



# **Die Bedeutung der Proteinphosphatase 2A und Proteinphosphatase 5 für die Signaltransduktion und Hypertrophie am Herzen**

Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
- Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Mara-Francine Dörner

geb. am 02.05.1991 in Leipzig

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Joachim Neumann
2. Prof. Dr. med. habil. Ralf Anton Benndorf
3. Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann

Halle (Saale), den 25.08.2022

## Abkürzungsverzeichnis

A	<i>spätdiastolische, aktive, linksventrikuläre Füllung</i>	Fn1	<i>Fibronektin 1</i>
A'	<i>spätdiastolische Mitralanulusgeschwindigkeit</i>	FS	<i>fractional shortening, Verkürzungsfraction</i>
AC	<i>Adenylylzyklase</i>	GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
AK	<i>Antikörper</i>	GPCR	<i>G-Protein-gekoppelter-Rezeptor</i>
Akt	<i>Proteinkinase B</i>	GRK	<i>G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase</i>
AMP	<i>Adenosin-monophosphat</i>	HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
ANF	<i>atrialer natriuretischer Faktor</i>	HDAC4	<i>Histon-Deacetylase 4</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance, Varianzanalyse</i>	HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
ANP	<i>atriales natriuretisches Peptid</i>	Hepes	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
AP	<i>Alkalische Phosphatase</i>	HF	<i>Herzfrequenz</i>
APS	<i>Ammoniumpersulfat</i>	HR	<i>Hazard Ratio</i>
AR	<i>Adrenozeptor</i>	HSF1	<i>Hitzeschockfaktor 1</i>
ASK-1	<i>Apoptose-signalregulierte Serin-/Threonin-Kinase -1</i>	HSP70	<i>Hitzeschockprotein 70</i>
ATP	<i>Adenosin-triphosphat</i>	HSP90	<i>Hitzeschockprotein 90</i>
AUC	<i>Area under the curve, Fläche unter der Kurve</i>	I.E.	<i>Internationale Einheiten</i>
BNP	<i>B-natriuretisches Peptid</i>	i.p.	<i>intraperitoneal</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>	I-1	<i>Inhibitor-1</i>
CaMKII	<i>Calmodulin-Kinase II</i>	I-2	<i>Inhibitor-2</i>
cAMP	<i>zyklisches Adenosinmonophosphat</i>	IFM	<i>Interfibrilläre Mitochondrien</i>
Col1 $\alpha$ 1	<i>Kollagen Typ 1, Subtyp <math>\alpha</math>1</i>	Ig	<i>Immunoglobulin</i>
Col3 $\alpha$ 1	<i>Kollagen Typ 3, Subtyp <math>\alpha</math>1</i>	IKK	<i>I<math>\kappa</math>B-Kinase-Komplex</i>
CS	<i>Citratsynthase</i>	IL-6	<i>Interleukin-6</i>
CSQ	<i>Calsequestrin</i>	Iso	<i>Isoprenalin</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonat</i>	IVCT	<i>isovolumetrische Kontraktionszeit</i>
dH <sub>2</sub> O	<i>destilliertes Wasser</i>	IVRT	<i>isovolumetrische Relaxationszeit</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfonsäureoxid</i>	IVSd	<i>enddiastolische Septumdicke</i>
DT	<i>doppelt transgen</i>	IVSs	<i>endsystolische Septumdicke</i>
DTT	<i>1,4-Dithiothreitol</i>	kb	<i>Kilobasen</i>
E	<i>frühdiastolische, passive, linksventrikuläre Füllung</i>	kDa	<i>Kilodalton</i>
E'	<i>frühdiastolische Mitralanulusgeschwindigkeit</i>	KG	<i>Körpergewicht</i>
EDTA	<i>Ethylendiamin-tetraessigsäure</i>	KWK	<i>Konzentrations-wirkungskurve</i>
EF	<i>Ejektionsfraktion</i>	LPS	<i>Gramnegatives Endotoxin</i>
EGTA	<i>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure</i>	LTCC	<i>spannungsabhängiger L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal</i>
EKG	<i>Elektrokardiogramm</i>	LVIDd	<i>linksventrikulärer innerer enddiastolischer Durchmesser</i>
ET	<i>Ejektionszeit</i>		
FA	<i>Formaldehyd</i>		
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>		

Abkürzungsverzeichnis

LVIDs	<i>linksventrikulärer innerer endsystolischer Durchmesser</i>	rpm	<i>rounds per minute, Umdrehungen pro Minute</i>
LVPWd	<i>linksventrikuläre enddiastolische Hinterwanddicke</i>	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
LVPWs	<i>linksventrikuläre endsystolische Hinterwanddicke</i>	RT	<i>Raumtemperatur</i>
mA	<i>Milliampere</i>	-RT	<i>Probe ohne Reverse Transkriptase</i>
MG	<i>Masson-Goldner</i>	RyR2	<i>Ryanodin-Rezeptor</i>
mN	<i>Millinewton</i>	SDS-PAGE	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese</i>
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure</i>	SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
MP	<i>Milchpulver</i>	Ser/Thr-PP	<i>Serin/Threonin-Proteinphosphatasen</i>
NCX	<i>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher</i>	SERCA	<i>SR-Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
NF-κB	<i>Nukleärer Faktor κB</i>	SR	<i>Sarkoplasmatisches Retikulum</i>
NPPA	<i>natriuretic peptide precursor A</i>	SSM	<i>Subsarkolemmale Mitochondrien</i>
NPPB	<i>natriuretic peptide precursor B</i>	t <sub>1</sub>	<i>Kontraktionszeit</i>
NTC	<i>No Template Control</i>	t <sub>2</sub>	<i>Relaxationszeit</i>
p38	<i>p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen</i>	TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung</i>	TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	TE	<i>Tris-EDTA</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>	TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin</i>
PLAX	<i>parasternale Längsachseneinstellung</i>	TnC	<i>Troponin C</i>
PLB	<i>Phospholamban</i>	TNF-α	<i>Tumornekrosefaktor α</i>
PP	<i>Proteinphosphatase</i>	TnI	<i>Troponin I</i>
PP1	<i>Proteinphosphatase 1</i>	TPR	<i>Tetratrikopeptid</i>
PP2A	<i>Proteinphosphatase 2A</i>	UE	<i>Untereinheit</i>
PP2B	<i>Proteinphosphatase 2B, Calcineurin</i>	UTR	<i>untranslatierter Bereich</i>
PP2C	<i>Proteinphosphatase 2C</i>	UV	<i>Ultraviolett</i>
PP3	<i>Proteinphosphatase 3</i>	V	<i>Volt</i>
PP4	<i>Proteinphosphatase 4</i>	V <sub>max</sub>	<i>Kontraktionsgeschwindigkeit</i>
PP5	<i>Proteinphosphatase 5</i>	V <sub>min</sub>	<i>Relaxationsgeschwindigkeit</i>
PP7	<i>Proteinphosphatase 7</i>	Vold	<i>linksventrikuläres enddiastolisches Volumen</i>
PPM	<i>Metallabhängige Proteinphosphatasen</i>	Vols	<i>linksventrikuläres endsystolisches Volumen</i>
PPP	<i>Phospho-Proteinphosphatasen</i>	VTI	<i>Geschwindigkeits-Zeit-Integral</i>
PTFE	<i>Polytetrafluorethylen</i>	α-MHC	<i>Myosin, schwere Kette 6, α-Isoform</i>
ROS	<i>reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies</i>	β-AR	<i>β-Adrenozeptor</i>
		β-MHC	<i>Myosin, schwere Kette 7, β-Isoform</i>

## Zusammenfassung

Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) und Proteinphosphatase 5 (PP5) sind von großer Bedeutung für die Signalwege im Rahmen von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen im Herzen. Aufgrund ihrer klinischen Relevanz für die kardiale Hypertrophie und der daran beteiligten Signaltransduktionswege wurde in der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell mit kardialer Co-Überexpression der katalytischen Untereinheit der PP2A und der PP5 etabliert (PP2AxPP5). Zusätzlich zur basalen Charakterisierung wurden Stressparameter wie Hypoxie,  $\beta$ -Adrenozeptor (AR) Stimulation und Alterung betrachtet. Die Überexpression beider Proteinphosphatasen (PP) bedingte eine ausgeprägte Hypertrophie mit massiv eingeschränkter linksventrikulärer Funktionalität (Ejektionsfraktion unter 40 %), die auch durch  $\beta$ -Adrenozeptor Stimulation nicht beeinflusst werden konnte. Weiterhin war nach  $\beta$ -Adrenozeptor Stimulation die Kontraktionskraft an isometrisch stimulierten linken Vorhöfen verringert, die Relaxations- und Kontraktionszeiten verlängert und die Phosphorylierung der regulatorischen Proteine Phospholamban (PLB) und Troponin I (TnI) herabgesetzt, was Rückschlüsse auf eine gestörte elektromechanische Kopplung zulässt. Die Stressbedingungen unter Hypoxie zeigten eine irreversible Kontraktilitätsstörung und einen Einfluss auf mögliche Apoptose-assoziierte Signalwege durch zeitabhängige verminderte Phosphorylierung der regulatorischen Proteine Proteinkinase B (Akt) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38-MAPK). Im Alter von 10 - 11 Monaten entwickelten die PP2AxPP5-Tiere eine histologisch (Masson-Goldner Färbung) und genetisch (Kollagen Typ 1 alpha 1, Kollagen Typ 3 alpha 1) nachgewiesene Fibrose, welche mit Kontraktions- und Relaxationsstörungen einherging. Die erhöhten, typischen Genmarker bestätigten eine Aktivierung von Entzündungssignalen (Tumornekrosefaktor alpha, Interleukin-6, Nukleärer Faktor kappa B) und eine kardiale Umstrukturierung, bedingt durch die hohe Belastung der Gewebe-Hypertrophie (alpha Isoform der Myosin schweren Kette 6, beta Isoform der Myosin schweren Kette 7, atriales natriuretisches Peptid, B-natriuretisches Peptid). Dies ging einher mit einer erhöhten Sterblichkeit der PP2AxPP5-Tiere.

Trotz ihres ausgeprägteren Phänotyps waren die Gen- und Proteinlevel der PP2A und PP5 in den PP2AxPP5-Tieren nicht höher als in den einfach transgenen Tieren. Ebenso war die PP1- und PP2A-Aktivität zwischen den PP2AxPP5-Tieren und einfach transgenen Tieren unverändert.

Die gemeinsame Überexpression der PP2A und PP5 im Mausmodell bewirkte durch ihr Eingreifen in bestimmte Signalwege eine Progredienz der Hypertrophie mit Fibrose, was letztlich zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz und vermehrter Sterblichkeit führte. Eine gegenseitige Regulation von PP2A und PP5 findet somit statt, was zu Veränderungen bestimmter Signalwege führen kann.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>IV</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Reversible Phosphorylierung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Proteinphosphatasen.....</b>	<b>1</b>
1.2.1 Serin/Threonin-Proteinphosphatasen.....	2
1.2.1.1 Proteinphosphatase 2A.....	3
1.2.1.2 Proteinphosphatase 5.....	4
<b>1.3 Elektromechanische Kopplung im Herzen .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Pathophysiologische Rolle der Ser/Thr-PP im Herzen .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>13</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Tierhaltung und Mauslinie .....</b>	<b>14</b>
3.1.1 Mauslinien.....	14
3.1.1.1 PP2A.....	14
3.1.1.2 PP5.....	15
3.1.1.3 PP2AxPP5.....	15
<b>3.2 Physiologische Methoden .....</b>	<b>15</b>
3.2.1 Narkose und Organentnahme .....	15
3.2.2 Verarbeitung von Blutproben.....	16
3.2.2.1 Plasma und Serum .....	16
3.2.3 Isometrische Kontraktionsversuche an isolierten Herzvorhöfen.....	16
3.2.3.1 Versuchsvorbereitung.....	16
3.2.3.2 Kontraktionsversuche mit Hypoxie und $\beta$ -AR Stimulation .....	17
3.2.3.3 Kontraktionsversuche mit Desensitivierung .....	18
3.2.3.4 Auswertung der Kontraktionsversuche am linken Vorhof .....	19
3.2.4 Echokardiographie .....	19
3.2.4.1 Vorbereitung.....	19
3.2.4.2 Zweidimensionale Echokardiographieaufnahme.....	20
3.2.4.3 Doppler-Echokardiographie .....	21
3.2.4.4 Intraperitoneale Injektion .....	22

<b>3.3</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.3.1	Homogenisierung von tierischem Gewebe .....	22
3.3.2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	23
3.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford .....	23
3.3.4	Gel-Elektrophorese .....	23
3.3.5	Western Blot und Ponceau-Färbung .....	24
3.3.6	Immunologische Identifizierung von Proteinen .....	24
3.3.7	Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität .....	25
3.3.7.1	Herstellung <sup>32</sup> P-markierter Phosphorylase a .....	25
3.3.7.2	Durchführung Proteinphosphatase Assay .....	26
<b>3.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.4.1	Isolierung von Mitochondrien aus Mausherzgewebe .....	26
3.4.2	Arbeiten mit RNA .....	27
3.4.2.1	RNA-Isolierung .....	27
3.4.2.2	Konzentrationsbestimmung der RNA .....	28
3.4.2.3	RNA-Qualitätsbestimmung mittels Elektrophorese .....	28
3.4.2.4	dsDNAse-Verdau und cDNA-Synthese .....	29
3.4.2.5	Real-Time Quantitative PCR (qPCR) .....	29
3.4.3	Arbeiten mit DNA .....	30
3.4.3.1	DNA-Isolierung .....	30
3.4.4	PCR .....	30
3.4.5	Agarosegelelektrophorese .....	31
<b>3.5</b>	<b>Immunologische Methoden</b> .....	<b>31</b>
3.5.1	Indirekte Immunofluoreszenz .....	31
3.5.2	Durchflusszytometrie (FACS) .....	32
3.5.2.1	Vorbereitung der Proben .....	32
3.5.2.2	Oberflächenfärbung .....	33
3.5.2.3	Messung .....	33
<b>3.6</b>	<b>Histologische Methoden</b> .....	<b>33</b>
3.6.1	Histologische Färbung der Herzen .....	33
<b>3.7</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Genotypisierung</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Phänotyp</b> .....	<b>35</b>
4.2.1	Kaplan-Meier-Überlebenswahrscheinlichkeit .....	35
4.2.2	Morphologische Parameter .....	37
4.2.3	Laborchemische Parameter .....	39
<b>4.3</b>	<b>Immunologische Parameter</b> .....	<b>40</b>
4.3.1	Kardiale Zellanalyse .....	40

4.3.2	T-Lymphozytendifferenzierung .....	41
4.3.3	Serum-Autoantikörper .....	42
<b>4.4</b>	<b>Histologie .....</b>	<b>44</b>
4.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	44
4.4.2	Masson-Goldner-Färbung .....	45
<b>4.5</b>	<b>Vorhofkontraktionen .....</b>	<b>46</b>
4.5.1	Einfluss der Hypoxie auf die Kontraktionskraft linker Vorhöfe.....	46
4.5.2	Einfluss der Hypoxie auf die Kontraktionszeiten und -geschwindigkeiten linker Vorhöfe.....	48
4.5.3	Einfluss der Hypoxie auf die Relaxationszeiten und -geschwindigkeiten linker Vorhöfe.....	50
4.5.3.1	Einfluss der Desensitivierung des $\beta$ -AR auf die Kontraktionskraft linker Vorhöfe .....	51
4.5.4	Frequenz rechter Vorhöfe .....	53
4.5.4.1	Einfluss der Hypoxie auf die Frequenz rechter Vorhöfe .....	53
<b>4.6</b>	<b>Herzfunktion in vivo .....</b>	<b>55</b>
4.6.1	Systolische linksventrikuläre Funktion .....	55
4.6.2	Gewebe-Doppler und diastolische Funktion .....	58
4.6.3	Gefäße.....	60
4.6.4	Altersabhängige Veränderungen.....	60
4.6.4.1	Altersabhängige Veränderungen der basalen Herzfunktion in vivo .....	60
4.6.4.2	Altersabhängige Veränderungen der Herzfunktion in vivo nach $\beta$ -AR Stimulation.....	62
<b>4.7</b>	<b>Kardiale Proteinexpression in Vorhof und Ventrikel .....</b>	<b>63</b>
4.7.1	Basale Expression kardialer Proteine im Ventrikel .....	63
4.7.1.1	$\beta$ -AR-abhängige Proteinphosphorylierung im Vorhof .....	63
4.7.1.2	Einfluss der Hypoxie auf die $\beta$ -AR-abhängige Proteinphosphorylierung im Vorhof.....	65
4.7.2	Expression der PP2A und PP5 in Ventrikel und Vorhof.....	66
<b>4.8</b>	<b>Kardiale Proteinexpression in isolierten Mitochondrien .....</b>	<b>67</b>
<b>4.9</b>	<b>Kardiale Transkription Herzinsuffizienz-assoziiertes Gene und Proteinphosphatasen.....</b>	<b>69</b>
4.9.1	Hypertrophie- und Herzinsuffizienzmarker.....	69
4.9.2	Entzündungsmarker .....	70
4.9.3	Fibrosemarker.....	71
4.9.4	Proteinphosphatasen .....	72
4.9.4.1	PP2A .....	72
4.9.4.2	PP5 .....	74
<b>4.10</b>	<b>Proteinphosphatase-Aktivität .....</b>	<b>75</b>

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
5.1	<b>Kardialer Phänotyp der transgenen Tiere.....</b>	<b>77</b>
5.2	<b>Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf die basale kardiale Funktionalität.....</b>	<b>78</b>
5.3	<b>Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf Stressfaktoren.....</b>	<b>84</b>
5.3.1	Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf $\beta$ -AR Stimulation .....	84
5.3.2	Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf Hypoxie .....	88
5.3.3	Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf Alterungsprozesse.....	90
5.4	<b>Einfluss und Bedeutung der kardialen Co-Überexpression von PP2A und PP5 auf die Gentranskription, Proteinexpression und Enzymaktivität der PP2A und PP5 .....</b>	<b>92</b>
5.5	<b>Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>122</b>
7.1	<b>Material.....</b>	<b>122</b>
7.2	<b>Geräte und Software .....</b>	<b>127</b>
7.3	<b>Berechnungen .....</b>	<b>129</b>
7.4	<b>Erklärung .....</b>	<b>130</b>
7.5	<b>Danksagung.....</b>	<b>131</b>
7.6	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>132</b>
7.7	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>133</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der reversiblen Proteinphosphorylierung.....	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der PP2A. ....	3
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der PP5.....	4
Abbildung 4:	Calcium-Homöostase in der Herzmuskelzelle unter basalen Bedingungen. ....	6
Abbildung 5:	Calcium-Homöostase in der Herzmuskelzelle nach $\beta$ -AR Stimulation.....	8
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der $\alpha$ -MHC-PP2A $\alpha$ -Expressionskassette. ....	15
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der $\alpha$ -MHC-PP5-Expressionskassette.....	15
Abbildung 8:	Versuchsapparatur für isometrische Kontraktionsmessungen an isolierten Vorhofpräparaten.....	17
Abbildung 9:	Versuchsaufbau der Kontraktionsversuche.....	18
Abbildung 10:	Versuchsaufbau der Desensitivierungsversuche.....	19
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Kontraktionsversuchsauswertung am linken Vorhof.....	19
Abbildung 12:	Vorbereitung für die Durchführung eines Herzultraschalls an einer Maus. ...	20
Abbildung 13:	Echokardiographieaufnahme der PLAX des linken Ventrikel im M-Mode. ....	21
Abbildung 14:	Repräsentative Darstellung der Herzultraschallmessung im Doppler- Mode. ....	22
Abbildung 15:	RNA-Qualitätsbestimmung mittels Elektrophorese und photometrischer Bestimmung.....	28
Abbildung 16:	Darstellung des qPCR-Programms zur Bestimmung der Transkription kardialer Gene mit anschließender Schmelzkurve .....	30
Abbildung 17:	Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte aus Schwanzspitzen- DNA zur Genotypisierung. ....	35
Abbildung 18:	Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von WT-, PP2A-, PP5- und PP2A $\alpha$ PP5-Tieren.....	36
Abbildung 19:	Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von weiblichen und männlichen PP2A $\alpha$ PP5-Tieren.....	36
Abbildung 20:	Vergleich von Herz- und Körpergewichten der jungen und alten Tiere des jeweiligen Genotyps.....	38
Abbildung 21:	Darstellung charakteristischer Mausherzen des jeweiligen Genotyps im Alter von 3 - 4 Monaten und 10 - 11 Monaten. ....	39
Abbildung 22:	Zellsubpopulationen im Herzen von WT- und PP2A-Tieren .....	41
Abbildung 23:	Prozentuale Häufigkeit von CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD8 <sup>+</sup> T- Lymphozyten in mediastinalen Lymphknoten (ML), subiliakalen Lymphknoten (SL) und Milz .....	42

Abbildung 24: Intensität an Serum-Autoantikörpern in jungen und alten WT- und PP2A-Tieren. ....	43
Abbildung 25: Hämatoxylin-Eosin Färbung der Herzschnitte von 3 - 4 Monate und 10 - 11 Monate alten Tieren. ....	44
Abbildung 26: Masson-Goldner-Färbung der Herzschnitte von 3 - 4 Monate und 10 - 11 Monate alten Tieren. ....	45
Abbildung 27: Darstellung der Kontraktionskräfte linker Vorhöfe von Tieren während einer kumulativen KWK von Isoprenalin.....	47
Abbildung 28: Darstellung der Kontraktionszeiten linker Vorhöfe von Tieren während einer kumulativen KWK von Isoprenalin.....	49
Abbildung 29: Darstellung der Relaxationszeiten linker Vorhöfe von Tieren während einer kumulativen KWK von Isoprenalin.....	51
Abbildung 30: Desensitivierung des $\beta_1$ -AR mittels Iso-KWK an linken Vorhöfen von WT und PP2A-TG .....	52
Abbildung 31: Darstellung der Schlagfrequenzen rechter Vorhöfe während einer kumulativen KWK von Isoprenalin .....	54
Abbildung 32: Darstellung der Ejektionsfraktion und Herzfrequenz aus der M-Mode Echokardiographie mit Originalaufnahme. ....	56
Abbildung 33: Darstellung der linksventrikulären Dimensionen junger Tiere bestimmt mit M-Mode Ultraschall.....	57
Abbildung 34: Auswertung der Doppler-Echokardiographie von Tieren im Alter von 3 - 4 Monaten basal und nach Isoprenalingabe.....	59
Abbildung 35: Darstellung der Flüsse durch die Arteria pulmonalis und Aorta ascendens..	60
Abbildung 36: Kardiale Proteinexpression in Ventrikeln von 3 - 4 Monate und 10 - 11 Monate alten Mäusen. ....	63
Abbildung 37: Quantitative Bestimmung der Phosphorylierung regulatorischer Proteine in Isoprenalin-behandelten linken Vorhöfen von 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Mäusen .....	64
Abbildung 38: Quantitative Bestimmung der Proteinphosphorylierung nach 30-minütiger Hypoxie in Vorhöfen von 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Mäusen. ....	65
Abbildung 39: Kardiale Proteinexpression der katalytischen UE von PP2A (PP2Ac) und PP5 in Ventrikeln und linken Vorhöfen.....	67
Abbildung 40: Expression von kardialen Proteinen in isolierten subsarkolemmalen (SSM) und interfibrillären (IFM) Mitochondrien.....	68
Abbildung 41: $2^{-\Delta CT}$ -Darstellung der kardialen Expression von Hypertrophiemarkern.....	70
Abbildung 42: $2^{-\Delta CT}$ -Darstellung der kardialen Expression von Entzündungsmarkern .....	71
Abbildung 43: $2^{-\Delta CT}$ -Darstellung der kardialen Expression von Fibrosemarkern .....	72

Abbildung 44:  $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Darstellung der kardialen Gentranskription von PP2A ..... 73

Abbildung 45:  $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Darstellung der kardialen Gentranskription von PP5..... 74

Abbildung 46: Darstellung der Aktivität der PP1 und PP2A, sowie der Gesamt PP-  
Aktivität in Ventrikeln ..... 76

Abbildung 47: Schema zur Darstellung des Einflusses der PP2A und PP5 auf diverse  
Signalwege ..... 99

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Substanzen und Mengen zur Herstellung von SDS-Trenn- und - Sammelgelen .....	23
Tabelle 2:	Nachzuweisende Proteine und Bedingungen zur immunologischen Identifizierung in Mausherzgewebe .....	25
Tabelle 3:	qPCR-Programm zur Bestimmung der Transkription kardialer Gene.....	29
Tabelle 4:	PCR-Programm für die Amplifizierung der PP2A- und PP5-Sequenz.....	30
Tabelle 5:	Organgewichte aller Tiere .....	39
Tabelle 6:	Plasmakonzentrationen an Natrium, Kreatinin und Harnstoff in jungen und alten Tieren. ....	40
Tabelle 7:	Altersabhängiger Vergleich basaler Echokardiographie-Parameter.....	60
Tabelle 8:	Altersabhängiger Vergleich der Echokardiographie Parameter nach $\beta$ -AR Stimulation. ....	62
Tabelle 9:	Oligonukleotide (PCR- und qPCR-Primer).....	122
Tabelle 10:	Lösungen, Substanzen und Chemikalien .....	123
Tabelle 11:	Materialien .....	124
Tabelle 12:	Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung.....	125
Tabelle 13:	Verwendete Marker.....	126
Tabelle 14:	Primärantikörper.....	126
Tabelle 15:	Sekundärantikörper.....	127

# 1 Einleitung

## 1.1 Reversible Phosphorylierung

Die herausragende, physiologische Bedeutung der reversiblen Phosphorylierung wurde von Edmond Fischer und Edwin Krebs in den 1950er Jahren erkannt (Cohen 1989), welche 1992 dafür den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten. Den Grundstein dieser Entdeckung legten bereits Carl Cori und Getry Cori in den 1930er Jahren durch Untersuchungen der beteiligten Enzyme in der Glykogenolyse. Anhand von zwei Formen der Glykogenphosphorylase, damals a und b genannt, wurde die Umwandlung zwischen beiden Formen durch ein sogenanntes PR-(prosthetic group removing)-Enzym vermutet (Cori und Green 1943). Man konnte sich zu diesem Zeitpunkt die Entstehung der beiden Formen und die Rolle von 5'AMP, welches die Aktivität der jeweiligen Phosphorylase bestimmte, in diesem Zusammenhang nicht vollständig erklären. Später wurde von Edmond Fischer und Edwin Krebs die Aktivität von Proteinkinasen untersucht und dabei die Umwandlung von Phosphorylase b in Phosphorylase a in Anwesenheit von Magnesiumkationen, Adenosin-triphosphat (ATP) und einer sogenannten Phosphorylase-Kinase beschrieben. Die umgekehrte Reaktion wurde nach ihren Ergebnissen durch ein Phosphat-Releasing Enzym, heute als Proteinphosphatase 1 bekannt, katalysiert (Fischer und Krebs 1955; Krebs und Fischer 1956; Krebs et al. 1958). An diese ersten Erkenntnisse schließen sich bis heute Untersuchungen zur Bedeutung von Proteinphosphorylierungen im menschlichen Organismus, sowie von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen (PP) an.

## 1.2 Proteinphosphatasen

Reversible Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Proteinen gehören zu den lebensnotwendigen, posttranslationalen Modifikationen in der eukaryotischen Zelle (Cohen 2000; 2002; DePaoli-Roach et al. 1994). Die von Phosphatasen regulierten reversiblen Dephosphorylierungen basieren auf der Hydrolyse von Phosphorsäureestern zu Phosphatresten und Alkoholen. Die umgekehrte Reaktion, die Phosphorylierung eines Alkohols unter Abspaltung von Wasser, wird von Kinasen katalysiert. Im eukaryotischen Stoffwechsel ist die Phosphorylierung der Proteine an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin, sowie z.B. auch Histidin durch Proteinkinasen und die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen von Bedeutung (Chen et al. 2017). Regulatorische Proteine können durch die genannte Phosphorylierung oder Dephosphorylierung an ihren Aminosäuren in ihrer Aktivität modifiziert werden. Dieser Vorgang stellt einen zentralen Mechanismus in der Anpassung der metabolischen und zellulären Prozesse des Organismus auf die Zellentwicklung, Apoptose, Gentranskription, Protein-Protein-Interaktionen, Kontraktilität

sowie auf äußere Veränderungen wie pH-Wert, UV-Strahlung, osmotischer und oxidativer Stress dar (Abbildung 1; Cohen 1989; 2002; Cseh et al. 2014; Kishi et al. 2001; Luo et al. 2001; Rahimi und Costello 2015; Sun und Wang 2012). Die Entgleisung physiologischer Phosphorylierungszustände von Proteinen kann vermehrt pathophysiologische Erkrankungen hervorrufen (Boknik et al. 2001; Bollmann et al. 2020; Gergs et al. 2019b; Götz et al. 1998; Martin et al. 2013; Neumann et al. 1997; 2021). Proteinphosphatasen lassen sich unter anderem in Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (Ser/Thr-PP), Tyrosin-Proteinphosphatasen und dualspezifische Proteinphosphatasen unterscheiden (Cohen 1989). Ser/Thr-PP kommen in Kardiomyozyten des Menschen vor und werden aufgrund ihrer großen Bedeutung im Herzen im Folgenden näher betrachtet (Herzig und Neumann 2000; Lubbers und Mohler 2016; Weber et al. 2015).

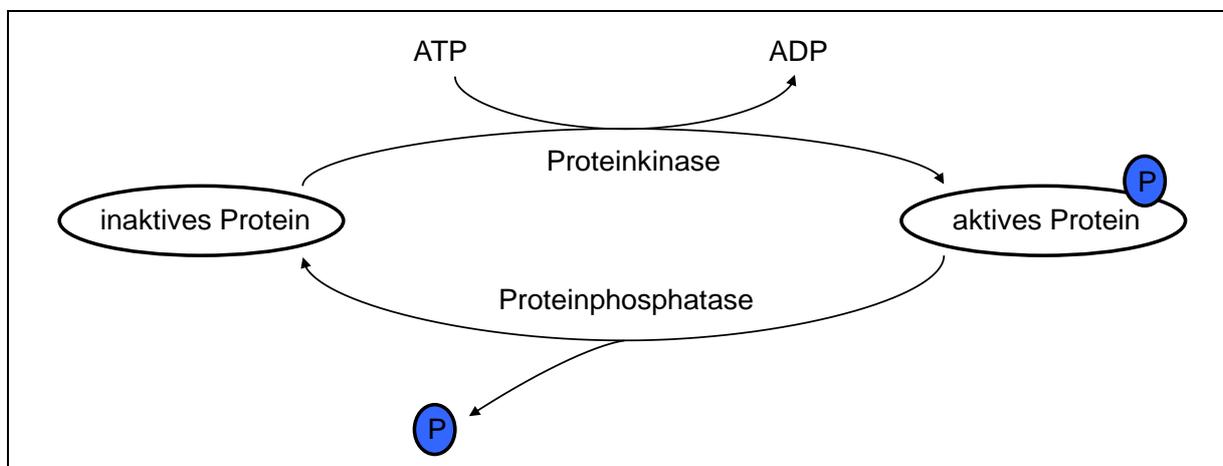


Abbildung 1: Schematische Darstellung der reversiblen Proteinphosphorylierung

### 1.2.1 Serin/Threonin-Proteinphosphatasen

Ser/Thr-PP können neben den elektrophysiologischen Vorgängen, den Calciumionen-Haushalt, die Kontraktilität und die Zell-Zell-Kommunikation im Herzen beeinflussen (Heijman et al. 2013). Sie lassen sich in die drei Familien der Phospho-PP (PPP), metallabhängigen Proteinphosphatasen (PPM) und aspartat-basierten Phosphatasen unterteilen (Shi 2009). Die PPM, wie die PP2C, werden Magnesium-Kationen-abhängig aktiviert und besitzen, im Gegensatz zu den PPP, keine regulatorische Untereinheit sondern einheitliche Domänen und konservierte Sequenzbereiche, die die Substratspezifität steuern (Shi 2009). Die PPPs werden in die PP1, PP2A, PP2B (Calcineurin), PP3, PP4, PP5 und PP7 unterteilt. Strukturell betrachtet haben sie drei konservierte Bereiche innerhalb ihrer katalytischen Kerndomäne gemeinsam (Shi 2009). Nach ihrer IUPAC Nomenklatur (International Union of Pure and Applied Chemistry) werden sie in die Enzymklasse der Hydrolasen unter 3.1.3.16 eingeteilt. Ser/Thr-PP spielen vor allem bei der Aktivierung und Deaktivierung von regulatorischen Proteinen im Herzen und in der elektromechanischen Kopplung der Herzmuskelkontraktion eine große Rolle. Rund 90 % aller Phosphatase-Aktivität

im Herzen wird durch die PP1 und PP2A reguliert (Cohen 1989; Herzig und Neumann 2000; MacDougall et al. 1991).

### 1.2.1.1 Proteinphosphatase 2A

Der spezielle Aufbau der Ser/Thr-PP ermöglicht die Vielfältigkeit dieser Enzyme in ihrer Lokalität und Funktion (DePaoli-Roach et al. 1994). Das Kernenzym der PP2A ist wahrscheinlich ein Dimer, welches aus einer 36 kDa großen, katalytischen C-Untereinheit (PP2Ac) und einer 65 kDa großen, gerüstbildenden A-Untereinheit (PR65) besteht. Zusätzlich lassen sich im Kernenzym vier verschiedene Formen einer weiteren, variablen regulatorischen B-Untereinheit in B, B', B'' und B''' unterscheiden (Abbildung 2; Janssens und Goris 2001; Lubbers und Mohler 2016; Reynhout und Janssens 2019; Wlodarchak und Xing 2016). Diese werden von verschiedenen Genen kodiert und bilden unterschiedliche Splicevarianten. Die A-, B- und C-Untereinheit bilden zusammen das Holoenzym der PP2A. Die B-Untereinheiten sind zwischen 65 und 108 kDa groß, werden gewebespezifisch exprimiert und bestimmen die Lokalisation und Substratspezifität des Holoenzym. Ihre Assoziation mit dem Dimer ist weitestgehend unklar (Cundell et al. 2016; Hertz et al. 2016; Lambrecht et al. 2013). Die katalytische Untereinheit der PP2A kommt ubiquitär vor und wird vor allem im Herzen und Gehirn verstärkt exprimiert (Khew-Goodall et al. 1991; Khew-Goodall und Hemmings 1988; Stone et al. 1987). Ihre zwei Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  besitzen zwar nahezu die gleiche Primärsequenz, jedoch wird die PP2A $\alpha$  in etwa 10mal häufiger auf mRNA-Ebene exprimiert (Arino et al. 1988; Green et al. 1987; Khew-Goodall und Hemmings 1988; Stone et al. 1987). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Proteinexpression kann die höhere Aktivität des PP2A $\alpha$ -Genpromotors sein (Janssens und Goris 2001; Khew-Goodall et al. 1991; Lubbers und Mohler 2016).

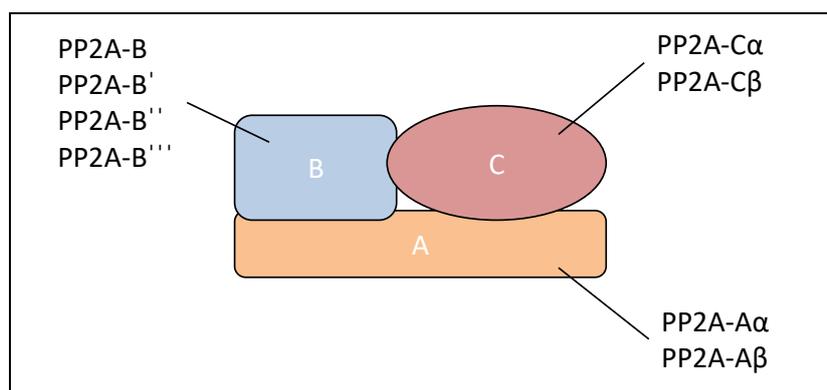


Abbildung 2: Schematische Darstellung der PP2A. Das Kernenzym bestehend aus der A- und C-Untereinheit interagiert mit der variablen B-Untereinheit um ein Holoenzym zu bilden. Die B-Untereinheit besteht aus vier Familien, welche wiederum aus zwei bis fünf Isoformen bestehen und für die verschiedenen Gene kodieren.

Das intrazelluläre Vorkommen der PP2A konnte sowohl im Zytosol als auch im Zellkern und in der Plasmamembran nachgewiesen werden und ist unter anderem von der Interaktion des Dimers mit der regulatorischen Untereinheit abhängig (Jakes et al. 1986;

Seshacharyulu et al. 2013; Turowski et al. 1995). Ihre Bedeutung im Herzen ist auf den Einfluss auf diverse Ionenkanäle, regulatorische Proteine und Transporter zurückzuführen. Neben Membranproteinen reguliert sie Proteine des kontraktile Apparats, der Calciumionen-Regulation, des Zellmetabolismus, der Genregulation und von verschiedenen Signalwegen. Diese Vielfältigkeit kommt durch die diversen Strukturen der PP2A-Holoenzyme, bedingt durch die variable B-Untereinheit mit ihren verschiedenen Splicevarianten zustande, welche größtenteils im kardialen Gewebe vorkommen (Lubbers und Mohler 2016). Die wichtigsten membranständigen Substrate der PP2A im Herzen sind der spannungabhängige L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal (LTCC), der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX), die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und Connexin 43 (Lubbers und Mohler 2016). Im kontraktilem Apparat kann die PP2A neben Troponin I (Tnl) auch das Myosin-bindende Protein C dephosphorylieren (Kuster et al. 2012; Solaro und Kobayashi 2011). Weiterhin reguliert die PP2A die Speicherung von Ca<sup>2+</sup> während der Diastole durch ihren Einfluss auf Phospholamban (PLB) und die kardiale Form des Ryanodin-Rezeptors (RyR2) (Little et al. 2015; MacDougall et al. 1991). Die Hemmung der Phosphatase-Aktivität durch aus der Natur gewonnene Inhibitoren, wie z.B. Okadasäure, kann die Dephosphorylierung von regulatorischen Proteinen aufheben (Fernández et al. 2002; Neumann et al. 1993; Xing et al. 2006).

### 1.2.1.2 Proteinphosphatase 5

Im Gegensatz zur PP2A wird die PP5 in Eukaryoten von nur einem Gen kodiert und besteht aus einem einzelnen Polypeptid, in welchem die regulatorische und katalytische Domäne lokalisiert sind (Abbildung 3; Neumann et al. 2021; Shi 2009; Swingle et al. 2004). Sie wird ubiquitär mit einem hohen Vorkommen im Herz, Gehirn und in Neuronen exprimiert und kommt in drei Isoformen vor (Chen et al. 1994; 2017). Die normale Form ist 58 kDa groß (Becker et al. 1994; Chen et al. 1994; Chinkers 1994). Am N-Terminus besitzt die PP5 eine TPR-(Tetratrikopeptid)-Domäne, welche ein regulatorisches Motiv für Protein-Protein-Interaktionen darstellt (Blatch und Lässle 1999; Lamb et al. 1995).

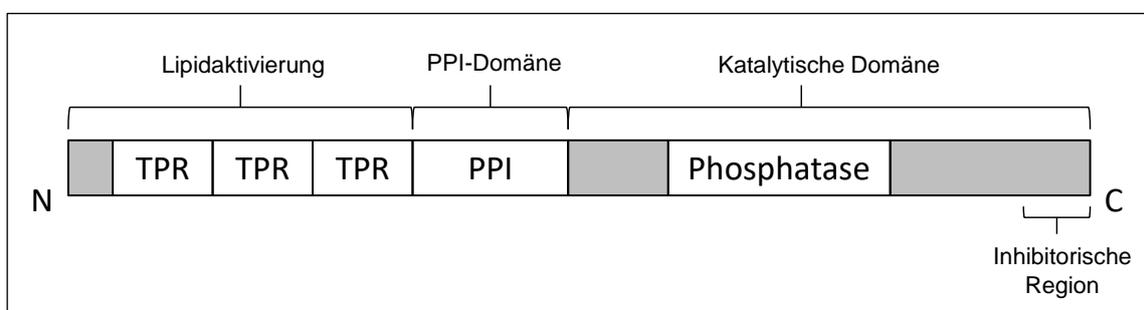


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PP5. Die TPR-Domäne an der N-terminalen Region der PP5 ist für die Lipidaktivierung und HSP90-Bindung verantwortlich. Die Phosphatase-Domäne befindet sich am C-Terminus. TPR...Tetratrikopeptid-Domäne; PPI...Peptidyl-prolyl cis trans-Isomerase Domäne; N...N-Terminus; C...C-Terminus

Die Aminosäuresequenz der PP5 unterscheidet sich mit 40 % Übereinstimmung deutlich zur Sequenz der PP2A und ist einer anderen Subfamilie der PPP zuzuordnen (Becker et al. 1994; Chen et al. 1994; Shi 2009). Unter normalen Bedingungen besitzt die PP5 eine geringe Phosphatase-Aktivität, da diese durch die Interaktion der TPR-Domäne mit einer inhibitorischen Region in der katalytischen Domäne selbst gehemmt wird (Hinds und Sanchez 2008). Man spricht hier von einer Autoinhibition innerhalb des Polypeptids zwischen dem N- und dem C-Terminus (Shi 2009). Die PP5 ist Bestandteil des Steroid-Rezeptor-HSP90-Heterokomplexes und ist damit in die Expression des Glukokortikoid- und Estrogen-Rezeptors involviert (Hinds und Sanchez 2008; Silverstein et al. 1997). Das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) kann mit der TPR-Domäne in vivo interagieren und resultierend die Phosphatase-Aktivität erhöhen (Davies et al. 2005; Ramsey et al. 2000). Durch die Interaktion der TPR-Domäne mit HSP90 und die negative Regulation des Hitzeschockfaktor 1 (HSF1), welcher als Transkriptionsfaktor u.a. HSP70 und HSP90 steuert, wird ein Einfluss der PP5 auf die Glukokortikoid-Rezeptor vermittelte Wirkung vermutet (Conde et al. 2005; Shi 2009). Weiterhin kann die Phosphatase-Aktivität durch die Bindung der TPR-Domäne mit langen mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure gesteigert werden (Golden et al. 2008; Skinner et al. 1997; Yang et al. 2005). Die PP5 beeinflusst ebenso Zellapoptoseprozesse, indem sie die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Aktivierung von ASK-1 (Apoptose-signalregulierte Serin-/Threonin-Kinase-1) hemmt und damit den ASK1-abhängigen Signalweg der Zellapoptose unterbindet (Morita et al. 2001). Die subzelluläre Verteilung der PP5 konzentriert sich vor allem auf den Zellkern und das Zytoplasma (Chen et al. 1994). Weiterhin lassen sich Rückschlüsse auf ein mögliches Auftreten in der Plasmamembran aufgrund der Interaktionen mit ANF-Rezeptoren und Komplexen mit HSP90 und Glukokortikoid-Rezeptoren ziehen (Skinner et al. 1997). Die Phosphatase-Aktivität der PP5 kann, ebenso wie die der PP2A, durch Okadasäure inhibiert werden (Chen et al. 1994; Neumann et al. 1993). Die Hemmwirkung der PP5 durch Microcystin ist geringer als die Hemmung der PP2A (Chen et al. 1994). Ein wichtiger Angriffspunkt der PP5 ist die N2B-Domäne des Titins im kontraktilen Apparat des Herzens. Das Protein Titin ist für die Elastizität der Sarkomere verantwortlich. Bei einer vorhandenen Herzinsuffizienz geht die Elastizität der Myofilamente aufgrund der Dephosphorylierung von Titin durch eine erhöhte Aktivität der PP5 verloren (Kötter et al. 2013; Krysiak et al. 2018; Hamdani et al. 2013).

### **1.3 Elektromechanische Kopplung im Herzen**

Für die Aufrechterhaltung aller Prozesse der elektromechanischen Kopplung im Herzen spielt der Calciumionen-Haushalt eine übergeordnete Rolle (Chien et al. 2003). Bei Depolarisation der Zellmembran durch äußere Stimuli strömt Ca<sup>2+</sup> über die Öffnung des spannungabhängigen L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanals in das Zytoplasma der Herzmuskelzelle. Der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal ist ein

spannungsabhängiger, transmembranärer Ionenkanal, welcher u.a. im Sarkolemma lokalisiert ist. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg im Zytosol bewirkt einen zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Zytosol über den RyR2 oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung dient der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C (TnC) und bewirkt mittels ATP eine Kontraktion an den Myofilamenten. Nach erfolgter Kontraktion dissoziieren in der Diastole die  $\text{Ca}^{2+}$  von TnC ab und werden über die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), den NCX, die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase oder den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter aus dem Zytosol gebracht. Ca. 70 % der vorher zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  werden mittels SERCA in das SR gebracht und für die nächste Kontraktion gespeichert. Sie werden dabei an Calsequestrin (CSQ) gebunden, welches bei einer folgenden Kontraktion mit dem RyR2 über Proteine interagiert, um  $\text{Ca}^{2+}$  ins Zytosol freizusetzen. CSQ dient als Bindeprotein für  $\text{Ca}^{2+}$  im SR, um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während der Diastole durch SERCA aufrecht zu erhalten und als Speicher für den Bedarf hoher Mengen  $\text{Ca}^{2+}$  während der Systole (Györke et al. 2009; Györke und Terentyev 2008; Rossi et al. 2020). Die Aktivität von SERCA und infolgedessen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins SR werden von PLB reguliert. Unter basalen Bedingungen liegen die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bei  $10^{-7}$  mol/l. Im Gegensatz dazu herrschen im Extrazellulärraum  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von  $10^{-3}$  mol/l (Goodman 2018; Mutschler et al. 2013). Abbildung 4 zeigt den schematischen Ablauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulierung im Herzen (Bers 2002; Bodi et al. 2005; duBell und Rogers 2004; Haghghi et al. 2014; MacLennan und Kranias 2003; Ramirez-Correa et al. 2010; Zhihao et al. 2020).

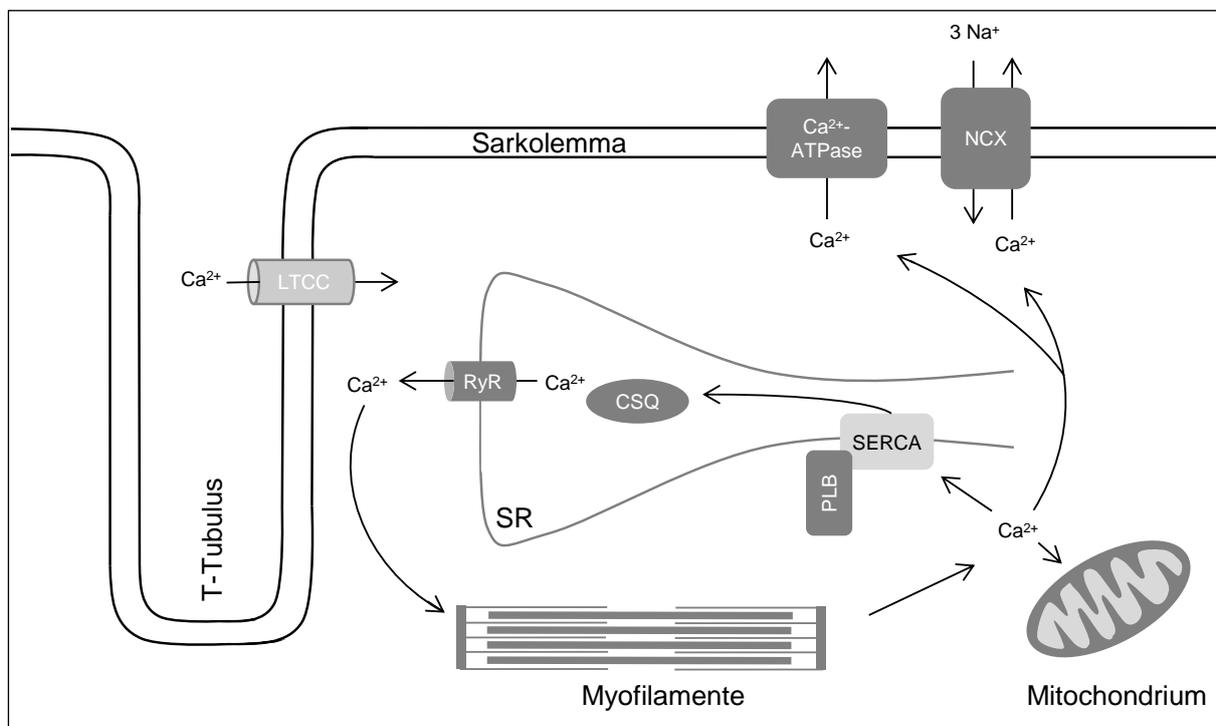


Abbildung 4: Calciumionen-Homöostase in der Herzmuskelzelle unter basalen Bedingungen. LTCC... L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal; NCX... Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher; SERCA... Sarkoplasmatisches Retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase; PLB... Phospholamban; RyR... Ryanodin-Rezeptor; TnC... Troponin I; CSQ... Calsequestrin; SR... Sarkoplasmatisches Retikulum

Der Calciumionen-Haushalt in der Herzmuskelzelle wird durch viele regulatorische Proteine aufrechterhalten. Sie können durch Dephosphorylierungen und Phosphorylierungen in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Phosphorylierungen mehrerer Targets bewirken in diesem Zyklus eine Erhöhung der Kontraktionskraft und -frequenz (Feldman und Gros 2007). Bei Eintritt der Aktivierung des  $\beta_1$ -Adrenozeptors ( $\beta$ -AR), durch z.B. endogene Neurotransmitter oder Isoprenalin, wird über ein  $G_s$ -Protein des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors (GPCR) die Aktivität der Adenylylzyklase (AC) gesteigert (Abbildung 5). Infolgedessen kommt es zu einer vermehrten Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem second messenger, welcher die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA kurbelt durch Phosphorylierung der regulatorischen Proteine den  $Ca^{2+}$ -Stoffwechsel in der Herzmuskelzelle an (Abbildung 5). Sie phosphoryliert u.a. den LTCC, PLB an Ser16, den RyR2 an Ser2808, TnC und TnI an Ser23/24. Die Phosphorylierung des LTCC bewirkt durch dessen Öffnung einen vermehrten  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle (Kamp und Hell 2000). Über Phosphorylierung des RyR2 gelangen weitere  $Ca^{2+}$  in das Zytosol und erhöhen die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel. Die erhöhte  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zytosol dient der Verstärkung der Kontraktionskraft in der Systole durch Querbrückenaktivierung der Myofibrillen über TnC. Durch Phosphorylierung von TnI an Serin-23 und Serin-24 wird die Affinität von TnC für  $Ca^{2+}$  über eine Desensitivierung der Myofilamente gegenüber  $Ca^{2+}$  gesenkt und die Relaxationszeit beschleunigt (Bers 2002; Solaro 2011). Während der Diastole bewirkt die Phosphorylierung von PLB an den Aminosäuren Serin-16 und Threonin-17 eine Enthemmung von SERCA und folglich einen erhöhten  $Ca^{2+}$ -Einstrom in das SR um die zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Spiegel zu senken und eine Relaxation zu ermöglichen, was als positive Lusitropie bezeichnet wird (Hamstra et al. 2020; MacLennan und Kranias 2003). Die Phosphorylierung von PLB an Serin-16 erfolgt durch die PKA. Die Phosphorylierung am Threonin-17 wird von der Calmodulin-Kinase II (CaMKII) oder von der Proteinkinase B (Akt) reguliert. Diese wird nach  $\beta$ -AR Stimulation neben der PKA durch eine erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration ebenfalls phosphoryliert und aktiviert (Kockskamper und Pieske 2006; O'Brien et al. 2015). Die vermehrte Speicherung von  $Ca^{2+}$  im SR dient der Zelle zur Aufbringung einer erhöhten Kontraktionskraft im Zuge der Anpassung an die gesteigerte Stimulation des  $\beta$ -AR (positive Inotropie). Die PKA- und CaMKII-abhängige Phosphorylierung von PLB stellt den Hauptmechanismus der positiven Lusitropie und Inotropie im Herzen dar (Hamstra et al. 2020; Lohse et al. 2003; Mattiazzi et al. 2005; Simmerman und Jones 1998). Die vermehrten Phosphorylierungen an regulatorischen Proteinen können durch PP gegenreguliert werden und die Proteine wieder in ihre dephosphorylierte Form zurückbringen, um die basale Inotropie zu erreichen (Bers 2002).

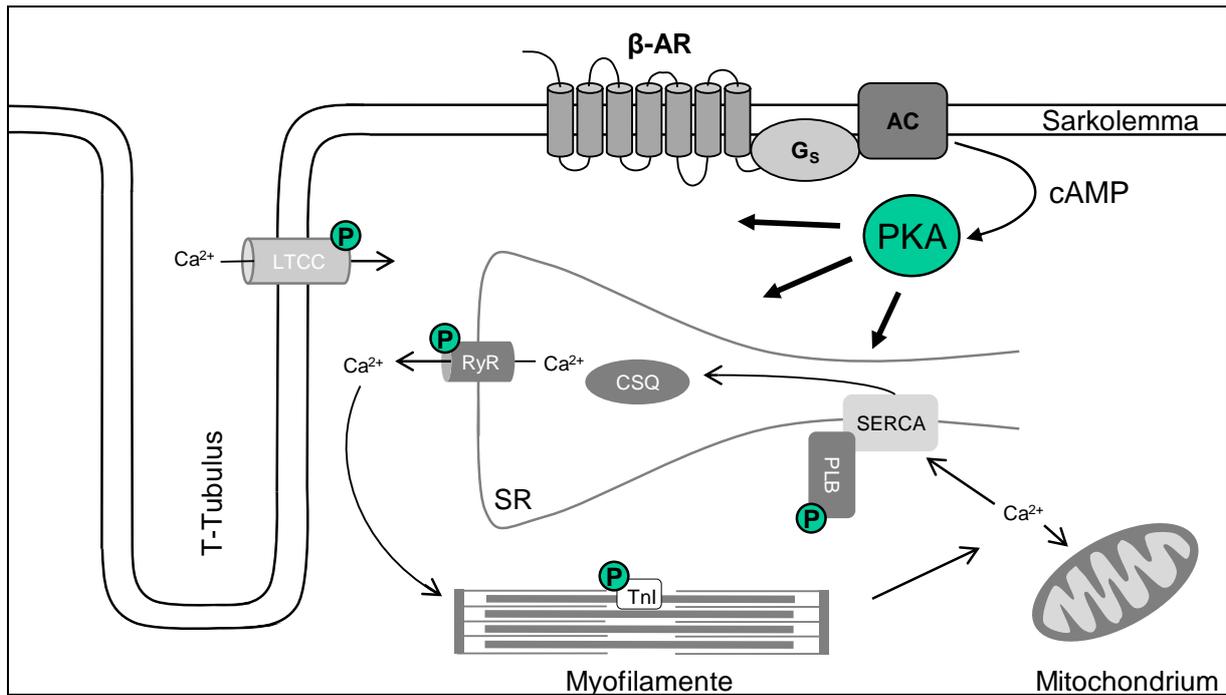


Abbildung 5: Calciumionen-Homöostase in der Herzmuskelzelle nach  $\beta$ -AR Stimulation. LTCC... L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal; NCX...  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; SERCA... Sarkoplasmatisches Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase; PLB... Phospholamban; RyR... Ryanodin-Rezeptor; TnI... Troponin I;  $G_s$ ... stimulatorisches G-Protein; AC... Adenylcyclase; cAMP... zyklisches AMP; PKA... Proteinkinase A; CSQ... Calsequestrin;  $\beta$ -AR...  $\beta$ -Adrenozeptor; SR... sarkoplasmatisches Retikulum, P... mögliche Phosphorylierungsstellen

## 1.4 Pathophysiologische Rolle der Ser/Thr-PP im Herzen

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Die 1-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 50 % (Virani et al. 2020). Ihre Prävalenz und Inzidenz sind stark altersabhängig: Während bei den 65 - 69 jährigen Menschen im Durchschnitt 6,9 % erkrankt sind, betrifft es bei den 80 - 84 jährigen Menschen 24,3 % und bei den über 95 jährigen Menschen sogar 47,2 % (Arzneimittelkommission Der Deutschen Apotheker (AMK) et al. 2019; Zipes 2019). Die Herzinsuffizienz lässt sich in verschiedene Bereiche klassifizieren, wie in die linke, rechte oder globale Herzinsuffizienz, und in die akute und chronische Herzinsuffizienz. Mit diesen Klassifizierungen gehen verschiedene Formen des Schweregrads einher, die durch die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) definiert werden. Man unterscheidet in die erhaltene EF (> 50 %), die geringgradig eingeschränkte EF (40 - 49 %) und die reduzierte EF (< 40 %). Die Ursachen einer Herzinsuffizienz sind multimodal. Sie ist fast immer die Spätfolge von vorangegangenen kardialen Erkrankungen, wie z.B. einer Koronaren Herzerkrankung oder Hypertonie. Im Krankheitsverlauf führen eine Zunahme des Zellvolumens (Hypertrophie) und ein erhöhter Zellverlust von Kardiomyozyten (Apoptose) zu einer Verringerung des kontraktiven Herzmuskelgewebes (Arzneimittelkommission Der Deutschen Apotheker (AMK) et al. 2019; Zipes 2019). Es kann im Krankheitsverlauf auch eine zelluläre Umstrukturierung in Form einer Fibrose auftreten (Nattel et al. 2007).

Unter anderem liegt der Herzinsuffizienz eine Störung der in Kapitel 1.3 beschriebenen elektromechanischen Kopplung in der Herzmuskelzelle durch Abweichungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts zugrunde (Gorski et al. 2015; Lompré et al. 2010). Die Dysbalancen gehen mit einer zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, eines gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Uptakes im SR und einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck einher. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung im Zytosol ist begründet durch eine erhöhte PKA-abhängige Phosphorylierung, was einen vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den LTCC bewirkt, sowie die gestörte Funktion des NCX (Schröder et al. 1998; Sipido et al. 2002). Die Dysfunktion von SERCA, basierend auf einer verminderten Aktivität sowie verringerter RNA- und Proteinlevel, ist die Hauptursache der gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme im SR (Hasenfuss et al. 1994; Kiss et al. 1995; Zhang et al. 2002; Zhihao et al. 2020). Damit einher geht eine typische verminderte Phosphorylierung von PLB bei Herzinsuffizienz (Huang et al. 1999; Schwinger et al. 1999). Beides führt zu einer Verlängerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in der Diastole und einer erhöhten enddiastolischen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Ein vermehrter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR während der Diastole kann durch die gestörte Taktung des RyR2 entstehen (Terentyev und Hamilton 2016). Obwohl die Expression des RyR2-Rezeptors selbst unverändert ist, wurde bei einer Herzinsuffizienz auch eine Hyperphosphorylierung des Rezeptors an einer Kanal-stabilisierenden Bindungsstelle beschrieben (Hain et al. 1995; Marx et al. 2000; Sainte Beuve et al. 1997). Eine weitere Ursache für eine Dysfunktion des RyR2 kann auch die CaMKII-abhängig erhöhte Phosphorylierung des Rezeptors an Ser2008 und Ser2814 bei Herzinsuffizienz sein (Dobrev und Wehrens 2014). Die Störungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts bei der Herzinsuffizienz bewirken eine nahezu gleichbleibende zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole und Diastole, was eine ausgeprägte Kontraktionsstörung während der Systole und eine Relaxationsstörung während der Diastole zur Folge hat. Der beschriebene Pathomechanismus weist darauf hin, dass die Phosphorylierungen der betroffenen regulatorischen Proteine inkl. einer möglichen Dephosphorylierung durch PP eine entscheidende Funktion in der Entwicklung einer Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz haben können.

Im nicht insuffizienten Herzen wird die Phosphorylierung und Dephosphorylierung über sogenannte Feedback Loops z.B. mittels Inhibitoren reguliert. Inhibitor-1 (I-1) und Inhibitor-2 (I-2) sind Inhibitoren der PP1 und können mittels Phosphorylierung durch unterschiedliche Kinasen aktiviert, aber auch deaktiviert werden (El-Armouche et al. 2003; Li et al. 2007; Weber et al. 2016). Bemerkenswert ist auch das Zusammenspiel zwischen den PPs: So können PP2A und PP2B die Inaktivierung von PP1 durch Inaktivierung von I-1 regulieren (El-Armouche et al. 2006). Die Regulation der Aktivität der katalytischen Untereinheit der PP2A kann über eine Phosphorylierung an Tyr307 basierend auf einer sterischen Instabilität gesenkt werden, jedoch über eine Methylierung an Leu309 erhöht werden (DeGrande et al. 2013). Eine Regulation von PP1 und PP2A kann auch direkt oder indirekt durch die reaktive

Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) erfolgen (Fetrow et al. 1999). Man hat weiterhin herausgefunden, dass die  $\beta$ -AR Stimulation zu einer verminderten PP-Aktivität führen kann (Gupta et al. 2002). Die genannten Regulationsmechanismen sind für ein Gleichgewicht an Phosphorylierung und Dephosphorylierung im gesunden Herzen verantwortlich und können bei Kardiomyopathien geschädigt sein.

Da sich die Substrate für Ser/Thr-PP über fast alle Zellkompartimente verteilen, ist es möglich die zelluläre Signalkaskade vielfältig zu beeinflussen (Lei et al. 2015). Durch Bindung an einer funktionsbestimmenden Phosphorylierungsstelle der PKA kann die PP2A die Aktivität des LTCC an der Plasmamembran senken (Davare et al. 2000; Heijman et al. 2013) und auch die Phosphorylierung an Ser18 der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase über die PP2A-B56 Untereinheit beeinflussen (Bhasin et al. 2007). Am SR kann die PP2A den RyR2-Holo-Komplex mittels ihrer PR130 Untereinheit dephosphorylieren (Marx et al. 2001; Reiken et al. 2003). Die PP2A senkt weiterhin die Aktivität von SERCA und kann PLB an Ser16 und Thr17 dephosphorylieren (Herzig und Neumann 2000; MacDougall et al. 1991; Neumann et al. 1999; Weber et al. 2015). An den Myofilamenten können Ser/Thr-PP den Troponin-Inhibitorkomplex Tnl an Ser23 und Ser24 dephosphorylieren, sowie möglicherweise auch an das kardial-myosin-bindende Protein C binden (Jideama et al. 2006; Kirchhefer et al. 2014; Mumby und Walter 1993; Solaro und Kobayashi 2011). Im Zellkern kann die PP2A die Histon-Deacetylase 4 (HDAC4) dephosphorylieren, deren subzelluläre Lokalisation kontrollieren und damit deren Aktivität steuern (Ling et al. 2012; Paroni et al. 2008).

Untersuchungen am insuffizienten Herzen haben gezeigt, dass im Endstadium einer Herzinsuffizienz Patienten eine erhöhte Expression und Aktivität von Ser/Thr-PP aufweisen (Neumann et al. 1997). Die verminderte Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen wurde ebenso an Herzmuskel-Proben von diesen Patienten belegt (Bartel et al. 1996; Schmidt et al. 1999; Zakhary et al. 1999). Weiterhin zeigte die Induktion einer Herzinsuffizienz am Tiermodell durch Langzeit  $\beta$ -AR-Stimulation neben einer erhöhten PP1- und PP2A-Aktivität eine verringerte Phosphorylierung von PLB an Ser16 und Thr17, sowie eine erhöhte Expression des atrialen natriuretischen Peptid (ANP) (Boknik et al. 2000). Insgesamt sind die Veränderungen der PP-Expression durch die vielfältige Pathologie einer Herzinsuffizienz verschieden. Neben einer stets erhöhten PP1-Expression, gab es Veröffentlichungen über eine verringerte als auch über eine erhöhte PP2Ac-Expression, wobei die Daten über eine erhöhte Expression überwiegen und vielseitig aus der Literatur bestätigt werden (DeGrande et al. 2013; Gergs et al. 2012; 2019c; Heijman et al. 2013; Nicolaou und Kranias 2009; Wijnker et al. 2011). Das bestätigen auch die unterschiedlichen Expressionen der B-Untereinheit der PP2A, welche erhöht in nicht-ischämischen Herzen aber unverändert in Herzen einer ischämischen Herzinsuffizienz war (DeGrande et al. 2013). Weitestgehend ungeklärt bleibt die Frage, inwieweit die erhöhte PP-Aktivität Ursache oder Folgeerscheinung der pathophysiologischen Entwicklung einer Kardiomyopathie ist. Im

Mausmodell mit PP1 $\alpha$ -Überexpression im Herzen entwickelte sich eine Herzinsuffizienz mit verminderter Kontraktilität und Fibrose. Die Überexpression von I-1 und eine damit einhergehende verminderte Aktivität von PP1 bewirkte das Wiederrückkehren der adrenergen Signalkaskade im geschwächten Herzen, was für eine Progression der Kardiomyopathie durch PP1-Aktivität spricht (Carr et al. 2002). Im Gegensatz dazu führt die verringerte Aktivität von PP1 durch direkte Hemmung mittels I-2 zu einer Vorhof-Hypertrophie, einer ventrikulären Fibrose und kontraktilen Dysfunktion, womit die komplette Hemmung der PP als therapeutische Option einer Herzinsuffizienz ausgeschlossen werden kann (Grote-Wessels et al. 2008). Die kardiale Überexpression von PP2A und von PP5 im Mausmodell führte in beiden Fällen zu einer kardialen Hypertrophie und eingeschränkten Kontraktilität (Dörner et al. 2021; Gergs et al. 2004; 2012).

Ischämische oder hypoxische Zustände können eine Begleiterscheinung vieler kardiovaskulärer Erkrankungen sein und der Sauerstoffmangel im Herzen kann als Spätfolge zu einem programmierten Zelltod (Apoptose) führen. In diesem Zusammenhang steht die Funktionalität der Mitochondrien im Vordergrund: Wird weniger Sauerstoff über den Blutkreislauf transportiert, kann über die Mitochondrien in den Kardiomyozyten kein ATP mehr gebildet werden, was zu einer Dysfunktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase führt und schließlich eine Kumulation von Na<sup>+</sup> im Zytosol der Zelle bewirkt. Diese intrazellulär erhöhten Na<sup>+</sup>-Konzentrationen aktivieren die Funktion des NCX. Da Ser/Thr-PP sowohl die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase als auch den NCX beeinflussen können, soll ihr Einfluss auf eine Hypoxie in den genetisch veränderten Mausmodellen untersucht werden. Es gibt Hinweise darauf, dass u.a. die PP2A einen Einfluss auf die Apoptose durch Dephosphorylierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) auf Zellebene hat (Brichese et al. 2004; Dagda et al. 2003; Ruvolo et al. 2002; Tamura et al. 2004). Weiterhin wurde ihr Einfluss auf die Phosphorylierung von Connexin-43 im Zusammenhang mit einer Ischämie und Präkonditionierung untersucht (Totzeck et al. 2008). Für das Protein S100A1 wurde gezeigt, dass es mit der ATP-Synthase wechselwirken kann, damit eine erhöhte Synthese von ATP bewirkt wird und einen Einfluss auf die hypoxie-ausgelöste kardiale Entzündungsreaktion hat (Boerries et al. 2007; Imbalzano et al. 2016; Yu et al. 2015). Auch die PP5 könnte für einen Zusammenhang der Ser/Thr-PP mit der mitochondrialen Funktion stehen, da S100-Proteine womöglich die PP5 regulieren (Yamaguchi et al. 2012).

Ein weiterer Zusammenhang ist zwischen der Alterung als Risikofaktor für Kardiomyopathien und der veränderten Expression von Ser/Thr-PP beschrieben. Der kardiale Alterungsprozess basiert physiologisch auf einer sympathischen Überaktivierung und bedingt post-synaptisch eine verminderte Reaktionsfähigkeit auf Neurotransmitter (Esler et al. 2002; Hotta und Uchida 2010). Das geschieht auf zellulärer, subzellulärer und molekularer Ebene durch strukturelle kardiale Veränderungen wie vergrößerte Kardiomyozyten, eine verringerte Anzahl an Kardiomyozyten und eine Erhöhung des Matrix-Bindegewebes (Lakatta 1999). Die

daraus folgenden funktionellen Veränderungen sind vielfältig und können teilweise auf eine veränderte Expression und Aktivität von Ser/Thr-PP hinweisen (Gombosova et al. 1998). Besonders die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ist im Alter durch vielerlei Veränderungen, wie einen erhöhten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, eine verringerte Dichte des LTCC, eine verschlechterte Kopplung zwischen  $\beta$ -AR und AC, einer verringerten PLB-Phosphorylierung sowie einer verminderten SERCA-Proteinexpression gestört (Lakatta 1999; Neumann 2002). Im rechten Vorhofgewebe von Menschen unter Propranolol-Behandlung hat man mit steigendem Alter eine verringerte Proteinexpression von PP2Ac und auch von I2 der PP2A beobachtet, ohne jedoch genau die PP-Aktivität gemessen zu haben (Gergs et al. 2019c). Dass die Phosphataseaktivität dennoch im Zusammenhang mit den Untersuchungen stehen kann, zeigten Ergebnisse an Ratten, welche durch Blockade des  $\beta$ -AR Signalwegs eine erhöhte PP-Aktivität im Herzen aufwiesen (Boknik et al. 2000). Auch andere Untersuchungen zeigten eine erhöhte PP2A-Aktivität in beiden Ventrikeln im alternden Herzen der Ratte (Fenton et al. 2005). Die erhöhte Ser/Thr-PP-Aktivität konnte sogar im adulten Rattenherzen im Vergleich zum juvenilen festgestellt werden (Grey et al. 2003). Man könnte aufgrund dessen davon ausgehen, dass die Phosphorylierung der regulatorischen Proteine herabgesetzt war oder sogar die Proteinexpression selbst vermindert war. Jedoch zeigten die Erfahrungswerte kontroverse Ergebnisse. Im Alter sank die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR, was teilweise mit einer möglicherweise verringerten Proteinexpression (Assayag 1998) oder -phosphorylierung des RyR2 (Xu und Narayanan 1998) oder zum anderen mit einer verringerten Proteinexpression von SERCA im Zusammenhang stehen könnte (Lakatta und Sollott 2002). Diverse Arbeiten haben eine Verringerung von SERCA auf RNA- und Proteinebene im Alter nachgewiesen (Cain et al. 1998; Herraiz-Martínez et al. 2015; Lompré et al. 1991), oder zeigten unveränderte SERCA/PLB-Level (Gergs et al. 2019b) oder aber demonstrierten eine erhöhte SERCA-Aktivität (Schmidt et al. 2000). Die gleichen Kontroversen galten für die altersabhängige Veränderung von CSQ (Herraiz-Martínez et al. 2015; Schmidt et al. 2000; Xu und Narayanan 1998; Zhu et al. 2005). Jedoch kann CSQ altersabhängig eine tragende Funktion für die Hypertrophie und Kontraktilität im Herzen haben (Gergs et al. 2017).

## 2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die pathophysiologische Bedeutung der PP2A und PP5 im Herzen besser zu verstehen. Im Hinblick auf ihre Funktionalität hat ihre Expression im Herzen einen Einfluss auf die Kontraktilität der Myofibrillen, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, die Genexpression in den Kardiomyozyten, die Apoptose durch Gewebeschädigung, sowie die ATP-Synthese in den Mitochondrien. Mit Hilfe von in-vitro- und in-vivo-Methoden soll neben ihrem Einfluss auf die Funktionalität des Herzens, der Regulation der PP2A und PP5 auf molekularer Ebene nachgegangen werden. Die Expression der PP2A und der PP5 soll auf Gen- und auf Proteinebene unter Einfluss verschiedener Stressfaktoren wie Alterungsprozessen, Ischämie, Hypertrophie und  $\beta$ -AR Stimulation untersucht werden, sowie deren Veränderungen auf die physiologische und pathophysiologische Funktionalität des Herzens betrachtet werden. Um den Einfluss der gegenseitigen Regulation von Phosphatasen und eine mögliche Regulation der PP2A durch andere Phosphatasen unter diesen Bedingungen näher zu beleuchten, soll die Funktion der PP2A unter gleichzeitiger Überexpression der PP5 im Herzen charakterisiert werden, um Aufschlüsse über mögliche Veränderungen in Signalwegen zu geben. Dazu soll ein Mausmodell mit gemeinsamer Überexpression der PP2A und PP5 etabliert und charakterisiert werden.

Die Regulation der PP2A und PP5 hat weitreichende Folgen auf die Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen, welche mit einer gestörten elektromechanischen Kopplung der Herzaktion einhergehen. Darum soll die Untersuchung der Regulation der PP2A unter Einfluss einer anderen Phosphatase, der PP5, und entgegengesetzt die Regulation der PP5 unter Einfluss der PP2A, neue Erkenntnisse über die Mechanismen der Steuerung von Ser/Thr-PP geben und uns mögliche Signalwege aufzeigen, welche in der Vergangenheit noch nicht betrachtet wurden. Die altersabhängigen Stressreaktionen sollen Aufschluss über veränderte physiologische Regulationsmechanismen im Alter im Gegensatz zu pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen einer fortschreitenden Kardiomyopathie bis hin zu einer Herzinsuffizienz aufzeigen. Die hier dargelegten Ergebnisse sollen den Wissenstand über die Pathomechanismen der Herzinsuffizienz im Zusammenhang mit der PP2A und PP5 beschreiben und in diesem Rahmen erste Hinweise auf mögliche Therapieansätze von kardiovaskulären Erkrankungen durch Modifikation der Phosphorylierungen wichtiger Substrate geben.

## 3 Methoden

### 3.1 Tierhaltung und Mauslinie

Alle tierexperimentellen Arbeiten fanden unter der behördlichen Genehmigung des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt dem Referat Veterinärangelegenheiten und Verbraucherschutz über den Tierschutzbeauftragten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nach § 8 des Tierschutzgesetzes mit dem Aktenzeichen 42502-2-1078 MLU, 425-2-1494 MLU und 425-2-1518 MLU statt.

#### 3.1.1 Mauslinien

##### 3.1.1.1 PP2A

Für die Versuche wurden transgene Mäuse mit genetischem CD1-Hintergrund verwendet (CD1(ICR)-Stamm), welche die  $\alpha$ -Isoform der katalytischen Untereinheit der PP2A (PP2A $\alpha$ ) herzspezifisch überexprimieren, sowie deren Wildtyp-Geschwistertiere (Gergs et al. 2004). Hierzu wurde die komplette RNA aus Mausherzgewebe mittels TriStar-Reagenz nach dem entsprechenden Herstellerprotokoll (AGS, Heidelberg) extrahiert. Ein insgesamt 1382 bp Fragment, bestehend aus einem 69 bp untranslatierten Bereich am 5'-Ende (5'UTR), der kodierenden Sequenz für die katalytische Untereinheit PP2A $\alpha$  und einem 326 bp untranslatierten Bereich am 3'Ende (3'UTR), wurde mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen NotI und SalI aus dem PCR-Produkt ausgeschnitten. Die gewonnene cDNA wurde in die entsprechenden Stellen der Expressionskassette eines Vektors mit dem mausherzspezifischen Promotor der  $\alpha$ -Isoform der schweren Kette des Myosins ( $\alpha$ -MHC) mittels Ligation eingefügt. Die Expression der PP2A $\alpha$  steht damit unter gewebsspezifischer Kontrolle des Promotors, welcher eine geringe Expression in der Embryonalentwicklung, jedoch in der postnatalen Entwicklung eine starke Expression der von diesem Promotor kontrollierten Gene in Herzmuskelzellen gewährleistet (Gulick et al. 1991a). Weiterhin ist die Genexpression mit der Entwicklung der Schilddrüse postnatal verknüpft (Ojamaa und Klein 1991). Zur Terminierung der Transkription enthält die Expressionskassette eine Simian-Virus-(SV40)-Polyadenylierungssequenz. Die gesamte 7 kb große Expressionskassette inkl. der kodierenden Region für PP2A $\alpha$  (Abbildung 6) wurde mittels Restriktionsendonuklease NruI aus dem Ursprungsplasmid isoliert und anschließend in befruchtete Maus-Oozyten des CD1-Stamms mikroinjiziert.

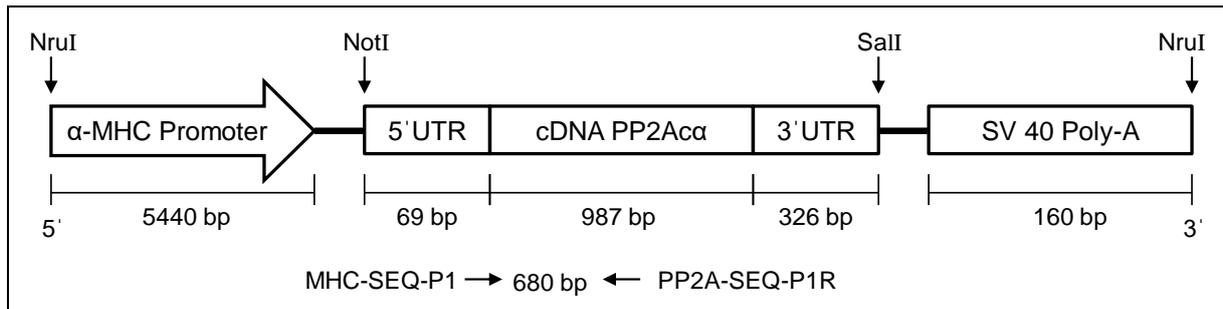


Abbildung 6: Schematische Darstellung der  $\alpha$ -MHC-PP2A $\alpha$ -Expressionskassette. Mittels der Primer MHC-SEQ-P1 und PP2A-SEQ-P1R wurde ein 680 bp großes Segment in der genomischen DNA durch PCR nachgewiesen.

### 3.1.1.2 PP5

Weiterhin wurden transgene Mäuse mit CD1-Hintergrund verwendet (CD1(ICR)-Stamm), die die PP5 herzspezifisch überexprimieren (Gergs et al. 2012). Dabei wurde die cDNA-Sequenz der PP5 aus *Rattus norvegicus* verwendet (Chinkers 1994) und vergleichbar wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, die kodierende Region für PP5 inkl. 3'UTR aus dem Ursprungsplasmid isoliert und in befruchtete Maus-Oozyten des CD1-Stamms mikroinjiziert (siehe Abbildung 7).

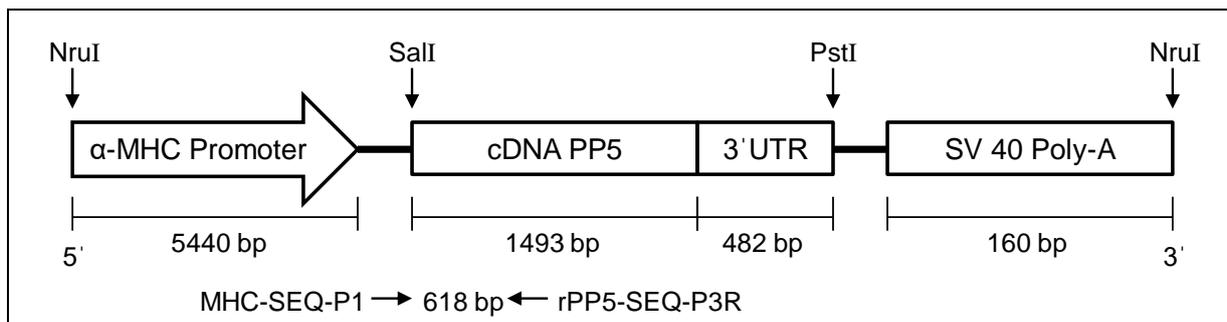


Abbildung 7: Schematische Darstellung der  $\alpha$ -MHC-PP5-Expressionskassette. Die cDNA der PP5 (*Rattus norvegicus*) wurde von Prof. M Chinkers (University of South Alabama, Mobile, USA) zur Verfügung gestellt. Mittels der Primer MHC-SEQ-P1 und rPP5-SEQ-P3R wurde ein 618 bp großes Segment in der genomischen DNA durch PCR nachgewiesen.

### 3.1.1.3 PP2AxPP5

Die doppelt-transgenen Tiere PP2AxPP5, welche sowohl die PP2A als auch die PP5 herzspezifisch überexprimieren, wurden durch Kreuzung der transgenen Mäuse aus der Linie PP2A mit transgenen Mäusen aus der Linie PP5 erhalten.

## 3.2 Physiologische Methoden

### 3.2.1 Narkose und Organentnahme

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital-Natrium entsprechend der Herstellerangaben (400 mg/kg Körpergewicht). Die Überprüfung des Stellreflexes, sowie des Schwanz- und Zwischenzehenreflexes diente zur Kontrolle der Narkosetiefe. Nach komplettem Kreislaufstillstand wurde der Bauchraum geöffnet, das Herz entnommen und in *Tyrode*-Lösung inkl. 1 % Heparin überführt (siehe Tabelle 12 in 7.1). Das Herz wurde durch gleichmäßiges Massieren entblutet und nach Bestimmung des feuchten

Herzgewichts in ein weiteres Becherglas mit frischer *Tyrode*-Lösung inkl. 1 % Heparin überführt. Schnellstmöglich erfolgte die Blutentnahme mittels 1ml-Spritze aus dem Bauchraum in einfache Reaktionsgefäße (1,5 ml, Eppendorf®) für die Serumgewinnung oder in EDTA-beschichtete Probenröhrchen zur Gewinnung von Plasma. Lunge, Leber und Nieren wurden ebenfalls entnommen und gewogen. Die Lunge und die Leber wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Milz, sowie die mediastinalen und subiliakalen Lymphknoten für die Immunhistochemie- und FACS-Analyse (siehe 3.5) wurden nach ihrer Entnahme in 3 ml eines RPMI-Zellmediums (ROTI® Cell RPMI-1640) inkl. 1000 I.E./ml Kollagenase bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die histologischen Versuche (siehe 3.6) wurde das entnommene Herz vollständig mit *Tyrode*-Lösung blutfrei perfundiert.

Für die Mitochondrienisolation aus Herzgewebe wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, das Herz schnellstmöglich entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung entblutet.

### **3.2.2 Verarbeitung von Blutproben**

#### **3.2.2.1 Plasma und Serum**

Zur Plasmagewinnung wurde das entnommene Blut (siehe 3.2.1) bei 2300 x g bei 10 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Gewinnung von Serum wurde das entnommene Blut in ein einfaches Eppendorf-Gefäß gegeben und bis zur vollständigen Gerinnung bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 2500 x g zentrifugiert und der entnommene Überstand bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

Die Messungen von Elektrolyten in Plasma und Serum wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle durchgeführt.

### **3.2.3 Isometrische Kontraktionsversuche an isolierten Herzvorhöfen**

#### **3.2.3.1 Versuchsvorbereitung**

Jede Messvorrichtung bestand aus einem temperierbaren Organbad, welches zu Beginn des Versuchs mit 10 ml *Tyrode*-Lösung befüllt wurde. Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen fand eine ständige Begasung der Lösung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) und eine Wasserbadtemperierung auf 37 °C statt. Zwei senkrecht voneinander fest angebrachte Metallhaken ermöglichen das Einhängen der Vorhöfe. Die Messung der Kontraktionskräfte erfolgte über einen Kraftaufnehmer am oberen Haken, welcher die gemessene Spannung über einen Energiewandler und Brückenverstärker an die Software des Computers weitergeleitet hat (Abbildung 8). In jeder Messanlage befinden sich zwei Reizelektroden, zwischen denen

die Vorhöfe angebracht wurden. Die linken Vorhofpräparationen wurden mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert, da sie der Auswertung der Kontraktionskräfte dienen. Die Frequenzauswertung erfolgte an den unstimulierten, spontan schlagenden rechten Vorhofpräparationen, da sie durch den intakten Sinusknoten ein funktionierendes Reizleitungssystem besaßen. Vor dem Beginn jedes Versuchs wurde der Kraftaufnehmer kalibriert. Hierbei wurde durch das freie Hängen des Metalldrahts der Nullpunkt bestimmt. Mit dem Anhängen eines 500 mg schweren Gewichts, wurde der Ausschlag als eine entsprechende Kraft von 5 mN als Referenzwert in der Software gespeichert. Die Präparation des frisch entnommenen Herzens (siehe Kapitel 3.2) erfolgte in carbogenbegaster Tyrode-Lösung in einer Petrischale. Der rechte und linke Vorhof wurden vom Ventrikel abpräpariert und mit jeweils zwei Metallhäkchen versehen, um diese in der Vorrichtung der Organmessaanlage zu platzieren. Nach einer 30-minütigen Äquilibration inkl. dreimaligen Spülens der Präparate im Organbad wurde der Versuch begonnen.

Direkt im Anschluss an die Versuche wurden die Vorhöfe einzeln in flüssigem Stickstoff gefroren und die Ventrikel mittels vorgekühlter Wollenberger-Zange schockgefroren (Wollenberger et al. 1960). Die Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

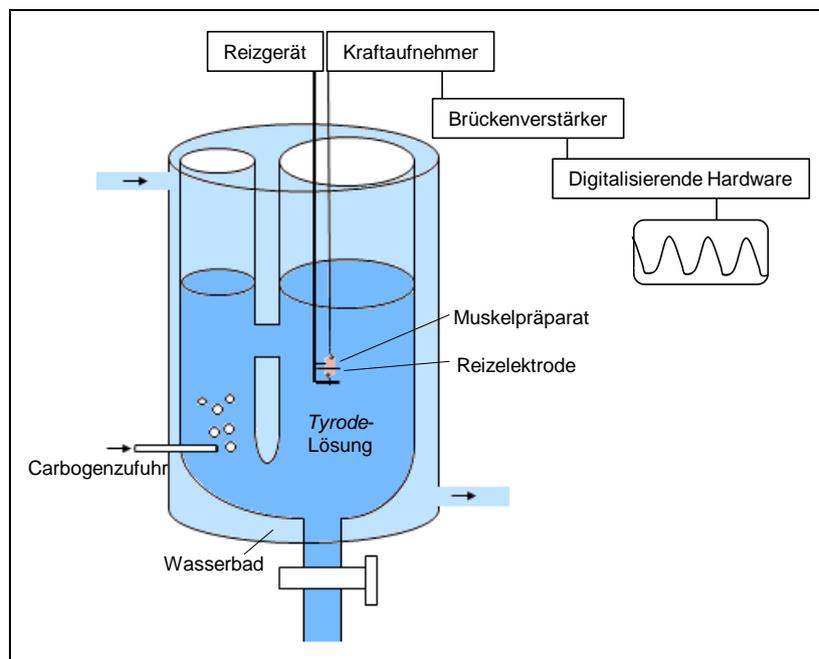


Abbildung 8: Versuchsanordnung für isometrische Kontraktionsmessungen an isolierten Vorhofpräparaten.

### 3.2.3.2 Kontraktionsversuche mit Hypoxie und $\beta$ -AR Stimulation

Die Organentnahme und Präparation der Vorhöfe wurden, wie in den Kapiteln 3.2 und 3.2.3.1 beschrieben, durchgeführt. Vor Beginn jedes Versuchs wurden die Präparate im Organbad stabilisiert. Eine Hypoxie wurde durch das Umstellen der Carbogenzufuhr auf eine

Stickstoff-/CO<sub>2</sub>-Zufuhr (N<sub>2</sub>: 95 %, CO<sub>2</sub>: 5 %) eingeleitet. Um anschließend die Reoxygenierung durchzuführen wurde der Hahn der Stickstoff-/CO<sub>2</sub>-Zufuhr geschlossen und wie zu den Anfangsbedingungen die Carbogenzufuhr geöffnet. Eine Konzentrationswirkungskurve (KWK) für Isoprenalin wurde durch kumulative Applikation steigender Konzentrationen einer Isoprenalin-Lösung alle 3 - 5 min gemessen, sodass sich die folgenden Endkonzentrationen im Organbad ergaben: 1 nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM; 0,1 µM; 0,3 µM; 1 µM; 3 µM; 10 µM. Am Ende des Versuchs wurden die Vorhofpräparate und Ventrikel in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Abbildung 9 zeigt die jeweiligen Versuchsreihen. In Versuchsprotokoll 1 (Abbildung 9) folgte nach der Stabilisierung, die Hypoxie, eine Reoxygenierung und die KWK mit Isoprenalin. In Versuchsprotokoll 2 (Abbildung 9) wurde die Reihenfolge so umgekehrt, dass Hypoxie und Reoxygenierung auf die KWK mit Isoprenalin folgten. Versuchsprotokoll 3 (Abbildung 9) diente als Zeitkontrolle indem nach der Iso-KWK eine 60-minütige Stabilisierung folgte.

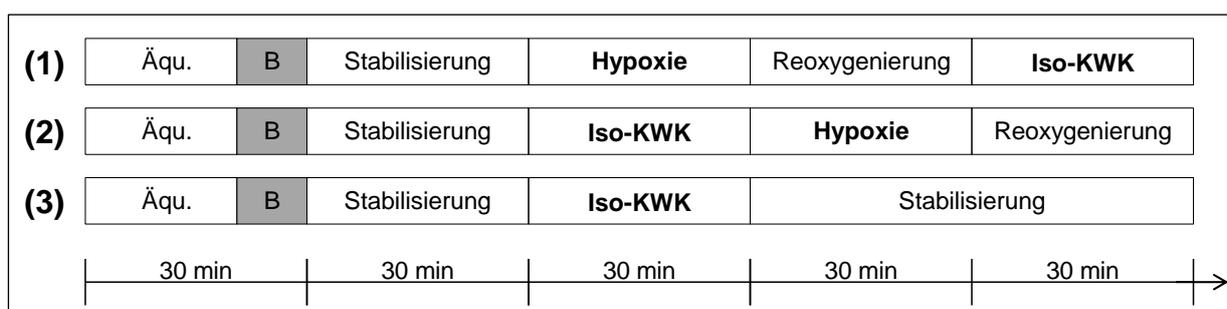


Abbildung 9: Versuchsaufbau der Kontraktionsversuche. B...Badwechsel; Äqu...Äquilibration; Iso-KWK...Isoprenalin-Konzentrationswirkungskurve

### 3.2.3.3 Kontraktionsversuche mit Desensitivierung

Die Versuchsvorbereitung erfolgte wie in 3.2.3.1 beschrieben. Im Anschluss an die Äquilibration und den Badwechsel wurde für die Versuche der Desensitivierung eine kumulative KWK mit Isoprenalin mit Konzentrationen von 0,1 nM bis 1 µM durchgeführt. In Versuchsprotokoll 4 (Abbildung 10) erfolgte nach der KWK ein dreimaliger Badwechsel im Abstand von 5 min bis die Ausgangslage erreicht wurde, eine 30-minütige Stabilisierung der Präparate, eine Inkubation mit 1 µM Isoprenalin, ein nochmaliger dreifacher Badwechsel im Abstand von 5 min und eine zweite kumulative KWK mit Isoprenalin. Versuchsprotokoll 5 diente als Zeitkontrolle in der keine zusätzliche Inkubation mit 1 µM Isoprenalin stattfand (Abbildung 10).

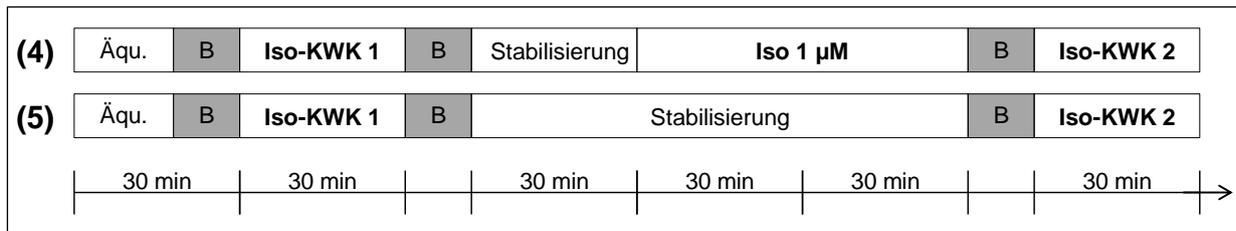


Abbildung 10: Versuchsaufbau der Desensitivierungsversuche. B...Badwechsel; Äqu...Äquibrierung; Iso-KWK...Isoprenalin-Konzentrationswirkungskurve

### 3.2.3.4 Auswertung der Kontraktionsversuche am linken Vorhof

Die Auswertung der isometrischen Kontraktionsversuche erfolgte über die Software LabChart. Zur Auswertung von Kontraktionskraft und Schlagfrequenz wurden mehrere Peaks über einen bestimmten Zeitraum betrachtet und deren Mittelwert gebildet. In der folgenden Einzelpeakauswertung konnten ebenso die Kontraktionszeit, die Relaxationszeit, die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit ermittelt werden. Abbildung 11 zeigt einen typischen Verlauf der Kontraktionskräfte anhand eines Originalmechanogramms (Abbildung 11 A) und die genannten Parameter anhand eines einzelnen Peaks (Abbildung 11 B).

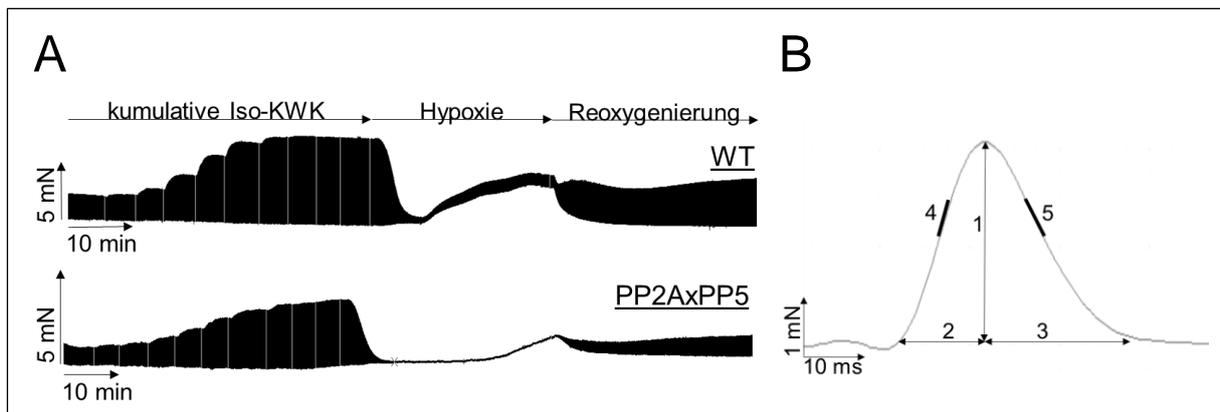


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Kontraktionsversuchsauswertung am linken Vorhof. **A:** Originalmechanogramm linker Vorhofpräparate bei Iso-KWK und anschließender Hypoxie. **B:** Darstellung der Einzelpeakauswertung. 1 - Kontraktionskraft [mN], 2 - Kontraktionszeit  $t_1$  [ms], 3 - Relaxationszeit  $t_2$  [ms], 4 - Kontraktionsgeschwindigkeit aus dem maximalen Anstieg der Kontraktion  $V_{max}$  [mN/s], 5 - Relaxationsgeschwindigkeit aus dem maximalen Abfall der Relaxation  $V_{min}$  [mN/s]

## 3.2.4 Echokardiographie

### 3.2.4.1 Vorbereitung

Die Herzultraschalluntersuchungen (Echokardiographie) fanden am narkotisierten Tier statt. Zur Narkoseeinleitung wurde ein Gasmischung aus 2 % Isofluran (Forene®) und 98 % Sauerstoff bei einem Fluss von 1 l/min verwendet. Nach der Einleitung in einem geschlossenen Glasgefäß, wurden die Tiere auf einem beheizten Tisch mit integrierten EKG-Elektroden fixiert und die Narkose über eine Nasensonde bei 1,5 % Isofluran aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe des beheizten Tisches und eines rückgekoppelten

Rektalfühlers konstant bei 37 °C gehalten. Der Brustkorb der Tiere wurde mit Hilfe einer Enthaarungscreme enthaart und mit Wasser gereinigt. Unter Verwendung eines aufgewärmten Ultraschallkontaktgels, wurden die Herzparameter mit einem hochauflösenden Imaging-System (Vevo 2100, VisualSonics) für kleine Tiere nach Anleitung des Herstellers ermittelt (siehe Abbildung 12).

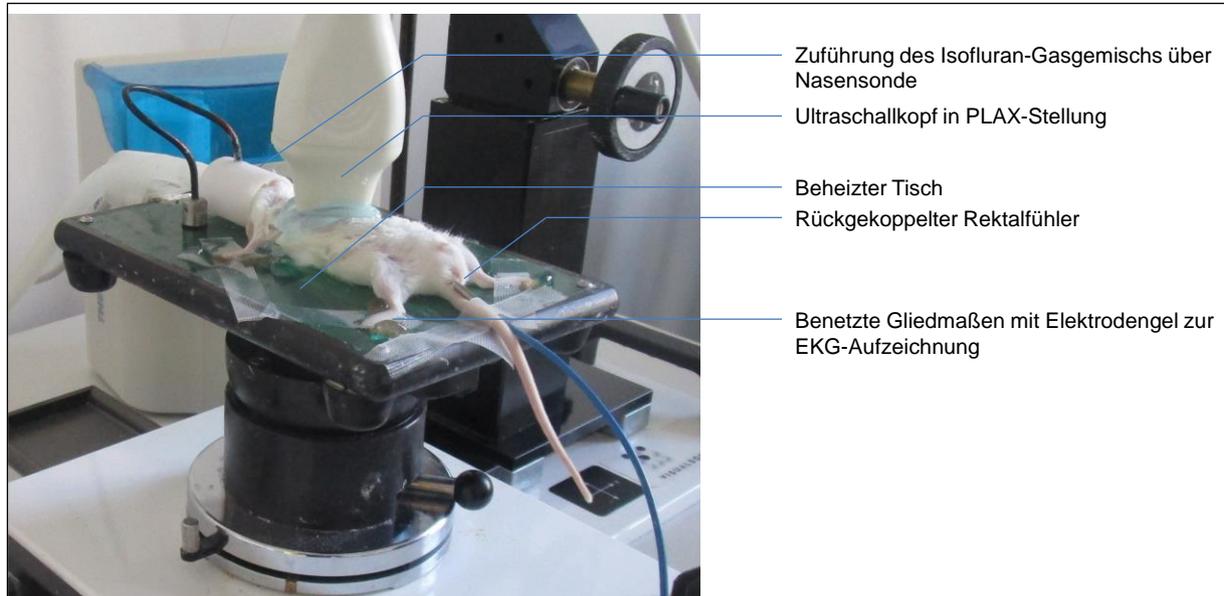


Abbildung 12: Vorbereitung für die Durchführung eines Herzultraschalls an einer Maus.

### 3.2.4.2 Zweidimensionale Echokardiographieaufnahme

Zu Beginn einer Messung wurde der Schallkopf so ausgerichtet, dass entweder die parasternale Längs- oder Querachse des Herzens untersucht werden konnte. Aufnahmen wurden im B-Mode (brightness modulation) und im M-Mode (motion) gemacht. Im B-Mode wird die Echo-Intensität durch Helligkeit in einer zweidimensionalen Aufnahme wiedergegeben, während im M-Mode die Aufnahme im zeitlichen Verlauf dargestellt wird. Die Auswertung von drei Herzzyklen (Systole und Diastole) fand nach Angaben des Herstellers mit der Anwendung „LV Trace/cyclic measurements“ statt. Im M-Mode der parasternalen Längsachseneinstellung (PLAX) wurden die interventrikuläre Septumdicke in Endsystole und Enddiastole (IVSs, IVSd), die Hinterwanddicke in Systole und Diastole (LVPWs, LVPWd), das linksventrikuläre innere Volumen in Systole und Diastole (Vols, Vold), die Herzfrequenz (HF) und der endsystolische und enddiastolische linksventrikuläre Durchmesser (LVIDs, LVIDd) gemessen (siehe Abbildung 13). Aus den gemessenen Daten wurden die Parameter der Ejektionsfraktion (EF) und der Verkürzungsfraktion (FS) rechnerisch ermittelt (Ram et al. 2011).

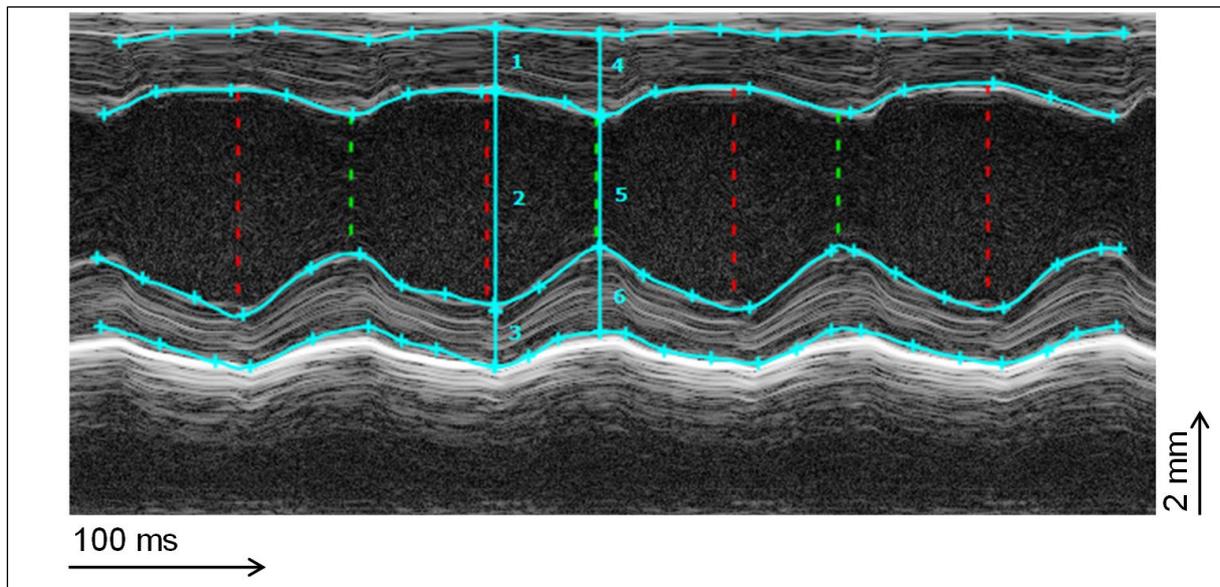


Abbildung 13: Echokardiographieaufnahme der PLAX (parasternalen Längsachseneinstellung) des linken Ventrikel im M-Mode. 1 – IVSd... interventrikuläre Septumdicke in der Enddiastole; 2 – LVIDd... enddiastolischer linksventrikulärer Durchmesser; 3 – LVPWd... linksventrikuläre Hinterwanddicke in der Diastole; 4 – IVSs... interventrikuläre Septumdicke in der Endsystole; 5 – LVIDs... endsystolischer linksventrikulärer Durchmesser; 6 – LVPWs... linksventrikuläre Hinterwanddicke in der Systole

### 3.2.4.3 Doppler-Echokardiographie

Mit Hilfe der Doppler-Echokardiographie wurden Fließeigenschaften des Blutes in ausgewählten Gefäßen und die Funktionalität der Gefäße selbst, untersucht. Die Doppler-Echokardiographie dient der Auswertung der diastolischen linksventrikulären Parameter. Durch die Untersuchung der Mitralklappe aus dem apikalen Vierkammerblick wurden der Fluss der frühdiastolischen, passiven, linksventrikulären Füllung (E) und der Fluss der spätdiastolischen, aktiven, linksventrikulären Füllung (A) bestimmt. Die Gewebedopplermessung aus der parasternalen Kurzsachseneinstellung (PSAX) ermöglichte die Bestimmung der frühdiastolischen (E') und der spätdiastolischen Mitralanulusgeschwindigkeit (A'), sowie der isovolumetrischen Kontraktions- und Relaxationszeit (IVCT, IVRT) und der Ejektionszeit (ET). Die Untersuchung der Arteria pulmonalis erfolgte aus dem parasternalen Längsachsenblick. Zur Messung der Parameter der Aorta ascendens wurde der Aortenbogenblick angewandt. In den Gefäßen wurden die jeweiligen diastolischen und systolischen Spitzenflussgeschwindigkeiten (Peak Velocity) und Geschwindigkeits-Zeit-Integrale (VTI) bestimmt (Abbildung 14).

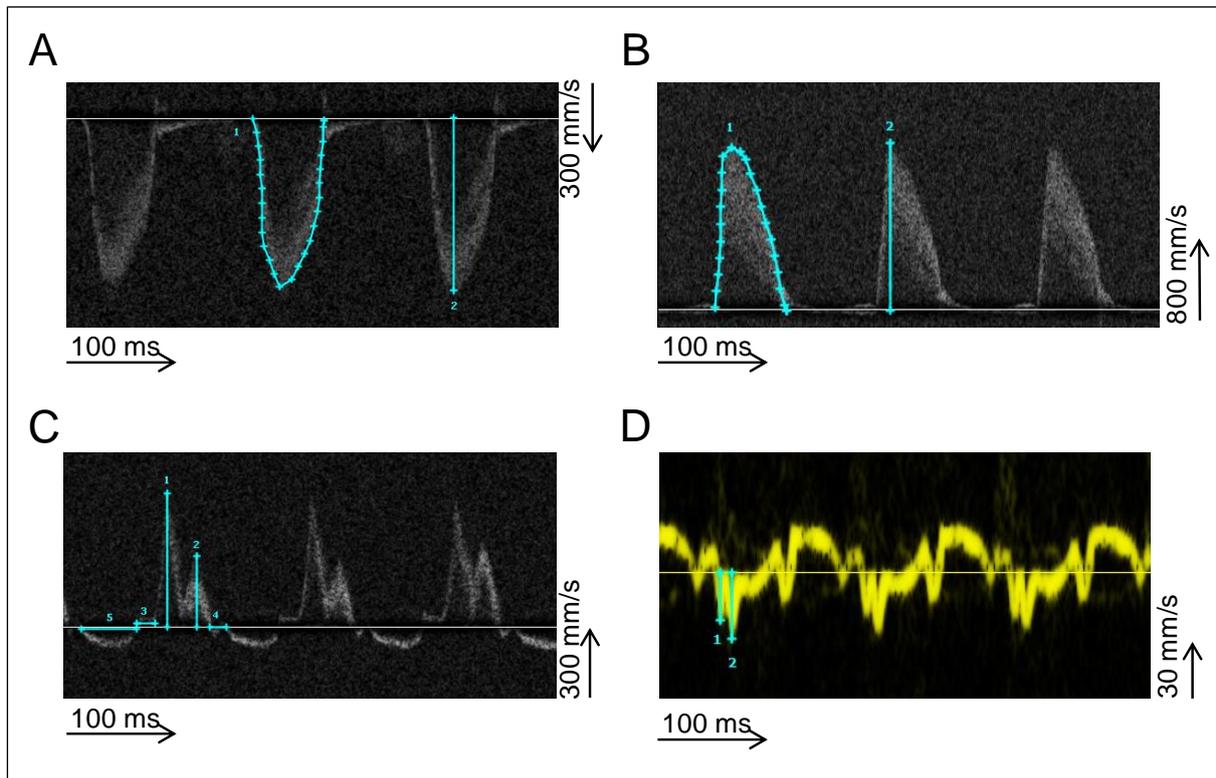


Abbildung 14: Repräsentative Darstellung der Herzultraschallmessung im Doppler-Mode. **A:** Arteria pulmonalis; 1 – VTI...Geschwindigkeits-Zeit-Integral, 2 - Peak Velocity; **B:** Aorta ascendens; 1 – VTI...Geschwindigkeits-Zeit-Integral, 2 - Peak Velocity; **C:** Mitralklappe; 1 – E... frühdiastrische passive linksventrikuläre Füllung, 2 – A...spätdiastrische aktive linksventrikuläre Füllung, 3 – IVRT... isovolumetrischen Relaxationszeit, 4 – IVCT... isovolumetrischen Kontraktionszeit, 5 – ET...Ejektionszeit; **D:** Gewebedoppler; 1 - E'... frühdiastrische Mitralanulusgeschwindigkeit, 2 - A'... spätdiastrische Mitralanulusgeschwindigkeit

### 3.2.4.4 Intraperitoneale Injektion

Nach Bestimmung der Basalwerte wurde den Tieren eine Lösung von 1 mM Isoprenalin, gelöst in 0,9%-iger NaCl, i.p. mit einer Kanüle von 25 - 27G injiziert. Jeweils ein Volumen von 100  $\mu$ l wurde bei einer Maus mit 30 g Körpergewicht verwendet (0,7 mg/kg Körpergewicht). Fünf Minuten nach der Applikation wurden die Ultraschallmessungen wiederholt. Nach Beendigung der Ultraschalluntersuchung wurden die Tiere noch in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Die Organentnahme erfolgte wie in Kapitel 3.2 beschrieben.

## 3.3 Proteinchemische Methoden

### 3.3.1 Homogenisierung von tierischem Gewebe

Die Homogenisierung der eingefrorenen Gewebe fand unter ständigem Kühlen mit flüssigem Stickstoff mit dem Mikro-Dismembrator S (Sartorius AG, Göttingen) statt. Dazu wurde das gefrorene Gewebe inklusive einer Mahlkugel aus Wolframcarbid (Sartorius AG, Göttingen) in ein Schüttelgefäß aus PTFE mit Deckel überführt. Dieses wurde in dem Mikro-Dismembrator eingespannt. Die Zerkleinerung erfolgte für eine Minute bei 2700 rpm. Das pulverisierte Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung von Homogenaten für die proteinchemische Analyse mittels Western Blot wurden ca. 50-100 mg

Gewebepulver in ein Eppendorf-Gefäß überführt und sofort mit 300 µl SDS-Homogenisationspuffer versetzt. Bei der Homogenisierung der Vorhofgewebeprobe wurden 50 µl SDS-Homogenisationspuffer direkt vor der Homogenisierung in das Schüttelgefäß gegeben. Die Proben wurden danach im Ultraschallhomogenisator für 3 x 15 s behandelt (75 % Intensität) und 30 min bei RT inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei RT und 18400 x g. Der Überstand wurde abgenommen und als fertiges Homogenat bis zur Weiterverwendung bei -80 °C eingefroren.

### 3.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung der SDS-haltigen Homogenate (siehe 3.3.1) erfolgte nach Lowry et al. 1951. Als Standard wurde hierbei BSA (Bovine Serum Albumine) verwendet.

### 3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung der SDS-freien Mitochondrienproben wurde mit der Methode nach Bradford durchgeführt. Als Standard diente BSA (Bradford 1976).

### 3.3.4 Gel-Elektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) diente der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur. Die Herstellung der Gele erfolgte nach Porzio und Pearson (1977). Es wurden ein 10%-iges Porzio-Trenngel und ein 4%-iges Sammelgel wie folgt hergestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Substanzen und Mengen zur Herstellung von SDS-Trenn- und -Sammelgelen

Substanz	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Lösung 30%	12,5 ml	1,25 ml
Porziopuffer	18,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,35 ml
dH <sub>2</sub> O	5,0 ml	5,8 ml
TEMED	32,5 µl	6 µl
10 %iges APS	150 µl	95 µl
Glycerol	3,125 ml	-

Mit Zugabe des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) beginnt die Polymerisation, welche durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) katalysiert wird. Die Trenngele wurden gegossen, mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) überschichtet und 60 min bei RT stehen gelassen. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel darüber gegeben und die Kämme eingelegt. Die Homogenate der Ventrikel und Vorhöfe wurden so mit 4x SDS-PAGE-Probenpuffer verdünnt, dass eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl erreicht wurde. Anschließend wurden die Proben 5 min auf 95 °C erhitzt und zu 60 µg Protein der Ventrikel- und Vorhofproben in die Geltaschen aufgetragen. Zur Kontrolle der Proteingrößen wurden

außerdem 25 µl eines Proteinmarkers aufgetragen. Der Gellauf fand in 1x Elektrophoresepuffer bei 80 V für 4 h statt. Die Zusammensetzungen der jeweiligen Lösungen sind in Kapitel 7.1 aufgeführt.

### **3.3.5 Western Blot und Ponceau-Färbung**

Um die aufgetrennten Proteine nach der Elektrophorese sichtbar zu machen und nachzuweisen, wurden diese mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Hirano 2012; Hnasko und Hnasko 2015). Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese aus der Elektrophoreseapparatur entfernt und mit Schwämmen, Filterpapier und Membran in die Vorrichtung platziert. Der Western Blot wurde für 16 h bei 250 mA und 4 °C in Transferpuffer durchgeführt. Die Färbung der Membranen mit dem reversiblen Proteinfarbstoff Ponceaurot im Anschluss diente der Qualitätsbestimmung des Verfahrens.

### **3.3.6 Immunologische Identifizierung von Proteinen**

Die Nitrocellulosemembran wurde je nach Protein an den zu erwarteten Bereichen zugeschnitten. Die Blots wurden im Anschluss an die Ponceaufärbung dreimal 10 Minuten mit 1x TBST-Puffer gewaschen, 1 h mit dem jeweiligen Blockierungsreagenz inkubiert und über Nacht mit dem entsprechenden Primärantikörper (gelöst im jeweiligen Blockierungsreagenz aus Milchpulver oder BSA) behandelt (siehe Tabelle 2). Am Folgetag wurde die Primärantikörperlösung von den Membranen abgenommen, die Membranen dreimal 10 Minuten mit 1x TBST-Puffer gewaschen und mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (im entsprechenden Blockierungsreagenz gelöst) für 2 h inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal 10 Minuten mit 1x TBST-Puffer und zweimal 2 Minuten mit AP-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran mit einer ECF-Substrat-Lösung in AP-Puffer (Verdünnung 1:10) für 5 min bei Dunkelheit zur Aktivierung des Fluoreszenzsubstrats. Die Fluoreszenz wurde durch Scannen der Membranen mit einem Typhoon Imager (GE Healthcare) detektiert (Extinktionswellenlänge 532 nm, Emissionsfilter 526 SP) und quantifiziert. Dabei war die gebundene Antikörpermenge proportional zur Signalstärke.

Tabelle 2: Nachzuweisende Proteine und Bedingungen zur immunologischen Identifizierung in Mausherzgewebe. BSA...Bovine Serum Albumine; MP...Milchpulver

Protein	Protein- größe [kDa]	Primär-AK Konzentration	Primär-AK Blockingreagenz in 1x TBST	Sekundär-AK Blockingreagenz in 1x TBST
CSQ	54	1:1000	MP 5 %	MP 5 %
PP2Ac	36	1:10000	BSA 2 %	MP 5 %
PP5	58	1:1000	MP 5 %	MP 5 %
p-Ser16-PLB	12	1:5000	BSA 2 %	MP 5 %
PLB	12	1:2000	BSA 2 %	MP 5 %
p38	38	1:1000	BSA 5 %	MP 5 %
p-p38	38	1:1000	BSA 5 %	MP 5 %
SERCA	96	1:1000	BSA 5 %	MP 5 %
Akt	60	1:2000	BSA 5 %	MP 5 %
p-Akt	60	1:1000	BSA 5 %	BSA 5 %
Tnl	30	1:1000	BSA 2 %	BSA 2 %
p-Tnl	30	1:1000	BSA 2 %	BSA 2 %
CS	45	1:1000	MP 5 %	MP 5 %

Die quantitative Auswertung der Proteine erfolgte mit der ImageQuant Software durch dreidimensionale Densitometrie. Die Hintergrundfluoreszenz wurde vom Gesamtsignal subtrahiert. Die Signale wurden rechnerisch über die Fläche unter der Kurve (AUC) ermittelt. Das CSQ-Signal jeder Probe diente als Standard. Alle zu bestimmenden Proteinmengen wurden relativ zur Stärke der CSQ-Bande wie folgt berechnet:

$$\text{relative Menge an Protein} = \frac{\text{AUC (Protein)}}{\text{AUC (CSQ)}}$$

Die Proteinmengen der phosphorylierten Proteine wurden entsprechend ihres unphosphorylierten Gesamtproteins wie folgt ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{relative Menge an phosphoryliertem Protein} = \frac{\text{AUC (Phosphoprotein)}}{\text{AUC (Gesamtprotein)}}$$

### 3.3.7 Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivität

Die Versuche erfolgten in Zusammenarbeit mit PD Dr. Peter Boknik aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Münster.

#### 3.3.7.1 Herstellung <sup>32</sup>P-markierter Phosphorylase a

Für die Herstellung der <sup>32</sup>P-markierten Phosphorylase a wurde radioaktives Orthophosphat mittels Phosphorylase Kinase an einem Serin-Rest (Ser14) der AMP-abhängigen Phosphorylase b eingebaut (Ahmad et al. 1989; DePaoli-Roach 1984). Dazu wurde die Phosphorylase-Kinase-Lösung mit 2 mCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP für 150 min bei 30 °C inkubiert. Die <sup>32</sup>P-

markierte Phosphorylase a wurde zweimal durch Zugabe von 3 Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und anschließend jeweils für 20 min zentrifugiert (12000 x g, 4 °C). Die gefällten Proteine wurden in 4 ml Dialysepuffer in einem semipermeablen Dialyseschlauch zweimal gegen je 5 l Puffer für 8 h dialysiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Das Produkt der Phosphorylierungsreaktion, die <sup>32</sup>P-markierte-AMP-unabhängige Phosphorylase a, diente als Substrat für die endogene PP1 und PP2A.

### **3.3.7.2 Durchführung Proteinphosphatase Assay**

Der PP-Assay wurde mit der hergestellten <sup>32</sup>P-markierten Phosphorylase a nach (Neumann et al. 1991) durchgeführt. Als Maß für die PP-Aktivität wurden die Menge an abgespaltenem, radioaktivem Orthophosphat mittels Szintillationszähler bestimmt. 30 µl des Ventrikelhomogenats wurden für 10 min bei 30 °C inkubiert und die Reaktion mit Zugabe von 20 µl [<sup>32</sup>P]-Phosphorylase a enthaltenem Reaktionsansatz gestartet. Die Vorverdünnung des Homogenates mit M1-Puffer wurde in Vorversuchen so optimiert, dass maximal 20 % des freisetzbaren <sup>32</sup>P umgesetzt wurden. Aufgrund des Überangebots der <sup>32</sup>P-markierten Phosphorylase a wurde damit eine lineare Dephosphorylierungsreaktion sichergestellt.

Nach 30 min bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 50%iger-Trichloressigsäure und 30 µl 2%-igem-BSA beendet und alle Proteine für 10 min auf Eis gefällt und durch 5 min Zentrifugation bei 15000 x g sedimentiert. Das verbliebene freie radioaktive Phosphat wurde im Szintillationszähler gemessen. Zur Unterscheidung zwischen der PP1- und PP2A-Aktivität wurden 3 nM des PP-Inhibitors Okadasäure eingesetzt. Bei dieser Konzentration von Okadasäure wird fast ausschließlich die PP2A gehemmt (Ishihara et al. 1989; Tachibana et al. 1981).

## **3.4 Molekularbiologische Methoden**

### **3.4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Mausherzgewebe**

Am Versuchstag wurden 50 ml Homogenisationspuffer frisch filtriert (0,22 µm) und 0,028 g ATP hinzugegeben. 50 ml des Mitochondrienisolationspuffers wurden nach Filtration (0,22 µm) mit einer Tablette *cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail* versetzt. Zur Isolierung von Mitochondrien aus frischem Mausherzgewebe wurden jeweils drei Herzen vereint, da die Ausbeute aus einem Herz nicht genügend Material erbrachte, um Folgearbeiten durchführen zu können. Die frisch entnommenen Herzen wurden in 0,9%iger NaCl blutfrei gespült. Ein kleiner Teil jedes Herzens wurde mit einer Schere abgetrennt und bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Diese Herzstücke dienten als Kontrolle im folgenden Western Blot und wurden später, wie in 3.3.1 beschrieben, pulverisiert und homogenisiert. Die Restherzen wurden in ca. 5 ml Homogenisationspuffer mit einer Schere zerkleinert und von Thromben entfernt. Es folgte eine weitere Zerkleinerung der Herzen im Ultraturrax für 3 mal 15 s auf

höchster Stufe. Die Suspension wurde anschließend bei 1000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt die subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM) und im Sediment die interfibrillären Mitochondrien (IFM). Die SSM-Fraktion wurde in einen Gewebehomogenisator nach Potter-Elvehjem überführt und per Hand einmal homogenisiert. Die IFM-Fraktion wurde mit 8 U Nargase/g Herzgewicht für eine Minute auf Eis inkubiert und 5-mal händisch im Gewebehomogenisator zerkleinert. Die so aufbereiteten SSM und IFM wurden 10 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in 2ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf®) überführt und anschließend bei 8000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 1 ml Puffer verworfen, das Sediment in dem verbleibenden Puffer resuspendiert und die Inhalte der Reaktionsgefäße so zusammengeführt bis nur noch ein Gefäß vorhanden war. Der Überstand des letzten Sediments wurde verworfen und das Sediment in 100 µl Mitochondrienisolationpuffer resuspendiert. Die suspendierten Mitochondrien wurden auf 10 ml einer 30%-igen Percoll®-Lösung in einem Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben und bei 50000 x g für 30 min bei 4 °C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Diese Dichtegradientenzentrifugation diente zur Trennung der Mitochondrien von Verunreinigungen wie anderen Zellkompartimenten. Nach erfolgter Zentrifugation bildete sich ein oberer Ring bestehend aus Verunreinigungen und ein unterer Ring bestehend aus den Mitochondrien. Der obere Ring wurde verworfen. Die Mitochondrien im unteren Ring wurden in einem Reaktionsgefäß gesammelt und anschließend durch mehrmalige Zentrifugation (10400 x g, 10 min, 4 °C) von der Percoll®-Lösung getrennt. Dabei wurde nach jedem Zentrifugationsschritt die obere Hälfte des Percoll®-haltigen Überstandes verworfen und das Sediment, nach Zugabe der entsprechenden Menge von Mitochondrienisolationpuffer, anschließend resuspendiert. Dieser Vorgang wurde bis zum festen Absetzen eines Sediments wiederholt. Das entstandene Sediment wurde in 100 µl Mitochondrienisolationpuffer resuspendiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **3.4.2 Arbeiten mit RNA**

#### **3.4.2.1 RNA-Isolierung**

Zur Isolierung von RNA wurde das in Kapitel 3.3.1 eingefrorene Ventrikelpulver mit 1 ml TRIzol® bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde die Probe kurz geschwenkt und wiederum 5 min inkubiert. Im Anschluss fand eine Zentrifugation der Probe bei 10000 rpm (Zentrifuge 5424R mit Rotor FA-45-24-11, Eppendorf) für 5 min bei 4 °C statt. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit einem Volumenteil Isopropanol versetzt und gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte für 15 min bei RT mit anschließender Abtrennung mittels Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min bei 4 °C. Die RNA-Sedimente wurden nach Verwerfen des Überstands mit 0,9 ml 75 %igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert

(10000 rpm, 5 min, 4 °C) und nochmals auf gleiche Weise gewaschen. Die extrahierte RNA wurde getrocknet, in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen, bei 60 °C für 10 min inkubiert und danach mit 1 µl RNase-Inhibitor versetzt.

### 3.4.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde photometrisch bei 260 nm und 280 nm mit einer Verdünnung von 1:50 in TE-Puffer mittels Eppendorf Biophotometer gemessen. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm diente der Bestimmung der Reinheit der Probe und sollte ca. zwei sein (Abbildung 15 C, Seite 28).

### 3.4.2.3 RNA-Qualitätsbestimmung mittels Elektrophorese

Zur Herstellung des Gels wurden 0,3 g Agarose in 3 ml 10x FA-Puffer und 27 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht, anschließend mit 1,5 ml Formaldehyd und 3 µl RedSafe versetzt und in die Gelvorrichtung inkl. Probenkamm gegossen. Nach erfolgter Gelierung wurde der Kamm entfernt und die Gelkammer mit 1x FA-Puffer befüllt. Die RNA-Proben wurden wie folgt vorbereitet: 2 µg RNA wurden mit 5x RNA-Ladepuffer versetzt und mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Als Standard wurden 5 µl eines 1 kB DNA-Standards verwendet. Die Elektrophorese fand für ca. 30 min bei 100 mA statt. Nach dem Lauf wurde der Farbstoff im Gel mit UV-Licht bei 254 nm angeregt und die Fluoreszenz mit der Software AlphaDigiDoc® aufgezeichnet. Zur Überprüfung der Qualität der RNA wurden die Bandenintensitäten der 28S-rRNA (4718 Nukleotide) und 18S-rRNA (1874 Nukleotide) bestimmt (Abbildung 15 A). Das Verhältnis 28S/18S-rRNA sollte ca. 2:1 betragen um eine Degradierung der RNA auszuschließen (Abbildung 15 B).

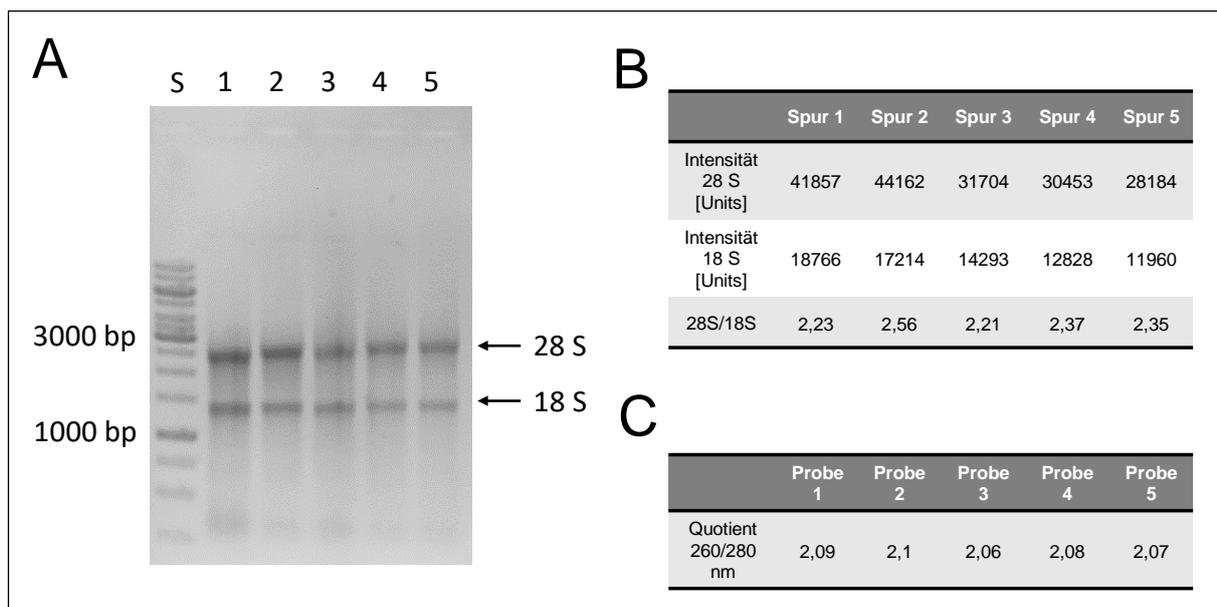


Abbildung 15: RNA-Qualitätsbestimmung mittels Elektrophorese und photometrischer Bestimmung.  
**A:** Exemplarische Darstellung einer Agarose-Gelelektrophorese von isolierter RNA aus Mausherzgewebe,

**B:** Beispielhafte Berechnung der Qualitätsbestimmung der RNA aus Mausherzgewebe mittels 28S/18S-Quotient, **C:** Beispielhafte Werte des Quotienten 260/280 nm anhand photometrischer Bestimmung. Standard (S) 1 kb DNA Leiter

#### 3.4.2.4 dsDNAse-Verdau und cDNA-Synthese

Der dsDNAse Verdau und die cDNA-Synthese wurden mit Hilfe des Kits *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNAse* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde so vorverdünnt, dass eine Menge von 5 µg RNA pro Probenansatz erreicht wurde. Als Kontrolle wurde zu jeder Probe ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (-RT) mitgeführt. Um die Reinheit aller Lösungen zu gewährleisten wurde eine Probe ohne RNA als Negativkontrolle (NTC) ebenso mitgeführt. Die fertige cDNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.4.2.5 Real-Time Quantitative PCR (qPCR)

Das Template für die qPCR war die erstellte cDNA aus Kapitel 3.4.2.4. Die qPCRs wurden mit dem Kit *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde ein Probenansatz von 10 µl gewählt, welcher je 500 nM jedes Primers und 100 ng der jeweiligen cDNA enthielt. Das PCR-Protokoll ist in Tabelle 3 dargestellt. Im Anschluss an die Vervielfältigung der cDNA wurde eine Schmelzkurve von 65 °C bis 95 °C in 0,5 °C Schritten durchgeführt. Abbildung 16 zeigt den Ablauf der qPCR mit anschließender Schmelzkurve. Als Standard wurde die Gensequenz von GAPDH, einem ubiquitär vorkommenden Enzym verwendet. Zur quantitativen Auswertung wurde die Differenz der CT-Werte des zu bestimmenden Gens und der CT-Werte von GAPDH derselben Probe ermittelt, sodass sich für jedes Tier und Gen ein  $\Delta$ CT-Wert ergeben hat. Die  $\Delta$ CT-Werte der transgenen Tiere wurden auf die  $\Delta$ CT-Werte der WT-Tiere gemittelt und unter Anwendung der  $2^{-\Delta$ CT-Methode die Transkription quantitativ ausgewertet (Livak und Schmittgen 2001).

Tabelle 3: qPCR-Programm zur Bestimmung der Transkription kardialer Gene

Programm	Temp. [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	95	5	40
Annealing/Elongation	60	30	
Final	95	10	1

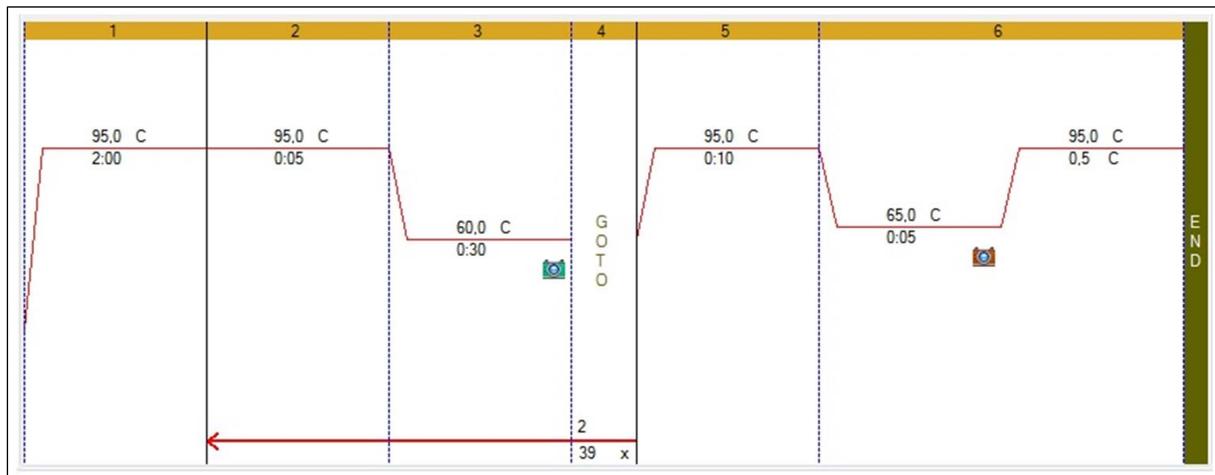


Abbildung 16: Darstellung des qPCR-Programms zur Bestimmung der Transkription kardialer Gene mit anschließender Schmelzkurve

### 3.4.3 Arbeiten mit DNA

#### 3.4.3.1 DNA-Isolierung

Die Genotypisierung der jeweiligen Mauslinien erfolgte durch eine Schwanzspitzenbiopsie. Die Schwanzspitzenbiopsien (2 mm) wurden zur DNA-Freisetzung durch alkalische Hydrolyse über Nacht in 250 µl Extraktionslösung-1 bei 56 °C schüttelnd inkubiert. Nach anschließender Neutralisation durch Zugabe von 250 µl Extraktionslösung-2 konnte der Extrakt für die anschließende PCR verwendet werden.

#### 3.4.4 PCR

Die in 3.4.3 verdauten Schwanzspitzen wurden als DNA-Grundlage für die folgende PCR verwendet. Die PCR ermöglicht die Amplifizierung einer ausgewählten Nukleotidsequenz mittels des Enzyms Taq-Polymerase. Die Probenvorbereitung erfolgte nach Angaben des Herstellers zur Verwendung des 2x Super Master Mix. Zur Amplifizierung der PP2A wurden die Primer MHC-SEQ-P1 und PP2A-SEQ-P1R verwendet. Die Amplifizierung der PP5-Sequenz erfolgte mit den Primern MHC-SEQ-P1 und rPP5-SEQ-P3R. Pro Ansatz wurde 1 µl DNA-Template verwendet. Das PCR-Programm für die Genabschnitte der PP2A und PP5 ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Probe wurde bis zur Entnahme aus dem Thermocycler bei 16 °C gekühlt.

Tabelle 4: PCR-Programm für die Amplifizierung der PP2A- und PP5-Sequenz

Programm	Temp. [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	300	1
Denaturierung	94	30	30
Annealing	60	30	
Elongation	72	120	
Finale Elongation	72	300	1

### **3.4.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte mit einer Agarosegelelektrophorese. Zur Herstellung des Gels wurden 0,8 % Agarose in der entsprechenden Menge 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Es erfolgte anschließend die Zugabe von 2 µl Farbstoff (RedSafe™), der es durch Interkalation in die doppelsträngige DNA ermöglichte, die Gele nach der Auftrennung auf einem Transilluminator auszuwerten und die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar zu machen. Nach Abkühlen und Gelierung der Gelmasse wurden die Proben in die dafür vorgesehenen Taschen zu 20 µl aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V in 1x TAE-Puffer. Die Zugabe von 1 µl eines DNA-Standards (Gene Ruler 100 bp, Thermo Scientific) ermöglichte die Größenbestimmung der aufgetrennten Nukleotidbanden jeder Probe.

## **3.5 Immunologische Methoden**

Die Versuche erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Max Rieckmann und Dr. Gustavo Ramos aus dem Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III (Kardiologie und Angiologie) des Universitätsklinikums Halle.

### **3.5.1 Indirekte Immunofluoreszenz**

Das Prinzip der Methode basiert auf dem indirekten Sichtbarmachen von Autoantikörpern aus dem Serum von WT und PP2A-Tieren mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gegen murines IgG und IgM. Zur Detektion der Autoantikörper, dienen die Herzschnitte von B-Zell-defizienten Mäusen als Grundlage. Da sie in Ihrem Gewebe keine B-Zellen besitzen, können sie keine Immunglobuline bilden und werden als Negativkontrolle gehandhabt. Die Gefrierschnitte wurden zur Weiterverarbeitung aufgetaut und anschließend getrocknet. Zur Fixierung wurden sie für 10 min bei -20 °C in Aceton eingelegt und mit phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) drei mal 5 min gewaschen. Der Gewebsausschnitt wurde mit einem hydrophoben Stift auf dem Objektträger umkreist um eine Barriere zu erzeugen und die notwendigen Volumina der verwendeten Lösungen klein zu halten. Zur Vermeidung der Austrocknung lagerten die Schnitte ständig in einer Feuchtekammer.

Der erste Blockierungsschritt unter Zugabe von 30 - 50 µl carbogenfreier Blockierungslösung erfolgte für 30 min bei RT, gefolgt von einem Waschschrift mit PBS für dreimal 5 min. Zur Markierung wurden die Schnitte 1 h bei RT mit verdünntem Serum (Verdünnung 1:20 in Carbogenfreier Blockierungslösung) von WT- und PP2A-Mäusen inkubiert und anschließend mit PBS für 3 mal 5 min gewaschen. In diesem Schritt binden die Antikörper des Serums an die Antigene der Schnitte der B-Zell-defizienten Mäuse. Es wurde eine Menge von je 60 µl aufgetragen. Von jedem aufgetragenen Reagenz wurde eine Kontrollprobe erstellt, welche keinen Primärantikörper enthält um das Ausmaß der unspezifischen Bindung des

Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpers an der Oberfläche zu erkennen. Es folgte ein weiterer Waschschrift von drei mal 5 min mit PBS-Tween. Die Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörper gegen murines IgG (Alexa Fluor 488) und IgM (Alexa Fluor 546) wurden vor ihrer Verwendung 1:200 in Blockierungspuffer verdünnt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 30 min bei Dunkelheit in der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert. Vor Beendigung der Inkubation wurden zur Sichtbarmachung der Zellekerne 5 µl einer Hoechst/DAPI-Lösung für 5 min hinzugegeben, die Schnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet. Die Präparate wurden bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Die Ansicht der Schnitte erfolgte mit einem Axioskop 2 plus (Carl Zeiss Jena GmbH) und entsprechender Software (Axio Vision). Alle Präparate wurden für eine kurze Zeit (um ein Ausbleichen zu verhindern) mit UV-Licht angeregt, um die entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar zu machen. Die Aufnahme der verschiedenen Fluoreszenzen erfolgte mit den entsprechenden Filtern jeweils als 16 bit Graustufenbild und die quantitative Auswertung wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt, wobei die Intensitäten anhand der Graustufen ermittelt wurden.

### **3.5.2 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die Durchflusszytometrie untersucht die Eigenschaften von fluoreszenzmarkierten Zellen in Zellsuspensionen. Dabei werden die Zellen nach ihren Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von einem Laser angeregt und sortiert. Das individuelle Streulicht ermöglicht die Charakterisierung der Struktur und des Volumens jeder einzelnen Zelle. Über einen Photomultiplier wird das Emissionslicht detektiert und in elektrische Signale umgewandelt. Die Auswertung der Signale erfolgt über sogenannte Dot Plots, welche die Seitwärtsstreuung (Side Scatter, SSC) und Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC) der Zellen veranschaulichen. Schlüsse über die Zellgranulität können aus der SSC gezogen werden, wobei die FSC Aussagen über die Zellgröße macht.

#### **3.5.2.1 Vorbereitung der Proben**

Zur Analyse im Durchflusszytometer wurden das perfundierte Herz, die mediastinalen und subiliakalen Lymphknoten, sowie die Milz von WT- und PP2A-Tieren verwendet (siehe 3.2.1). Das entnommene Gewebe wurde 30 min bei 37 °C in einer Verdauungslösung (RPMI-Medium inkl. 1000 I.E./ml Kollagenase) inkubiert und anschließend wieder auf RT gebracht um die Reaktion zu stoppen. Die verdauten Gewebeteile wurden durch ein 70 µm Zellsieb gegeben und damit die groben Gewebeteile vom flüssigen Überstand getrennt. Das Zellsieb wurde mit HBSS/BSA-Puffer gewaschen bis der Zelldurchlauf auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt wurde. Durch eine Zentrifugation bei 400 x g für 5 min bei 4 °C wurden die Zellen sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 250 ml FACS-Puffer resuspendiert und mit der Färbung fortgeföhren.

### 3.5.2.2 Oberflächenfärbung

Die Zellen wurden zu maximal  $10^6$  Zellen pro Kavität in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit v-förmigem Boden gebracht. Nach der anschließenden Zentrifugation (400 x g, 3 min, 4 °C) wurden die Überstände verworfen und das Zellsediment mit je 25 µl pro Kavität einer Antikörper-Lösung für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die AK-Lösung ist eine 1:500 Verdünnung eines Fc-Rezeptor CD16/32-Antikörpers gelöst in FACS-Puffer. Anschließend wurde der Antikörper-Master-Mix (2x Master Mix in FACS-Puffer) angefertigt und ebenso 25 µl pro Kavität hinzugegeben und 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 150 µl FACS-Puffer pro Kavität gewaschen und zentrifugiert (400 x g, 3 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Sedimente in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung gelagert.

### 3.5.2.3 Messung

Zur Quantifizierung der Zellzahl in den jeweiligen Organen dienten sogenannte 123™ Counting Beads (Invitrogen). Weiterhin wurden aus dem kardialen Gewebe mittels FACS die prozentualen Anteile an Makrophagen, T-Zellen und Granulozyten bestimmt. Aus dem aufbereiteten Gewebe der Lymphknoten und der Milz wurden die prozentualen Anteile an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen bestimmt.

## 3.6 Histologische Methoden

### 3.6.1 Histologische Färbung der Herzen

Für die Anfertigung der histologischen Schnitte wurden die Herzspitzen der Tiere in 4%-iger Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die angefertigten Schnitte wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Methode angefärbt. Die Zellkerne erscheinen bei dieser Übersichtsfärbung blauviolett und das Zellplasma rot (Cardiff et al. 2014). Zur Quantifizierung der Fibrose wurden die Schnitte mit Masson-Goldner-(MG)-Trichromfärbung behandelt. Hierbei färbten sich die Zellkerne braunschwarz, das Zytoplasma rosa und kollagenes Bindegewebe blaugrün (Goldner 1938). Die Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss Mikroskop „Axio Imager Z1“ und einer AxioCam Digital Mikroskopkamera mit anschließender Auswertung über die Software AxioVision (Carl Zeiss Vision, Deutschland). Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Igor Buchwalow (Institut für Hämatopathologie, Fangdieckstraße 75a, 22547 Hamburg) durchgeführt.

## 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Zur Auswertung von Unterschieden in zwei Gruppen wurde der *Students* t-Test (unverbunden und verbunden) angewandt. Für Vergleiche von mehr als zwei Gruppen (Variablen), wurden ein- oder mehrfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) mit Post-hoc-Tests

nach Bonferroni zum Vergleich von Mittelwerten durchgeführt. Es wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) angegeben. Wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 erreicht, so wurde das Ergebnis als statistisch signifikant deklariert. Die Bezeichnung „n“ steht für die Anzahl der verwendeten Tiere.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genotypisierung

Wie in den Kapitel 3.4.3, 3.4.4 und 3.4.5 beschrieben, wurde der Genotyp jedes Tieres durch die DNA-Isolierung aus den Schwanzspitzen mit nachfolgender Amplifizierung der zu ermittelnden DNA-Sequenzen mittels PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese ermittelt. Entsprechend ihrer Sequenzlänge zeigten PP2A-transgene Tiere eine Bande bei 680 bp und PP5-transgene Tiere eine Bande bei 618 bp auf. PP2AxPP5 doppelt transgene Tiere konnten durch das Auftreten einer PP2A- und einer PP5-Bande ermittelt werden. Proben, die keine Bande zeigten, wurden als WT-Tiere identifiziert. Abbildung 17 zeigt als Beispiel das Ergebnis einer Genotypisierung.

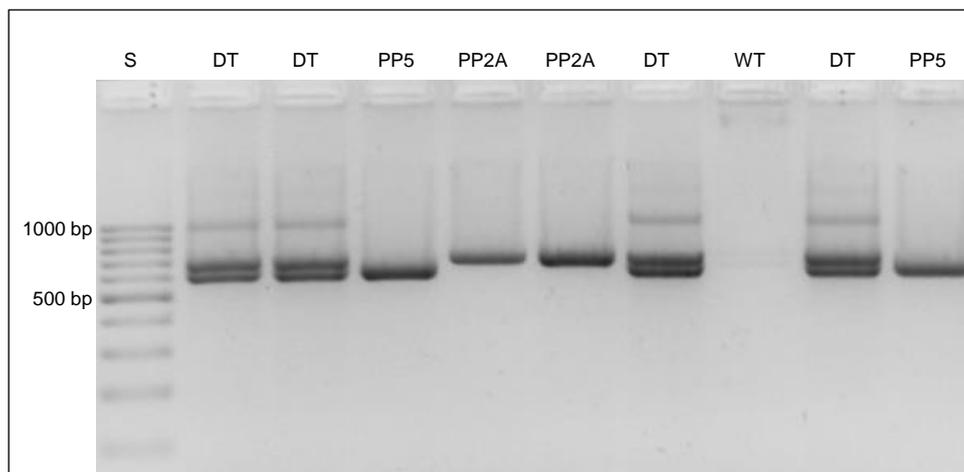


Abbildung 17: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte aus Schwanzspitzen-DNA zur Genotypisierung. S...DNA-Standard, Gene Ruler 100bp DNA Leiter

## 4.2 Phänotyp

### 4.2.1 Kaplan-Meier-Überlebenswahrscheinlichkeit

Mittels Kaplan-Meier-Statistik wurde eine Überlebenszeitanalyse von WT-Tieren, PP2A transgenen Tieren, PP5 transgenen Tieren und PP2AxPP5 doppelt transgenen Tieren ermittelt (Kaplan und Meier 1958; Zwiener et al. 2011). Alle Tiere wurden bis zu einer maximalen Lebensdauer von 315 Tagen beobachtet. Innerhalb dieses Zeitraums ist keines der WT-Tiere verstorben (Überleben nach 315 Tagen: 100 %,  $n_{\text{gesamt}} = 10$ ). Von den PP2A- und PP5-Tieren haben 92,3 % den Beobachtungszeitraum überlebt ( $n_{\text{gesamt}} = 13$ ). In allen drei Gruppen konnte aufgrund der hohen Überlebensrate kein mittleres Überleben statistisch berechnet werden. Mit Sicherheit kann man nur sagen, dass es bei mehr als 315 Tagen liegt. Die Überlebensstatistik der PP2AxPP5 Tiere dahingegen unterschied sich signifikant von den anderen Gruppen (Log-Rank Test  $p < 0,05$  vs. WT, PP2A, PP5). Das mittlere Überleben dieser Tiere, der Wert bei dem noch 50 % der Gruppe leben, liegt bei 236 Tagen ( $n_{\text{gesamt}} = 25$ ). Zum Ende der

Beobachtungszeit bei 315 Tagen lebten noch 32 % der doppelt transgenen Tiere. Damit wiesen die PP2AxPP5 Tiere ein deutlich höheres Sterblichkeitsrisiko im Vergleich zu WT (Hazard Ratio (HR) = 5,25), PP2A-TG (HR = 5,0) und PP5-TG (HR = 5,06) auf (Abbildung 18, Zwiener et al. 2011).

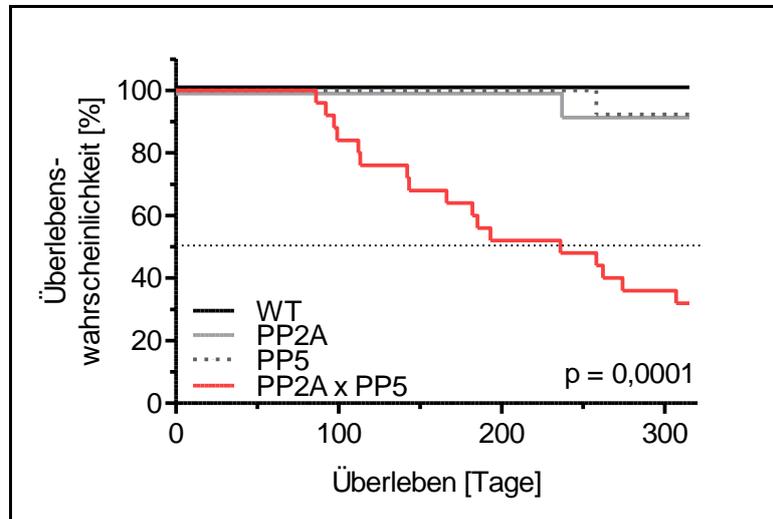


Abbildung 18: Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von WT-, PP2A-, PP5- und PP2AxPP5-Tieren. WT: n = 10; PP2A: n = 13; PP5: n = 13; PP2AxPP5: n = 25

Um Geschlechtsunterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere erfassen zu können, wurde eine entsprechende Kaplan-Meier-Statistik der weiblichen und männlichen PP2AxPP5 Tiere erhoben (Abbildung 19). Das mittlere Überleben war dabei statistisch nicht verschieden (männlich: 236 Tage;  $n_{\text{gesamt}} = 14$  vs. weiblich: 225,5 Tage;  $n_{\text{gesamt}} = 11$ ;  $p = 1,0$ ; HR = 1,0). Nach einem Zeitraum von 315 Tagen lebten noch 36,4 % der weiblichen Tiere und 28,6 % der männlichen Tiere.

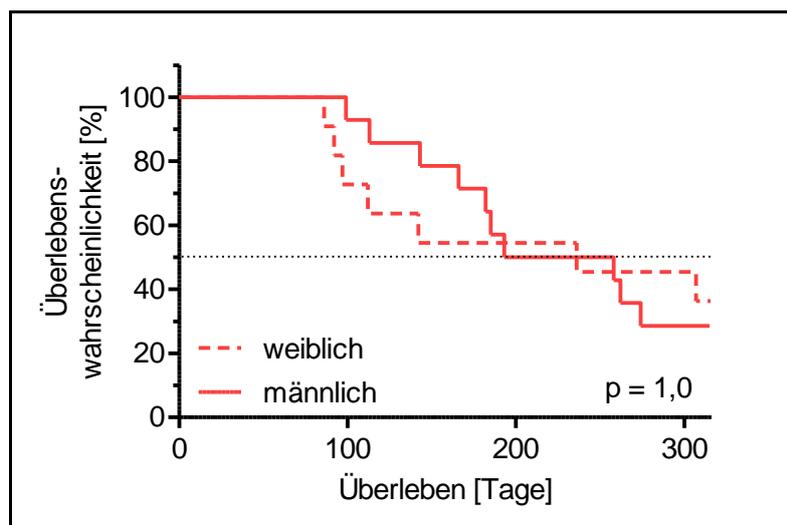


Abbildung 19: Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von weiblichen und männlichen PP2AxPP5-Tieren. weiblich: n = 11; männlich: n = 14

#### 4.2.2 Morphologische Parameter

Die Bestimmung verschiedener morphologischer Parameter diente der besseren Charakterisierung der Tiere. Neben dem Herzgewicht und dem Körpergewicht wurde, als Maß für eine kardiale Hypertrophie, das relative Herzgewicht als Herzgewicht-Körpergewicht-Quotient ermittelt. In der jungen Altersgruppe zeigte sich ein erhöhtes relatives Herzgewicht sowohl bei den PP2A transgenen Tieren ( $9,11 \pm 0,34$  mg/g vs.  $7,34 \pm 0,15$  mg/g;  $p < 0,05$ ), als auch bei den PP2AxPP5 doppelt transgenen Tieren ( $9,68 \pm 0,93$  mg/g vs.  $7,34 \pm 0,15$  mg/g;  $p < 0,05$ ; Abbildung 20 A) im Vergleich zum WT. Betrachtet man die alten Tiere, konnte nur bei den PP2A transgenen Tieren ein erhöhtes relatives Herzgewicht im Vergleich zum WT bestimmt werden ( $9,99 \pm 0,75$  mg/g vs.  $7,30 \pm 0,33$  mg/g;  $p < 0,05$ ; Abbildung 20 A). Bemerkenswerterweise trat nur bei den alten PP2AxPP5 Mäusen eine Erhöhung des Körpergewichts im Vergleich zum WT auf ( $47,94 \pm 2,23$  g vs.  $41,39 \pm 1,11$  g;  $p < 0,05$ ; Abbildung 20 C). Das absolute Herzgewicht war ausschließlich bei den jungen PP2AxPP5 Tieren ( $370,7 \pm 32,1$  mg vs.  $256,9 \pm 11,7$  mg;  $p < 0,05$ ; Abbildung 20 B) und bei den alten PP2A Tieren ( $401,6 \pm 28,2$  mg vs.  $300,8 \pm 14,2$  mg;  $p < 0,05$ ; Abbildung 20 B) erhöht im Vergleich zum gleichaltrigen WT. Es konnte demnach eine kardiale Hypertrophie, basierend auf einem erhöhten Herzgewicht-Körpergewicht-Quotienten, bei den jungen und alten PP2A-Tieren und bei den jungen PP2AxPP5-Tieren bestimmt werden.

Trotz eines nicht erhöhten Herzgewicht-Körpergewicht-Quotienten kann man in den alten PP2AxPP5 Tieren von einer kardialen Hypertrophie sprechen. Der Quotient ist in diesen Tieren nicht erhöht basierend auf der Tatsache, dass die alten PP2AxPP5 Tiere an Körpergewicht zugenommen haben im Gegensatz zu den Tieren anderer Genotypen. Abbildung 21 zeigt altersabhängig charakteristische Beispiele der Mausherzen des jeweiligen Genotyps und zeigt sehr deutlich ein stark vergrößertes Herz in den jungen und alten PP2AxPP5-Tieren und bestätigt die Daten aus Abbildung 20. Es wurden weiterhin die Lungen-, Leber- und Nierengewichte der Tiere erhoben (Tabelle 5). Das Lungengewicht der jungen PP2AxPP5 Tiere im Vergleich zum WT und den mono-transgenen Tieren war erhöht. Altersabhängig erhöhte sich das Lungengewicht der WT-, PP2A- und PP5-Tiere, jedoch blieb das der PP2AxPP5-Tiere konstant. Die Lebergewichte aller jungen Tiere waren unverändert zum WT, wohingegen sich altersabhängig eine Erhöhung des Lebergewichts bei den WT, PP2A und PP2AxPP5-Tieren zeigte (Tabelle 5). Dementsprechend war das Lebergewicht der PP5-Tiere im Alter verringert im Vergleich zu allen anderen gleichaltrigen Tieren. Die Nierengewichte waren in allen Tieren unverändert.

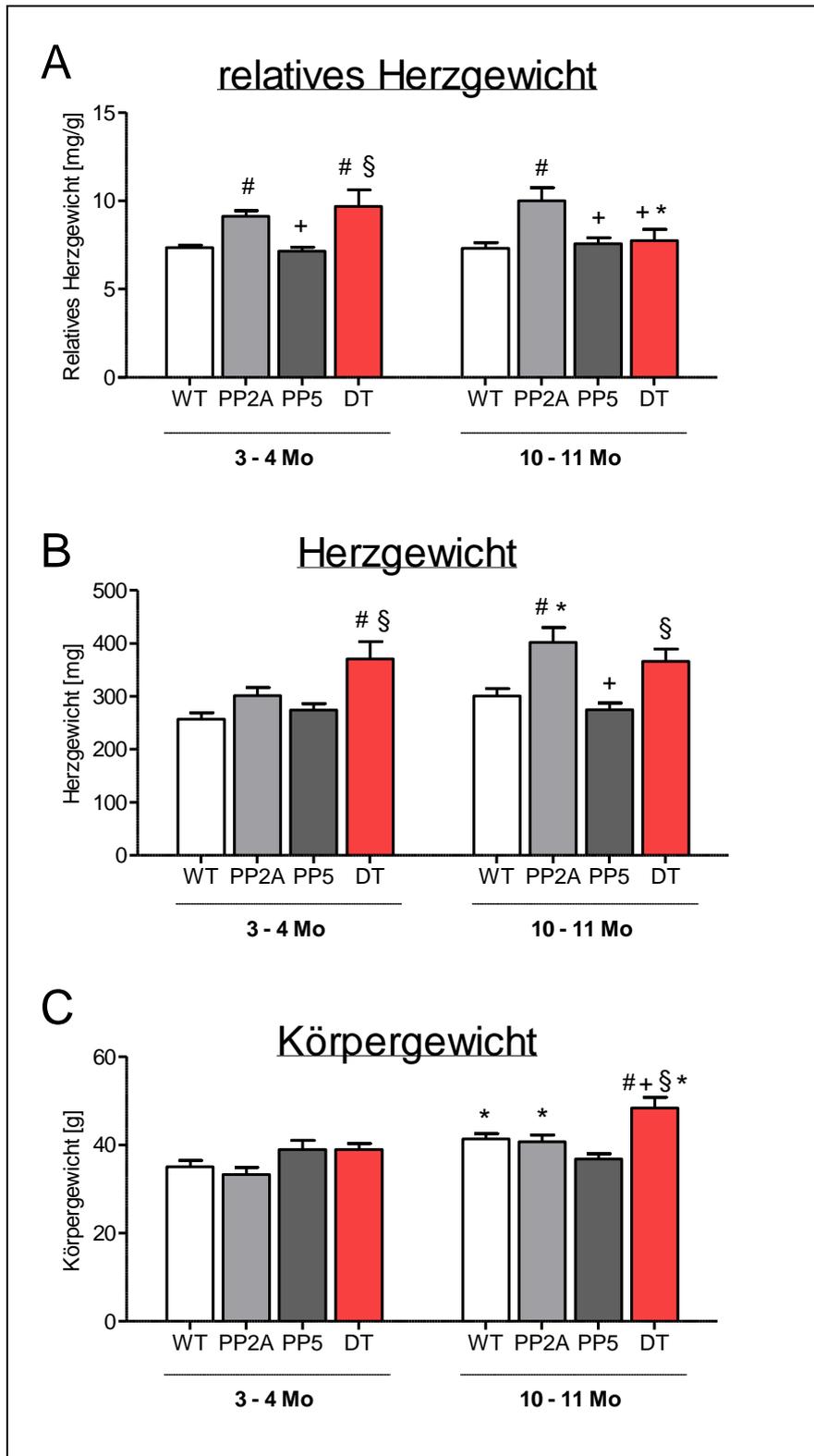


Abbildung 20: Vergleich von Herz- und Körpergewichten der jungen und alten Tiere des jeweiligen Genotyps. **A:** Relatives Herzgewicht; **B:** Herzgewicht; **C:** Körpergewicht; jung: WT: n = 24; PP2A: n = 18; PP5: n = 18; PP2A<sup>x</sup>PP5: n = 14; alt: WT: n = 15; PP2A: n = 13; PP5: n = 22; PP2A<sup>x</sup>PP5: n = 11; #p < 0,05 vs. WT; +p < 0,05 vs. PP2A; §p < 0,05 vs. PP5; \*p < 0,05 vs. 3 - 4 Monate.

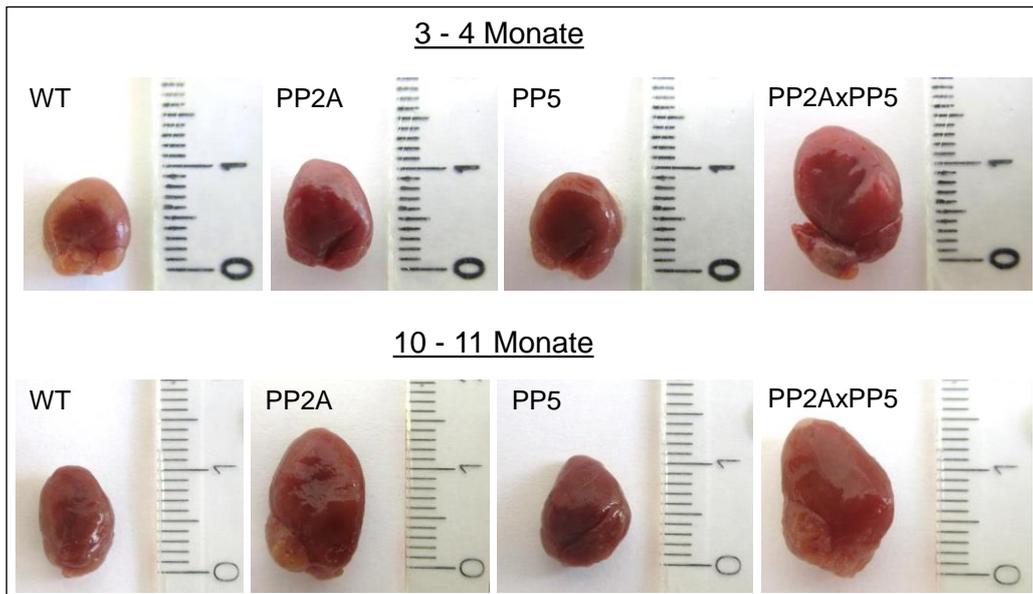


Abbildung 21: Darstellung charakteristischer Mausherzen des jeweiligen Genotyps im Alter von 3 - 4 Monaten und 10 - 11 Monaten.

Tabelle 5: Organgewichte aller Tiere im Alter von 3 - 4 Monaten und 10 - 11 Monaten. #p < 0,05 vs. WT; +p < 0,05 vs. PP2A; §p < 0,05 vs. PP5; \*p < 0,05 vs. 3 - 4 Monate.

	3 - 4 Monate				10 - 11 Monate			
	WT	PP2A	PP5	DT	WT	PP2A	PP5	DT
<b>n</b>	24	18	20	13	21	19	22	8
<b>m<sub>Lunge</sub> [mg]</b>	220 ± 9	214 ± 8	213 ± 5	262 ± 17 <sup>#+§</sup>	290 ± 7 <sup>*</sup>	311 ± 10 <sup>*§</sup>	245 ± 8 <sup>**</sup>	273 ± 22
<b>n</b>	24	18	20	13	21	19	22	8
<b>m<sub>Leber</sub> [mg]</b>	1878 ± 83	1694 ± 99	1752 ± 85	2025 ± 99	2310 ± 88 <sup>*</sup>	2468 ± 162 <sup>§*</sup>	1846 ± 82 <sup>#</sup>	2695 ± 227 <sup>§*</sup>
<b>n</b>	11	12	19	13	8	8	22	13
<b>m<sub>Niere</sub> [mg]</b>	566 ± 47	523 ± 38	511 ± 39	501 ± 29	587 ± 53	527 ± 48	518 ± 26	573 ± 44

#### 4.2.3 Laborchemische Parameter

Das entnommene Blutplasma wurde zur Bestimmung von Konzentrationen an Elektrolyten und Stoffwechselabbauprodukten herangezogen. Es zeigten sich keine Veränderungen in den Plasmakonzentrationen von Natriumionen, Kreatinin und Harnstoff in den jungen oder alten PP2AxPP5-Tieren im Vergleich zum WT. Lediglich die Natriumionenkonzentration in den alten PP5 transgenen Tieren war verringert im Vergleich zu gleichaltrigen PP2A transgenen Mäusen und die Kreatininwerte von jungen PP5-Tieren waren im Vergleich zu gleichaltrigen PP2A-Mäusen vermindert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Plasmakonzentrationen an Natrium, Kreatinin und Harnstoff in jungen und alten Tieren. +p < 0,05 vs. PP2A.

	WT		PP2A		PP5		PP2AxPP5	
	jung	alt	jung	alt	jung	alt	jung	alt
<b>n</b>	5	5	6	5	6	5	5	5
<b>Na<sup>+</sup> [mM]</b>	150 ± 4	152 ± 1	155 ± 5	157 ± 2	154 ± 3	150 ± 1 <sup>+</sup>	152 ± 1	154 ± 1
<b>n</b>	5	5	5	5	6	4	5	5
<b>Kreatinin [μM]</b>	21,2 ± 2,2	21,4 ± 6,2	32,4 ± 7,5	18,0 ± 2,1	15,7 ± 0,5 <sup>+</sup>	16,0 ± 0,7	16,6 ± 0,9	16,0 ± 0,6
<b>n</b>	5	5	6	5	7	5	5	5
<b>Harnstoff [mM]</b>	8,04 ± 0,81	6,22 ± 0,60	8,40 ± 0,73	7,24 ± 0,50	6,47 ± 0,82	6,56 ± 0,37	8,68 ± 0,75	6,68 ± 0,33

### 4.3 Immunologische Parameter

#### 4.3.1 Kardiale Zellanalyse

Mittels FACS wurden die Subpopulationen von Immunzellen im Herzen von WT- und PP2A-Tieren bestimmt (Abbildung 22). Der Anteil an kardialen Granulozyten in alten PP2A Tieren war erhöht im Vergleich zur jungen Altersgruppe ( $1,38 \pm 0,42$  % vs.  $0,12 \pm 0,08$  %;  $p < 0,05$ ; Abbildung 22 A). Ebenso konnte eine Verringerung an kardialen T-Zellen in den alten PP2A-Tieren im Vergleich zu den jungen PP2A-Tieren festgestellt werden ( $11,24 \pm 1,57$  % vs.  $33,97 \pm 3,97$  %;  $p < 0,05$ ; Abbildung 22 C). Ein statistischer Unterschied zwischen jungen und alten WT-Tieren war bei dieser n-Zahl und der hohen Standardabweichung nicht zu berechnen. Der Anteil an kardialen Monozyten und B-Zellen war in allen Tieren unverändert (Abbildung 22 B, D).

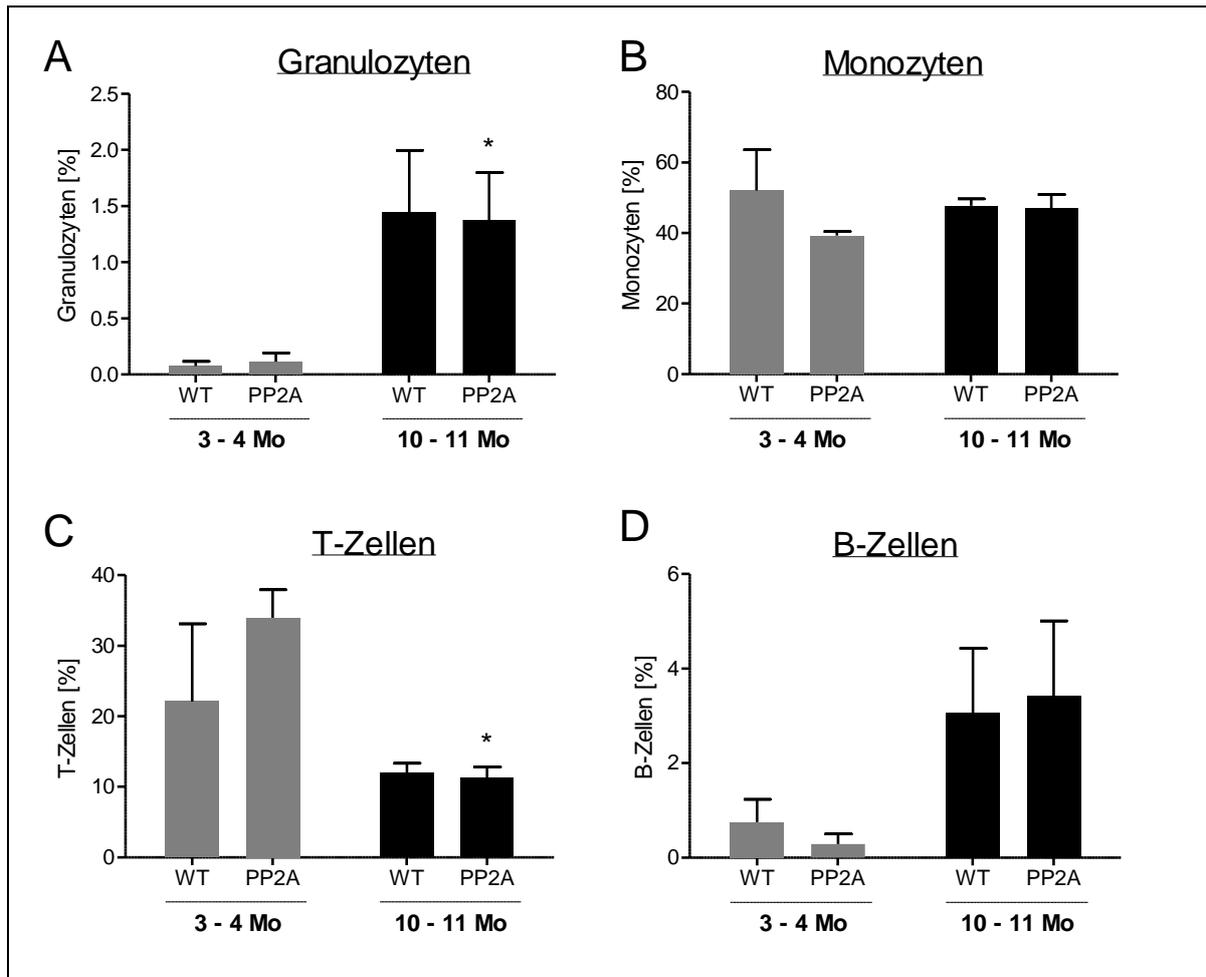


Abbildung 22: Zellsubpopulationen im Herzen von WT- und PP2A-Tieren im Alter von 3 - 4 Monaten ( $n = 3$ ) und 10 - 11 Monaten ( $n = 6$ ). **A:** Zellfrequenz der kardialen Granulozyten; **B:** Zellfrequenz der kardialen Monozyten; **C:** Zellfrequenz der kardialen T-Lymphozyten; **D:** Zellfrequenz der kardialen B-Lymphozyten; \* $p < 0,05$  vs. 3 - 4 Monate.

#### 4.3.2 T-Lymphozytendifferenzierung

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurden die entnommenen mediastinalen und subiliakalen Lymphknoten sowie die Milz zur Analyse des immunologischen Status der Tiere herangezogen. Mittels FACS wurden die Zellsubpopulationen an  $CD4^+$  T-Zellen und  $CD8^+$  T-Zellen in den jeweiligen Tieren und genannten Organen ermittelt. Der Anteil an  $CD4^+$  T-Zellen war in den alten WT- und PP2A-Tieren im Vergleich zu den jungen Tieren des gleichen Genotyps in den mediastinalen Lymphknoten, in den subiliakalen Lymphknoten und in der Milz verringert (Abbildung 23 A, C, E). Unterschiede zwischen gleichaltrigen WT und PP2A transgenen Tieren waren nicht vorhanden. Der Anteil an  $CD8^+$  Zellen war in allen untersuchten lymphatischen Organen unverändert (Abbildung 23 B, D, F).

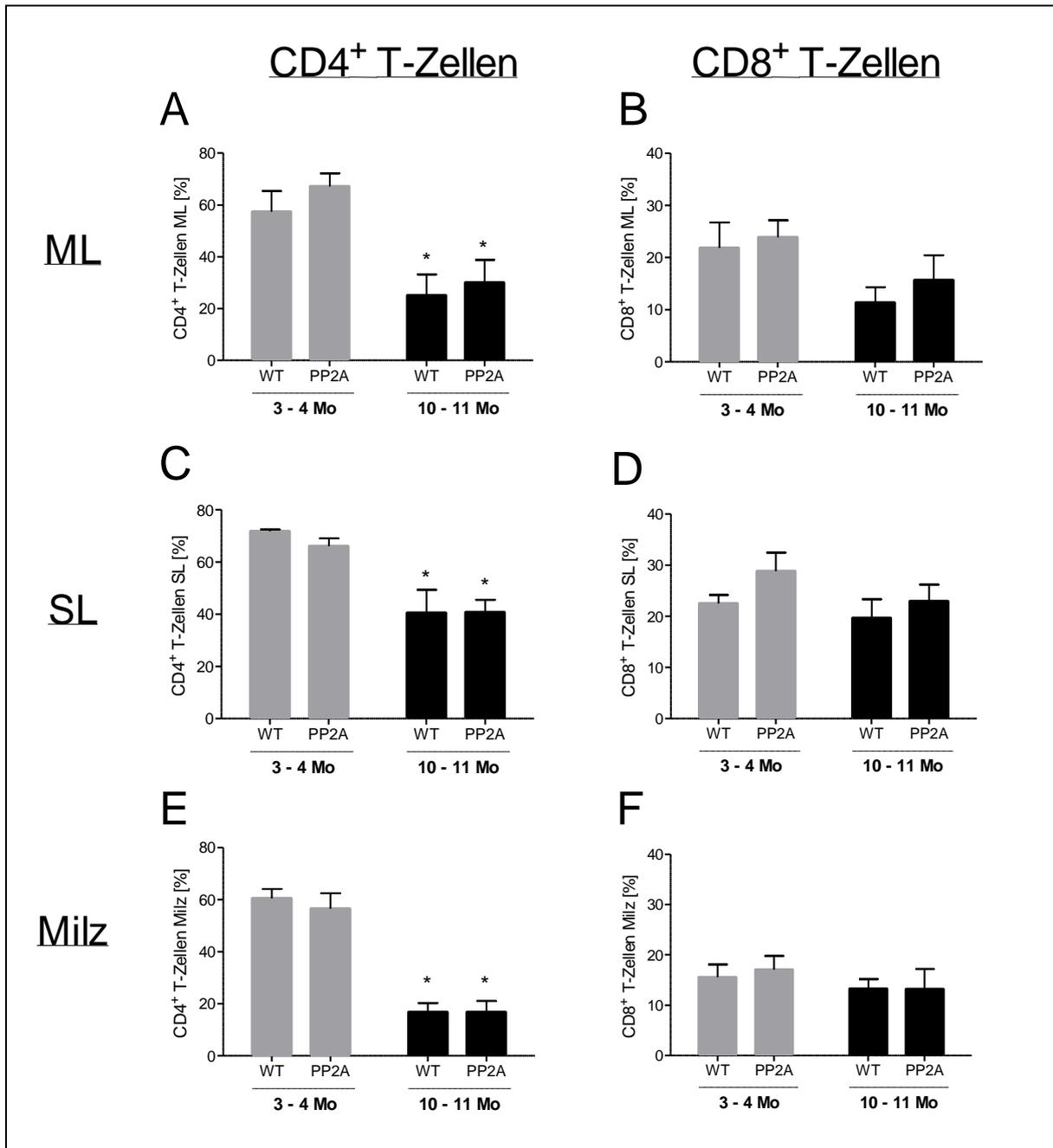


Abbildung 23: Prozentuale Häufigkeit von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in mediastinalen Lymphknoten (ML), subiliakalen Lymphknoten (SL) und in der Milz von 3 - 4 Monate (n = 3) und 10 - 11 Monate (n = 6) alten Tieren; \*p < 0,05 vs. 3 - 4 Monate

#### 4.3.3 Serum-Autoantikörper

Wie in 3.5.1 beschrieben, wurden die Autoantikörper im Serum von WT- und PP2A-Tieren über ein indirektes Immunofluoreszenzverfahren detektiert. In den alten PP2A-Tieren konnte ein erhöhtes Vorkommen von IgG im Vergleich zu den gleichaltrigen WT-Tieren detektiert werden (Abbildung 24 A, B). Nach Auswertung der mittleren Intensitäten gab es im Vorkommen von IgM keine alters- oder genotypabhängigen Veränderungen (Abbildung 24 C, D). Die DNA-Menge war in allen Proben unverändert (Abbildung 24 E, F).

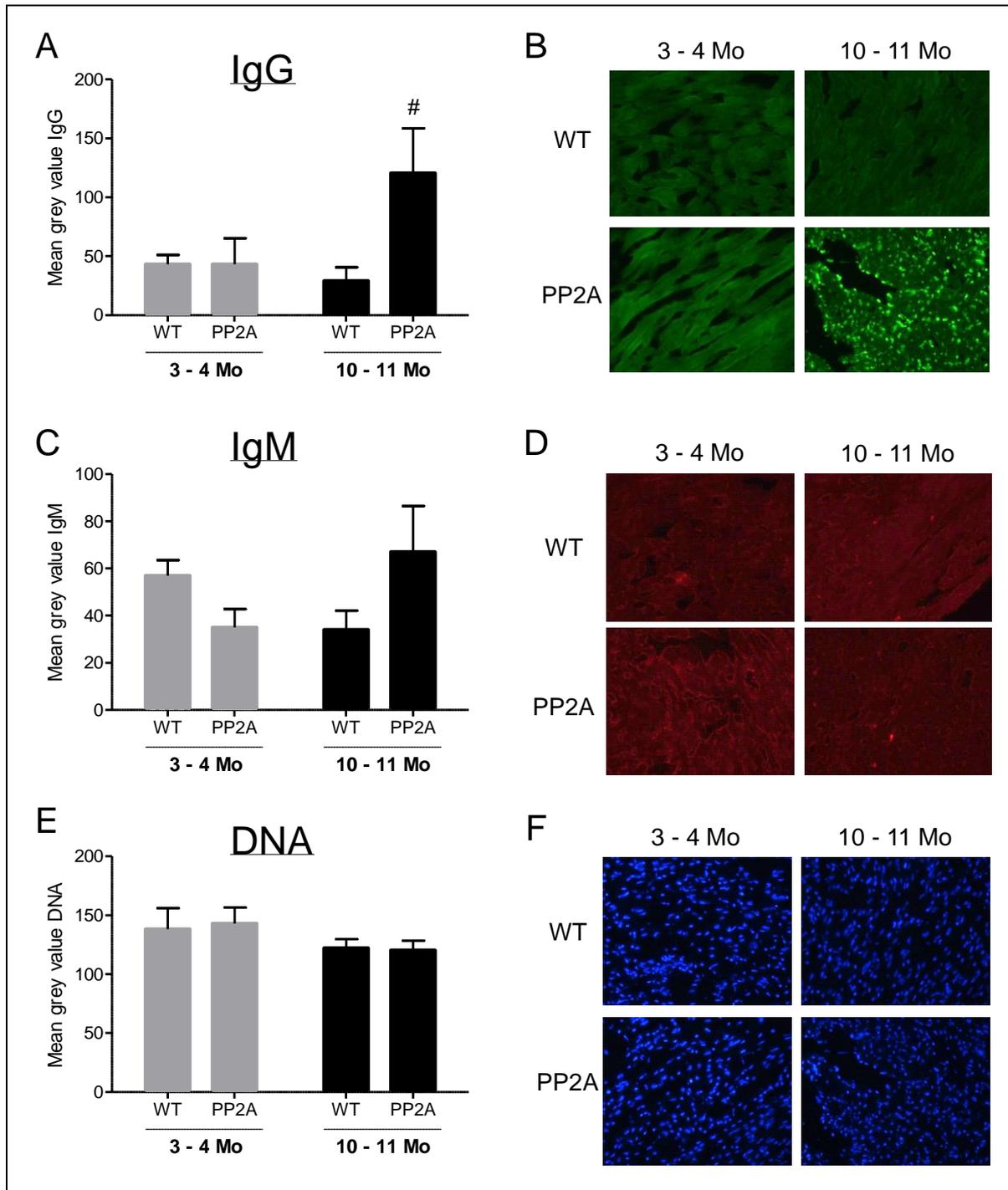


Abbildung 24: Intensität an Serum-Autoantikörpern in jungen und alten WT- und PP2A-Tieren. **A, B:** Auto IgG-Antikörper; **C, D:** Auto IgM-Antikörper; **E, F:** DNA-Färbung (Hoechst). # $p < 0,05$  vs. WT,  $n = 3$ .

## 4.4 Histologie

### 4.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Färbung der Herzschnitte mit Hämatoxylin-Eosin diente als Übersichtsfärbung (Cardiff et al. 2014). Anhand dieser Methode waren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Präparaten sichtbar (Abbildung 25).

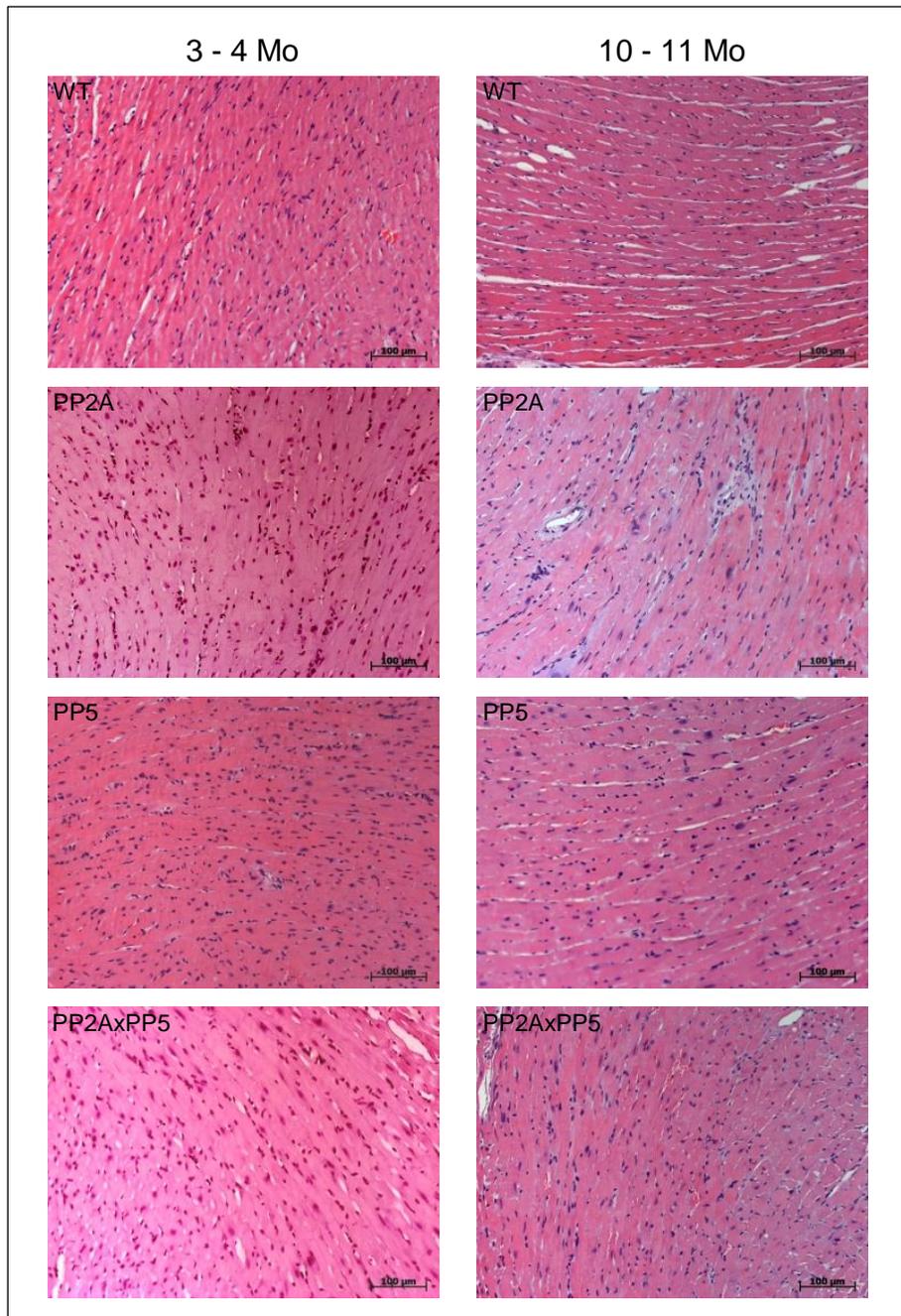


Abbildung 25: Hämatoxylin-Eosin Färbung der Herzschnitte von 3 - 4 Monate und 10 - 11 Monate alten Tieren.

#### 4.4.2 Masson-Goldner-Färbung

Wie in 3.6 beschrieben, wurde eine Fibrose mittels Masson-Goldner Färbung der Herzspitzen beurteilt. Eine vorangeschrittene diffuse, interstitielle Fibrose war in den Präparaten der alten PP2A-Tiere und der alten PP2AxPP5-Tiere anhand der blau gefärbten Bereiche zu sehen. In allen anderen Präparaten waren keine Anzeichen einer Fibrose erkennbar (Abbildung 26).

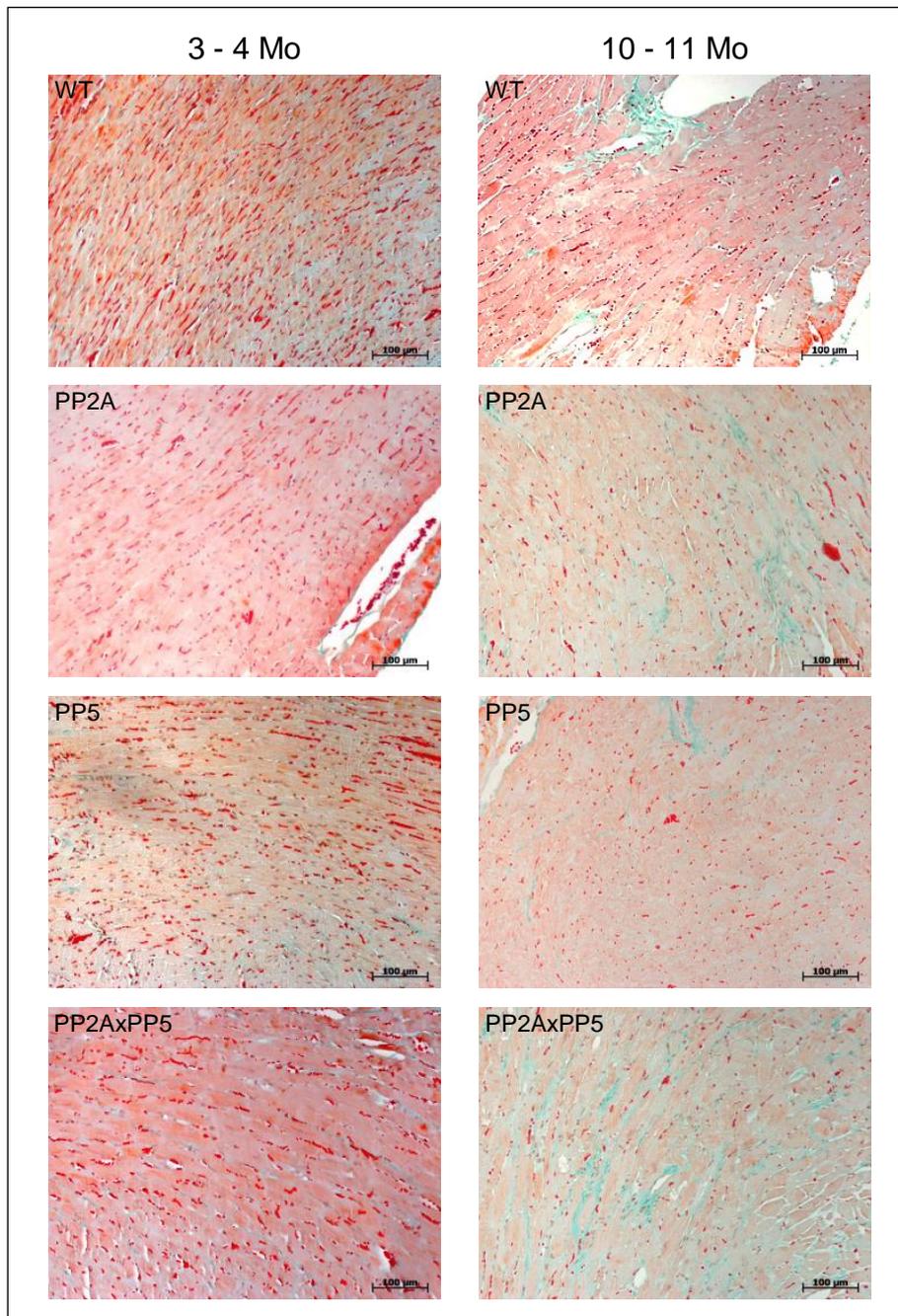


Abbildung 26: Masson-Goldner-Färbung der Herzspitze von 3 - 4 Monate und 10 - 11 Monate alten Tieren.

## 4.5 Vorhofkontraktionen

### 4.5.1 Einfluss der Hypoxie auf die Kontraktionskraft linker Vorhöfe

Wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, wurden die Vorhofpräparate der Tiere durch eine kumulative Gabe von Isoprenalin stimuliert um die kontraktile Funktionalität durch Aktivierung von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren im linken Vorhof zu untersuchen. Abbildung 27 zeigt die entwickelte Kontraktionskraft als Differenz ausgehend von der Kontraktionskraft ohne Gabe von Isoprenalin (Kontrolle) in  $\Delta mN$  in den 3 - 4 Monate alten Tieren (Abbildung 27 A) und den 10 - 11 Monate alten Tieren (Abbildung 27 B). Die entwickelte Kontraktionskraft war in den jungen PP2AxPP5-Tieren deutlich verringert im Vergleich zu den WT-, PP2A- und PP5-Tieren ab einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l Isoprenalin (Abbildung 27 A). In den Präparaten der alten Tiere war dahingegen kein Unterschied in den Isoprenalin-KWKs zu erkennen (Abbildung 27 B). In den Abbildungen 27 C und 27 D sind die KWKs der Präparate dargestellt, welche zuvor einer 30-minütigen Hypoxie ausgesetzt wurden (siehe 3.2.3.2). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die PP5- und PP2AxPP5-Präparate nach einer Hypoxie am meisten in ihrer Kontraktionskraft vermindert waren. Die Kontraktionskräfte beider junger Präparate sind ab einer Konzentration von  $3 \times 10^{-8}$  mol/l signifikant verringert zum WT und ab  $10^{-7}$  mol/l auch verringert im Vergleich zu PP2A-TG. Auch die KWK der PP2A transgenen Tiere ist ab einer Konzentration von  $3 \times 10^{-7}$  mol/l zum WT verschieden (Abbildung 27 C). In den Präparaten der alten Tiere zeigte sich nach Hypoxie ein ähnliches Bild. Die Kontraktionskräfte der PP5- und PP2AxPP5-Tiere waren verglichen zum WT ab einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l verringert und erstaunlicherweise bereits ab einer Konzentration von  $3 \times 10^{-8}$  mol/l signifikant verringert im Vergleich zu PP2A-TG (Abbildung 27 D). Die KWK der alten PP2A-Tiere war unverändert zum gleichaltrigen WT (Abbildung 27 D). Als Maß für die Stimulierbarkeit eines Rezeptors durch eine Substanz gilt die  $EC_{50}$ . Der Wert  $\log EC_{50}$  stellt dabei den logarithmischen Wert der Isoprenalin-Konzentration dar, bei der die Hälfte der maximalen Kontraktionskraft erreicht wird. Die ermittelten  $\log EC_{50}$ -Werte jeder Isoprenalin-KWK wurden in Abbildung 27 E dargestellt. Vergleicht man die  $\log EC_{50}$ -Werte der basalen KWK mit denen nach erfolgter Hypoxie, war nur in den jungen WT-Präparaten und erstaunlicherweise in den alten PP2A-Präparaten kein Unterschied festzustellen. In allen anderen Präparaten war die  $\log EC_{50}$  nach Hypoxie vermindert und somit die Potenz des Agonisten verringert. Vergleicht man die basalen  $EC_{50}$ -Werte der verschiedenen Präparate miteinander, war in den jungen Tieren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen festzustellen. In den alten Tieren dahingegen war die  $\log EC_{50}$  der PP2A transgenen Tiere verringert im Vergleich zum WT. Betrachtet man ausschließlich die  $\log EC_{50}$ -Werte nach Hypoxie gab es überraschenderweise keinen Unterschied zwischen allen Präparaten (Abbildung 27 E).

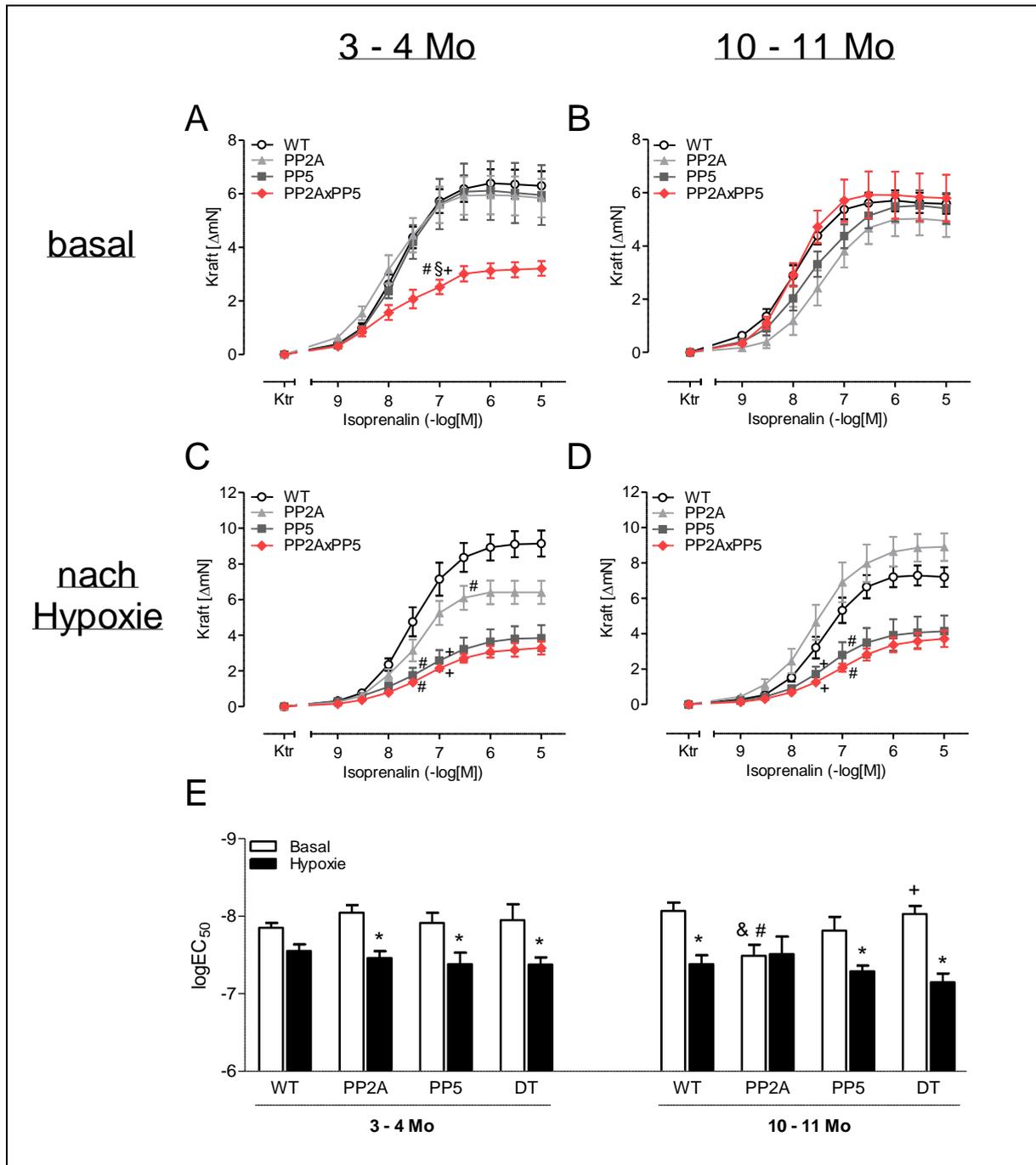


Abbildung 27: Darstellung der Kontraktionskräfte linker Vorhöfe von Tieren während einer kumulativen KWK von Isoprenalin ohne vorherige Behandlung (A; B) und nach 30-minütiger Hypoxie (C; D) im Alter von 3 - 4 Monaten (A; C) und 10 - 11 Monaten (B; D) und deren dazugehörige logEC<sub>50</sub>-Werte (E). Ktr...Kontrolle; A-D: #erster Wert  $p < 0,05$  vs. WT; +erster Wert  $p < 0,05$  vs. PP2A; §erster Wert  $p < 0,05$  vs. PP5; E: # $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. PP2A; & $p < 0,05$  vs. 3 - 4 Mo; \* $p < 0,05$  vs. basal;  $n = 5 - 12$ .

#### **4.5.2 Einfluss der Hypoxie auf die Kontraktionszeiten und -geschwindigkeiten linker Vorhöfe**

Nicht nur die entwickelten Kontraktionskräfte der linken Vorhöfe können zur Charakterisierung der atrialen Funktionalität herangezogen werden, sondern auch die Zeiten und Geschwindigkeiten der Kontraktion, wie die Kontraktionszeit ( $t_1$ ) und die Anstiegsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ). Sie dienen zur Definierung der kontraktiven Funktionalität der Präparate. Abbildung 28 zeigt den Verlauf der Kontraktionszeiten der basalen Isoprenalin-KWK in jungen und alten Tieren. Die Kontraktionszeiten der jungen PP2AxPP5-Tiere waren deutlich erhöht im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG (Abbildung 28 A). In den alten Tieren war wiederum, ähnlich dem Verlauf der Kontraktionskräfte, kein Unterschied zwischen allen Präparaten messbar (Abbildung 28 B). Betrachtet man den Verlauf nach vorangegangener Hypoxie, wurde deutlich, dass ab einer Iso-Konzentration von  $3 \times 10^{-9}$  mol/l die jungen PP2AxPP5-Tiere signifikant erhöhte Kontraktionszeiten aufwiesen im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG (Abbildung 28 C). In den Präparaten der alten Tiere war dieser Unterschied erstaunlicherweise nicht vorhanden: Es gab keinen Unterschied zwischen PP2AxPP5-TG und WT. Hier wiesen allerdings die alten PP2A-Tiere höhere Kontraktionszeiten im Vergleich zu WT und PP5-TG auf (Abbildung 28 D). Die jeweiligen Kontraktionsgeschwindigkeiten am Ende des Versuchs, bei der höchsten Isoprenalin-Konzentration, in den jungen und alten Tieren zeigen Abbildung 28 E und Abbildung 28 F. Nach Ende der 30-minütigen Hypoxie und Reoxygenierung (Hyp) verhielten sich alle Präparate gleich in ihrer Kontraktionsgeschwindigkeit. Am Ende der KWK bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin (Iso) hingegen wiesen die jungen und alten PP2AxPP5-Präparate verringerte Kontraktionsgeschwindigkeiten im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG auf.

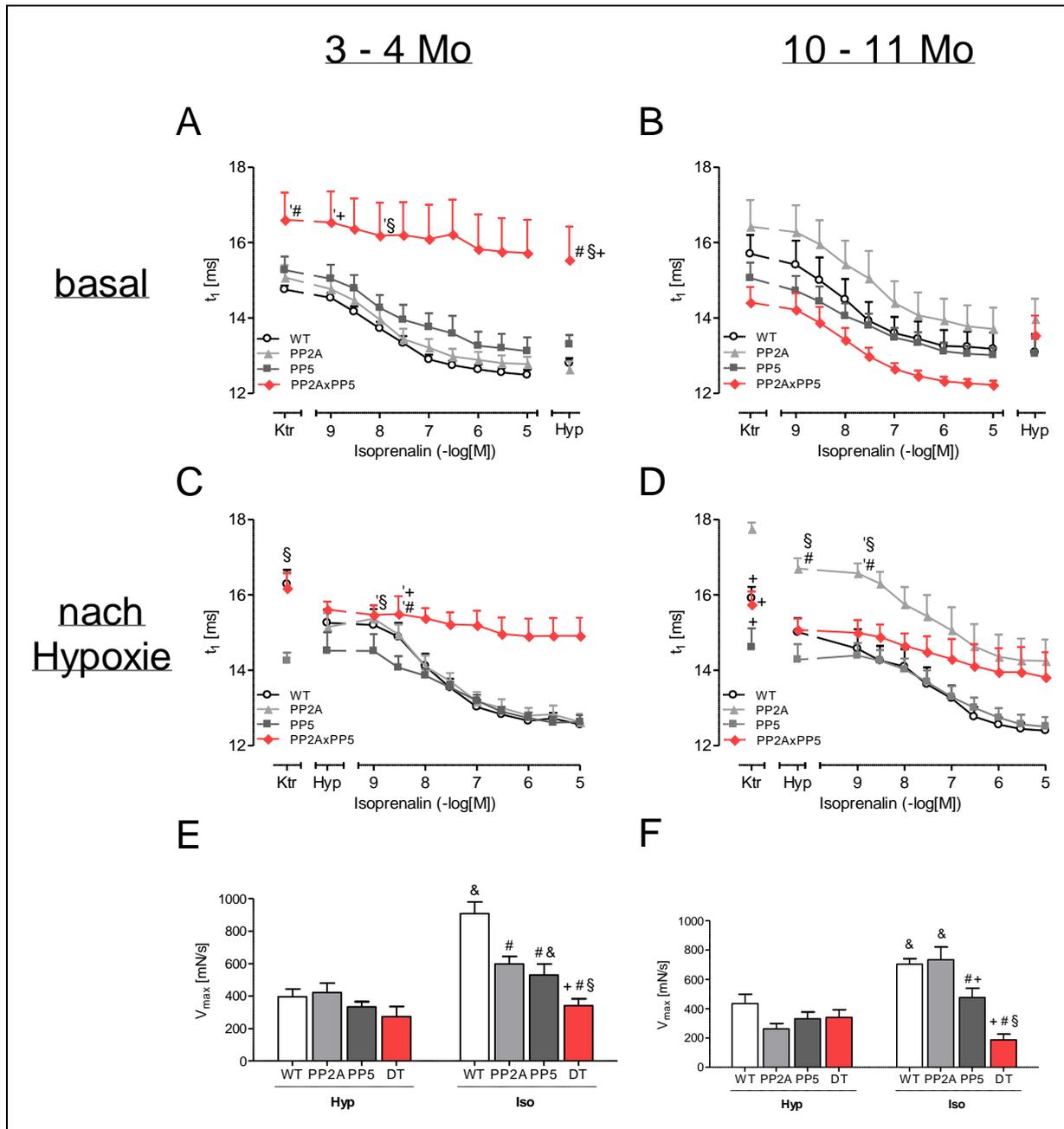


Abbildung 28: Darstellung der Kontraktionszeiten linker Vorhöfe von Tieren während einer kumulativen KWK von Isoprenalin ohne vorherige Behandlung (**A; B**) und nach 30-minütiger Hypoxie (**C; D**) im Alter von 3 - 4 Monaten (**A; C**) und 10 - 11 Monaten (**B; D**). Darstellung der Kontraktionsgeschwindigkeiten ( $V_{max}$ ) am Ende des jeweiligen Versuchs im Alter von 3 - 4 Monaten (**E**) und 10 - 11 Monaten (**F**). Ktr...Kontrolle; Hyp...Hypoxie; Iso...Isoprenalin; A-D: #,erster Wert  $p < 0,05$  vs. WT; +,erster Wert  $p < 0,05$  vs. PP2A; §,erster Wert  $p < 0,05$  vs. PP5; E-F: # $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. PP2A; § $p < 0,05$  vs. PP5; & $p < 0,05$  vs. Hyp;  $n = 5 - 16$ .

### **4.5.3 Einfluss der Hypoxie auf die Relaxationszeiten und -geschwindigkeiten linker Vorhöfe**

Zur Charakterisierung der diastolischen, atrialen Funktionalität wurden die Relaxationszeiten ( $t_2$ ) und -geschwindigkeiten ( $V_{\min}$ ) herangezogen. Ähnlich der Kontraktionszeiten, waren auch die Relaxationszeiten bei  $\beta$ -AR Stimulation durch Isoprenalin in den jungen PP2AxPP5-Tieren erhöht im Vergleich zu WT (Abbildung 29 A). In den alten Tieren zeigte sich dahingegen kein Unterschied während der Iso-KWK. Ausschließlich nach erfolgter Hypoxie waren die PP2AxPP5-Präparate in ihrer Relaxationsgeschwindigkeit erhöht im Vergleich zum WT (Abbildung 29 B). Betrachtet man die Präparate in denen eine 30-minütige Hypoxie der  $\beta$ -AR Stimulation vorausging, waren keine Unterschiede der Relaxationszeiten in den jungen Tieren zu messen (Abbildung 29 C). In den alten Tieren wiederum, ähnlich der Kontraktionszeiten, wiesen die Präparate der PP2A-Tiere deutlich erhöhte Relaxationszeiten bis zu einer Konzentration von  $3 \times 10^{-7}$  mol/l Isoprenalin im Vergleich zu WT und PP5-TG auf. Bei höheren Isoprenalin-Konzentrationen passten sich die Werte denen von WT an (Abbildung 29 D). Die gemessenen Relaxationsgeschwindigkeiten zum Ende jedes Versuchs sind in Abbildung 29 E und Abbildung 29 F dargestellt. Im Anschluss an eine 30-minütige Hypoxie und Reoxygenierung (Hyp) gab es, mit Ausnahme der alten PP2A-TG Präparate, keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen (Abbildung 29 E). Am Ende der KWK bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M Isoprenalin (Iso) wiesen sowohl die alten, als auch die jungen PP2AxPP5-Präparate verminderte Relaxationsgeschwindigkeiten im Vergleich zum WT auf.

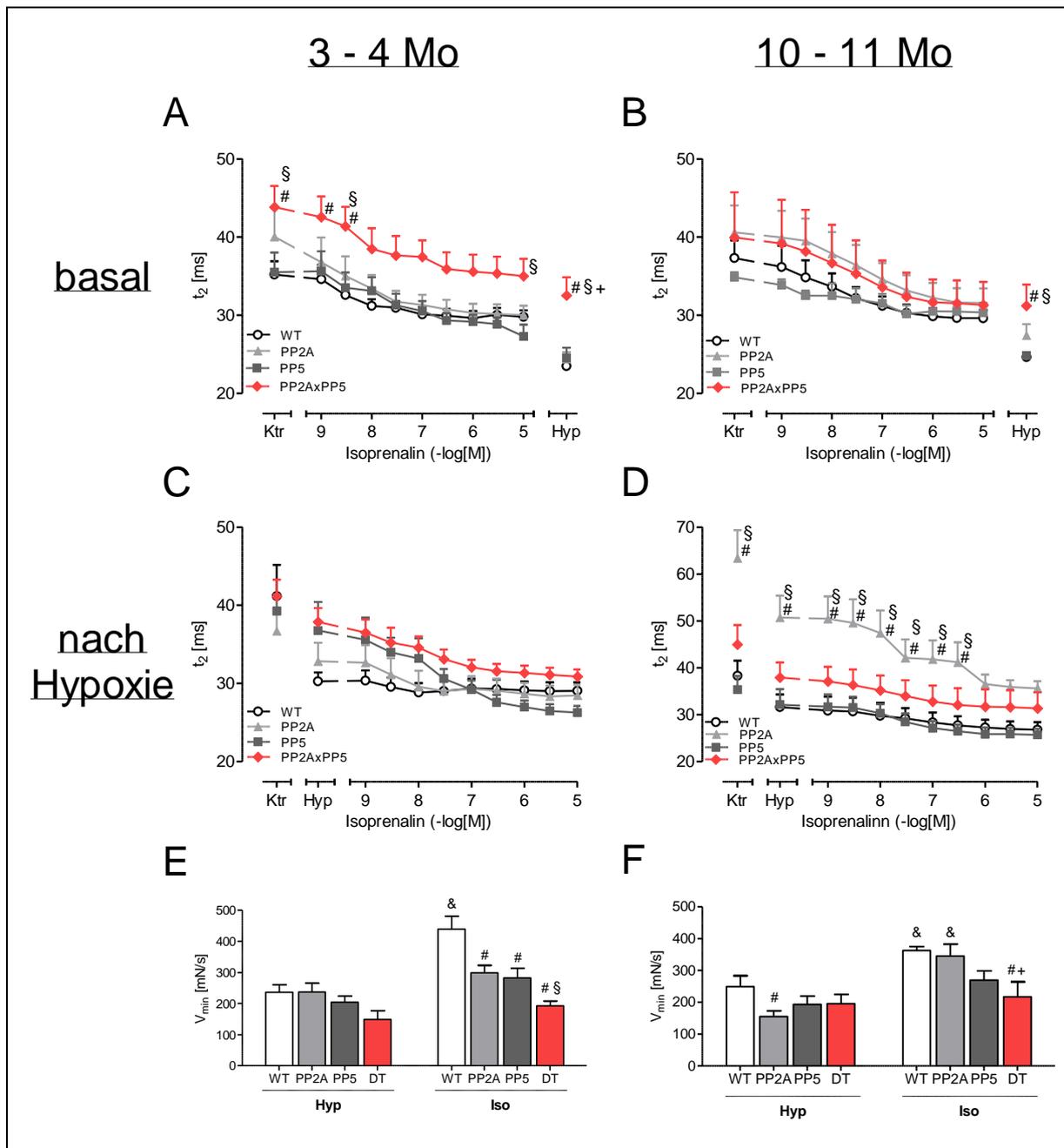


Abbildung 29: Darstellung der Relaxationszeiten linker Vorhöfe von Tieren während einer kumulativen KWK von Isoprenalin ohne vorherige Behandlung (**A; B**) und nach 30-minütiger Hypoxie (**C; D**) im Alter von 3–4 Monaten (**A; C**) und 10–11 Monaten (**B; D**). Darstellung der Relaxationsgeschwindigkeiten ( $V_{min}$ ) am Ende des jeweiligen Versuchs im Alter von 3–4 Monaten (**E**) und 10–11 Monaten (**F**). Ktr...Kontrolle; Hyp...Hypoxie; Iso...Isoprenalin; # $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. PP2A; § $p < 0,05$  vs. PP5; & $p < 0,05$  vs. Hyp;  $n = 5 - 16$ .

#### 4.5.3.1 Einfluss der Desensitivierung des $\beta$ -AR auf die Kontraktionskraft linker Vorhöfe

Die Desensitivierung von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren mit 1  $\mu$ M Isoprenalin an isolierten, linken Vorhöfen wurde an jungen und alten WT- und PP2A-Tieren durchgeführt. Es wurden die kumulativen Konzentrationswirkungskurven mit Isoprenalin ohne vorherige Behandlung (KWK1) und nach 60-minütiger Inkubation mit 1  $\mu$ M Isoprenalin (KWK2) unterschieden. Betrachtet man in den Präparaten von jungen Tieren die Veränderung der Kontraktionskraft ausgehend von der Ausgangskraft (angegeben in  $\Delta$ mN), war kein Unterschied zwischen WT

und PP2A-TG erkennbar (Abbildung 30 A). Ein Effekt der Desensitivierung wurde dennoch festgestellt, da die  $\log EC_{50}$ -Werte von KWK1 und KWK2 sowohl in WT ( $\log EC_{50}$ :  $-7,94 \pm 0,08$  vs.  $7,52 \pm 0,09$ ;  $p < 0,05$ ), als auch in PP2A ( $\log EC_{50}$ :  $-7,90 \pm 0,10$  vs.  $-7,36 \pm 0,15$ ;  $p < 0,05$ ) verschoben waren (Abbildung 30 B). Wie bereits in den Versuchen zur isometrischen Vorhofkontraktion bestätigt (siehe Abbildung 27), war der  $\log EC_{50}$  der KWK1 in PP2A-TG unverändert im Vergleich zum WT ( $\log EC_{50}$ :  $-7,90 \pm 0,10$  vs.  $-7,94 \pm 0,08$ ). Die gleiche Versuchsreihe an den Präparaten der alten Tiere ergab dagegen eine Verschiebung des  $\log EC_{50}$  in der basalen KWK von PP2A-TG im Vergleich zum WT ( $-7,48 \pm 0,12$  vs.  $-7,89 \pm 0,07$ ;  $p < 0,05$ ). Weiterhin zeigten nur die alten WT-Präparate eine Verschiebung der  $\log EC_{50}$  nach Desensitivierung ( $-7,89 \pm 0,07$  vs.  $-7,37 \pm 0,11$ ;  $p < 0,05$ ), wohingegen diese in PP2A-TG unverändert blieb ( $-7,48 \pm 0,12$  vs.  $-7,26 \pm 0,10$ ;  $p = 0,06$ ; Abbildung 30 D). Anhand der Kontraktionskräfte der kumulativen KWKs bestätigte sich ein Desensitivierungseffekt in den Präparaten der alten WT-Tiere bei Konzentrationen von  $10^{-8}$  bis  $10^{-7}$  mol/l Isoprenalin (Abbildung 30 C).

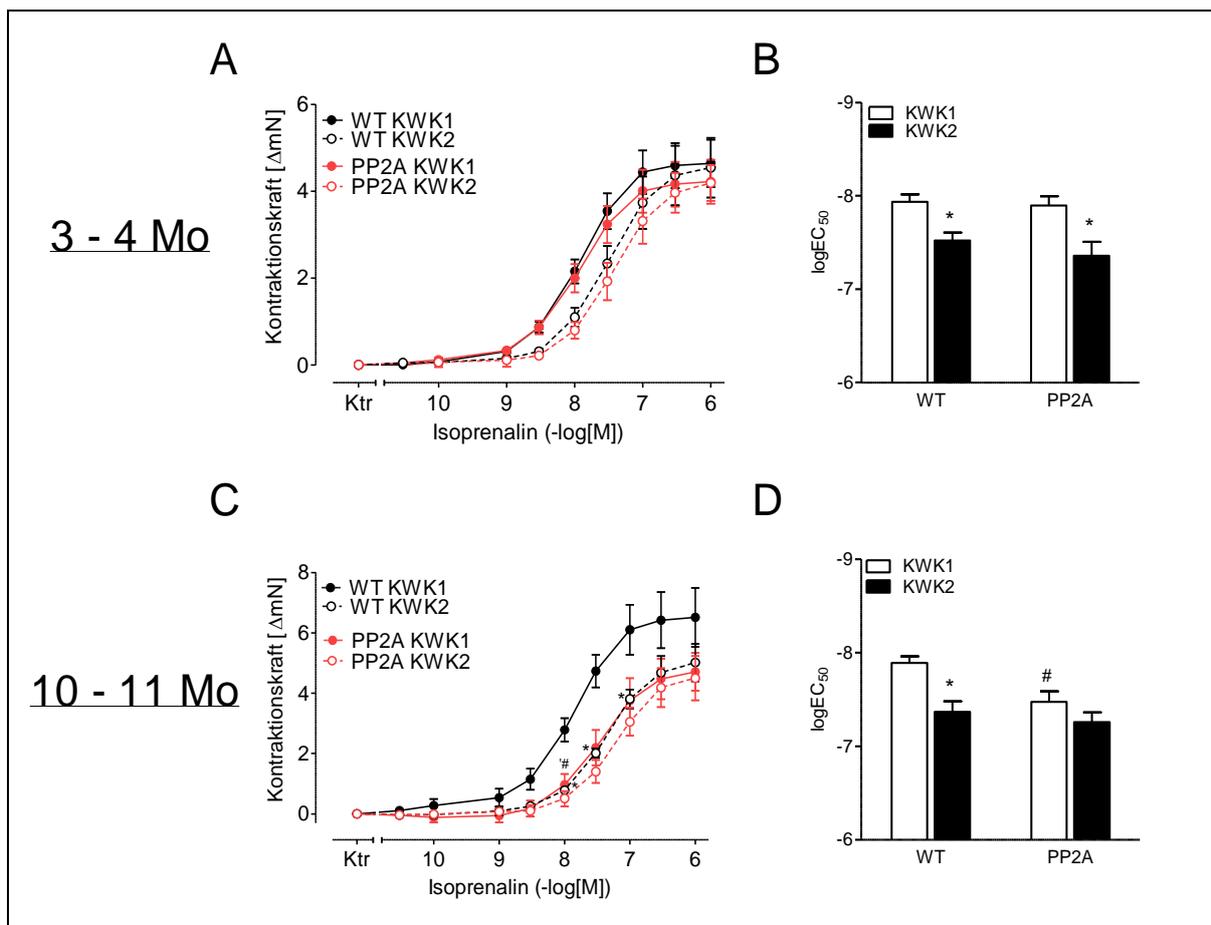


Abbildung 30: Desensitivierung des  $\beta_1$ -AR mittels Iso-KWK an linken Vorhöfen von WT und PP2A-TG im Alter von 3-4 Monaten (A; B) und 10-11 Monaten (C; D). KWK...Konzentrationswirkungskurve; # $p < 0,05$  vs. WT; \* $p < 0,05$  vs. KWK1; #erster Wert  $p < 0,05$  vs. WT;  $n = 5$ .

#### 4.5.4 Frequenz rechter Vorhöfe

##### 4.5.4.1 Einfluss der Hypoxie auf die Frequenz rechter Vorhöfe

Die rechten Vorhöfe wurden den gleichen Versuchsbedingungen wie die linken Vorhöfe ausgesetzt. Da die rechten Vorhöfe einen intakten Sinusknoten hatten, dienen sie als Frequenzmodell. In Abbildung 31 wurden die Schlagfrequenzen während der Iso-KWK vor und nach einer Hypoxie in den Vorhofpräparaten junger und alter Tiere dargestellt. In den jungen Tieren waren in den basalen Iso-KWKs keine Unterschiede in den Frequenzen zwischen den verschiedenen Genotypen vorhanden (Abbildung 31 A). In den alten Präparaten dahingegen zeigten die PP2AxPP5-Tiere eine signifikante Verringerung der Frequenz im Vergleich zum WT über mehrere Konzentrationsbereiche (Abbildung 31 B). In der Versuchsreihe mit vorangegangener Hypoxie (Abbildung 31 C, D) zeigten nur die alten PP2AxPP5-Tiere eine Veränderung in ihren Schlagfrequenzen im Vergleich zum WT ( $3 \times 10^{-7}$  mol/l) und PP2A-TG ( $3 \times 10^{-7}$  bis  $10^{-7}$  mol/l; Abbildung 31 D). Abbildung 31 E zeigt die  $\log EC_{50}$ -Werte der jeweiligen Präparate. Anhand der  $\log EC_{50}$  wird in den alten PP2AxPP5-Präparaten nach Hypoxie eine verringerte Potenz von Isoprenalin im Vergleich zu WT, PP2A-TG, PP5-TG und im Vergleich zu den jungen PP2AxPP5-Tieren deutlich (Abbildung 31 E).

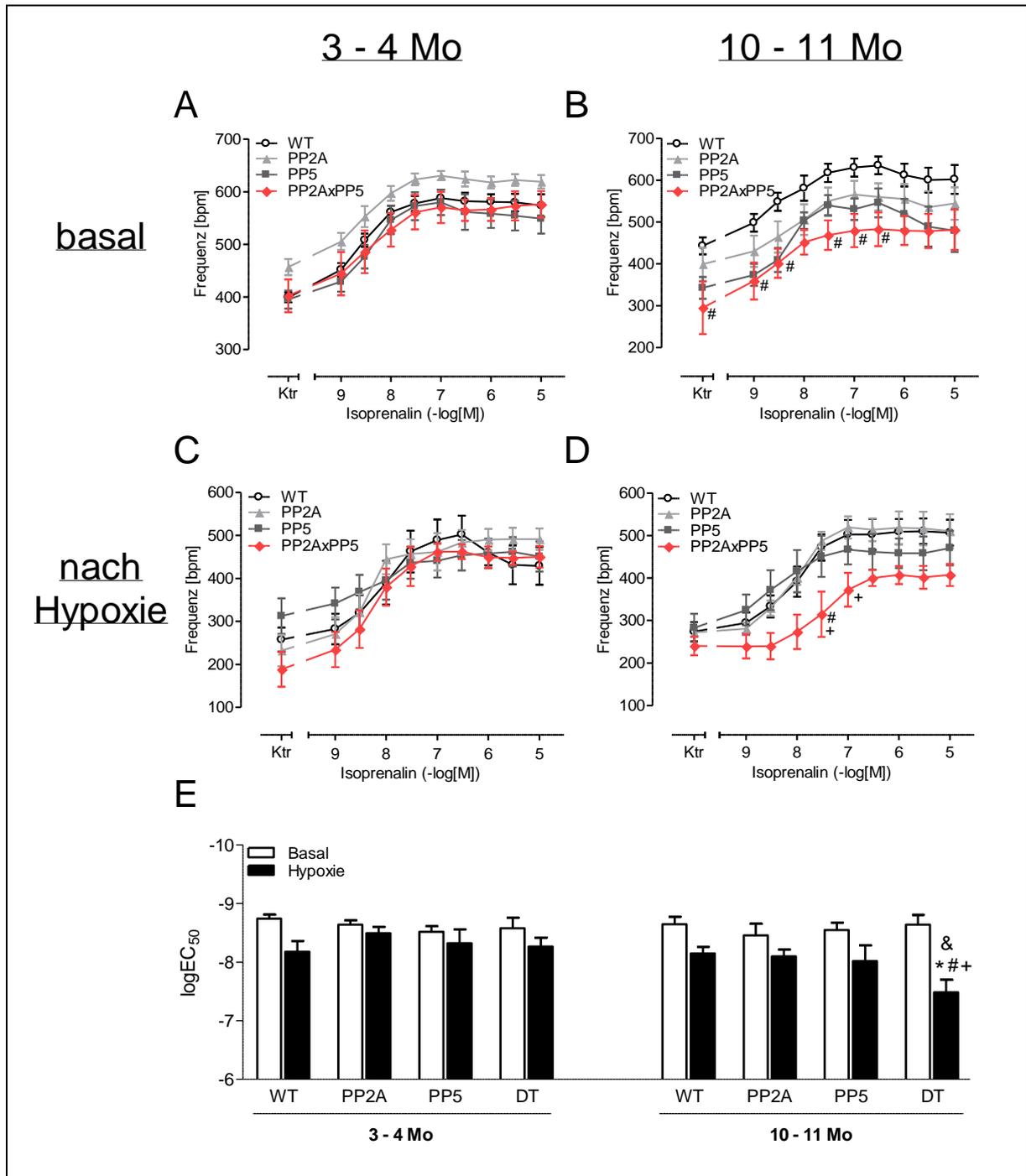


Abbildung 31: Darstellung der Schlagfrequenzen rechter Vorhöfe während einer kumulativen KWK von Isoprenalin ohne vorherige Behandlung (**A**; **B**) und nach 30-minütiger Hypoxie (**C**; **D**) im Alter von 3 - 4 Monaten (**A**; **C**) und 10 - 11 Monaten (**B**; **D**) und deren dazugehörige logEC<sub>50</sub>-Werte (**E**). Ktr...Kontrolle; #p < 0,05 vs. WT; +p < 0,05 vs. PP2A; §p < 0,05 vs. PP5; &p < 0,05 vs. 3 - 4 Mo; \*p < 0,05 vs. basal; n = 4 - 13.

## 4.6 Herzfunktion in vivo

### 4.6.1 Systolische linksventrikuläre Funktion

Zur Untersuchung der Herzfunktion in vivo diente die Echokardiographie aller Tiere im Alter von 3 - 4 Monaten und 10 - 11 Monaten. Dabei wurden neben der basalen Herzfunktion (Ktr) dieselben Parameter nach  $\beta$ -AR Stimulation, durch intraperitoneale Applikation von Isoprenalin (Iso), gemessen. Im Folgenden werden ausschließlich die Ergebnisse der Tiere im Alter von 3 - 4 Monate beschrieben. Der altersabhängige Vergleich mit den Messungen der Tiere im Alter von 10 - 11 Monaten erfolgt ab Kapitel 4.6.4.

Als Maß für die systolische linksventrikuläre Funktion wurde die Ejektionsfraktion (EF) herangezogen. Die jungen PP2A- und PP2AxPP5-Tiere zeigten eine stark verminderte EF im Vergleich zu WT und PP5-TG auf. Nach  $\beta$ -AR Stimulation erhöhte sich die EF in WT, PP2A- und PP5-Tieren signifikant. Lediglich die EF der PP2AxPP5-Tiere blieb nach Iso unverändert zum basalen Wert ( $30,52 \pm 6,55$  vs.  $19,98 \pm 3,21$ ; Abbildung 32 A). Die Herzfrequenz (HF) war innerhalb aller Tiere mit gleicher Behandlung unverändert (Abbildung 32 B). Wie zu erwarten, erhöhte sich die HF nach Isoprenalingabe in den WT, PP2A- und PP5-Tieren im Vergleich zum Basalwert (WT:  $432,2 \pm 27,9$  vs.  $533,1 \pm 11,6$ ;  $p < 0,05$ ; PP2A:  $441,9 \pm 21,9$  vs.  $586,6 \pm 19,3$ ;  $p < 0,05$ ; PP5:  $411,7 \pm 29,0$  vs.  $522,8 \pm 21,6$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 32 B). Die HF der PP2AxPP5-Tiere veränderte sich nach Isoprenalingabe statistisch nicht nach Auswertung über die Varianzanalyse. Die Auswertung über einen *Students t-Test* ohne Berücksichtigung der anderen Genotypen ergab allerdings einen signifikanten Unterschied ( $420,4 \pm 22,7$  vs.  $510,2 \pm 18,8$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 32 B). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass sich die HF in den PP2AxPP5-Tieren nach Isoprenalingabe nicht in dem Ausmaß wie in WT, PP2A-TG und PP5-TG erhöht. Das deutet auf ein geringeres Ansprechen der PP2AxPP5-Tiere auf  $\beta$ -AR Stimulation hin. Abbildung 32 C zeigt charakteristische PLAX-Aufnahmen im M-Mode von WT- und PP2AxPP5-Tieren basal (Ktr) und nach  $\beta$ -AR Stimulation (Iso).

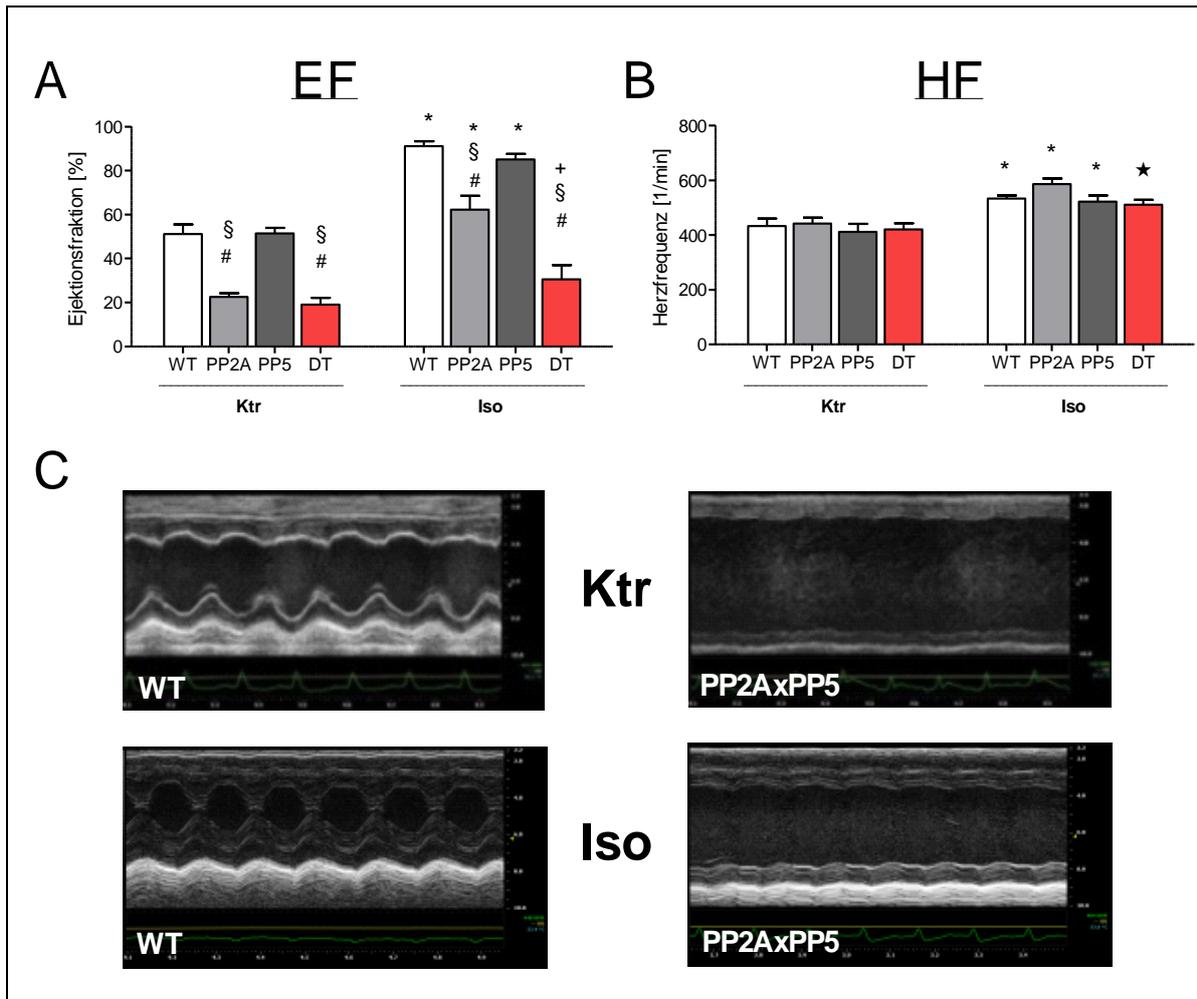


Abbildung 32: Darstellung der Ejektionsfraktion und Herzfrequenz aus der M-Mode Echokardiographie mit Originalaufnahme. **A:** Ejektionsfraktion basal (Ktr) und nach Isoprenalingabe (Iso) in 3 - 4 Monate alten Tieren aus der M-Mode Echokardiographie; **B:** Herzfrequenz basal (Ktr) und nach Isoprenalingabe (Iso) in 3 - 4 Monate alten Tieren aus der M-Mode Echokardiographie; **C:** Originale M-Mode Aufnahme von WT und DT im Alter von 3 - 4 Monaten basal (Ktr) und nach Isoprenalingabe (Iso). # $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. PP2A; § $p < 0,05$  vs. PP5; \* $p < 0,05$  vs. Ktr; ★ $p < 0,05$  vs. Ktr (Students t-Test);  $n = 5 - 9$ .

Weiterhin wurden die kardialen Dimensionen wie die Hinterwanddicke (LVPW), die Septumdicke (IVS), der linksventrikuläre Durchmesser (LVID) und das linksventrikuläre Volumen (LV Volumen) in der Enddiastole und Endsystole bestimmt (Abbildung 33). Die IVSs war verringert in den PP2AxPP5-Tieren im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG, sowohl basal, als auch nach Iso-Gabe (Abbildung 33 B). In der Diastole waren die Werte der PP2AxPP5-Tiere ebenso nach Iso-Gabe verringert im Vergleich zu den anderen Genotypen (Abbildung 33 A). Ähnlich verhielt es sich mit der LVPWs und LVPWd: Diese waren endsystolisch signifikant verringert in den PP2AxPP5-Tieren im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG nach Iso-Gabe (Abbildung 33 F), und enddiastolisch verringert im Vergleich zu PP2A-TG und PP5-TG nach Iso-Gabe (Abbildung 33 E). Der linksventrikuläre Durchmesser und das linksventrikuläre Volumen waren endsystolisch und enddiastolisch nach Isoprenalingabe in den PP2AxPP5-Tieren erhöht im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG (Abbildung 33 C, D, G, H). Ebenso konnte in diesen Tieren bereits basal eine Erhöhung dieser

Werte gegenüber WT und PP5-TG gemessen werden. Die PP2A-Tiere wiesen ebenso basal erhöhte Werte in ihrem linksventrikulären Durchmesser und Volumen im Vergleich zum WT auf, welche jedoch nach Isoprenalingabe den Werten von WT entsprachen. Die PP5-Tiere waren in ihren linksventrikulären Dimensionen unverändert zum WT.

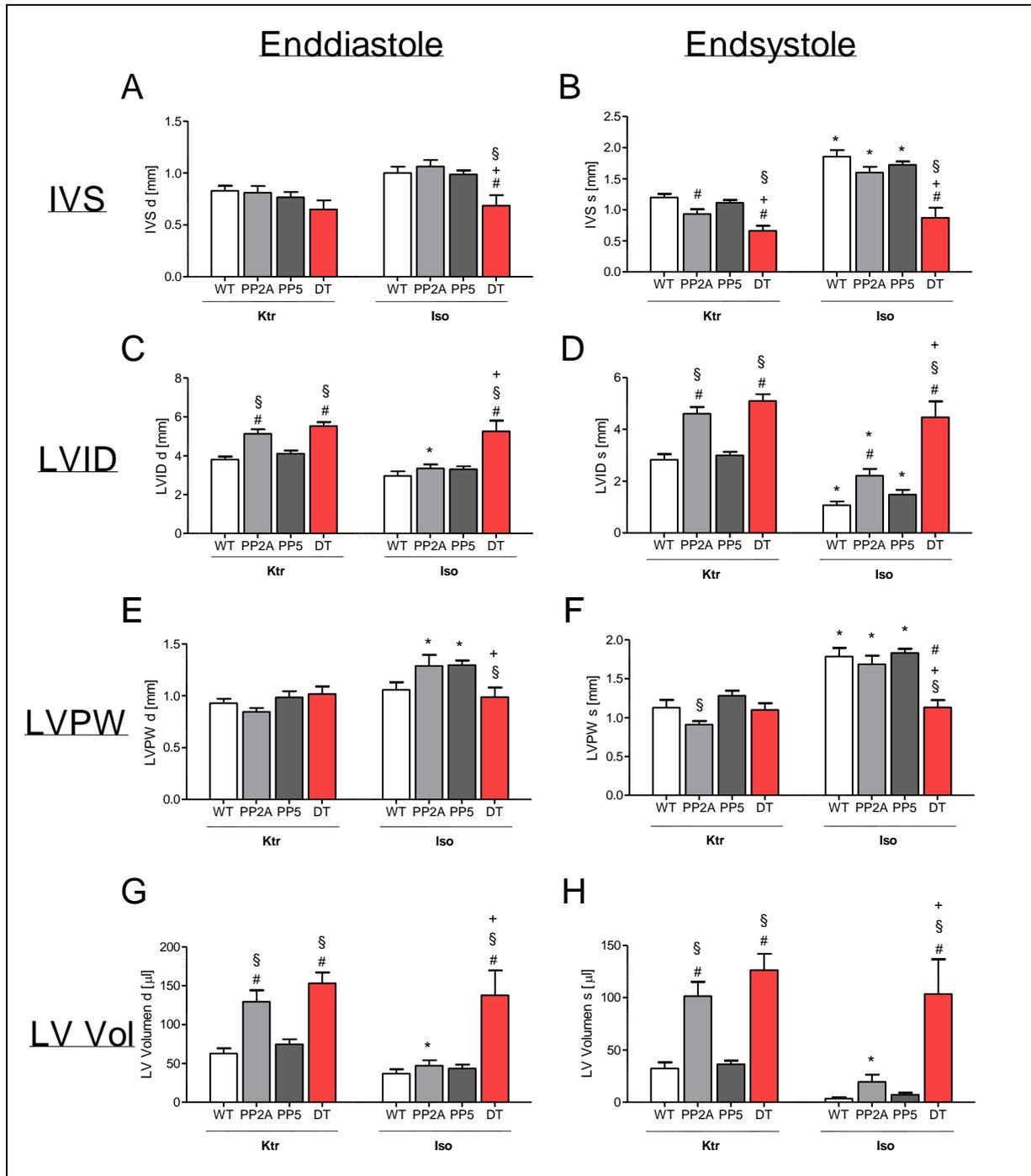


Abbildung 33: Darstellung der linksventrikulären Dimensionen junger Tiere bestimmt mit M-Mode Ultraschall unter basalen Bedingungen (Ktr) und nach Gabe von Isoprenalin (Iso). **A, B:** Interventrikuläre Septumdicke (IVS) in Enddiastole und Endsystole; **C, D:** Linksventrikulärer innerer Durchmesser (LVID) in Enddiastole und Endsystole; **E, F:** Linksventrikuläre Hinterwanddicke (LVPW); **G, H:** Linksventrikuläres Volumen (LV Vol) in Enddiastole und Endsystole. #p < 0,05 vs. WT; +p < 0,05 vs. PP2A; §p < 0,05 vs. PP5; \*p < 0,05 vs. Ktr; n = 5 - 9.

#### 4.6.2 Gewebe-Doppler und diastolische Funktion

Die Auswertung der Gewebedoppler-Messungen ergab eine deutlich verringerte frühdiastolische Mitralanulusgeschwindigkeit ( $E'$ ) in den PP2A- und PP2AxPP5-Tieren im Vergleich zu WT, sowohl basal als auch nach Isoprenalingabe. In den PP5-Tieren war  $E'$  lediglich nach Isoprenalingabe verringert im Vergleich zum WT (Abbildung 34 A). Die Ejektionszeiten (ET) waren basal in allen Tieren unverändert. Nach Isoprenalingabe verringerten sie sich im Vergleich zur eigenen basalen Kontrolle in WT, PP2A-TG und PP5-TG (Abbildung 34 B). In den PP2AxPP5-Tieren konnte keine Veränderung der ET durch Isoprenalingabe bestimmt werden (Abbildung 34 B). Die IVCT und IVRT in den PP2A- und PP2AxPP5-Tieren waren basal stark erhöht im Vergleich zum WT, haben sich aber auf das Niveau des WT normalisiert nach  $\beta$ -AR Stimulation (Abbildung 34 C, D). Der Quotient  $E'/E'$  dient als Maß für die diastolische Funktion. Dieser Quotient konnte in den PP2AxPP5-Tieren nicht berechnet werden, da eine Messung der Mitralklappenfunktion über den Vierkammerblick bei diesen Tieren nicht möglich war. In den PP2A-Tieren war der Quotient basal und nach Isoprenalingabe erhöht im Vergleich zum WT. Die diastolische Funktion der PP5-Tiere anhand dieses Quotienten war unverändert (Abbildung 34 F). Der MPI ist ein Zahlenwert, der zur Ermittlung der globalen Herzdysfunktion dient. Er beinhaltet die systolische und diastolische Funktion unter Einberechnung der ET, IVRT und IVCT und ist unabhängig von der HF (Goroshi und Chand 2016). In den PP2A- und PP2AxPP5-Tieren war dieser Wert deutlich erhöht im Vergleich zu WT und PP5-TG. Jedoch waren nach Isoprenalingabe alle Werte wieder auf Niveau der WT-Tiere verringert (Abbildung 34 E).

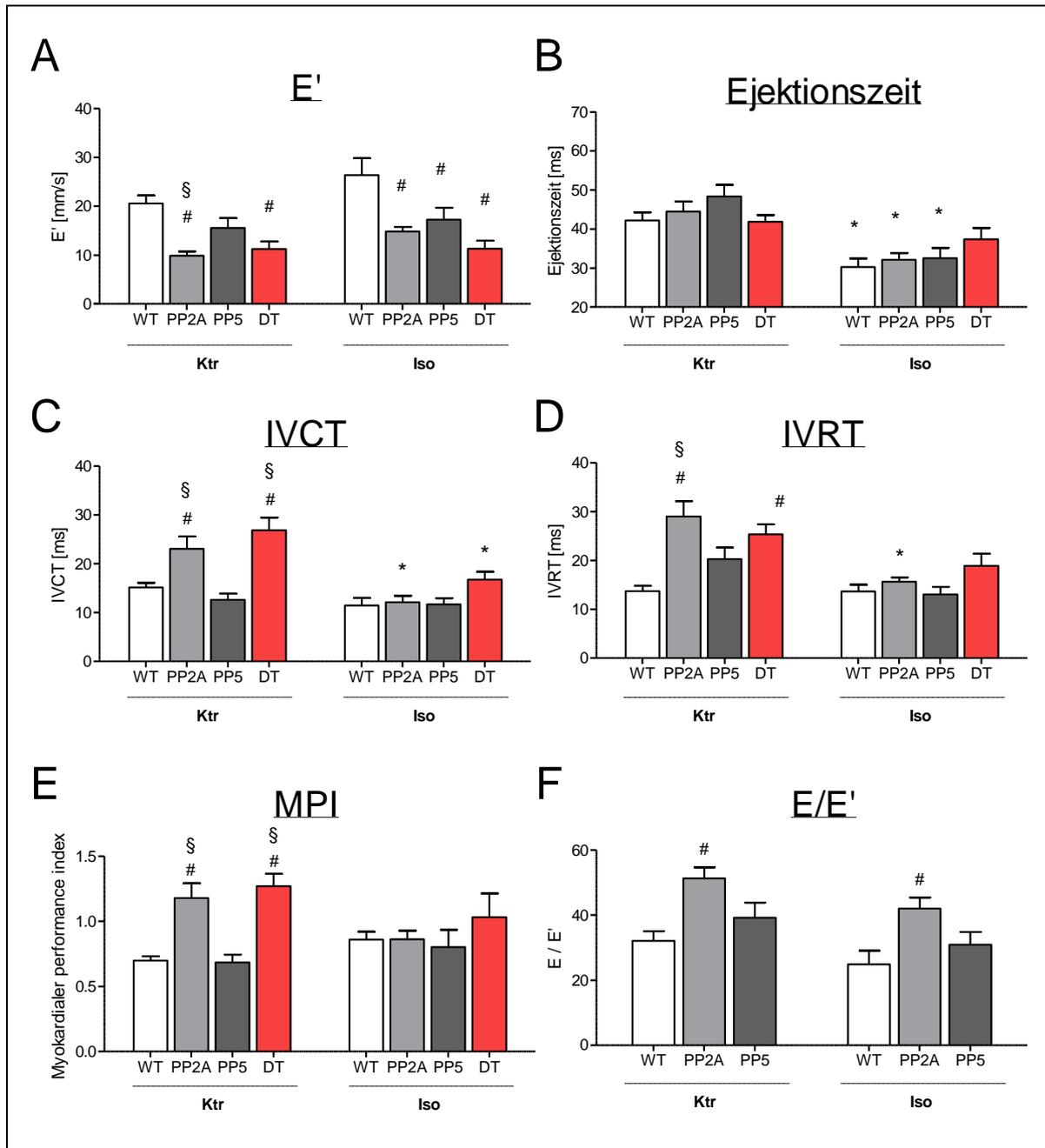


Abbildung 34: Auswertung der Doppler-Echokardiographie von Tieren im Alter von 3 - 4 Monaten basal und nach Isoprenalingabe. **A:** frühdiastolische Mitralanulusgeschwindigkeit ( $E'$ ); **B:** Ejektionszeit; **C:** Isovolumetrische Kontraktionszeit; **D:** Isovolumetrische Relaxationszeit; **E:** Myokardialer Performance Index (MPI); **F:** Quotient aus dem Fluss der frühdiastolischen, passiven, linkventrikulären Füllung ( $E$ ) und der frühdiastolischen Mitralanulusgeschwindigkeit ( $E'$ ); Ktr...Kontrolle; Iso...Isoprenalin; # $p < 0,05$  vs. WT; § $p < 0,05$  vs. PP5; \* $p < 0,05$  vs. Ktr;  $n = 5 - 9$ .

### 4.6.3 GefäÙe

Mittels Doppler-Echokardiographie wurden die jeweiligen diastolischen und systolischen Spitzenflussgeschwindigkeiten (Peak Velocity) und Geschwindigkeits-Zeit-Integral (VTI) der Arteria pulmonalis und Aorta ascendens bestimmt. In beiden GefäÙen waren das VTI und die Spitzenflussgeschwindigkeiten der PP2AxPP5-Tiere basal und nach  $\beta$ -AR Stimulation deutlich verringert im Vergleich zu denen von WT-, PP2A- und PP5-Tieren (Abbildung 35).

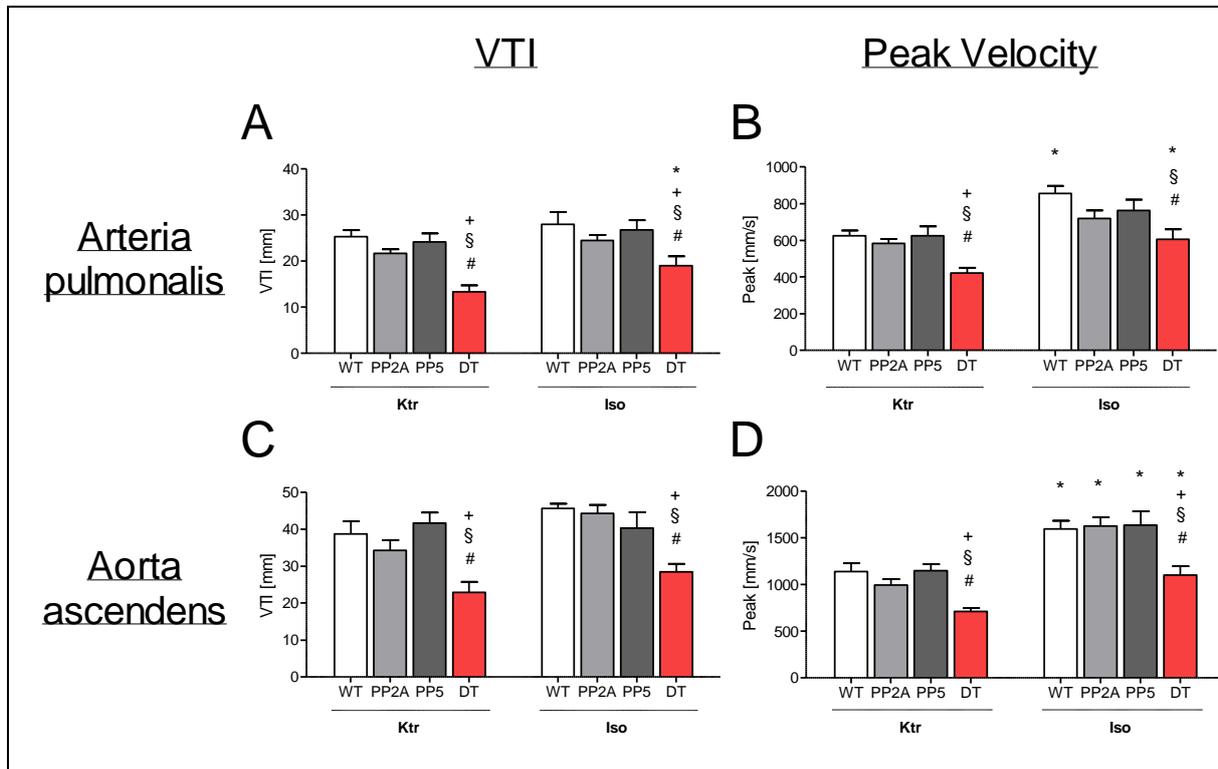


Abbildung 35: Darstellung der FlüÙe durch die Arteria pulmonalis und Aorta ascendens von Tieren im Alter von 3 - 4 Monaten **A**: VTI der Arteria pulmonalis; **B**: Spitzenflussgeschwindigkeit der Arteria pulmonalis; **C**: VTI der Aorta ascendens; **D**: Spitzenflussgeschwindigkeit der Aorta ascendens; #p < 0,05 vs. WT; +p < 0,05 vs. PP2A; §p < 0,05 vs. PP5; \*p < 0,05 vs. Ktr; n = 4 - 11.

### 4.6.4 Altersabhängige Veränderungen

#### 4.6.4.1 Altersabhängige Veränderungen der basalen Herzfunktion in vivo

Die gemessenen in vivo Basalwerte der Tiere wurden auch altersabhängig untersucht. Jedoch zeigten die Herzultraschallparameter nur vereinzelt Unterschiede zwischen den 3 - 4 Monate alten und 10 - 11 Monate alten Tieren desselben Genotyps auf. Beispielsweise war im Alter die IVCT in den PP2A-Tieren und die IVRT in den WT-Tieren erhöht im Vergleich zur jungen Altersgruppe. Ebenso war der MPI in den alten PP2AxPP5-Tieren erhöht im Vergleich zu den jungen Tieren. Die Peak Geschwindigkeit der Aorta ascendens war in den PP5-Tieren im Alter verringert (Tabelle 7).

## Ergebnisse

Tabelle 7: Altersabhängiger Vergleich basaler Echokardiographie-Parameter. &p < 0,05 vs. 3 - 4 Mo; n = 4 - 11

	<u>WT</u>		<u>PP2A</u>		<u>PP5</u>		<u>PP2AxPP5</u>	
	<u>jung</u>	<u>alt</u>	<u>jung</u>	<u>alt</u>	<u>jung</u>	<u>alt</u>	<u>jung</u>	<u>alt</u>
EF [%]	51,1 ± 4,31	51,5 ± 3,35	22,6 ± 1,60	24,9 ± 2,31	51,5 ± 2,4	48,6 ± 3,99	19,0 ± 3,2	19,8 ± 3,22
HF [bpm]	432 ± 27,9	419 ± 14,7	442 ± 21,9	408 ± 24,2	412 ± 29,0	409 ± 17,7	420 ± 22,7	389 ± 34,2
IVSs [mm]	1,20 ± 0,05	1,19 ± 0,07	0,93 ± 0,08	1,04 ± 0,08	1,11 ± 0,04	1,21 ± 0,13	0,66 ± 0,08	0,89 ± 0,17
IVSd [mm]	0,83 ± 0,05	0,80 ± 0,04	0,81 ± 0,06	0,82 ± 0,05	0,77 ± 0,05	0,85 ± 0,07	0,65 ± 0,09	0,78 ± 0,12
LVPWs [mm]	1,13 ± 0,10	1,26 ± 0,08	0,91 ± 0,05	0,94 ± 0,06	1,28 ± 0,06	1,39 ± 0,12	1,10 ± 0,09	1,01 ± 0,08
LVPWd [mm]	0,93 ± 0,04	0,98 ± 0,05	0,84 ± 0,04	0,90 ± 0,08	0,98 ± 0,06	1,09 ± 0,10	1,02 ± 0,07	0,89 ± 0,09
LVIDs [mm]	2,83 ± 0,21	3,09 ± 0,14	4,60 ± 0,27	4,40 ± 0,30	2,99 ± 0,14	3,33 ± 0,15	5,09 ± 0,27	4,63 ± 0,42
LVIDd [mm]	3,80 ± 0,16	4,32 ± 0,10	5,12 ± 0,25	5,00 ± 0,28	4,10 ± 0,17	4,39 ± 0,11	5,53 ± 0,21	5,15 ± 0,39
LV Vols [μl]	32,2 ± 5,96	39,8 ± 4,01	101,5 ± 13,6	94,9 ± 14,51	36,3 ± 3,38	45,8 ± 5,42	126,4 ± 15,52	108,8 ± 19,20
LV Vold [μl]	62,7 ± 6,59	81,1 ± 4,42	129,3 ± 14,8	124,4 ± 16,5	74,6 ± 6,40	87,4 ± 4,54	153,2 ± 13,8	136,5 ± 16,6
E' [mm/s]	20,6 ± 1,69	17,1 ± 1,83	9,8 ± 0,92	10,1 ± 1,52	15,5 ± 2,08	14,8 ± 2,87	11,3 ± 1,50	6,3 ± 1,08
ET [ms]	42,2 ± 2,12	44,1 ± 2,18	44,4 ± 2,55	45,1 ± 2,2	48,4 ± 2,93	55,8 ± 4,80	41,9 ± 1,74	41,3 ± 2,10
IVCT [ms]	15,2 ± 0,95	18,9 ± 2,56	23,0 ± 2,55	<b>31,8 ± 3,07<sup>&amp;</sup></b>	12,6 ± 1,31	14,6 ± 2,07	26,9 ± 2,59	37,5 ± 4,11
IVRT [ms]	13,7 ± 1,12	<b>22,8 ± 2,75<sup>&amp;</sup></b>	29,0 ± 3,16	34,2 ± 1,55	20,2 ± 2,39	17,1 ± 1,61	25,4 ± 2,04	32,2 ± 3,94
MPI	0,70 ± 0,03	0,93 ± 0,08	1,18 ± 0,12	1,47 ± 0,09	0,68 ± 0,06	0,59 ± 0,04	1,27 ± 0,09	<b>1,69 ± 0,07<sup>&amp;</sup></b>
E/E'	32,0 ± 2,99	36,9 ± 3,96	51,3 ± 3,35	38,0 ± 3,39	39,2 ± 4,68	46,4 ± 8,69	-	-
A.pul. VTI [mm]	25,3 ± 1,44	28,2 ± 1,22	21,7 ± 0,91	22,9 ± 1,32	24,2 ± 1,86	26,3 ± 2,06	13,3 ± 1,38	15,8 ± 2,20
A.pul. Peak [mm/s]	625 ± 28,2	619 ± 24,8	583 ± 24,0	570 ± 25,0	625 ± 51,8	628 ± 32,1	422 ± 28,6	451 ± 43,0
A.asc. VTI [mm]	38,8 ± 3,39	32,5 ± 1,96	34,3 ± 2,77	31,6 ± 32,5	41,7 ± 2,84	29,7 ± 2,78	22,9 ± 2,90	21,9 ± 3,76
A.asc. Peak [mm/s]	1139 ± 84	1007 ± 79	992 ± 66	984 ± 75	1148 ± 70	<b>837 ± 58<sup>&amp;</sup></b>	710 ± 38	780 ± 89

#### 4.6.4.2 Altersabhängige Veränderungen der Herzfunktion in vivo nach $\beta$ -AR Stimulation

Auch die Herzultraschallparameter nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin zeigten kaum altersabhängige Veränderungen. Lediglich die IVCT in den PP2AxPP5-Tieren war im Alter erhöht im Vergleich zur jungen Altersgruppe (Tabelle 8).

Tabelle 8: Altersabhängiger Vergleich der Echokardiographie Parameter nach  $\beta$ -AR Stimulation. &  $p < 0,05$  vs. 3 - 4 Mo;  $n = 4 - 11$

	<u>WT</u>		<u>PP2A</u>		<u>PP5</u>		<u>PP2AxPP5</u>	
	jung	alt	jung	alt	jung	alt	jung	alt
EF [%]	91,1 ± 2,26	92,4 ± 1,28	62,1 ± 6,33	61,0 ± 4,21	85,0 ± 2,56	79,0 ± 4,53	30,5 ± 6,55	32,2 ± 5,10
HF [bpm]	533 ± 11,6	556 ± 20,1	586 ± 19,3	565 ± 8,6	523 ± 21,6	497 ± 21,3	510 ± 18,8	484 ± 14,0
IVSs [mm]	1,86 ± 0,10	1,95 ± 0,11	1,60 ± 0,09	1,58 ± 0,14	1,72 ± 0,05	1,67 ± 0,18	0,87 ± 0,16	0,99 ± 0,14
IVSd [mm]	1,00 ± 0,06	1,15 ± 0,07	1,06 ± 0,06*	1,08 ± 0,09	0,99 ± 0,04	1,03 ± 0,15	0,68 ± 0,10	0,79 ± 0,10
LVPWs [mm]	1,79 ± 0,11	1,94 ± 0,08	1,69 ± 0,11	1,82 ± 0,15	1,83 ± 0,05	1,74 ± 0,11	1,13 ± 0,09	1,30 ± 0,11
LVPWd [mm]	1,06 ± 0,07	1,11 ± 0,07	1,29 ± 0,11	1,46 ± 0,12	1,29 ± 0,05	1,29 ± 0,07	0,98 ± 0,09	1,10 ± 0,05
LVIDs [mm]	1,07 ± 0,14	1,18 ± 0,11	2,21 ± 0,25	2,29 ± 0,20	1,49 ± 0,18	1,77 ± 0,17	4,47 ± 0,62	4,13 ± 0,45
LVIDd [mm]	2,96 ± 0,24	3,25 ± 0,11	3,35 ± 0,21	3,58 ± 0,20	3,31 ± 0,15	3,40 ± 0,08	5,26 ± 0,54	4,88 ± 0,39
LV Vols [μl]	3,41 ± 1,11	3,49 ± 0,69	19,5 ± 6,75	23,8 ± 4,64	7,04 ± 1,94	10,1 ± 2,45	103,6 ± 33,3	81,8 ± 22,4
LV Vold [μl]	36,9 ± 5,69	41,3 ± 2,54	47,0 ± 7,11	55,1 ± 7,03	43,6 ± 4,81	46,6 ± 2,91	137,8 ± 32,0	114,4 ± 21,4
E' [mm/s]	26,4 ± 3,48	21,3 ± 2,69	14,9 ± 0,93	15,1 ± 1,64	17,2 ± 2,44	16,0 ± 3,57	11,3 ± 1,64	12,1 ± 2,50
ET [ms]	30,2 ± 2,25	31,0 ± 1,10	32,1 ± 1,74	36,5 ± 2,36	32,5 ± 2,62	34,1 ± 3,45	37,4 ± 2,90	39,7 ± 3,36
IVCT [ms]	11,5 ± 1,54	13,0 ± 1,55	12,1 ± 1,34	16,7 ± 1,48	11,7 ± 1,31	13,1 ± 1,71	16,8 ± 1,55	<b>29,8 ± 5,27*</b>
IVRT [ms]	13,7 ± 1,38	19,5 ± 2,47	15,6 ± 0,93	22,9 ± 1,28	13,0 ± 1,57	18,7 ± 1,64	18,9 ± 2,45	22,2 ± 3,09
MPI	0,86 ± 0,06	1,06 ± 0,09	0,86 ± 0,07	1,08 ± 0,13	0,80 ± 0,13	0,97 ± 0,08	1,03 ± 0,18	1,32 ± 0,06
E/E'	24,9 ± 4,21	30,8 ± 6,18	42,0 ± 3,40	42,6 ± 10,9	30,9 ± 3,92	49,9 ± 10,4	-	-
A.pul. VTI [mm]	28,0 ± 2,66	24,6 ± 2,47	24,5 ± 1,16	19,1 ± 1,00	26,8 ± 2,15	24,7 ± 1,53	19,0 ± 2,05	15,7 ± 2,12
A.pul. Peak [mm/s]	856 ± 41,1	791 ± 51,5	719 ± 43,6	728 ± 52,3	762 ± 59,5	753 ± 40,3	605 ± 55,4	498 ± 39,3
A.asc. VTI [mm]	45,7 ± 1,28	36,5 ± 2,60	44,3 ± 2,34	31,9 ± 34,8	40,3 ± 4,33	35,6 ± 40,8	28,4 ± 2,17	25,4 ± 4,32
A.asc. Peak [mm/s]	1595 ± 86	1584 ± 74	1625 ± 94	1487 ± 131	1637 ± 144	1359 ± 140	1100 ± 95	971 ± 142

## 4.7 Kardiale Proteinexpression in Vorhof und Ventrikel

### 4.7.1 Basale Expression kardialer Proteine im Ventrikel

Wie in 3.3.1, 3.3.4, 3.3.5 und 3.3.6 beschrieben, wurde mittels Western Blot die Expression von kardialen Proteinen aus dem Ventrikelhomogenat unbehandelter Mäuse bestimmt. Es wurden die Proteine PLB, Tnl und SERCA quantitativ untersucht. Es wurden keine Unterschiede in der Expression dieser Proteine zwischen den verschiedenen Ventrikelproben ermittelt (Abbildung 36). Lediglich SERCA war in den jungen PP2A-Tieren im Vergleich zum WT verringert ( $34,9 \pm 6,1 \%$  vs.  $100 \pm 16,6 \%$ ,  $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 36 D).

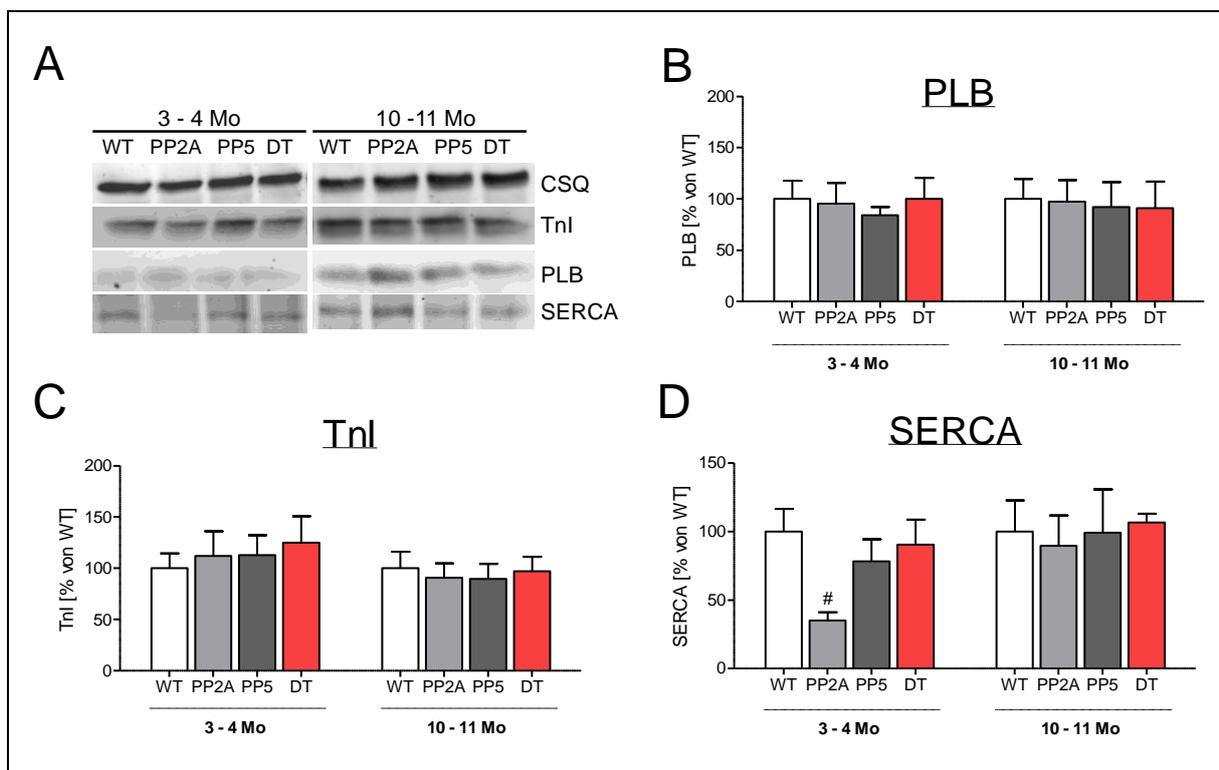


Abbildung 36: Kardiale Proteinexpression in Ventrikeln von 3 - 4 Monate und 10 - 11 Monate alten Mäusen. **A:** Charakteristische Originalaufnahmen der entsprechenden Western Blots; **B-D:** Densitometrische Auswertungen der Western Blots; **B:** Phospholamban; **C:** kardiales Troponin I; **D:** SR  $Ca^{2+}$ -ATPase; # $p < 0,05$  vs. WT;  $n = 4 - 6$ .

#### 4.7.1.1 $\beta$ -AR-abhängige Proteinphosphorylierung im Vorhof

Die Proteinphosphorylierung regulatorischer Proteine wurde durch Zugabe von Isoprenalin zum Organbad der linken Vorhöfe stimuliert (siehe 3.2.3.2, Versuchsprotokoll 1). Die Vorhofproben wurden direkt nach Einwirkung von  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin in flüssigem Stickstoff fixiert und weiterbehandelt, wie in Kapitel 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.4 beschrieben. Mittels Western Blot wurde der Phosphorylierungszustand jedes Proteins berechnet, indem ein Quotient aus dem Signal des phosphorylierten Proteins zum Signal des unphosphorylierten Proteins einen relativen phosphorylierten Anteil des zu ermittelnden Proteins darstellte. Es wurden die unphosphorylierten und phosphorylierten Proteine PLB, Tnl, p38 und Akt bestimmt. Die Phosphorylierung von Tnl und p38 war in allen Proben unverändert (Abbildung 37 C, D). Die

Phosphorylierung von PLB an Ser16 hingegen war in den jungen und alten PP2AxPP5-Tieren verringert im Vergleich zum WT (jung:  $28,4 \pm 15,2$  % vs.  $100 \pm 23,6$  %;  $n = 4 - 5$ ;  $p < 0,05$ ; alt:  $30,4 \pm 4,7$  % vs.  $100 \pm 12,4$  %;  $n = 4 - 5$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 37 B). Auch in den alten PP2A-Tieren war die Ser16-Phosphorylierung von PLB verringert im Vergleich zum WT (*Students t-Test*;  $p < 0,05$ ). Die Phosphorylierung von Akt war ebenso verringert in den Präparaten der PP2AxPP5-Tiere im Vergleich zum WT (jung:  $35,9 \pm 6,3$  % vs.  $100 \pm 20,3$  %;  $n = 4 - 5$ ;  $p < 0,05$ ; alt:  $14,7 \pm 6,9$  % vs.  $100 \pm 12,9$  %;  $n = 4-5$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 37 E). Abbildung 37 A zeigt exemplarisch die Proteinbanden.

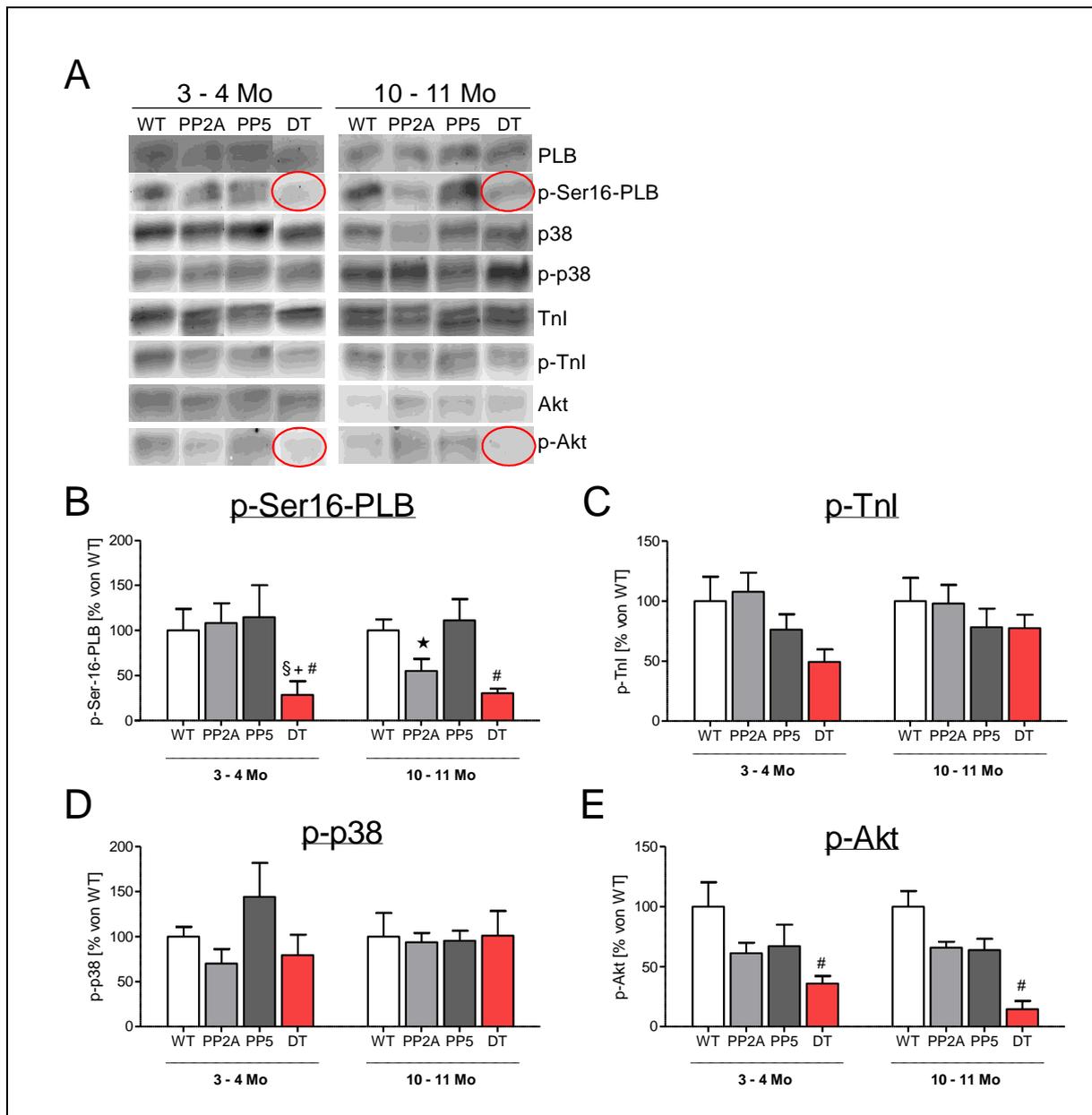


Abbildung 37: Quantitative Bestimmung der Phosphorylierung regulatorischer Proteine in Isoprenalin-behandelten linken Vorhöfen von 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Mäusen **A**: Charakteristische Originalaufnahmen der entsprechenden Western Blots; **B-D**: Densitometrische Auswertungen der Western Blots; **B**: p-Ser16-Phospholamban; **C**: p-Tnl; **D**: p-p38; **E**: p-Akt; #  $p < 0,05$  vs. WT; +  $p < 0,05$  vs. PP2A; §  $p < 0,05$  vs. PP5; \*  $p < 0,05$  vs. WT (*Students t-Test*);  $n = 3 - 6$ .

#### 4.7.1.2 Einfluss der Hypoxie auf die $\beta$ -AR-abhängige Proteinphosphorylierung im Vorhof

Die Phosphorylierung der in 4.7.1.1 dargestellten Proteine wurde auch an den Vorhöfen in Abhängigkeit von einer vorausgegangenen Hypoxie untersucht (siehe 3.2.3.2, Versuchsprotokoll 2). Die Phosphorylierung von Tnl war in allen Präparaten unverändert (Abbildung 38 C). Die Phosphorylierung von Akt war ausschließlich in den alten PP2AxPP5-Tieren verringert im Vergleich zum WT ( $29,8 \pm 11,8 \%$  vs.  $100 \pm 12,4 \%$ ,  $p < 0,05$ , Abbildung 38 E). Überraschenderweise war dahingegen die p38-MAPK-Phosphorylierung nur in den jungen PP2AxPP5-Tieren verringert im Vergleich zum WT ( $22,2 \pm 7,3 \%$  vs.  $100 \pm 12,5 \%$ ,  $p < 0,05$ , Abbildung 38 D). Wie in den Isoprenalin-behandelten Vorhöfen ohne Hypoxie (Abbildung 37), war auch in diesen Proben die Phosphorylierung von PLB an Ser16 in den jungen und alten PP2AxPP5-Tieren verringert im Vergleich zum WT (jung:  $14,9 \pm 6,4 \%$  vs.  $100 \pm 11,2 \%$ ;  $p < 0,05$ ; alt:  $25,6 \pm 14,3 \%$  vs.  $100 \pm 19,9 \%$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 38 B).

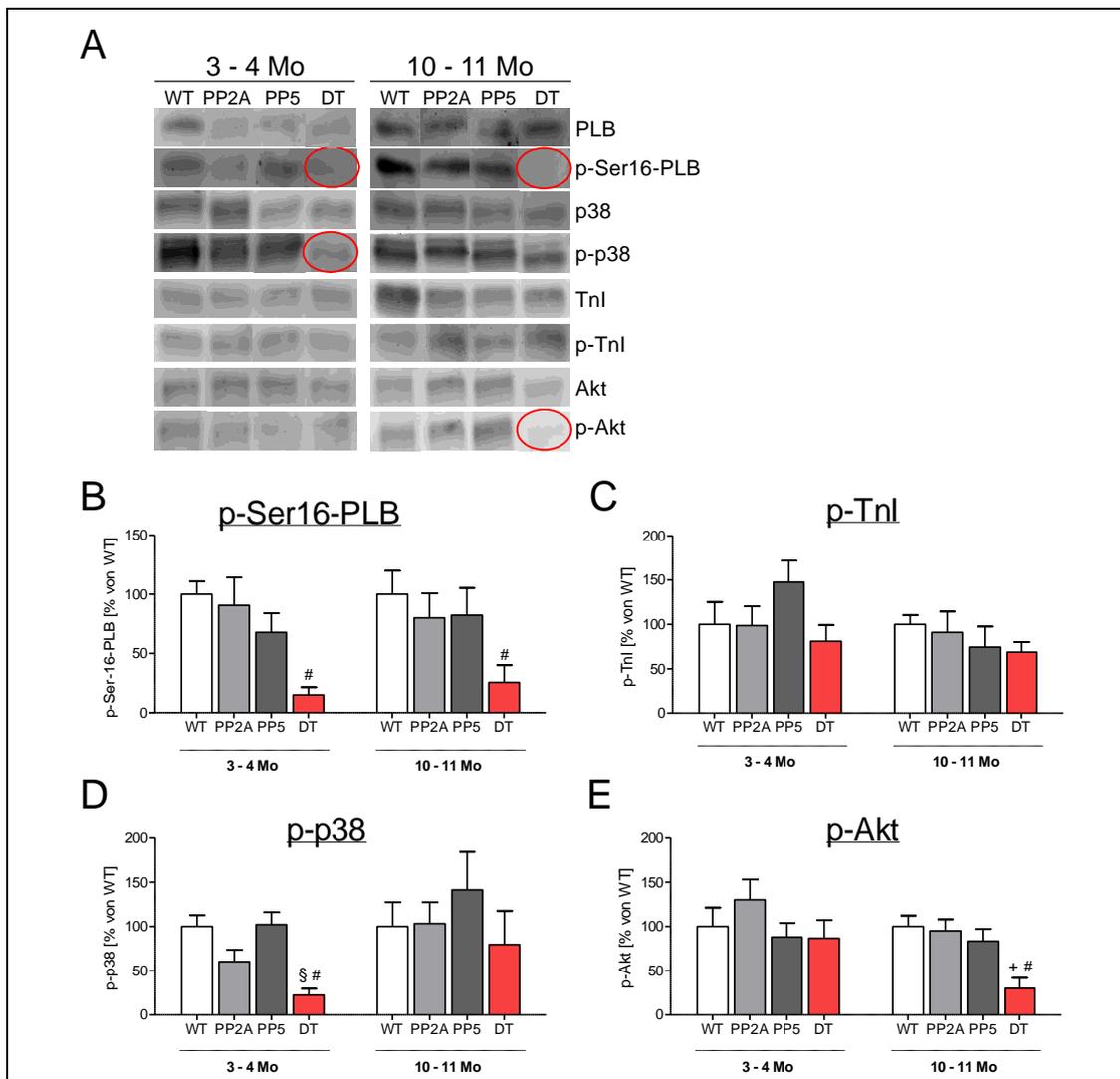


Abbildung 38: Quantitative Bestimmung der Proteinphosphorylierung nach 30-minütiger Hypoxie in Vorhöfen von 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Mäusen. **A**: Charakteristische Originalaufnahmen der entsprechenden Western Blots; **B-D**: Densitometrische Auswertungen der Western Blots B: p-Ser16-PLB; C: p-Tnl; D: p-p38; E: p-Akt; # $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. PP2A; \$ $p < 0,05$  vs. PP5;  $n = 3 - 6$ .

#### 4.7.2 Expression der PP2A und PP5 in Ventrikel und Vorhof

Es wurden im Ventrikel und in den Vorhöfen die Proteinexpression der katalytischen Untereinheit der PP2A (PP2Ac) und die Proteinexpression der PP5 mittels Western Blot in den jungen und alten Tieren ermittelt. Die Expression der PP2Ac verhielt sich in Ventrikel (Abbildung 39 B) und Vorhof gleich (Abbildung 39 D). In den jungen und alten PP2A-Tieren war sie, wie erwartet, im Ventrikel und Vorhof signifikant erhöht im Vergleich zu WT und PP5-TG. Überraschenderweise war die PP2A-Expression in den jungen und alten PP2AxPP5-Tieren nicht erhöht im Vergleich zu WT, sowohl im Ventrikel (jung:  $151,7 \pm 32,0$  % vs.  $100 \pm 16,2$  %,  $p = 0,16$ ; alt:  $144,7 \pm 39,9$  % vs.  $100 \pm 15,0$  %;  $p = 0,28$ ) als auch im Vorhof (jung:  $160,6 \pm 35,1$  % vs.  $100 \pm 11,3$  %;  $p = 0,11$ ; alt:  $189,2 \pm 46,3$  % vs.  $100 \pm 18,0$  %;  $p = 0,10$ ). Die Expression der PP5 dahingegen war in den Ventrikeln der jungen und alten Tiere sowohl in PP5-TG als auch in PP2AxPP5-TG signifikant erhöht im Vergleich zu WT und PP2A-TG (Abbildung 39 C). In den Ventrikeln der jungen Tiere war die PP5-Expression in PP5-TG und PP2AxPP5-TG gleich, während im Ventrikel der alten Tiere erstaunlicherweise die PP5-Expression von PP2AxPP5-TG verringert war im Vergleich zu PP5-TG ( $1721 \pm 526$  % vs.  $3847 \pm 417$  %;  $p < 0,05$ ; Abbildung 39 C). Die Expression der PP5 in den Vorhöfen der jungen Tiere war in PP5-TG erhöht im Vergleich zu WT und in PP2AxPP5-TG sogar erhöht im Vergleich zu WT und PP2A-TG (Abbildung 39 E). In den Vorhöfen der alten Tiere verhielt sich die PP5-Expression etwas anders. Hier war sie in den PP5-TG deutlich erhöht im Vergleich zu WT und PP2A-TG, während in den PP2AxPP5-Tieren nur eine Erhöhung der PP5-Expression im Vergleich zu WT vorlag (Abbildung 39 E).

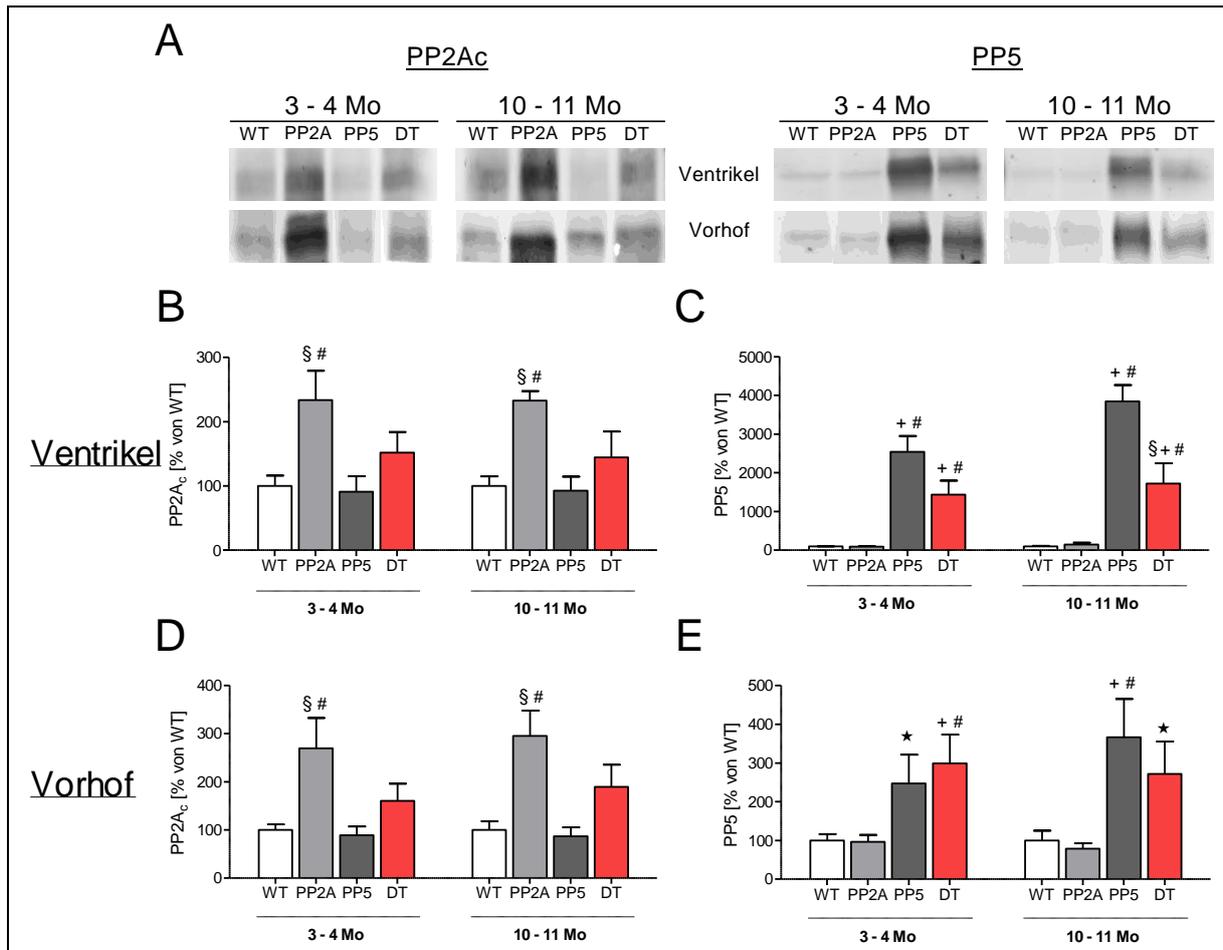


Abbildung 39: Kardiale Proteinexpression der katalytischen UE von PP2A (PP2Ac) und PP5 in Ventrikeln und Vorhöfen von 3 - 4 Monate und 10 - 11 Monate alten Mäusen; **A**: Charakteristische Originalaufnahmen der entsprechenden Western Blots; **B-D**: Densitometrische Auswertungen der Western Blots **B**: PP2Ac-Expression im Ventrikel; **C**: PP5-Expression im Ventrikel; **D**: PP2Ac-Expression im Vorhof; **E**: PP5-Expression im Vorhof; #p < 0,05 vs. WT; +p < 0,05 vs. PP2A; §p < 0,05 vs. PP5; \*p < 0,05 vs. WT (Students t-Test); n = 4 - 12.

#### 4.8 Kardiale Proteinexpression in isolierten Mitochondrien

In den isolierten Mitochondrien aus Herzgewebe (siehe 3.4.1) wurde die Expression verschiedener Proteine mittels Western Blot ermittelt. Als mitochondrialer Marker diente in diesen Untersuchungen das Protein Citratsynthase (CS), welches in der mitochondrialen Matrix vorkommt. CSQ wurde zur Unterscheidung der interfibrillären Mitochondrien (IFM) und subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM) verwendet, da es als Protein des Sarkolemmas geringfügig in den SSM aber nicht in den IFM vorkommen sollte. Abbildung 40 A zeigt die Originalaufnahme eines charakteristischen Western Blots. Anhand der erhöhten Proteinmenge an Citratsynthase in den IFM und SSM im Vergleich zum Homogenat wurde die erfolgreiche Isolierung kardialer Mitochondrien bestätigt (Abbildung 40 D). Die Mengen an Citratsynthase sind innerhalb gleicher Proben in allen Genotypen nicht verschieden (Abbildung 40 D). Weiterhin konnte mit der Abreicherung von CSQ in den SSM im Vergleich zum Homogenat und mit der völligen Abwesenheit von CSQ in den IFM die Reinheit der Mitochondrienproben bestätigt werden (Abbildung 40 E). Ebenso wurden die Proteine PP2A und PP5 in allen Proben untersucht. Die Expression der PP2A und PP5 im

Ventrikelhomogenat entspricht den Ergebnissen aus 4.7.2 (Abbildung 40 B, C). Allerdings waren unter den verwendeten Versuchsbedingungen weder in den IFM noch in den SSM die PP2A oder die PP5 detektierbar (Abbildung 40 A).

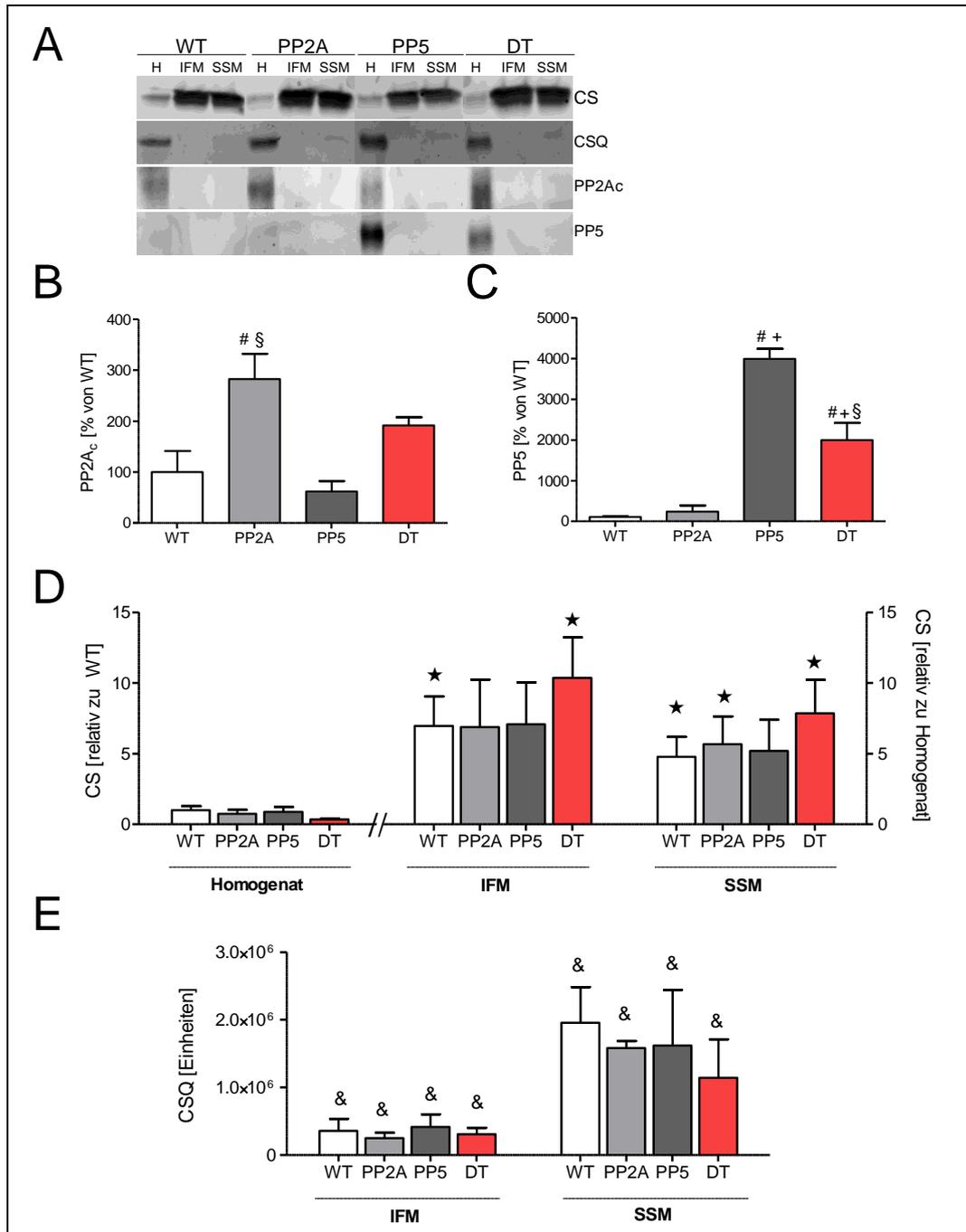


Abbildung 40: Expression von kardialen Proteinen in isolierten subsarkolemmalen (SSM) und interfibrillären (IFM) Mitochondrien im Vergleich zum Ventrikelhomogenat in Tieren im Alter von 3 - 4 Monaten; **A**: Charakteristische Originalaufnahmen der entsprechenden Western Blots; **B-E**: Densitometrische Auswertungen der Western Blots **B**: PP2Ac-Expression im Ventrikelhomogenat; **C**: PP5-Expression im Ventrikelhomogenat; **D**: CS-Expression in Homogenat, IFM und SSM; **E**: CSQ-Expression in IFM und SSM; #p < 0,05 vs. WT; §p < 0,05 vs. PP5; +p < 0,05 vs. PP2A; \*p < 0,05 vs. Homogenat (Students t-Test); &p < 0,05 vs. Homogenat (ANOVA); n = 4 - 6.

## 4.9 Kardiale Transkription Herzinsuffizienz-assoziiierter Gene und Proteinphosphatasen

Mittels beschriebener Quantitativer Real-Time PCR (siehe 3.4.2.5) wurde die Transkription verschiedener Gene in den Mausherzen mittels Darstellung über die  $2^{-\Delta CT}$ -Werte untersucht (Livak und Schmittgen 2001). Die  $\Delta CT$ -Werte in jedem Tier wurden durch Differenz des CT-Wertes des zu ermittelnden Gens und des CT-Werts der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) derselben Probe ermittelt. Danach wurden die  $\Delta CT$ -Werte der transgenen Tiere auf die des WT-Tieres normiert. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, weil es als sogenanntes housekeeping Gen fungiert und damit unabhängig von Zellstadien und Zelltyp exprimiert wird.

### 4.9.1 Hypertrophie- und Herzinsuffizienzmarker

Als Marker für eine Hypertrophie und Herzinsuffizienz wurden das atriale natriuretische Peptid (ANP), B-natriuretische Peptid (BNP), die  $\beta$ -Isoform der schweren Kette 7 des Myosins ( $\beta$ -MHC) und die  $\alpha$ -Isoform der schweren Kette 6 des Myosins ( $\alpha$ -MHC) herangezogen. Abbildung 41 zeigt die Gentranskription in WT-, PP2A-, PP5- und PP2AxPP5-Tieren im Alter von 3 - 4 Monaten und 10 - 11 Monaten. Sowohl die Menge an ANP, als auch an BNP war in den PP2AxPP5-Tieren beider Altersgruppen erhöht, im Vergleich zum WT (Abbildung 41 A, B). In den PP2A-Tieren ist ausschließlich in der jungen Altersgruppe ANP und BNP erhöht im Vergleich zum WT (Abbildung 41 A, B). Die Transkription von  $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC war in den jungen PP2AxPP5-Tieren unverändert zum WT, jedoch verringert zu den PP5-Tieren. In den alten PP2AxPP5-Tieren war eine Verringerung von  $\alpha$ -MHC im Vergleich zum WT messbar (Abbildung 41 C).

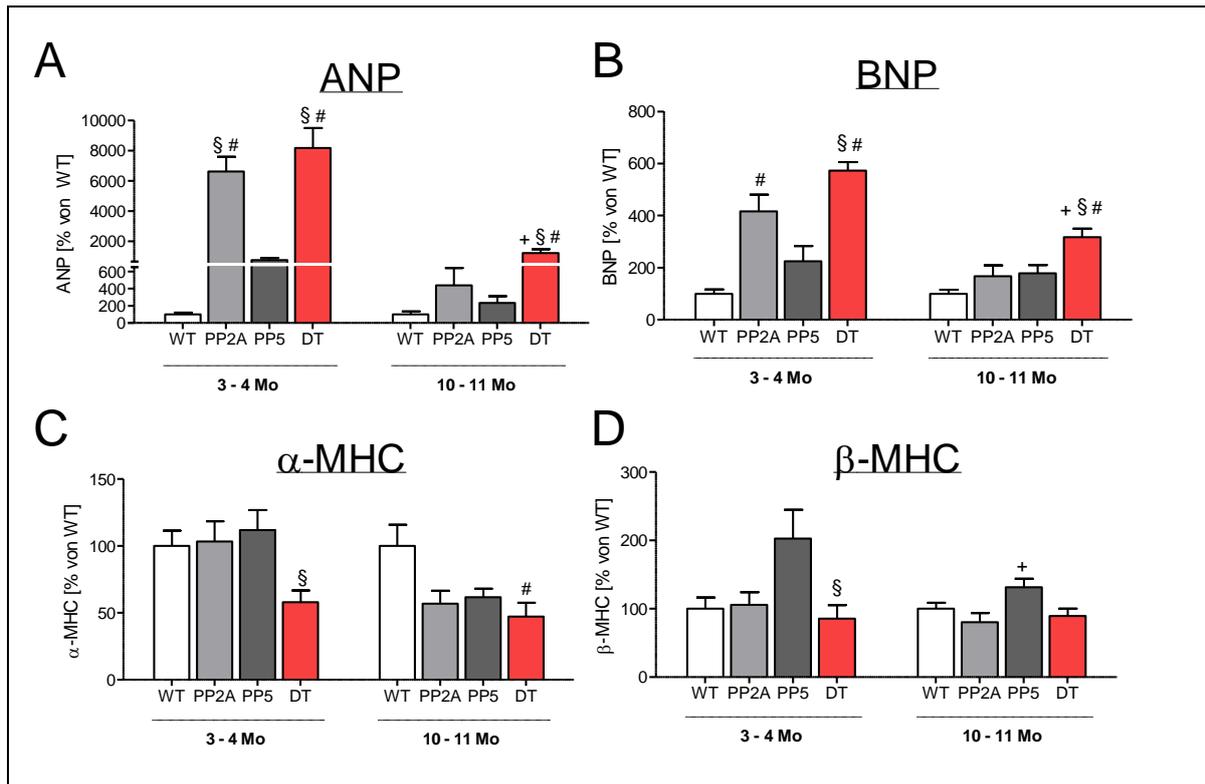


Abbildung 41:  $2^{-\Delta CT}$ -Darstellung der kardialen Expression von Hypertrophiemarkern in 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Tieren; **A**: ANP...atriales natriuretisches Peptid; **B**: BNP...B-natriuretisches Peptid; **C**:  $\alpha$ -MHC... $\alpha$ -Isoform der schweren Kette 6 des Myosins; **D**:  $\beta$ -MHC... $\beta$ -Isoform der schweren Kette 7 des Myosins; # $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. PP2A; § $p < 0,05$  vs. PP5;  $n = 5 - 6$ .

#### 4.9.2 Entzündungsmarker

Zur Abschätzung einer möglichen kardialen Entzündung wurde die Transkription von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), dem Nukleären Faktor  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) und Interleukin-6 (IL-6) bestimmt. IL-6 war in den jungen PP2AxPP5-Tieren stark erhöht im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG. In den alten PP2AxPP5-Tieren wurde ebenfalls eine Erhöhung von IL-6 im Vergleich zum WT ermittelt (Abbildung 42 C). NF- $\kappa B$  war in den jungen PP2A-, PP5- und PP2AxPP5-Tieren ebenso erhöht im Vergleich zum WT, jedoch in den jungen Tieren wieder normalisiert zu WT (Abbildung 42 B). Die Gentranskription von TNF $\alpha$  war in allen Tieren unverändert (Abbildung 42 A).

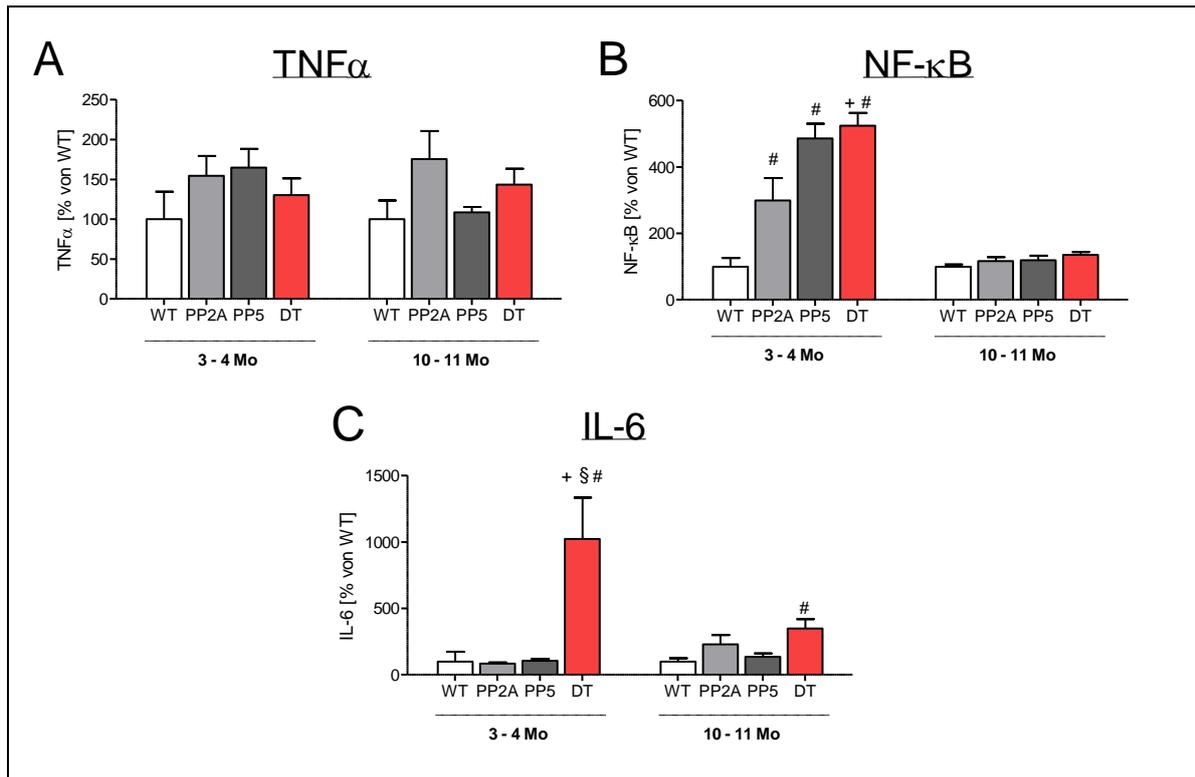


Abbildung 42:  $2^{-\Delta CT}$ -Darstellung der kardialen Expression von Entzündungsmarkern in 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Tieren. **A:** TNF $\alpha$ ...Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; **B:** NF- $\kappa$ B...Nukleärer Faktor  $\kappa$ B; **C:** IL-6...Interleukin-6; # $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. PP2A; § $p < 0,05$  vs. PP5;  $n = 5 - 6$ .

#### 4.9.3 Fibrosemarker

Als Fibrosemarker wurde die Gentranskription von Alpha-1-Typ-I-Kollagen (Col1 $\alpha$ 1) und Alpha-1-Typ-III-Kollagen (Col3 $\alpha$ 1), sowie die von Fibronectin 1 (Fn1) bestimmt. Die PP2AxPP5-Tiere wiesen eine deutliche Erhöhung beider Kollagene in den jungen Tieren im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG auf, sowie in den alten Tieren im Vergleich zu WT auf. Weiterhin war Col3 $\alpha$ 1 in den alten PP2A-Tieren und Col1 $\alpha$ 1 in den jungen PP2A-Tieren im Vergleich zum WT erhöht (Abbildung 43). Fn1 war in den jungen PP2AxPP5 Tieren erhöht im Vergleich zu WT, ging jedoch in den alten Tieren auf das Niveau von WT zurück (Abbildung 43 C).

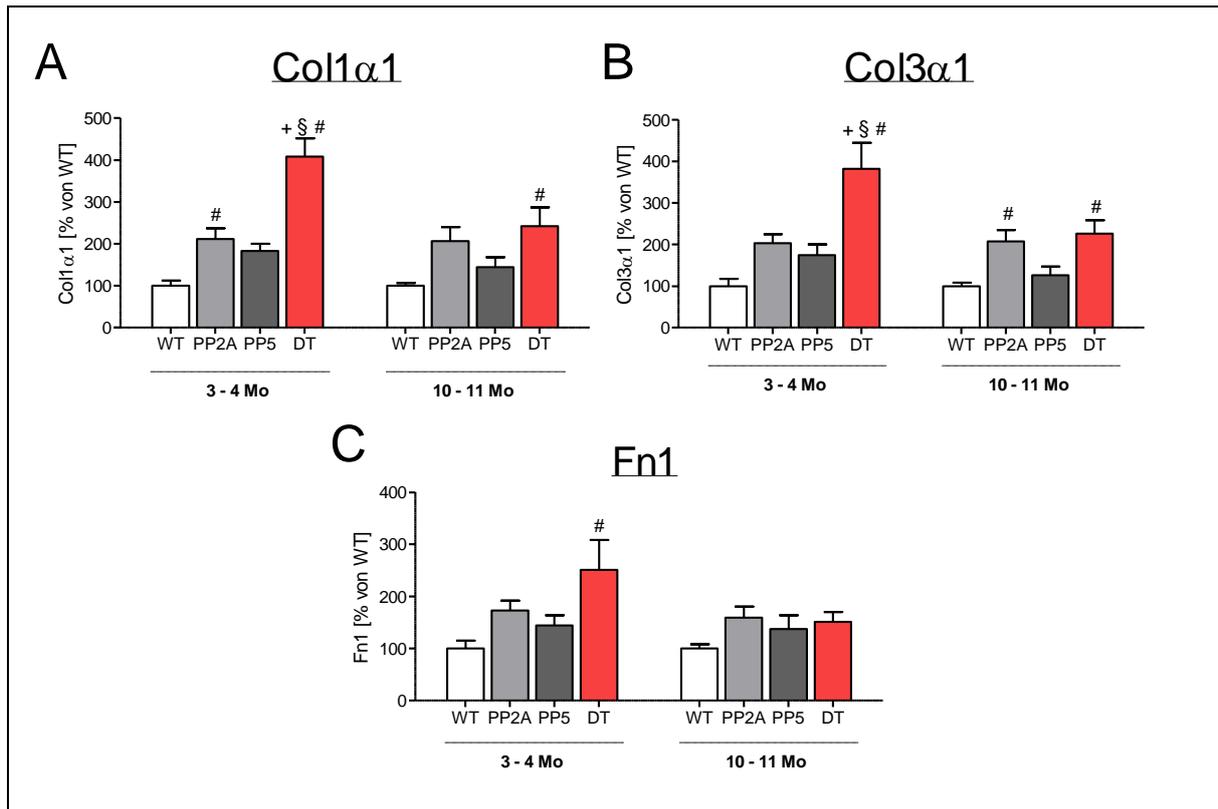


Abbildung 43: 2<sup>-ΔCT</sup>-Darstellung der kardialen Expression von Fibrosemarkern in 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Tieren. **A:** Col1α1...Alpha-1-Typ-I-Kollagen; **B:** Col3α1...Alpha-1-Typ-III-Kollagen; **C:** Fn1...Fibronektin 1; #p < 0,05 vs. WT; +p < 0,05 vs. PP2A; §p < 0,05 vs. PP5; n = 5 - 6.

#### 4.9.4 Proteinphosphatasen

##### 4.9.4.1 PP2A

Die Ermittlung der Gentranskription für die PP2A und PP5 erfolgte, wie in Kapitel 4.9 beschrieben, durch die Differenz aus den  $\Delta$ CT-Werten des zu ermittelnden Gens und GAPDH jeder Probe. Es wurden für die PP2A zum einen die Summe aus der endogenen und exogenen Form der PP2A $\alpha$  (Gesamt-PP2A $\alpha$ ) und zum anderen die PP2A $\alpha$  bestimmt. Zusätzlich wurde spezifisch die exogene, überexprimierte Form der PP2A $\alpha$  (PP2A $\alpha$ -TG-Sequenz) bestimmt. Diese konnte, wie erwartet, nur in PP2A-TG und PP2A $\alpha$ PP5-TG ermittelt werden, da sie nur in diesen Tieren exprimiert wurde. In beiden Altersgruppen entsprach das Transkriptionsverhältnis der Gesamt-PP2A $\alpha$  zwischen PP2A-TG und PP2A $\alpha$ PP5-TG dem der PP2A $\alpha$ -TG-Sequenz, sodass man davon ausgehen kann, dass die erhöhte Gentranskription in PP2A-TG und PP2A $\alpha$ PP5-TG ausschließlich durch die exogene Überexpression der PP2A $\alpha$  zustande kommt. Die niedrigen Werte der Gesamt-PP2A $\alpha$  in WT und PP5-TG demonstrieren, dass die Transkription der endogenen PP2A $\alpha$  so niedrig ist, dass womöglich auch ihr Beitrag zur Gesamt-PP2A $\alpha$  in PP2A-TG und PP2A $\alpha$ PP5-TG zu vernachlässigen ist. Erstaunlicherweise erkennt man sowohl in der Transkription der PP2A $\alpha$ -Sequenz (Abbildung 44 A, B), als auch in der Transkription der Gesamt-PP2A $\alpha$  (Abbildung 44 C, D) altersabhängige Unterschiede zwischen PP2A-TG und PP2A $\alpha$ PP5-TG. In den jungen

Tieren war die Transkription der PP2A $\alpha$ -Sequenz deutlich erhöht in PP2A-TG im Vergleich zu PP2AxPP5-TG ( $0,130 \pm 0,024$  vs.  $0,048 \pm 0,006$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 44 A). In den alten Tieren dahingegen, gab es keinen Unterschied zwischen der Transkription der PP2A $\alpha$ -Sequenz in PP2A-TG und PP2AxPP5-TG ( $0,041 \pm 0,009$  vs.  $0,028 \pm 0,01$ ;  $p = 0,36$ ; Abbildung 44 B). Die gleiche altersabhängige Veränderung zeigte sich in der Transkription der Gesamt-PP2A $\alpha$  (Abbildung 44 C, D). Die Transkription der Gesamt-PP2A $\alpha$  war, wie erwartet, in den jungen und alten PP2A-TG und PP2AxPP5-TG deutlich erhöht im Vergleich zu WT und PP5. Die Untersuchung der endogenen PP2A $\beta$  in jungen und alten Tieren ergab keine altersabhängigen oder Genotyp-abhängigen Transkriptionsunterschiede (Abbildung 44 E, F).

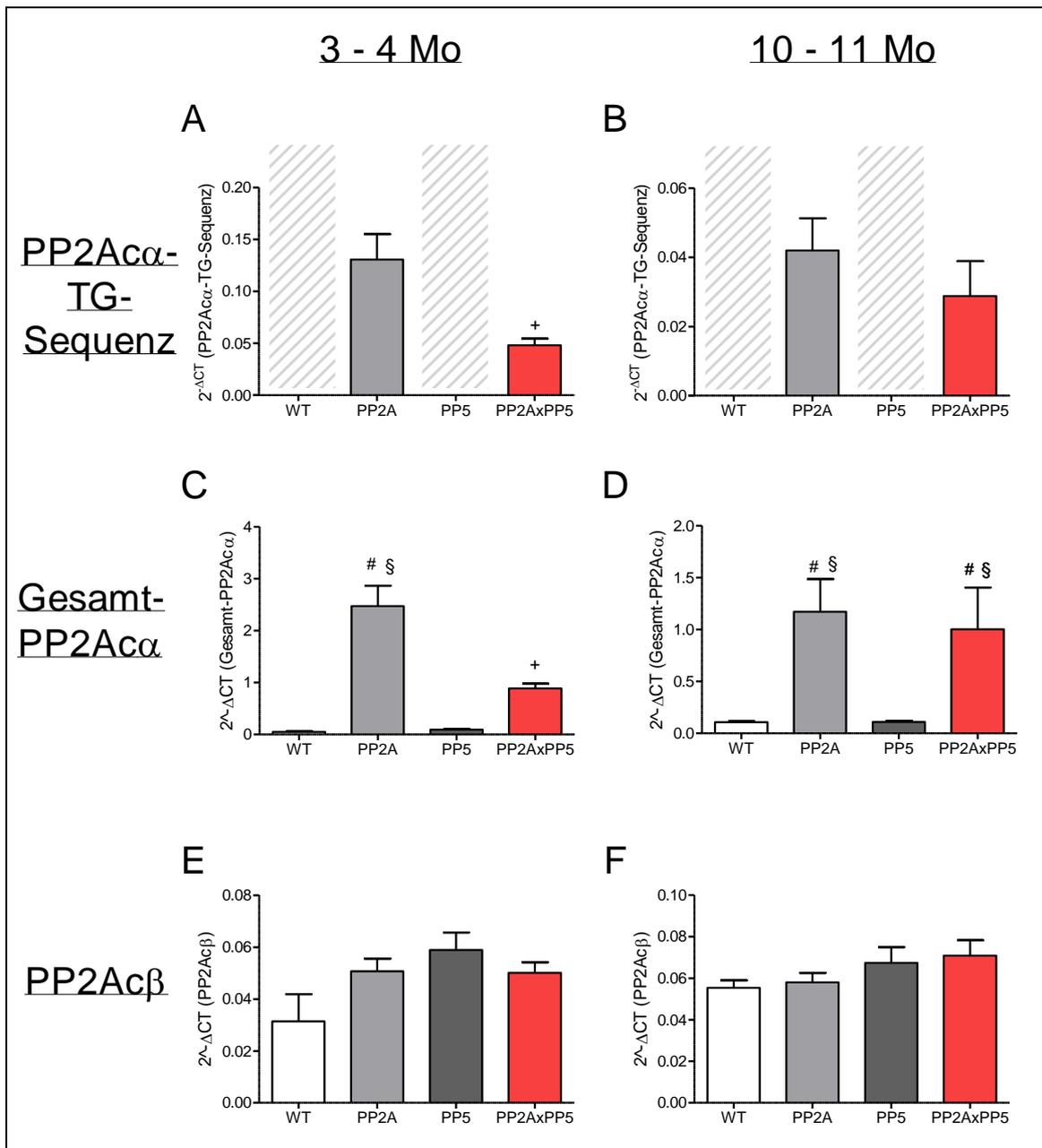


Abbildung 44:  $2^{-\Delta CT}$ -Darstellung der kardialen Gentranskription von PP2A in 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Tieren. **A, B:** PP2A $\alpha$ -Sequenz; **C, D:** Gesamt-PP2A $\alpha$ ; **E, F:** PP2A $\beta$ ; # $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. PP2A; \$ $p < 0,05$  vs. PP5;  $n = 4 - 6$ .

## 4.9.4.2 PP5

Es wurde auch für die PP5 die überexprimierte, exogene Form (PP5-TG-Sequenz, Abbildung 45 A, B) und die Summe aus der Transkription der endogenen und exogenen Form (Gesamt-PP5, Abbildung 45 C, D) bestimmt. In beiden Altersgruppen war in den PP5-Tieren, wie zu erwarten, die Transkription der Gesamt-PP5 signifikant erhöht im Vergleich zu WT und PP2A-TG und, überraschenderweise auch erhöht im Vergleich zu PP2AxPP5-TG (Abbildung 45 C, D). Die PP5-TG-Sequenz konnte ausschließlich in den PP5- und PP2AxPP5-Tieren nachgewiesen werden, da dieses Gen in den WT- und PP2A-Tieren nicht vorhanden ist. Sie war in den jungen und alten PP2AxPP5-Tieren verringert im Vergleich zu PP5-TG (jung:  $0,313 \pm 0,057$  vs.  $1,063 \pm 0,176$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 45 A; alt:  $0,369 \pm 0,139$  vs.  $1,363 \pm 0,304$ ;  $p < 0,05$ ; Abbildung 45 B). Anhand dieser Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass die unterschiedliche Gentranskription der Gesamt-PP5 in PP5-TG und PP2AxPP5-TG hauptsächlich durch die Unterschiede in der Expression der PP5-TG-Sequenz in PP5-TG und PP2AxPP5-TG zustande kommen.

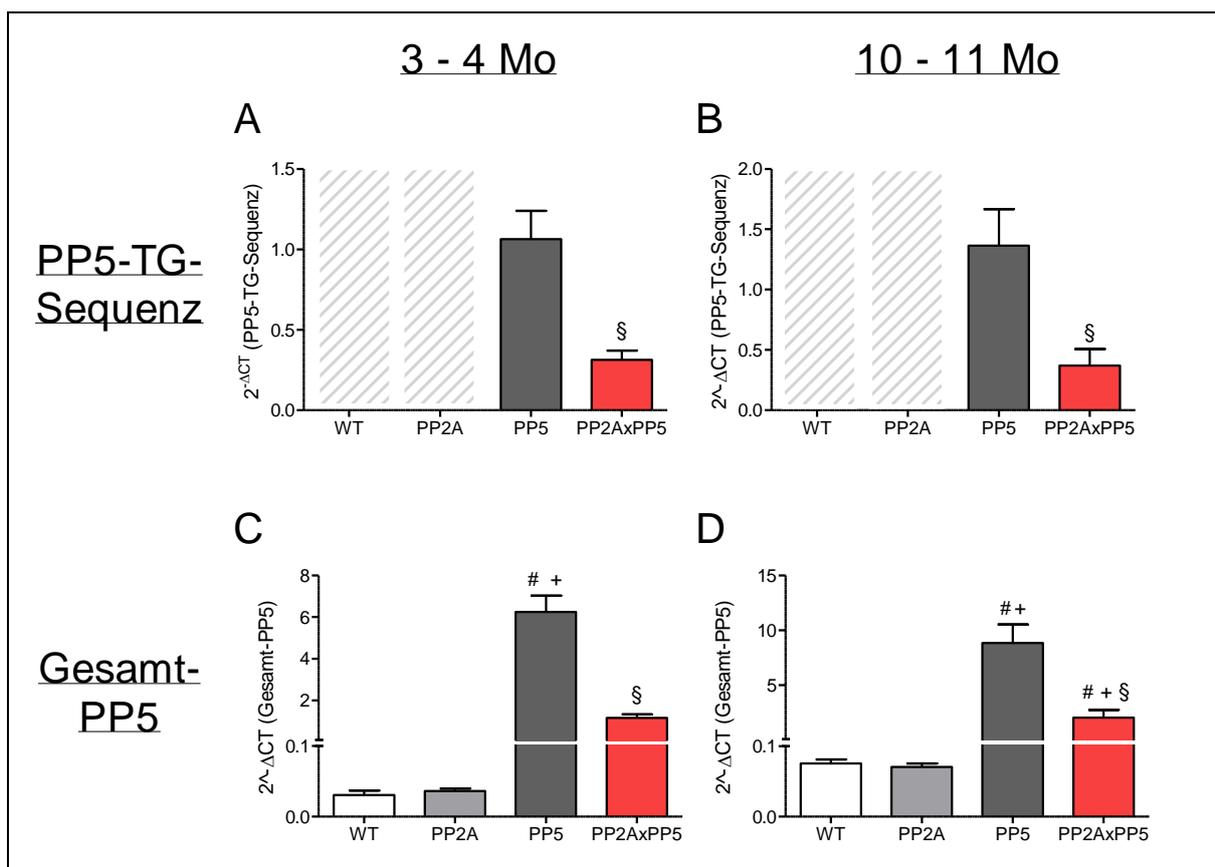


Abbildung 45:  $2^{-\Delta CT}$ -Darstellung der kardialen Gentranskription von PP5 in 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Tieren. **A, B:** PP5-TG-Sequenz; **C, D:** Gesamt-PP5; # $p < 0,05$  vs. WT; + $p < 0,05$  vs. PP2A; § $p < 0,05$  vs. PP5;  $n = 4 - 6$ .

#### 4.10 Proteinphosphatase-Aktivität

Die Aktivität der kardialen PP1 und PP2A im Ventrikel von jungen und alten WT-, PP2A-, PP5- und PP2AxPP5-Tieren wurde in einem radioaktiven Assay mit  $^{32}\text{P}$ -Phosphorylase a als Substrat bestimmt (siehe 3.3.7). Die Aktivität der PP1 war in den jungen PP2AxPP5-Tieren deutlich erhöht im Vergleich zu WT ( $0,75 \pm 0,12$  vs.  $0,15 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ) und PP5-TG ( $0,75 \pm 0,12$  vs.  $0,32 \pm 0,06$ ,  $p < 0,05$ ; Abbildung 46 A). In den jungen PP2A-Tieren war die PP1-Aktivität zwar nicht mittels Varianzanalyse erhöht, aber durch Berechnung mittels *Students t-Test* zumindest signifikant erhöht im Vergleich zu WT (Abbildung 46 C). In den alten Tieren war die Aktivität der PP1 sowohl in den PP2AxPP5-Tieren, als auch in den PP2A-TG Tieren erhöht, im Vergleich zum WT (PP2AxPP5:  $0,55 \pm 0,07$  vs.  $0,21 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ; PP2A:  $0,46 \pm 0,05$  vs.  $0,21 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ; Abbildung 46 B). Insgesamt verhielt sich die PP2A-Aktivität ähnlich. Diese war wie zu erwarten, in den jungen und alten PP2A-Tieren erhöht im Vergleich zu WT (jung:  $1,30 \pm 0,17$  vs.  $0,54 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ; alt:  $0,85 \pm 0,07$  vs.  $0,46 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ) und im Vergleich zu PP5-TG (jung:  $1,30 \pm 0,17$  vs.  $0,48 \pm 0,09$ ,  $p < 0,05$ ; alt:  $0,85 \pm 0,07$  vs.  $0,49 \pm 0,04$ ,  $p < 0,05$ ; Abbildung 46 C, D). Ebenso war die Aktivität der PP2A in den jungen und alten PP2AxPP5-Tieren erhöht im Vergleich zu WT und PP5-TG, obwohl wiederum anzumerken ist, dass sie in den jungen PP2AxPP5-Tieren nur mittels *Students t-Test* signifikant erhöht war gegenüber WT (Abbildung 46C, D). In der Betrachtung der Gesamt-Phosphatase-Aktivität war diese in den jungen und alten Tieren unverändert (Abbildung 46 E, F). Die Werte der PP2A- und PP2AxPP5-Tiere waren hier deutlich erhöht im Vergleich zu WT und PP5-TG (Abbildung 46 E, F). Insgesamt zeigte sich eine erhöhte PP1-, PP2A- und Gesamt-PP-Aktivität in den PP2A- und PP2AxPP5-Tieren im Vergleich zum WT und teilweise im Vergleich zu PP5-TG.

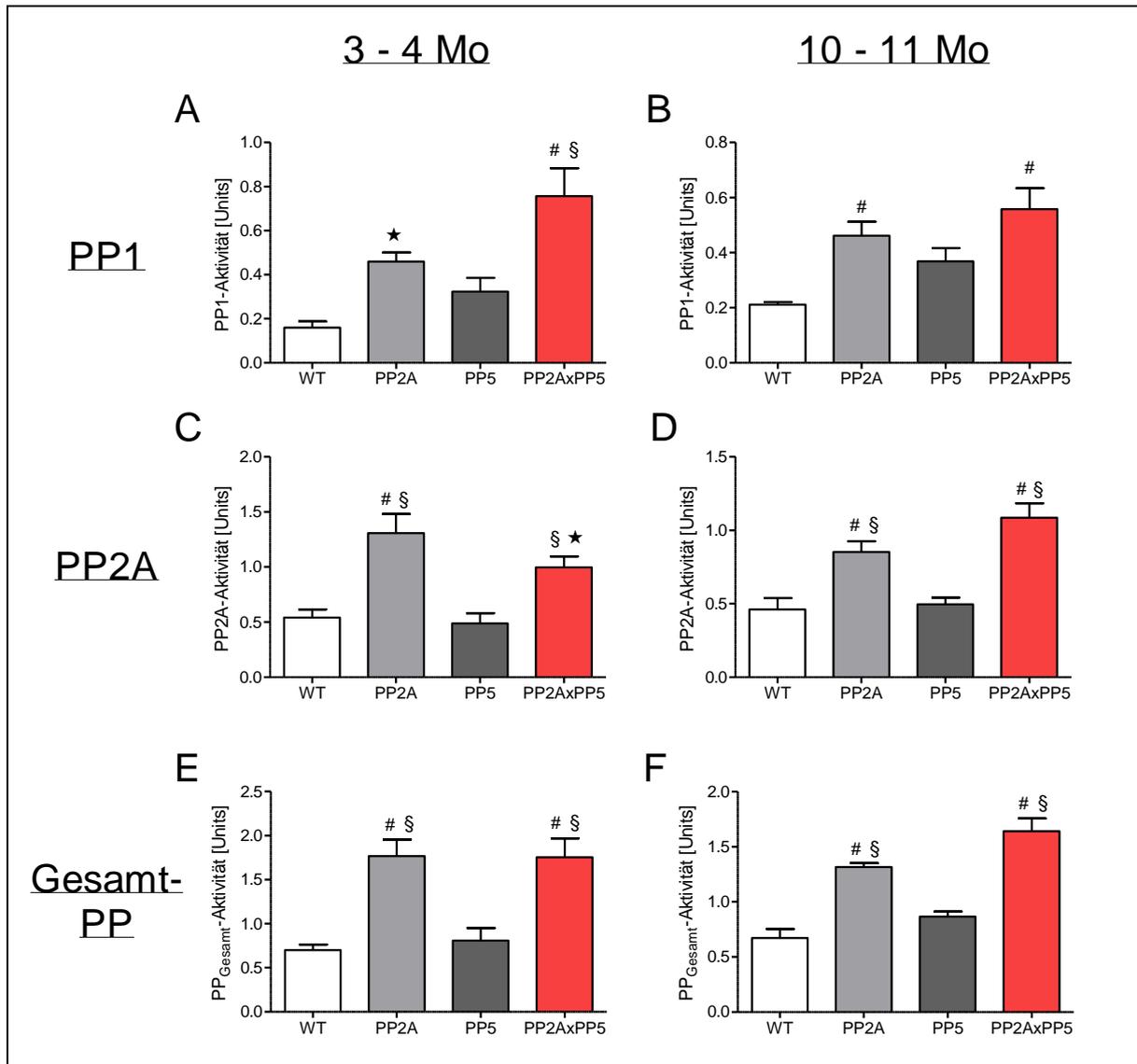


Abbildung 46: Darstellung der Aktivität der PP1 und PP2A, sowie der Gesamt-PP-Aktivität in Ventrikeln von 3 - 4 und 10 - 11 Monate alten Tieren. **A, B:** PP1-Aktivität; **C, D:** PP2A-Aktivität; **E, F:** Gesamt-PP-Aktivität; # $p < 0,05$  vs. WT; \$ $p < 0,05$  vs. PP5; \* $p < 0,05$  vs. WT (Students t-Test),  $n = 4 - 6$ .

## 5 Diskussion

Die dargestellten Ergebnisse zeigten die erfolgreiche Etablierung und Charakterisierung eines doppelt transgenen Mausmodells. Die vielseitigen Untersuchungen ermöglichten Einblicke in den Proteinphosphatase-Einfluss basal und unter ausgewählten Stressbedingungen. Die Messungen bestimmter Protein- oder Genmarker verhalfen zur Einordnung veränderter Signalwege durch die PP-Überexpression.

### 5.1 Kardialer Phänotyp der transgenen Tiere

Die Untersuchungen zeigten verschiedene kardiale Phänotypen in den transgenen Tieren. Anhand des erhöhten relativen Herzgewichts in den PP2A-Tieren (Abbildung 20) wurde bestätigt, dass die kardiomyozytenspezifische Überexpression der PP2A zu einer kardialen Hypertrophie führt (Gergs et al. 2004). Diese Hypertrophie verstärkte sich im Alter bedingt durch eine Erhöhung des Herzgewichtes. Neben des Herzgewicht/Körpergewicht-Quotienten (relatives Herzgewicht) kann auch der Quotient aus Herzgewicht und Tibialänge zur Beurteilung der kardialen Hypertrophie herangezogen werden. Dieser wird als verlässlicher für Tiere unter klinischen Bedingungen beschrieben, da die Tibialänge im Gegensatz zum Körpergewicht nicht geschlechtsspezifisch beeinflusst wird (Tiemann et al. 2003). Die Tibialänge wurde in den vorliegenden Versuchen nicht ermittelt, da die Tiere keinen Operationen unterzogen wurden, sondern einmalig in einem finalen Versuch euthanasiert wurden, sodass nicht von einem klinischen Einfluss des Körperwachstums der Tiere auszugehen war. Weiterhin stiegen altersabhängig das Leber- und Lungengewicht der PP2A-Tiere. Das hatte allerdings keinen Einfluss auf die Lebenserwartung der PP2A-Tiere (Abbildung 18). Eine Nierenbeteiligung aufgrund einer PP2A-bedingt kardiovaskulären Einschränkung konnte ausgeschlossen werden, da weder die relevanten Elektrolyte wie Natriumionen oder Kreatinin und Harnstoff noch das Nierengewicht verändert waren (Tabelle 5, Tabelle 6). Die histologischen Daten wiesen auf eine im Alter fortschreitende Fibrose in den PP2A-Tieren hin (Abbildung 26), was die Ergebnisse aus der Literatur bestätigen (Gergs et al. 2004). Die kardiale Überexpression der PP5 hatte geringere Auswirkungen auf den kardialen Phänotyp dieser Tiere. Es wurde weder eine veränderte Überlebenswahrscheinlichkeit (Abbildung 18), eine kardiale Hypertrophie anhand des relativen Herzgewichts, noch Veränderungen in Herz-, Körper-, Leber- und Nierengewicht (Abbildung 20, Tabelle 5) oder des Elektrolythaushalts festgestellt (Tabelle 6). Jedoch kann das altersabhängig erhöhte Lungengewicht der PP5-Tiere (Tabelle 5) ein Anhaltspunkt für ein Lungenödem und eine in der Literatur beschriebene dilatative Kardiomyopathie im fortgeschrittenen Alter sein (Gergs et al. 2012). Histologisch waren die PP5-Tiere allerdings unauffällig (Abbildung 25, Abbildung 26). Der kardiale Phänotyp der PP2AxPP5-Tiere dahingegen unterschied sich stark von dem der mono-transgenen Tiere. Die

Überlebenswahrscheinlichkeit war mit einem mittleren Überleben von 236 Tagen geschlechtsunabhängig verringert im Vergleich zur statistischen Lebenserwartung von Wildtyp-Tieren von 2 - 3 Jahren (Fox 2007, Abbildung 18, Abbildung 19). Das kann ein Merkmal für eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz sein, welche aufgrund der vergleichbaren Mortalität ein ähnliches Ausmaß wie in den PP1c-überexprimierenden Mäusen haben könnte (Carr et al. 2002). Die Tiere hatten eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie und wiesen einen altersabhängigen Anstieg des Körpergewichts auf (Abbildung 20). Die erhöhte Mortalität und die kardiale Hypertrophie wiesen auf eine stark eingeschränkte kardiale Funktionalität durch Co-Überexpression der PP2A und PP5 hin. Das erhöhte Lungengewicht kann ein weiteres Indiz für ein Lungenödem im Rahmen einer sich entwickelnden Herzinsuffizienz sein. Die histologischen Präparate konnten ausschließlich qualitativ bewertet werden, da eine Quantifizierung von n = 3 Herzen pro Gruppe statistisch schwierig auswertbar war. Dennoch waren die PP2AxPP5-Tiere histologisch auffällig, da die Kardiomyozyten im fortgeschrittenen Alter eine diffuse, interstitielle Fibrose, ähnlich dem Bild der PP2A-Tiere, aufwiesen (Abbildung 26).

## **5.2 Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf die basale kardiale Funktionalität**

Anhand der Echokardiographie-Aufnahmen der Tiere wurde die kardiale Funktionalität in vivo untersucht. Die EF ist der wichtigste Parameter zur Beurteilung der linksventrikulären Funktion (Ram et al. 2011). Die verminderte linksventrikuläre EF in den PP2A-Tieren (22,6 %) und PP2AxPP5-Tieren (18,9 %) im Vergleich zu WT- und PP5-Tieren bestätigte die Ergebnisse der Untersuchungen des kardialen Phänotyps. Die EF der WT-Tiere lag mit 50 % etwas unter dem Vergleichswert beim Menschen, da man hier Normalwerte von  $\geq 55$  % definiert (Lang et al. 2005; 2015). Betrachtet man aber die relative Abnahme der EF um mindestens 50 % in den PP2A- und PP2AxPP5-Tieren im Vergleich zum WT, kann die Einschränkung nach der American Society of Echocardiography (ASE) als hochgradig reduziert bezeichnet werden (Lang et al. 2005). Nach den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) entspricht das dem klinischen Bild einer mittelgradigen bis schweren systolischen Herzinsuffizienz (Ponikowski et al. 2016). Die verlängerten Isovolumetrischen Kontraktionszeiten (IVCT) in den PP2A- und PP2AxPP5-Tieren wiesen ebenso auf eine gestörte Kontraktilität hin. Die linksventrikulären Dimensionen in den PP2A- und PP2AxPP5-Tieren, wie die verringerten systolischen und diastolischen Durchmesser und die erhöhten end-systolischen und end-diastolischen Volumina, bestätigten den Befund einer systolischen Dysfunktion (Abbildung 33). Ein wichtiges Indiz für eine gestörte diastolische Funktion war der erhöhte linksventrikuläre Füllungsdruck bedingt durch eine gestörte Ventrikelfüllung. Zu dessen Beurteilung wurde zum einen  $E'$  und zum anderen das Verhältnis aus  $E/E'$  herangezogen (Oh et al. 2006; Ommen et al. 2000; Paulus et al. 2007). In PP2A-TG wurde

sowohl eine verringerte Mitralanulusgeschwindigkeit als auch ein erhöhter Wert aus  $E/E'$  gemessen, was deutlich eine diastolische Fehlfunktion zeigte. Die diastolische Dysfunktion in PP2A-TG wurde durch eine verlängerte isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT) bestätigt (Collins et al. 2003). Auch in PP5 zeigte sich im Gewebedoppler nach Isoprenalingabe ein verminderter Anstieg von  $E'$ , was jedoch ein Einzelbefund einer Abweichung zum WT war. In PP2AxPP5-TG waren ebenfalls neben einer erhöhten  $E'$  eine verlängerte IVRT gemessen worden, sodass auch eine diastolische Dysfunktion durch gemeinsame Überexpression der PP2A und PP5 entstehen könnte. Das Verhältnis aus  $E/E'$  konnte nicht bestimmt werden, da aufgrund der enorm verminderten Pumpleistung des Herzens dieser Tiere ein Vierkammerblick, der eine kopfüber geneigte Position des Tieres erfordert, nicht möglich war. Zur Beurteilung der globalen linksventrikulären Funktion diente der MPI als verlässlicher Parameter (Tei et al. 1997). Er beinhaltet die systolische und diastolische Funktion unter Einberechnung der ET, IVRT und IVCT und ist unabhängig von der Herzfrequenz (Goroshi und Chand 2016; Schaefer et al. 2005). Die deutliche Erhöhung dieses Wertes in den PP2A- und PP2AxPP5-Tieren bewies eine globale, linksventrikuläre Funktionseinschränkung. Die Messungen der Blutflüsse durch die Pulmonalarterie (Arteria pulmonalis) ermöglichten die indirekte Beurteilung der rechtsventrikulären Leistung. Die direkte Messung des rechten Ventrikels schwer möglich, weil er aufgrund seiner geringen Größe von anderen Strukturen verdeckt wurde. In den PP2AxPP5-Tieren zeigte sich eine Abnahme des Blutflusses in Pulmonalarterie und aufsteigender Aorta durch verringerte Werte des VTI und der Spitzengeschwindigkeit im Vergleich zu WT, PP2A-TG und PP5-TG, was die Vermutung einer rechtsventrikulären Leistungsminderung in den PP2AxPP5-Tieren bestätigen könnte. Entgegen der Literatur wurde anhand aller in-vivo Untersuchungen keine Funktionalitätseinschränkung durch kardiale Überexpression der PP5 festgestellt (Gergs et al. 2012).

Die Protein-Expressionen von Tnl, PLB und CSQ waren unverändert in allen Ventrikeln, was in Anlehnung an die Literatur nicht unerwartet war (Carr et al. 2002; Movsesian et al. 1994; Schwinger et al. 1999). Deshalb wurde, wie in vielen Arbeiten zuvor, CSQ als Ladungskontrolle verwendet (Gergs et al. 2019a; 2019c). Die Spezifität des CSQ-Antikörpers konnte durch Kontrollen mit Herzen von CSQ-Knock-out Mäusen gewährleistet werden. Insgesamt lassen sich die Protein-Expressionen zwischen den einzelnen Genotypen und Altersgruppen gut vergleichen, da alle Proben mit dem selben Antikörper behandelt wurden. Die PLB-Antikörper wurden vor Anwendung erhitzt, um das Protein leichter ausschließlich anhand der Monomerstruktur zu detektieren und innerhalb der verschiedenen Genotypen und Altersgruppen zu vergleichen. In den Ventrikeln der PP2A-Tiere war die Expression von SERCA vermindert, was bereits für Tiere mit kardialer Überexpression von PP2A gezeigt wurde (Hoehn et al. 2015), jedoch keine typische Veränderung für Kardiomyopathien an sich

ist (Hoehn et al. 2015; Schwinger et al. 1999). Die Proteinexpression von SERCA ist getrennt zur Enzymaktivität zu werten, da eine verringerte SERCA-Aktivität sowie eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität von SERCA wiederum ein typisches Merkmal einer Kardiomyopathie darstellen (Hasenfuss et al. 1994; Münch et al. 1998; Schwinger et al. 1995; 1999). Das lässt vermuten, dass trotz unveränderter Proteinexpression von SERCA und PLB im Ventrikel die SERCA-Aktivität in den PP2A/PP5 Tieren verringert sein könnte, da die verminderte Phosphorylierung von PLB an Ser-16, wie in Abbildung 37 B zu sehen, im direkten Zusammenhang mit der verringerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität von SERCA steht (Schwinger et al. 1999). Weitere Tiermodelle mit ähnlichen kontraktile Dysfunktionen wie die PP2A/PP5-Tiere hatten neben einer unveränderten PLB-Proteinexpression und einer verminderten PLB-Ser16-Phosphorylierung auch eine verringerte SERCA-Proteinexpression vorliegen, was die Komplexität der einzelnen regulatorischen Signalwege verdeutlicht (Carr et al. 2002).

Die mRNA-Untersuchungen zeigten eine Erhöhung von ANP und BNP in den Ventrikeln der PP2A/PP5- und PP2A-Tiere (Abbildung 41). ANP und BNP sind typische biochemische Hypertrophiemarker, die u.a. in der Klinik zur Beurteilung einer Herzinsuffizienz herangezogen werden, wobei die kardiale Hypertrophie vorrangig von ANP und die kardiale Fibrose vorrangig von BNP reguliert wird (Chien et al. 1991; Potter et al. 2009). Sowohl ANP als auch BNP gingen in den PP2A- und PP2A/PP5-Tieren in der Altersgruppe von 10 - 11 Monaten zurück. In den PP2A-Tieren waren sie in diesem Alter sogar auf einem Niveau zu WT. Das könnte auf einen möglichen Einfluss der Ser/Thr-PP Aktivität auf die ANP- und BNP-Regulation hindeuten.

Es wurden zusätzlich die mRNA-Transkriptionsraten der beiden Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  der schweren Ketten des Myosins untersucht, welches als kontraktiles Protein für den Querbrückenzyklus von Bedeutung ist (Squire 2019). Beide Isoformen kommen spezieabhängig vor und unterscheiden sich in ihrer ATPase-Aktivität. In der Embryonalentwicklung ist sowohl im Menschen, als auch in der Maus die  $\beta$ -Isoform vorherrschend im Ventrikel. In der Maus wird kurz nach der Geburt die  $\beta$ -Isoform durch die  $\alpha$ -Isoform innerhalb weniger Tage ersetzt. Im Gegensatz dazu bleibt die  $\beta$ -Isoform im Menschen auch postnatal zu einem hohen Anteil erhalten. Daher kommt die  $\alpha$ -Isoform mit hoher ATPase-Aktivität in adulten Mäusen vorwiegend vor, während die  $\beta$ -Isoform mit geringerer ATPase-Aktivität im Menschen zu finden ist (Miyata et al. 2000; Reiser und Kline 1998; Weiss und Leinwand 1996). Im fortschreitenden Alter und bei kardialen Hypertrophien kommt es typischerweise zu einem sogenannten MHC-Shift, bei dem die kodierende mRNA und Aktivität von Maus adultem  $\alpha$ -MHC verringert und von fetalem  $\beta$ -MHC sich mit zunehmenden Alter erhöht (Buttrick et al. 1991; O'Neill et al. 1991;

Schwartz et al. 1993). Dieser Shift stellt zuerst einen Anpassungsmechanismus des Muskels dar, trägt später aber zur Progression einer Herzinsuffizienz bei (Carvalho et al. 2003). Die geringere ATPase-Aktivität des  $\beta$ -MHCs bewirkt eine geringere Kontraktionsgeschwindigkeit und mit ihr eine erhöhte Kontraktionszeit, einer verringerte Kontraktilität und eine veränderte Relaxationsfähigkeit des Herzens (Jones et al. 1996). Weiterhin nimmt auch durch physiologisches Altern der Anteil an der  $\beta$ -Isoform zu (Miyata et al. 2000; Weiss und Leinwand 1996). Die mRNA-Untersuchungsergebnisse bestätigen eine Hypertrophie der PP2AxPP5-Tiere aufgrund der verringerten mRNA von  $\alpha$ -MHC in den alten PP2AxPP5 Tieren im Vergleich zu WT (Abbildung 41 C). Es wurde jedoch keine alters- oder genotyp-abhängige Veränderung von  $\beta$ -MHC festgestellt (Abbildung 41 D). Es gab dennoch bereits Tiermodelle mit kardialer Hypertrophie, in denen ebenso unerklärlich nur eine Senkung von  $\alpha$ -MHC bei unveränderter mRNA von  $\beta$ -MHC detektiert wurde (Boluyt et al. 1994; Boluyt 2000). Das wiederholte unveränderte Genlevel von  $\beta$ -MHC in den transgenen Tieren spricht für einen komplexen Mechanismus.

Eine myokardiale interstitielle Fibrose ist ein typisches Merkmal einer Herzinsuffizienz mit kardialer Hypertrophie (Anderson et al. 1979; Czubryt und Hale 2021; Huysman et al. 1989; Pearlman et al. 1982). Sie ist definiert als eine ungeordnete Anhäufung von kollagenen Fasern innerhalb des Interstitiums und ist ein Merkmal für kardiales Remodelling (Frangogiannis 2017; González et al. 2018; 2019). Sie führt zu einer Versteifung des Gewebes und geht mit einer diastolischen Dysfunktion einher (Weber und Brilla 1991; Weber et al. 1993). Ursache dafür ist eine Anhäufung von Proteinen der extrazellulären Matrix (Weber und Brilla 1991). Eine vermehrte Versteifung des Gewebes durch die Erhöhung von Markern der extrazellulären Matrix tragen zum Fortschreiten einer kompensierten Hypertrophie zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz bei (Conrad et al. 1995; Czubryt und Hale 2021). Marker für eine Fibrose im Rahmen einer Fortschreitung der kompensierten Hypertrophie zur Herzinsuffizienz sind erhöhte mRNA Expressionen der kodierenden Gene für Fn1, Col1 $\alpha$ 1 und Col3 $\alpha$ 1, da sie den Hauptbestandteil des interstitiellen, fibrillären Netzwerks ausmachen (Boluyt et al. 1994). Untersuchungen zu fibrotischen Ereignissen in den transgenen Tieren wurden zum einen histologisch und zum anderen über die Bestimmung der mRNA Transkriptionsraten der genannten Markergene bestimmt. Histologisch konnte mittels Masson-Goldner-Färbung eine interstitielle Fibrose in den Ventrikeln der alten PP2A und PP2AxPP5 festgestellt werden (Abbildung 26). Das wurde über die erhöhten Markergene von Fn1, Col1 $\alpha$ 1 und Col3 $\alpha$ 1 in den PP2AxPP5- und PP2A-Tieren bestätigt (Abbildung 43). Während Col1 $\alpha$ 1 und Col3 $\alpha$ 1 in den jungen und alten Herzen der PP2AxPP5-Tiere anstieg, war die Col1 $\alpha$ 1-Expression nur in den jungen PP2A-Tieren und die Col3 $\alpha$ 1-Expression dahingegen nur in den alten PP2A-Tieren erhöht (Abbildung 43 A, B). Bemerkenswerterweise war Fn1 nur in den jungen PP2AxPP5-Tieren erhöht und ging in den alten PP2AxPP5-Tieren zurück (Abbildung 43 C). Physiologisch

nimmt die mRNA von Fn1 zwischen Entwicklung und Erwachsenenalter ab und im seneszenten Herzen wieder zu, was zu den genannten Ergebnissen teilweise passen würde (Lakatta 2000; Mamuya et al. 1992).

Eine kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz gehen auch mit einer kardialen Entzündung einher (Adamo et al. 2020). Pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , werden mit zunehmender Schwere einer Herzinsuffizienz vermehrt produziert (Seta et al. 1996; Torre-Amione et al. 1996). Bei diesem Prozess handelt es sich um eine para-Entzündung: in frühem Stadium der Herzinsuffizienz dient die Ankurbelung der Entzündungs-Signalwege einer Aufrechterhaltung der Homöostase des Gewebes und der Behebung der Gewebeschädigung. Später können sie zur Progression der Herzinsuffizienz beitragen (Mann 2015). Man geht davon aus, dass der Mechanismus zu Beginn einer Herzinsuffizienz einen protektiven Effekt haben soll und erst später, nach dem Cross-Talk aus Myokard, peripherem Gewebe und Immunsystem, die Ankurbelung der Zytokine für eine Progression des Krankheitsverlaufs sorgt (Fuchs und Drexler 2004; Shirazi et al. 2017). TNF- $\alpha$  wird mit einer linksventrikulären Dysfunktion in Form von verminderter Kontraktilität, mit einer veränderten Ca<sup>2+</sup>-Homöostase und mit einer Desensitivierung von  $\beta$ -AR in Verbindung gebracht (Gulick et al. 1991b; Pagani et al. 1992; Yokoyama et al. 1993). In dieser Arbeit wurde die kodierende mRNA für die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 untersucht. Die TNF- $\alpha$  Transkriptionsrate war überraschenderweise in allen Tieren unverändert obwohl gemäß Literatur und aller bisherigen Ergebnisse von veränderten TNF- $\alpha$  Werten in den PP2AxPP5-Tieren auszugehen wäre. Aus der Literatur weiß man, dass ein Knockdown von PP2Ac sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene zu einer vermehrten TNF- $\alpha$  Produktion führt (Barisic et al. 2008). Es wird außerdem eine gesteigerte Expression von PP2A durch Gabe von TNF- $\alpha$  auf zellulärer Ebene postuliert (Kränkel et al. 2003). Weiterhin ergaben Untersuchungen an kultivierten neonatalen Herzmuskelzellen der Ratte eine Senkung der Tnl- und PLB- Phosphorylierung durch TNF- $\alpha$  (Yokoyama et al. 1999), was auf eine Beteiligung von Ser/Thr-PP hinweist, da phosphoryliertes Tnl und phosphoryliertes PLB u.a. Substrate der PP2A sind. IL-6 war in den jungen PP2AxPP5-Tieren um etwa das 7-fache erhöht im Vergleich zu den Herzen von WT-Tieren und einfach transgenen Tieren. In den alten PP2AxPP5-Tieren war dieser starke Anstieg aufgehoben, dennoch war IL-6 erhöht im Vergleich zu WT (Abbildung 42). Sowohl erhöhte mRNA-Level von TNF- $\alpha$  als auch IL-6 stehen in Verbindung mit einer Hypertrophie und Fibrose, was zu einer diastolischen Dysfunktion mit ventrikulärer Relaxationsstörung führt (Awad et al. 2010; Kubota et al. 2000; Levine et al. 1990). Es wird dennoch postuliert, dass IL-6 vermutlich kardioprotektiv zu Beginn einer Herzinsuffizienz wirken kann (Fuchs und Drexler 2004; Shirazi et al. 2017).

Des Weiteren wurde die mRNA des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B untersucht. NF- $\kappa$ B war in den jungen PP2A-, PP5- und PP2AxPP5-Tieren erhöht im Vergleich zu WT. Jedoch war dieser Anstieg in den alten Tieren verschwunden (Abbildung 42 B). In der Literatur wurde eine mögliche Rolle der Ser/Thr-PP in Bezug auf die NF- $\kappa$ B Signalwege beschrieben: Die NF- $\kappa$ B/Rel-Proteine sind dimere Transkriptionsfaktoren, die die Regulation der an vielen Entzündungsprozessen beteiligten Gene steuern. Sie werden von verschiedenen Stimuli wie pro-inflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6), Wachstumsfaktoren oder dem Gramnegativen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert (Liu et al. 2017). Diese aktivieren einen I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ ), welcher zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B führt (Gilmore 2006). I $\kappa$ B ist ein Inhibitor aus der NF- $\kappa$ B Familie, welcher stets an NF- $\kappa$ B gebunden ist. Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B bewirkt, dass dieser von NF- $\kappa$ B getrennt und proteosomal abgebaut wird (Yang et al. 2016). Das freie NF- $\kappa$ B transloziert in den Zellkern und bewirkt dort mit Hilfe von anderen Transkriptionsfaktoren wiederum die Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie u.a. TNF- $\alpha$  und IL-6 (Fallach et al. 2010; Kuzmich et al. 2017). Am Herzen äußert sich diese entzündliche Reaktion in Form von verminderter Kontraktilität (Boyd et al. 2006). Jedoch ist die spezielle Rolle der PP2A in NF- $\kappa$ B-abhängigen Zellreaktionen weiterhin umstritten. Zum einen gibt es Hinweise darauf, dass die Bildung eines IKK-PP2A-Komplexes notwendig ist für eine TNF-induzierte IKK-Phosphorylierung und damit die NF- $\kappa$ B Freisetzung verstärken kann (Kray et al. 2005). Zum anderen ist bereits bekannt, dass sowohl die PP2A, als auch die PP5 durch Inaktivierung des I $\kappa$ B Kinase Komplexes den NF- $\kappa$ B Signalweg negativ regulieren können und damit eine erhöhte Stresstoleranz hervorrufen (Chiang et al. 2011; Gergs et al. 2019a; Yang et al. 2016). Es wurde durch in-vitro Untersuchungen belegt, dass die PP2A in der Lage ist die Phosphorylierung des T-Loop Serins der IKK $\beta$  aufzuheben, sodass die Freisetzung von NF- $\kappa$ B vermindert wird und die darauffolgenden Aktivierungen von Zytokinen im Zellkern nicht stattfinden können (Barisic et al. 2008). Weiterhin hat man durch Hemmung der PP2A-Aktivität im Zellmodell mittels Okadasäure und Calyculin A die Phosphorylierung von I $\kappa$ B und deren proteosomalen Abbau ohne zusätzliche Zytokin-Behandlung gezeigt (Sun et al. 1995). Die PP2A wird deshalb auch als negativer Regulator des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes beschrieben (DiDonato et al. 1997) und weitestgehend als Tumorsuppressorprotein bezeichnet (Clark und Ohlmeyer 2019; Mumby 2007).

Die PP5 scheint, ähnlich wie die PP2A, den NF- $\kappa$ B -Signalweg negativ zu beeinflussen (Gergs et al. 2019a). Über ihre Untereinheit G4-1/G5PR interagiert die PP5 mit I $\kappa$ B und ihr Knockout bewirkt eine vermehrte Freisetzung von NF- $\kappa$ B (Chiang et al. 2011). Ganz im Gegenteil zur genannten Literatur weisen die hier untersuchten Ventrikel junger transgener Tiere eine erhöhte NF- $\kappa$ B Gentranskription auf. Das deutet auf eine positive Regulation des NF- $\kappa$ B Signalweges hin. In den alten Tieren ist dieser Effekt verschwunden und die

Gentranskription von NF- $\kappa$ B ist in allen Ventrikeln gleich. Zum Vergleich: In Gergs et al. (2019a) wurden Tiere im Alter von 6 - 8 Monaten untersucht, in deren Ventrikeln basal ebenso keine Transkriptionsunterschiede diverser Gene ermittelt wurden. Dies entspricht auch den Ergebnissen der alten Tiere in der vorliegenden Arbeit (10 - 11 Monate) und deutet auf einen möglichen altersabhängigen Effekt hin. Dennoch ist fraglich, was der Auslöser für die erhöhte Gentranskription von NF- $\kappa$ B ist, da Ser/Thr-PP den vorangegangenen Signalweg negativ beeinflussen (Clark und Ohlmeyer 2019).

Außerdem wurden mögliche immunologische Reaktionen auf zellulärer Ebene betrachtet, wie die Untersuchung von Zellsubpopulationen im Ventrikel, die Zellfrequenz von T-Lymphozyten im peripheren Gewebe und Serum-Autoantikörper (Abbildung 22-24). Es zeigte sich in WT-Tieren und PP2A-Tieren ein im Alter verringertes Vorkommen von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in mediastinalen und subiliakalen Lymphknoten sowie in der Milz, was ebenso in der Literatur bestätigt werden konnte (Ramos et al. 2017). In den PP2A-Tieren konnte wie erwartet eine im Alter auftretende Erhöhung der kardial-spezifischen Serum-Auto-Antikörper detektiert werden (Ramos et al. 2017). Die Zellfrequenz-Analyse der Ventrikel zeigte eine altersabhängige Erhöhung der Granulozyten und eine Verringerung der T-Lymphozyten (Abbildung 22), was insgesamt auf eine aktivierte Immunreaktion in den alten PP2A-Tieren hinweisen könnte.

Zusammenfassend wurde eine systolische und diastolische linksventrikuläre, sowie möglicherweise auch rechtsventrikuläre, Dysfunktion in vivo durch gemeinsame Überexpression von PP2A und PP5 mit erhöhten Markergenen für Hypertrophie, Entzündung, Remodelling und Fibrose bestätigt. Im Gegensatz dazu wurde durch alleinige Überexpression der PP2A eine ausschließlich linksventrikuläre Dysfunktion gezeigt mit Anzeichen einer milderer Fibrose, Hypertrophie und myokardialen Entzündung unter Minderepression des Ca<sup>2+</sup>-Zyklus relevanten Proteins SERCA, was eine Ursache für die Kontraktilitätsstörung sein könnte. Die Überexpression der PP5 zeigte lediglich einen Einfluss auf die Entzündungs-Signalwege in den jungen Tieren. Weder durch in-vivo Untersuchungen noch durch Markergene wurden linksventrikuläre Funktionseinschränkungen in PP5-Tieren ermittelt. Deutlich zu erkennen war die Erhöhung der Zytokinproduktion und Entzündungs-Signalwege in allen jungen transgenen Tieren, welche in den alten Tieren nicht erhalten blieb. Das lässt auf einen Einfluss der Ser/Thr-PP in Form einer möglicherweise protektiven Rolle im Verlauf der Progression einer Herzinsuffizienz schließen.

## **5.3 Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf Stressfaktoren**

### **5.3.1 Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf $\beta$ -AR Stimulation**

Die kontraktilen Folgen im Herzen auf die Aktivierung von  $\beta_1$ -AR liefern wichtige Informationen, um die Funktionalität, Signaltransduktion und Kontraktilität der Kardiomyozyten abzuschätzen.

Typischerweise geht eine kardiale Dysfunktion, wie eine Herzinsuffizienz, mit einer reduzierten Sensitivität auf  $\beta_1$ -AR-Agonisten einher (Braunwald und Bristow 2000). Man geht davon aus, dass die Ursache dieser Störung an einer Downregulation von  $\beta_1$ -Rezeptoren und an einer Funktionsminderung, dem sogenannten Entkoppeln, der noch verbliebenen Rezeptoren (Böhm et al. 1990; Braunwald und Bristow 2000; Bristow et al. 1982; Brodde 1991; Feldman und McTiernan 1999) und einer erhöhten Aktivität der  $\beta$ -AR-Kinase liegt (Ungerer et al. 1993; 1994). Durch die zeitlich fortschreitende Verschlechterung der Herzfunktion von normal über eine asymptomatische linksventrikuläre Funktionsstörung bis hin zu einer symptomatischen Herzinsuffizienz zirkulieren hohe Konzentrationen von Katecholaminen und diese führen zu einer fortschreitenden  $\beta_1$ -AR-Desensibilisierung (Anderson et al. 1989; Benedict et al. 1996). Die Desensibilisierung geht mit einer Down-Regulation der  $\beta$ -AR und einer erhöhten Koppelung an  $G_i$ -Proteine einher, was einen reduzierten positiv inotropen Effekt auf  $\beta_1$ -AR-Agonisten wie Isoprenalin zur Folge hat (Bernstein et al. 2011; Böhm et al. 1995; 1996).

Dieser verminderte positiv inotrope Effekt von Isoprenalin wurde in vitro an den linken Vorhöfen von jungen PP2AxPP5 mittels verminderter Kontraktionskraftentwicklung (Abbildung 27 A) und verlangsamten Kontraktions- und Relaxationszeiten (Abbildung 28 A; Abbildung 29 A) bestätigt. Im Alter schienen sich diese Einschränkungen in den PP2AxPP5-Tieren erstaunlicherweise zu normalisieren (Abbildung 27 B; Abbildung 28 B; Abbildung 29 B), jedoch wiesen die PP2A-Tiere weiterhin mit fortschreitendem Alter eine verringerte Potenz von Isoprenalin auf (Abbildung 27 A, E).

In vivo verdeutlichten die Aufnahmen des linken Ventrikels inkl. seiner Dimensionen, die Flüsse durch die Arteria pulmonalis und Aorta ascendens, sowie im Gewebe-Doppler die IVRT und ET eine stark eingeschränkte linksventrikuläre Kontraktilität der PP2A-Tiere und PP2AxPP5-Tiere, welche nach  $\beta$ -AR-Stimulation in PP2A nahezu kompensiert werden konnte und vergleichbar zu WT war, wohingegen es in PP2AxPP5 kein Effekt der Isoprenalingabe gab (Abbildung 32 - 35). Das fehlende Ansprechen der PP2AxPP5-Tiere auf Isoprenalin war ein eindeutiges Indiz für eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz. In den PP2A-Tieren bestand aufgrund dieser Ergebnisse vermutlich eine kompensatorische Hypertrophie (Hunter und Chien 1999). Die Stimulation des  $\beta$ -AR durch Isoprenalin diente zum leichteren Nachweis kleiner Beeinträchtigungen der kardialen Funktion, die unter basalen Bedingungen übersehen werden könnten. Außerdem kann sie ein Maß für die Belastbarkeit des Herzens unter definierten Stressbedingungen sein, da mit einer  $\beta$ -AR-Stimulation der Sympathikus aktiviert wird (Alhayek und Preuss 2021).

Die Auswirkungen von Isoprenalin auf die Chronotropie in vitro unterschied sich dagegen nur in den rechten Vorhöfen der alten PP2AxPP5-Tiere, welche im Vergleich zu WT eine geringere

Frequenz aufwiesen. In vivo war der positiv chronotrope Effekt durch Isoprenalin sogar in den jungen PP2AxPP5-Tieren im Vergleich zu den anderen Genotypen herabgesetzt. Der verminderte positiv chronotrope Effekt kann durch u.a. eine geringere  $\beta$ -AR-Dichte, eine gestörte Calcium-Homöostase oder auch möglicherweise auf unterschiedliche cAMP Kompartimente im Sinusknoten zurückzuführen sein (Ghigo und Mika 2019).

Die homologe Desensitivierung bezeichnet eine fehlende Rezeptorwirkung von GPCR durch Entkopplung des Rezeptors mit seinem G-Protein und stellt eine typische Eigenschaft von kardialen Hypertrophien dar (Choi et al. 1997). Dabei phosphorylieren die G-Protein-Rezeptorkinasen (GRK) nach Bindung des Agonisten den Rezeptor, welcher aufgrund der folgenden Konformitätsänderung und Trennung von seinem G-Protein seine Funktionalität kurzfristig verliert (Kelly et al. 2008; Lohse 1993; Lohse et al. 1996). Die Desensitivierungsversuche an linken Vorhöfen in dieser Arbeit sollten den altersabhängigen Einfluss der PP2A auf die Phosphorylierung des  $\beta_1$ -AR untersuchen (Kapitel 4.5.3.1). Eine homologe Desensitivierung des  $\beta_1$ -AR wurde in WT, sowohl jung als auch alt, durch wiederholte Gabe von Isoprenalin als  $\beta$ -AR-Agonisten über den verringerten  $\log EC_{50}$  in der zweiten KWK im Vergleich zur ersten Behandlung bestätigt (Abbildung 30 A, B). Der gleiche Effekt zeigte sich in den jungen PP2A-TG (Abbildung 30 A, B). Die Präparate der alten PP2A-Tiere wiesen keine veränderte Potenz von Isoprenalin und somit keine Desensitivierung in diesen Versuchen auf (Abbildung 30 D). Jedoch war in den alten PP2A-TG bereits initial Isoprenalin im Vergleich zu WT weniger potent. Das kann zum einen der Grund für die unveränderte Sensitivität nach Wiederholungsbehandlung sein oder die PP2A-Überexpression bewirkte nur in den alten, bereits stärker geschädigten Vorhöfen eine Inhibition der Phosphorylierung des  $\beta_1$ -AR durch GRKs. Diese Ergebnisse könnten zusätzliche Hinweise auf die GRK als Target für die PP2A sein (Kimura et al. 2011).

Die Proteinuntersuchungen an  $\beta$ -AR-stimulierten Vorhöfen zeigten neben der bereits erwähnten verringerten Phosphorylierung von PLB an der Aminosäure Ser-16 in PP2AxPP5-Tieren auch eine verminderte Phosphorylierung von PLB an Ser-16 in den alten PP2A-Tieren (Abbildung 37 B). Das bestätigt die Ser16-Bindungsstelle von PLB als Target für die PP2A (MacDougall et al. 1991) und eine möglicherweise stärkere Dephosphorylierung von PLB durch gemeinsame Überexpression von PP2A und PP5 als durch die Aktivität der PP2A allein, obwohl in den PP5-Tieren keine veränderte Phosphorylierung von Ser16-PLB gemessen wurde. Die unveränderte Phosphorylierung von Tnl an den Aminosäuren Ser23/24 im  $\beta$ -AR-stimuliertem Vorhof kann mehrere Ursachen haben. Es ist zwar bekannt, dass die Phosphorylierung von Tnl durch eine verminderte Aktivität der PKA in Kardiomyopathien sinkt (Bodor et al. 1997; van der Velden et al. 2003; Zakhary et al. 1999), jedoch gibt es auch selten gegenteilige Beobachtungen in denen trotz Kardiomyopathie keine Unterschiede in der

Phosphorylierung von TnI bestehen (El-Armouche et al. 2004; Knott et al. 2002). Der genaue Mechanismus der TnI-Phosphorylierung durch die PKA und Dephosphorylierung an Ser23/24 ist dennoch weitestgehend unklar (Layland et al. 2005). Man geht davon aus, dass durch die erhöhte PP2A-Aktivität die PKA gehemmt wird im Zusammenhang mit der Down-Regulation des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs (Liu und Hofmann 2003; McConnell et al. 1997; Zakhary et al. 1999). Obwohl die PP2A-Aktivität in den PP2A- und PP2AxPP5-Tieren gleichermaßen erhöht ist, scheint sie nicht allein für eine Minderphosphorylierung von TnI verantwortlich zu sein. Eine weitere Möglichkeit könnte die fehlende Spezifität des phospho-TnI-Antikörpers sein, sodass die Erfassung von unphosphoryliertem TnI die Aussagekraft des Western Blots erschwert. Obwohl eine Wechselwirkung zwischen der PKA und dem MAPK-Signalweg beschrieben wurde (Koga et al. 2019), konnte in den Untersuchungen keine veränderte Phosphorylierung der p38-MAPK in den Isoprenalin-behandelten Vorhöfen detektiert werden (Abbildung 37D). Akt spielt vor allem im Ischämie/Reperfusionsgeschehen eine protektive Rolle (Chaanine und Hajjar 2011; Fan et al. 2010; Hoehn et al. 2015). Dennoch ist die Phosphorylierung von Akt an der Aminosäure Thr308 auch nach Isoprenalinbehandlung der linken PP2AxPP5 Vorhöfe, sowohl in den jungen Herzen als auch in den alten Herzen, verringert. Daraus lässt sich möglicherweise ein Zusammenhang aus einer erhöhten PP-Aktivität mit einer verminderten kardioprotektiven Aktivität von Akt schließen. Auch könnte die Minderphosphorylierung von Akt an der Aminosäure Thr308 im Zusammenhang mit der Hypoxie, welcher die Vorhöfe vor der  $\beta$ -AR Stimulation ausgesetzt waren, stehen.

Insgesamt ergeben die Untersuchungen nach  $\beta$ -AR Stimulation ein schlüssiges Bild: Durch die gemeinsame Co-Überexpression der PP2A und PP5 kommt es zu einer Minderphosphorylierung von PLB, welche im dephosphorylierten Zustand die Aktivität von SERCA verringert, sodass der Rückstrom der  $\text{Ca}^{2+}$  vom Zytosol in das SR in der Diastole verlängert ist und ebenso mehr  $\text{Ca}^{2+}$  an den Myofilamenten verweilen und eine verlängerte Systole bedingen. Das geht einher mit einer verlängerten Kontraktions- und Relaxationszeit, sowie verringerten Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten in PP2AxPP5. Weiterhin lassen sich der verringerte positiv inotrope Effekt von Isoprenalin und die verlängerten Kontraktions- und Relaxationszeiten, sowie die verringerten Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten mit einer verringerten  $\beta$ -AR Dichte in den PP2AxPP5-Tieren erklären, welches ein typischer Schutzmechanismus bei einer Herzinsuffizienz ist (Baker 2014; Bristow et al. 1982). Die mutmaßlich geringere Rezeptordichte bedingt geringere cAMP Level, weniger phosphorylierte LTCC, die den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom regulieren, weniger zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  und letztlich einen verlängerten  $\text{Ca}^{2+}$ - Zyklus. Über die tatsächliche  $\beta$ -AR Dichte kann aufgrund des schlüssigen Signalwegs nur gemutmaßt werden, da diese in den Herzen der Tiere für diese Untersuchungen nicht gemessen wurde.

### 5.3.2 Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf Hypoxie

Die Hypoxie-Versuche am Vorhof (siehe 3.2.3.2) dienten der Imitation eines Ischämie-/Reperfusionsgeschehens im Herzen (Methode: Gergs et al. 2020). Durch eine Ischämie und Reperfusion können viele Signalwege aktiviert werden, welche eine myokardiale Entzündung hervorrufen, welche wiederum das Remodelling verstärkt und eine Herzinsuffizienz fördert (Ahn und Kim 2012; Marchant et al. 2012). In der Literatur wurde ein Zusammenhang zwischen Ser/Thr-PP und einem Ischämie-/Reperfusionversuchen beschrieben: Zum einen wurde gezeigt, dass die PP2Ac-Proteinexpression im menschlichen insuffizienten Herzen erhöht ist, unabhängig ob es sich um eine nicht-ischämische oder ischämische Herzinsuffizienz handelt (DeGrande et al. 2013). Dennoch schien in Kardiomyozyten von Ratten die PP2A-Aktivität durch Ischämie erhöht zu sein im Vergleich zu nicht-ischämischen (Fenton et al. 2005). Auch Hypoxie-Versuche an Mäusen zeigten eine erhöhte PP2A-Aktivität mit verminderter PLB-Phosphorylierung an Ser16 (Larsen et al. 2008). Die Hemmung der PP1 und PP2A durch Okadasäure in präkonditionierten und nicht-präkonditionierten ischämischen Herzen bewirkte einen Rückgang der Nekrose (Fenton et al. 2005). Viele Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die Hemmung von Ser/Thr-PP einen positiven Effekt auf das Gewebe im Ischämie/Reperfusionsgeschehen haben kann (Armstrong et al. 1998; Barancik et al. 1999; Weinbrenner et al. 1998), aber auch eine Hypoxie möglicherweise eine Hemmung der PP2A hervorruft (Elgenaidi und Spiers 2019).

Die Vorhöfe der jungen transgenen Tiere zeigten eine verringerte Potenz nach Hypoxie und entwickelten bei der darauffolgenden  $\beta$ -AR-Stimulation geringere Kontraktionskräfte als die WT-Präparate (Abbildung 27 C, E), was eindeutig für einen negativen Einfluss der PP2A und PP5 im Zusammenhang mit einer Hypoxie steht. In den Präparaten der alten Tiere war dagegen die Potenz von Isoprenalin in den WT-, PP5- und PP2AxPP5-Tieren herabgesetzt, jedoch nicht in den PP2A-Tieren. Die Präparate der alten PP2A-Tiere hatten ebenso vergleichbare Kontraktionskräfte zum WT, jedoch deutlich verlängerte Kontraktions- und Relaxationszeiten nach Hypoxie und anschließender  $\beta$ -AR-Stimulation im Gegensatz zu den restlichen Tieren (Abbildung 28 D, Abbildung 29 D), was möglicherweise eine erhöhte Stresstoleranz bestätigen könnte (Hoehn et al. 2015; Schulz et al. 2007, 2008). Die Hypoxie hatte im rechten Vorhof keinen Einfluss auf die Potenz von Isoprenalin in jungen und alten WT-, PP2A- und PP5-Tieren (Abbildung 31 C, D, E). Im Vergleich dazu bewirkte eine vorangegangene Hypoxie einen verringerten chronotropen Effekt auf die Isoprenalingabe in den rechten Vorhöfen von alten PP2AxPP5-Tieren (Abbildung 31 D, E). Es wurde durch die genannten Ergebnisse ein negativer Einfluss der Ser/Thr-PP auf ischämischen Stress verdeutlicht. Besonders waren die Kontraktionskräfte verringert durch Überexpression der

PP5 und gemeinsamer Überexpression von PP2A und PP5 (Abbildung 27 C, D), was einen möglichen negativen Einfluss der PP5 im Zusammenhang mit einer Hypoxie bedeuten könnte.

Durch die Ischämie/Reperfusion können auch der MAPK-(Mitogen-Activated Protein Kinases)-Signalweg und der PI3K/Akt-(Phosphoinositid-3-Kinase/Akt)-Signalweg aktiviert werden, welche verschiedene Zellprozesse wie u. a. die Apoptose steuern. Die p38-MAPK können sowohl protektiv als auch schädigend für eine kardiale Entzündung sein (Communal et al. 2000; Schneider et al. 2001; Yokota und Wang 2016). Akt und die p38-MAPK können zeitabhängig aktiviert werden während einer Ischämie/Reperfusion und einen protektiven Effekt auf das Gewebe hervorrufen (Bassi et al. 2008; Steenbergen 2002; Stensløkken et al. 2009). MAPK werden von Ser/Thr-PP reguliert (Junttila et al. 2008). Daher wird auch ein direkter Zusammenhang zwischen der PP2A und der Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs nachgewiesen (Prickett und Brautigan 2007; Westermarck et al. 2001), weshalb man von einem Schutzmechanismus des Herzens nach Ischämie/Reperfusion durch Hemmung der PP2A ausgeht (Fan et al. 2010). Weiterhin wird für die PP2A ein Zusammenspiel zwischen dem p38-MAPK-Signalweg und einer weiteren Proteinkinase namens Erk beschrieben, in dem die stressinduzierte PP2A-Aktivierung zu einer Hemmung von Erk und damit einem Fortschreiten der Apoptose führt (Cuadrado und Nebreda 2010; Junttila et al. 2008; Liu und Hofmann 2004). Gleichzeitig bewirkte die Hemmung von p38 eine Hemmung der PP2A und damit eine erhöhte Phosphorylierung von PLB, was mit einer erhöhten SERCA-Aktivität und vermehrter Kontraktilität einhergeht (Kaikkonen et al. 2014). Die Phosphorylierung von PLB an Ser16 war wie nach  $\beta$ -AR Stimulation in den PP2AxPP5-Tieren herabgesetzt. Die Phosphorylierung von Akt an Thr308 war ausschließlich in den alten PP2AxPP5 Vorhöfen verringert, was auf einen möglichen Einfluss von PP2A und PP5 auf die Akt-Aktivierung zurückzuführen ist (Ugi et al. 2004). In der Literatur ist ebenso beschrieben, dass nach ischämischen Stress die PP2A den Akt/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin-Signalweg stören kann und es in PP2A-überexprimierenden Tieren zu einer verminderten Akt-Phosphorylierung kam (Hoehn et al. 2015). Eine verringerte Phosphorylierung der p38-MAPK an Thr180 in den PP2AxPP5-Tieren bestätigte den negativen Einfluss der Ser/Thr-PP auf die Aktivierung von p38-MAPK. Allerdings ist unbekannt was die Ursache des zeitigeren Sterbens der Tiere war. Das Versterben könnte u.a. durch eine Arrhythmie oder durch Pumpversagen bedingt sein.

Insgesamt war durch eine Hypoxie die Kontraktilität in den linken Vorhöfen durch die verminderte Potenz von Isoprenalin verringert, auch in WT. Dennoch zeigten ausschließlich die Präparate mit Überexpression von PP5 und gemeinsamer Überexpression von PP2A und PP5 eine verringerte Kontraktionskraft. Das stand im Einklang mit der verringerten Phosphorylierung kontraktiler Proteine wie Akt, PLB, p38-MAPK in PP2AxPP5. Besonders der positiv chronotrope Effekt war in diesen Tieren nach Hypoxie verringert. Dennoch zeigten

alte Tiere mit Überexpression der PP2A eine erhöhte Toleranz in Form eines möglichen Schutzmechanismus vor Verlust der Sensitivität bei  $\beta$ -AR Stimulation im linken Vorhof nach Hypoxie. Möglicherweise basierte das auf einem veränderten Phosphorylierungsgrad des  $\beta$ -AR (Pitcher et al. 1995) und einer erhöhten PP2A-Aktivität im Alter, welche bereits beschrieben worden ist (Fenton et al. 2005), aber in dieser Arbeit durch ein möglicherweise zu junges Alter der alten Tiere (10 - 11 Monate) nicht nachgewiesen werden konnte.

### **5.3.3 Einfluss und Bedeutung der PP2A und PP5 auf Alterungsprozesse**

Im folgenden Abschnitt sollen die erfolgten Untersuchungen im Hinblick auf einen altersabhängigen Unterschied der Tiere erörtert werden. Laut Literatur kann es auch beim physiologischen Altern vor allem zu einer Verschlechterung der diastolischen linksventrikulären Funktion kommen während die systolische linksventrikuläre Funktion aufrecht erhalten wird (Shinmura 2016). In alternden Kardiomyozyten kann das in einer verringerten Kontraktions- und einer verlängerten Relaxationsgeschwindigkeit, einer geringeren Sensitivität auf  $\beta$ -AR Stimulation und einer erhöhten Steifigkeit des Gewebes resultieren (Lakatta und Levy 2003). Die Akkumulation von extrazellulären Matrixbestandteilen und Kollagen fördert dabei die Steifigkeit und diastolische Dysfunktion (Lakatta und Levy 2003). Daher kann eine Fibrose auch in gesunden alternden Herzen auftreten (Annoni et al. 1998; Besse et al. 1994).

In den Versuchen wurden Tiere im Alter von 3 - 4 Monaten (junge Tiere) und 10 - 11 Monaten (alte Tiere) untersucht. Diese Altersstufen wurden anhand einer Übersicht der Mausalterung im Vergleich zum Menschen gewählt (Flurkey et al. 2007). Ein Mausalter von 3 - 4 Monaten entspricht einem jungen Erwachsenen von 20 - 30 Jahren und ein Mausalter von 10 - 11 Monaten das eines Erwachsenen Mitte 40 Jahre. Die altersabhängige Entwicklung der Tiere stellte einen wichtigen Punkt zur Betrachtung des Fortschreitens der Kardiomyopathie dar, da die PP2AxPP5-Tiere eine erhöhte Mortalität aufwiesen. Nur 32 % der beobachteten PP2AxPP5-Tiere lebten bis zum Ende der Beobachtungszeit von 315 Tagen (10 - 11 Monate). Optimalerweise wäre die Betrachtung einer dritten Altersgruppe von 22 - 24 Monaten sehr hilfreich für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs einer Herzinsuffizienz gewesen, da dieses Alter einem Erwachsenen um die Mitte 60 Jahre entspricht und in der Klinik das Alter darstellt, bei dem sich eine Kardiomyopathie entwickelt.

Die WT-Tiere dienten hier als Kontrollgruppe zur Erkennung von physiologischen Alterungsprozessen und verhalfen diese von den pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der Kardiomyopathie oder veränderten PP-Expressionen zu unterscheiden. Insgesamt zeigten sich im WT kaum relevante altersabhängige Veränderungen, was unter Umständen auch auf das zu junge Alter der Tiere in der alten Altersgruppe zurückzuführen ist. In den alten WT zeigte sich nach Hypoxie eine Abnahme der Potenz auf Isoprenalin im linken

Vorhof, sodass man Rückschlüsse daraus ziehen konnte, dass auch eine vorübergehende Minderversorgung des gesunden kardialen Gewebes zu irreversiblen Schäden führen konnte. Weiterhin zeigte sich eine Aktivierung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion in sekundär lymphatischen Organen, da in den mediastinalen und subiliakalen Lymphknoten und in der Milz die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Alter zurückgegangen ist und dies bereits als typisches Altersphänomen beschrieben wurde (Ramos et al. 2017).

Das relative Herzgewicht diente in dieser Arbeit zur Beurteilung des Ausmaßes einer kardialen Hypertrophie. In den PP2AxPP5-Tieren war das relative Herzgewicht im Alter geringer als in den jungen Tieren, was auf ein schwereres Körpergewicht der alten PP2AxPP5-Tiere zurückzuführen war (Abbildung 20 C). Die kardiale Belastung war dabei in den PP2AxPP5-Tieren keineswegs zurückgegangen, was die mRNA der Hypertrophiemarker von ANP und BNP bestätigte (Abbildung 41). Da auch die WT-Tiere eine Körpergewichtszunahme im Alter aufwiesen konnte eine milde Erhöhung als physiologisch bewertet werden (Abbildung 20 C). Die PP2A-Tiere entwickelten im Alter eine ähnliche Hypertrophie wie es die PP2AxPP5-Tiere im jungen Alter hatten, sodass man davon ausgehen kann, dass in den PP2A-Tieren erst im höheren Alter eine ähnliche kardiale Funktionalitätseinschränkung wie in den PP2AxPP5-Tieren zu beobachten war. Allerdings könnte in den PP2A-Tieren eine Art Schutzmechanismus im Alter aktiviert worden sein, da die Hypertrophiemarker ANP und BNP in den jungen Tieren zwar erhöht waren, aber sich in den alten Tieren herunterregulierten. ANP und BNP sind Genmarker welche zu Beginn einer Hypertrophie protektiv wirken und im späteren Verlauf zur Progression der Hypertrophie beitragen (Potter et al. 2009). Darum könnte man spekulieren, dass sich die Hypertrophie der PP2A-Tiere im noch höheren Alter (> 11 Monate) nicht verschlechtert.

Die linksventrikulären Untersuchungen in vivo bestätigten die Annahmen, dass die PP2A-Tiere eine kompensierte Hypertrophie aufwiesen, da die Funktionalität zwar basal eingeschränkt war, sie aber auf  $\beta$ -AR Stimulation in Form einer Verbesserung der systolischen und diastolischen Parameter reagierten (Hunter und Chien 1999). In den PP2AxPP5-Tieren ist aufgrund der Untersuchungen von einer manifesten systolischen Herzinsuffizienz auszugehen, da eine fehlende Reaktion auf  $\beta$ -AR Stimulation ein typisches Zeichen war (Bristow et al. 1982). In vivo gab es jedoch keine Veränderungen in allen Tieren zwischen jung und alt. Ein Grund dafür könnte sein, dass die beiden untersuchten Altersgruppen nicht weit genug auseinander lagen und daher keiner der z.B. von Lakatta (1999) beschriebenen Effekte messbar war.

Die linksatrial geringeren Kontraktionskraftentwicklungen auf  $\beta$ -AR Stimulation sowie die verlängerten Kontraktions- und Relaxationszeiten in den jungen PP2AxPP5 passen zu den geringeren Proteinphosphorylierungen von PLB an Ser16 und Akt an Thr308, denn die

Minderphosphorylierung bedingt einen gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Zyklus, welcher wiederum die Kontraktilität schwächt und die Dauer der Relaxation verlängert. Kontrovers ist, dass die alten PP2AxPP5-Tiere zwar unveränderte linksatriale Kontraktionskräfte und Kontraktions- und Relaxationszeiten zum WT aufwiesen, jedoch die Proteinphosphorylierungen vermindert waren. Auffällig war auch, dass durch Überexpression der PP2A eine verringerte Potenz von Isoprenalin in den alten PP2A-Tieren erreicht wurde, diese aber in den nachweislich schwächeren PP2AxPP5-Tieren unverändert blieb. Das spricht für einen möglichen Kompensationsmechanismus in den PP2AxPP5-Tieren im Alter. Nach Hypoxie war die linksatriale Kontraktionskraft der PP5- und PP2AxPP5-Tiere altersunabhängig stark herabgesetzt mit verringerter Sensitivität auf  $\beta$ -AR Stimulation (Abbildung 27 C, D), was sich mit den geringeren Phosphorylierungen an den Proteinen Akt, PLB und p38-MAPK erklären lässt (Abbildung 38).

Was die Fibrose betrifft, war eindeutig ein Fortschreiten während der Altersentwicklung zu beobachten. Die Genmarker waren bereits in den jungen PP2A- und PP2AxPP5-Tieren erhöht und später im Alter histologisch sichtbar als interstitielle Fibrose (Abbildung 26). Das ist gut erklärbar, da die Gentranskription in der Proteinbiosynthese der Translation in Protein oder Enzym vorangeschaltet ist. Anders als bei der Fibrose, traten erhöhte Entzündungsmarker nur in den jungen Tieren auf und waren in den alten Tieren wieder normalisiert (Abbildung 42). Das könnte man als Protektion der PPs gegenüber einer Entzündung werten, da die meisten Entzündungsmarker zu Beginn als Anpassung überexprimiert werden und später zu einer Progression der kardialen Erkrankung beitragen. Da die Überexpression in den alten Tieren herabgesetzt ist, könnte das auf eine Hemmung der fortschreitenden Freisetzung von Entzündungsmarkern durch PP hindeuten (Seumen et al. 2021).

Insgesamt schienen die hier untersuchten Altersgruppen der Tiere zu nah aneinander zu liegen, sodass keine relevanten Altersunterschiede erfasst werden konnten. Die detektierten Unterschiede zwischen jungen und alten PP2A- und PP2AxPP5-Tieren waren auf die fortgeschrittene Kardiomyopathie und ggf. die in diesem Zusammenhang veränderte PP-Expression zurückzuführen und gingen nicht unmittelbar mit dem fortschreitenden Alter einher.

#### **5.4 Einfluss und Bedeutung der kardialen Co-Überexpression von PP2A und PP5 auf die Gentranskription, Proteinexpression und Enzymaktivität der PP2A und PP5**

In allen Tieren wurde die Transkription der kodierenden Gene für PP2A und PP5 untersucht, sowie die Proteinexpression der PP2A und PP5 und die Enzymaktivität bestimmt. Die Untersuchung der PP, welche in den Tieren überexprimiert waren, sollten einen Überblick über den Einfluss der jeweiligen PP auf den Phänotyp der Tiere ermöglichen. In den mRNA-

Untersuchungen wurde neben der Gentranskription der exogenen PP2A $\alpha$ -TG-Sequenz auch die Gesamt-PP2A $\alpha$  (endogene und exogene PP2A $\alpha$ ) bestimmt. Die Ergebnisse zeigten neben einer Erhöhung der exogenen PP2A $\alpha$  in den PP2A-Tieren und PP2AxPP5-Tieren, auch eine vermehrte Transkription der Gesamt-PP2A $\alpha$  in den Tieren. In beiden Altersgruppen entsprach das Transkriptionsverhältnis der Gesamt-PP2A $\alpha$  zwischen PP2A-TG und PP2AxPP5-TG dem der PP2A $\alpha$ -TG-Sequenz, sodass man davon ausgehen kann, dass die erhöhte Gentranskription in PP2A-TG und PP2AxPP5-TG ausschließlich durch die exogene Überexpression der PP2A $\alpha$  zustande kam. Die niedrigen Werte der Gesamt-PP2A $\alpha$  in WT und PP5-TG demonstrieren, dass die Transkription der endogenen PP2A $\alpha$  so niedrig ist, dass womöglich auch ihr Beitrag zur Gesamt-PP2A $\alpha$  in PP2A-TG und PP2AxPP5-TG zu vernachlässigen ist. Daher kann man davon ausgehen, dass die erhöhte Gentranskription ausschließlich durch die exogene Überexpression der PP2A $\alpha$  zustande kommt. In den PP2AxPP5-Tieren war auffällig, dass die mRNA der PP2A $\alpha$ -TG-Sequenz in den jungen Tieren noch geringer war als in den PP2A-Tieren und im Alter erst vergleichbar war zu den PP2A-Tieren. Auf Proteinebene ergab sich ein etwas anderes Muster: Die PP2AxPP5-Tiere wiesen eine verringerte Expression (bezogen auf den Mittelwert, ohne statistische Signifikanz) der PP2Ac im Vergleich zu den PP2A-Tieren altersunabhängig auf. Die Expression der PP2Ac im Vorhof und Ventrikel unterschied sich nicht, obwohl man eine erhöhtes Vorkommen der PP2A im Ventrikel erwartet hätte (Luss et al. 2000). Die Expression der PP2Ac war in den PP2A-Tieren in Ventrikel und Vorhof um etwa 2fach höher als in WT und PP5, in den PP2AxPP5 Tieren jedoch nicht erhöht im Vergleich zu WT (Abbildung 39 B, D). Im gegensatz dazu war die Enzymaktivität der PP2A war in jungen und alten PP2A- und PP2AxPP5-Tieren gleichermaßen erhöht (Abbildung 46 C, D). Möglicherweise kamen die Unterschiede der PP2A-Level in der mRNA in PP2A-TG und PP2AxPP5-TG durch die bereits fortgeschrittene Fibrose der PP2AxPP5-Tiere zustande. Die bereits in der jungen Altersgruppe in den PP2AxPP5-Tieren beginnende Fibrose (siehe mRNA der Kollagene und Fibronectin) könnte einen Verlust von Kardiomyozyten bedingen, welcher mit einem weniger hohen Vorkommen von transgenem Produkt im gesamten Herzen einherging. Je größer die Fibrose ist, umso weniger Kardiomyozyten sind vorhanden und desto weniger transgenes Produkt kann gemessen werden. Das könnte den Umstand erklären, dass die mRNA-Menge der PP2A im jungen Alter in den PP2AxPP5-Tieren kleiner war als in den PP2A-Tieren. Im Alter war die PP2A-mRNA in PP2A-Tieren und PP2AxPP5-Tieren wieder auf einem Niveau, da nun beide Tiere eine Fibrose entwickelt hatten und deswegen eventuell auch die mRNA-Menge der PP2A im Herzen der PP2A-Tiere bezogen auf die Gesamtmasse des Herzen gesunken war, was die  $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte bestätigten. Die Fibrose in den PP2AxPP5-Tieren wurde zuerst auf Genebene bemerkbar und war histologisch erst in der höheren Altersgruppe sichtbar, was sich gut erklären lässt, da die Genregulation der Zellregulation vorausgeschaltet war.

Die Untersuchungen der PP5 mRNA zeigten ein ähnliches Ergebnis. In den PP2AxPP5-Tieren war die mRNA der PP5 verringert im Vergleich zu den PP5-Tieren, sowohl in den jungen als auch alten Tieren, dennoch war die PP5 mRNA erhöht gegenüber WT- und PP2A-Tieren. Das kann man wiederum mit der frühen Fibrose der PP2AxPP5-Tiere begründen. Im Gegensatz zu den PP2A-Tieren entwickelten die PP5-Tiere im Alter keine Fibrose. Daher kam es nicht zu einem Rückgang an transgenem Produkt und der Unterschied zwischen den PP5- und PP2AxPP5-Tieren blieb auch im Alter auf mRNA-Ebene erhalten (Abbildung 45 A, B). Da das Verhältnis aus exogener PP5 und Gesamt-PP5 gleich war, kann man davon ausgehen, dass die endogene Expression der PP5 in keinem der Tiere verändert war. Die Proteinexpression der PP5 schwankte ein wenig. Sie war zwar in jungen und alten PP5-Tieren im Ventrikel und linkem Vorhof erhöht im Vergleich zu den WT- und PP2A-Tieren, aber erstaunlicherweise war die PP5-Expression in den alten PP2AxPP5-Tieren im Ventrikel verringert, obwohl sie im Vorhof stets unverändert war. Leider konnte die Enzymaktivität der PP5 in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Die Aktivitätsuntersuchungen könnten möglicherweise Aufschluss über diese Diskrepanz geben.

Insgesamt konnte man dementsprechend davon ausgehen, dass die Genregulation von PP2A und PP5 auch bei einer gemeinsamen Überexpression der PP2A und PP5 auf die gleiche Weise erfolgte wie bei der einzelnen Überexpression der PP2A und der PP5. Auch die Aktivität der PP2A und PP1 waren gleich, unabhängig von einer gemeinsamen Überexpression von PP2A und PP5 oder der einzelnen Überexpression der PP2A. Demnach könnte man schlussfolgern, dass die PP5 selbst keinen Einfluss auf die PP2A-vermittelte Wirkung in den PP2AxPP5-Tieren hat. Dagegen sprechen dennoch die verringerten PP2Ac-Proteinexpressionen in den PP2AxPP5-Tieren, für die es momentan keine regulatorische Erklärung gibt. Die Aktivität der PP1 war in den PP2A-Tieren und den PP2AxPP5-Tieren erhöht, obwohl diese exogen nicht verändert wurde. Möglicherweise könnte das mit einer verringerten Expression von Inhibitor-1 oder Inhibitor-2 im Zusammenhang stehen (El-Armouche et al. 2004; Gupta et al. 2003; Mishra et al. 2002; Neumann et al. 1997). Auch in Hoehn et al. (2015) wurde eine erhöhte PP1-Aktivität von WT- und PP2A-Tieren durch Ischämie verursacht. Dennoch war der Mechanismus unklar. Interessant war, dass es einige Übereinstimmungen in der Kardiomyopathie der hier untersuchten PP2AxPP5-Tiere mit PP1-überexprimierenden Tieren gab, welche in Carr et al. (2002) charakterisiert wurden. Die Tiere mit ca. 2,5-facher PP1-Aktivität entwickelten neben einem ähnlich hohen relativen Herzgewicht von 10,5 mg/g eine interstitielle Fibrose mit verringerter Überlebenswahrscheinlichkeit (50 %-Überleben: 194 Tage). Auch die Ähnlichkeit bei Proteinexpression (SERCA verringert in TG, CSQ und PLB unverändert in TG) und Proteinphosphorylierung (Ser16-PLB verringert in TG), sowie linksventrikulär erhöhtem Durchmesser sprechen für Parallelen im kardialen Phänotyp und den aktivierten Signaltransduktionswegen in PP1-TG und PP2AxPP5-TG. Allerdings war

die PP2A-Aktivität in den PP1-Tieren in Carr et al. (2002) nicht erhöht. Aufgrund der hier gezeigten Daten sollte in weiterführenden Arbeiten die Ursache der erhöhten PP1-Aktivität in den PP2AxPP5-Tieren untersucht werden. Zum einen sollte untersucht werden, inwieweit die Gen- und Proteinlevel der PP1 ebenfalls verändert sind oder ob die erhöhte PP1-Aktivität mit veränderten Expressionen von PP1-Inhibitoren im Zusammenhang steht. Vorstellbar wäre ein Mechanismus, bei dem die PP1 erst bei fortgeschrittener Kardiomyopathie, also bei erhöhter Kreislaufbelastung, wie hier in den PP2AxPP5-Tieren und in den alten PP2A-Tieren, unabhängig von der Expression weiterer Ser/Thr-PP, aktiviert wird. Es ist weiterhin ungeklärt, inwieweit eine erhöhte PP-Aktivität zur Progression beiträgt oder als Protektion wirksam ist. Bezieht man sich auf die in Carr et al. (2002) erzielten Erkenntnisse, so trägt die PP1 zur Progression der Kardiomyopathie bei, was die oben genannte Theorie der zeitverzögerten Aktivierung der PP1, erst bei hoher Kreislaufbelastung, bestätigen würde.

Abschließend wurden auch biochemische Untersuchungen an isolierten Mitochondrien durchgeführt, um zu überprüfen, inwiefern die hier untersuchten Ser/Thr-PP in den Mitochondrien vorkommen und die intrazellulären Prozesse der Zellentwicklung und Apoptose möglicherweise beeinflussen. Eine Ser/Thr-PP aus der Familie der PP2C konnte bereits im Mitochondrium nachgewiesen werden (Lu et al. 2007). Mitochondrien können ein wichtiges Ziel für therapeutischen Ansätze bei der Herzinsuffizienz sein, da Anomalien der mitochondrialen Struktur im Herzen im Rahmen einer Kardiomyopathie beobachtet wurden (Sabbah 2020). Es konnte jedoch weder die PP2A noch die PP5 in den IFM oder SSM nachgewiesen werden (Abbildung 40). Die erfolgreiche Isolierung der Mitochondrien wurde mittels Citratsynthase als Marker bestätigt, da sie in der Mitochondrienmatrix vorkommt. Die erfolgreiche Trennung der SSM und IFM wurde durch CSQ als Marker bestätigt, da CSQ in den SSM marginal vorkommen könnte, jedoch in dem IFM bei richtiger Trennung abwesend sein sollte (Abbildung 40). Eventuell war die Sensitivität der eingesetzten Antikörper zum Nachweis von PP2A und PP5 in den Mitochondrien nicht ausreichend. Eine weitergehende Optimierung der Nachweismethode war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich. In zukünftigen Studien sollten Vorkommen und Funktion von Ser/Thr-PP in Mitochondrien näher untersucht werden.

## 5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Zielsetzungen in dieser Arbeit bestanden in der Charakterisierung der Rolle der PP2A und PP5 für die Pathomechanismen einer Herzinsuffizienz. Die Herzinsuffizienz ist die Endstufe vieler verschiedener kardialer Einschränkungen, sodass sich ein sehr heterogenes Krankheitsbild ergibt, welches bereits in mehreren klinischen und epidemiologischen Studien analysiert wurde. Tiermodelle hingegen sind ein geeignetes Mittel, um den basierenden Mechanismen auf den Grund zu gehen (Bing et al. 2002; Rai et al. 2017). Alle bisherigen Untersuchungen stellten vielfältig den möglichen Einfluss von Ser/Thr-PP durch diverse Tiermodelle mit kardialer Überexpression einer PP oder mit Überexpression eines Inhibitors einer PP dar (Bruchert et al. 2008; Carr et al. 2002; Gergs et al. 2004; 2012; Grote-Wessels et al. 2008; Hoehn et al. 2015; Kirchhefer et al. 2005). Zusätzlich wurde ihr Vorkommen an Herzinsuffizienz-Modellen am Tier oder an Gewebe eines herzinsuffizienten Patienten untersucht (Kränkel et al. 2003; Neumann et al. 1997; Neumann 2002). Es gibt einen gewissen Konsens, dass die PP die Pathophysiologie einer Herzinsuffizienz beeinflussen und ein Ziel für eine mögliche Therapie der Erkrankung sein können (El-Armouche und Eschenhagen 2009; Heijman et al. 2013; Weber et al. 2015). Dennoch ist es bisher nicht gelungen einen erfolgreichen therapeutischen Ansatz zu schaffen. Die PP-Regulierung im Herzen ist so komplex, dass die alleinige Herunterregulation einer einzelnen PP eine komplette Dysbalance verursachen kann (Götz et al. 1998). Des Weiteren weiß man, dass sich PP gegenseitig regulieren können. Ein Beispiel ist die Regulierung des I-1 von PP1 über die PP2A (El-Armouche et al. 2006). Das Ziel dieser Arbeit war u.a. die Untersuchung des Zusammenspiels zweier Ser/Thr-PP, welche einen möglichen Einfluss auf die  $Ca^{2+}$ -Homöostase und die Kontraktilität von Kardiomyozyten haben. Um ihren Einfluss auf die Pathogenese zu charakterisieren, wurden verschiedene Stressbedingungen an einem bewährten Mausmodell gewählt, die mit einer Kardiomyopathie einhergehen. Ausgehend von der bisherigen Literatur ist bekannt, dass eine Überexpression der PP2A zu einer kardialen Hypertrophie, einer Minderphosphorylierung regulatorischer Proteine und einer Relaxationsstörung mit verminderter Kontraktilität führt (Gergs et al. 2004). Die PP5 wurde bisher weniger charakterisiert, aber über das existierende Mausmodell wurden ebenso Erkenntnisse über einen Einfluss der PP5 für die Kontraktilität im Herzen publiziert (Gergs et al. 2012). Weiterhin spielt die PP5 eine wichtige Rolle bei LPS-induzierten Entzündungsprozessen und ist beteiligt an Signalwegen, welche für die Genregulation, Apoptose oder Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren von Bedeutung sind (Gergs et al. 2019a; Hinds und Sanchez 2008). Zuletzt wurde ihr Einfluss auf die Titin-Phosphorylierung und MAPK-Signalwege für die Versteifung des Gewebes im Rahmen einer Herzinsuffizienz verdeutlicht (Krysiak et al. 2018). Die Co-Überexpression der PP2A und PP5 bewirkte in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Verschlechterung der kardialen Funktion der

doppelt-transgenen Tiere. Anhand der Gen- und Proteinlevel war ersichtlich, dass die kardiale Überexpression beider PP erfolgreich war. Um die klinische Situation der PP2AxPP5-Tiere zu beschreiben, kann man von einer Herzinsuffizienz im Endstadium mit interstitieller Fibrose sprechen. Die Untersuchungsergebnisse zeigten eine linksventrikuläre verminderte Funktion, welche auch durch  $\beta$ -AR-Stimulation unverändert war. Weiterhin wurden eine linksatrial verringerte Kontraktionskraft mit verlängerten Kontraktions- und Relaxationszeiten, eine verminderte Phosphorylierung regulatorischer Proteine, erhöhte Genmarker für Hypertrophie, Entzündung und Fibrose, eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie und schließlich eine erhöhte Sterblichkeit beobachtet. Eine alleinige Überexpression der PP2A verursachte hingegen, wie aus der Literatur zu erwarten, eine kompensierte Hypertrophie, welche erst im höheren Alter mit einer Fibrose einhergeht. Aus den Hypoxie- und Desensitivierungsversuchen wird durch PP2A-Überexpression eine erhöhte Stresstoleranz ersichtlich, wie schon mehrfach beschrieben wurde (Hoehn et al. 2015; Morita et al. 2001; Schulz et al. 2007; 2008). Die alleinige Überexpression der PP5 verursachte keine Hypertrophie in den Tieren, sondern zeigte nur in wenigen Versuchen, wie z.B. der Hypoxie ein pathologisches Verhalten. Umso interessanter ist die Erkenntnis, dass eine Kreuzung zweier wenig beeinträchtigten Tiere eine potenzierte Verschlechterung der systolischen Leistung mit sich bringt. Daher konnte mit diesen Versuchen ein neues Mausmodell für eine Charakterisierung der Progredienz einer dekompensierten Herzinsuffizienz im Zusammenhang mit der Funktion von Proteinphosphatasen geschaffen werden (Dörner et al. 2021). In den PP2AxPP5-Tieren sind viele Genmarker und regulatorische Proteine verändert, welche in den einfach transgenen Tieren in diesen Versuchen unbeeinflusst blieben. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die PP2A und PP5 sehr vielseitig verschiedene Signalwege beeinflussen, obwohl deren eigene Expression oder Aktivität nicht erhöht war. Möglicherweise spielte dabei auch die gegenseitige Regulation von PP eine wichtige Rolle, u.a. weil die PP1-Aktivität erhöht war ohne, dass sie exogen angesteuert wurde. Eine mögliche Rolle für die mitochondriale Funktion konnte aufgrund des fehlenden Nachweises beider PP in diesem Zellkompartiment nicht gezeigt werden. Dennoch sollte auch zukünftig ein Einfluss dieser und anderer PP auf die mitochondriale Aktivität untersucht werden.

Ser/Thr-PP können ein wichtiger Ansatz für die Therapie einer Kardiomyopathie sein. Sie sind stark regulierte Enzyme, welche viele Schlüsselmechanismen biologischer Aktivität der Zelle steuern (Honkanen und Golden 2002). Da sowohl die PP1 als auch die PP2A an fast allen grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt sind, und ihre Funktion in mehreren Stadien der Herzinsuffizienz und Arrhythmie nachgewiesen wurde, stellen sie eine wichtige therapeutische Option für diese Erkrankungen dar (Heijman et al. 2013; McConnell und Wadzinski 2009). Die PP5 ist zum jetzigen Stand an anderen und scheinbar weniger zellulären Prozessen beteiligt, dennoch konnte in dieser und anderen Arbeiten ihre Bedeutung für Entzündungswege im

Rahmen einer Kardiomyopathie verdeutlicht werden (Gergs et al. 2012; 2019a). In dieser Arbeit konnte durch die gemeinsame Überexpression der PP5 und der PP2A gezeigt werden, dass durch das Zusammenspiel beider PP Signalwege aktiviert werden, welche die Progredienz der Herzinsuffizienz fördern. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass die PP5 unter gewissen Voraussetzungen die linksventrikuläre Funktion inkl. Kontraktilität verschlechtern und eine Fibrose fördern kann. Weiterhin wird aus der vorliegenden Arbeit der Rückschluss gezogen, dass Ser/Thr-PP sich gegenseitig regulieren können und gemeinsam Signalwege aktivieren ohne selbst in ihrer Aktivität verändert zu sein. Aufgrund ihrer allgemeinen Funktion für die Aufrechterhaltung des Proteinkinase-Proteinphosphatase-Gleichgewichts kann es nicht das therapeutische Ziel sein, die katalytischen Untereinheiten von Ser/Thr-PP komplett zu hemmen, da das zu gravierenden Nebenwirkungen führen kann (Weber et al. 2015). Von großer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang eine gezielte Gewebe- und Zellspezifität der Therapie. Als therapeutische Option könnte ein bestimmtes Holoenzym (katalytische und regulatorische Untereinheit) als Angriffspunkt in Frage kommen, um den Phosphorylierungszustand eines bestimmten Substrats zu verändern und so eine substratspezifische Wirkung zu erhalten. Somit wird dann die Interaktion von Substrat mit regulatorischer Untereinheit, Substrat mit katalytischer Untereinheit oder die Interaktion von regulatorischer mit katalytischer Untereinheit gestört (Heijman et al. 2013; McConnell und Wadzinski 2009). Speziell am Herzen hatte die adenoviral vermittelte Gentherapie in Tieren Erfolg. Zum Beispiel konnte durch I-1 Überexpression nach Myokardinfarkt in Schweinen eine Verbesserung des Remodellings gezeigt werden (Fish et al. 2013). Auch in Mäusen mit Kardiomyopathie kam es durch die erfolgreiche PP1-Hemmung durch I-2 zu einem verlängerten Überleben (Yamada et al. 2006).

Das Ziel dieser Arbeit war nicht die möglichen veränderten Signalwege vollends zu untersuchen, sondern einen Überblick über die möglichen Zielstrukturen durch gemeinsame Überexpression von PP2A und PP5 zu gewinnen um in nachfolgenden Forschungsvorhaben detaillierter auf die möglichen veränderten Signalwege einzugehen und vor allem die Relevanz des Zusammenspiels von PP2A und PP5 zu beschreiben. Aufgrund der veränderten Gen- und Proteinmarker wurde gezeigt, dass die PP2A und PP5 an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt sind (Abbildung 47). Neben ihrer Relevanz für die Kontraktilität durch Dephosphorylierung von regulatorischen Proteinen im Zyklus der elektromechanischen Kopplung greifen sie in Signalwege der Fibrose ein. Weiterhin beeinflussen sie die Signalwege für Zellwachstum und Apoptose, welche für die Hypertrophie und das Verhalten unter Ischämie verantwortlich sind. Ihre Auswirkung auf Entzündungssignalwege beeinflusst letztlich sowohl den Verlauf einer Sepsis, als auch die Auswirkungen einer Ischämie mit eventueller Beteiligung der mitochondrialen Aktivität.

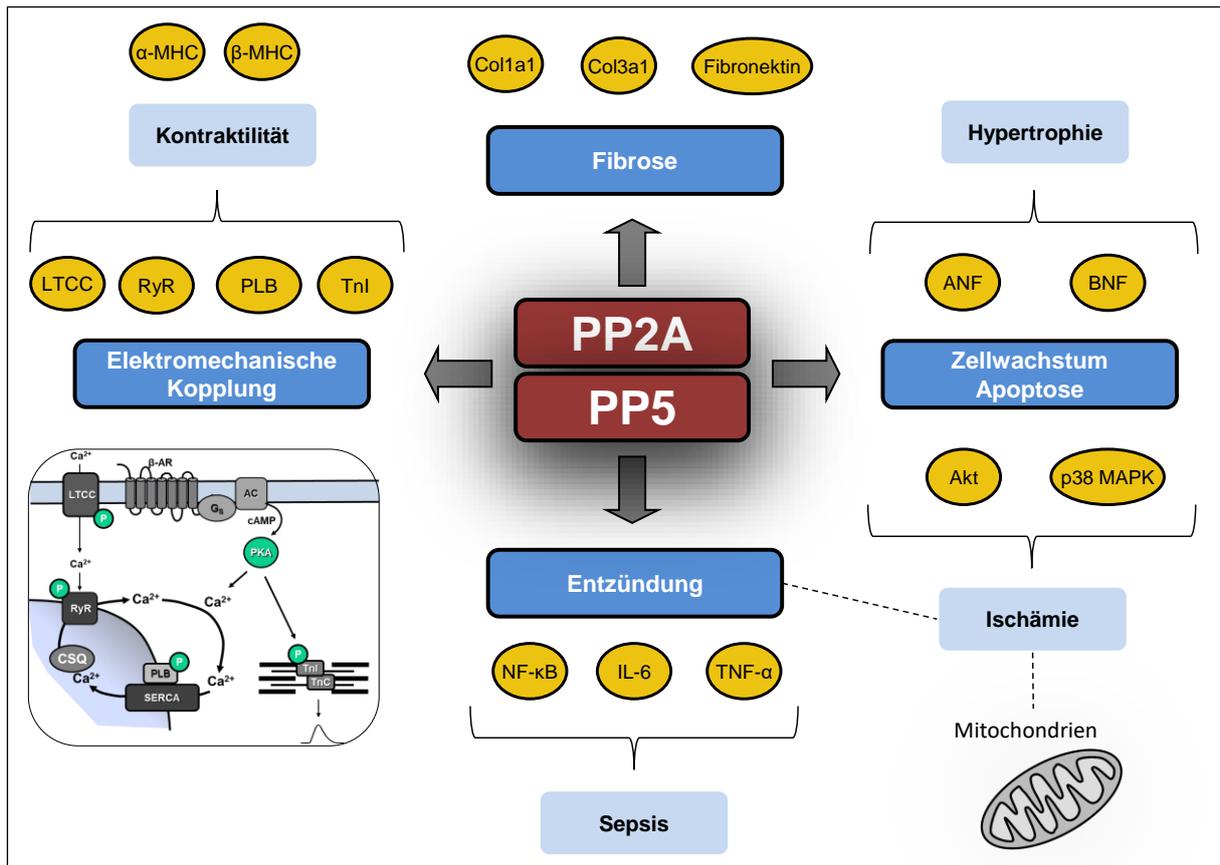


Abbildung 47: Schema zur Darstellung des Einflusses der PP2A und PP5 auf diverse Signalwege.

Das dargestellte Mausmodell scheint ein geeignetes Modell zur Untersuchung des klinischen Verlaufs einer Herzinsuffizienz zu sein. Um die Untersuchungen an den doppelt transgenen Tieren zu vervollständigen, sollte der Ursache der erhöhten PP1-Aktivität nachgegangen werden, z.B. durch Untersuchungen der PP1 auf Gen- und Proteinebene. Weiterhin sollten Versuche über die Expression und Aktivität von Inhibitoren der PP1, PP2A und PP5 Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang zwischen der PP-Aktivität und Inhibitor-Aktivität darstellen, denn eine erhöhte PP1-Aktivität kann in WT- und PP2A-Tieren im Zusammenhang mit einer hervorgerufenen Ischämie auftreten (Hoehn et al. 2015). Daher könnte die Erweiterung der Stressversuche, u.a. auch die Untersuchungen des LPS-Signalwegs, ein zukünftiges Ziel sein. So sollten die Messungen der PP5-Aktivität und eine Erweiterung der in-vivo Untersuchungen zur Charakterisierung der diastolischen Funktion durch optimierte Messungen der Mitralklappenfunktion und Pulmonalvene von Interesse für die Charakterisierung des Mausmodells sein. Mit Blick auf mögliche Therapiekonzepte sollten dafür geeignete Substrate von PP2A und PP5 identifiziert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL (2020) Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 17:269–285

Ahmad Z, Green FJ, Subuhi HS, Watanabe AM (1989) Autonomic regulation of type 1 protein phosphatase in cardiac muscle. *J Biol Chem* 264:3859–3863

Ahn J, Kim J (2012) Mechanisms and consequences of inflammatory signaling in the myocardium. *Curr Hypertens Rep* 14:510–516

Alhayek S, Preuss CV (2021) StatPearls: Beta 1 Receptors, Treasure Island (FL)

Al-Murrani SW, Woodgett JR, Damuni Z (1999) Expression of I<sub>2</sub><sup>PP2A</sup>, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c-Jun and AP-1 activity. *Biochem J* 341 (Pt 2):293–298

Anderson EA, Sinkey CA, Lawton WJ, Mark AL (1989) Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension* 14:177–183

Anderson KR, Sutton MG, Lie JT (1979) Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol* 128:79–85

Annoni G, Luvarà G, Arosio B, Gagliano N, Fiordaliso F, Santambrogio D, Jeremic G, Mircoli L, Latini R, Vergani C, Masson S (1998) Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in the rat myocardium. *Mechanisms of Ageing and Development* 101:57–72

Arino J, Woon CW, Brautigan DL, Miller TB, Johnson GL (1988) Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunit isotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4252–4256

Armstrong SC, Gao W, Lane JR, Ganote CE (1998) Protein phosphatase inhibitors calyculin A and fostriecin protect rabbit cardiomyocytes in late ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 30:61–73

Arzneimittelkommission Der Deutschen Apotheker, Arzneimittelkommission Der Deutschen Ärzteschaft, Bundesarbeitsgemeinschaft Selbsthilfe, Deutsche Diabetes Gesellschaft, Deutsche Gesellschaft Für Allgemeinmedizin Und Familienmedizin, Deutsche Gesellschaft Für Geriatrie, Deutsche Gesellschaft Für Innere Medizin, Deutsche Gesellschaft Für Internistische Intensivmedizin Und Notfallmedizin, Deutsche Gesellschaft Für Kardiologie-Herz- Und Kreislaufforschung, Deutsche Gesellschaft Für Nephrologie, Deutsche Gesellschaft Für Palliativmedizin, Deutsche Gesellschaft Für Pflegewissenschaft, Deutsche Gesellschaft Für Pneumologie Und Beatmungsmedizin, Deutsche Gesellschaft Für Prävention Und Rehabilitation Von Herz-Kreislaufkrankungen, Deutsche Gesellschaft Für Psychosomatische Medizin Und Ärztliche Psychotherapie, Deutsche Gesellschaft Für Rehabilitationswissenschaften, Deutsche Gesellschaft Für Schlafforschung Und Schlafmedizin, Deutsches Kollegium Für Psychosomatische Medizin, Ärztliches Zentrum Für Qualität In Der Medizin (2019) NVL Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 3. Auflage. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)

Assayag P (1998) Effects of sustained low-flow ischemia on myocardial function and calcium-regulating proteins in adult and senescent rat hearts. *Cardiovasc Res* 38:169–180

- Awad AE, Kandalam V, Chakrabarti S, Wang X, Penninger JM, Davidge ST, Oudit GY, Kassiri Z (2010) Tumor necrosis factor induces matrix metalloproteinases in cardiomyocytes and cardiofibroblasts differentially via superoxide production in a PI3Kgamma-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C679-92
- Baker AJ (2014) Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflugers Arch* 466:1139–1150
- Barancik M, Htun P, Schaper W (1999) Okadaic acid and anisomycin are protective and stimulate the SAPK/JNK pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:182–190
- Barisic S, Strozyk E, Peters N, Walczak H, Kulms D (2008) Identification of PP2A as a crucial regulator of the NF-kappaB feedback loop: its inhibition by UVB turns NF-kappaB into a pro-apoptotic factor. *Cell Death Differ* 15:1681–1690
- Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H (1996) Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem* 157:171–179
- Baskaran R, Velmurugan BK (2018) Protein phosphatase 2A as therapeutic targets in various disease models. *Life Sci* 210:40–46
- Bassi R, Heads R, Marber MS, Clark JE (2008) Targeting p38-MAPK in the ischaemic heart: kill or cure? *Curr Opin Pharmacol* 8:141–146
- Becker W, Kentrup H, Klumpp S, Schultz JE, Joost HG (1994) Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain. *J Biol Chem* 269:22586–22592
- Benedict CR, Shelton B, Johnstone DE, Francis G, Greenberg B, Konstam M, Probstfield JL, Yusuf S (1996) Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. SOLVD Investigators. *Circulation* 94:690–697
- Bernstein D, Fajardo G, Zhao M (2011) The Role of  $\beta$ -adrenergic receptors in heart failure: differential regulation of cardiotoxicity and cardioprotection. *Prog Pediatr Cardiol* 31:35–38.
- Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198–205
- Besse S, Robert V, Assayag P, Delcayre C, Swynghedauw B (1994) Nonsynchronous changes in myocardial collagen mRNA and protein during aging: effect of DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol* 267:H2237-44
- Bhasin N, Cunha SR, Mudannayake M, Gigena MS, Rogers TB, Mohler PJ (2007) Molecular basis for PP2A regulatory subunit B56alpha targeting in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H109-19
- Bing OHL, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW (2002) Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev* 7:71–88
- Blatch GL, Lässle M (1999) The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21:932–939
- Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A (2005) The L-type calcium channel in the heart: The beat goes on. *J Clin Invest* 115:3306–3317

- Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA (1997) Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96:1495–1500
- Boerries M, Most P, Gledhill JR, Walker JE, Katus HA, Koch WJ, Aebi U, Schoenenberger C-A (2007) Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction of S100A1 with F1-ATPase leads to an increased ATP content in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 27:4365–4373
- Böhm M, Castellano M, Agabiti-Rosei E, Flesch M, Paul M, Erdmann E (1995) Dose-dependent dissociation of ACE-inhibitor effects on blood pressure, cardiac hypertrophy, and beta-adrenergic signal transduction. *Circulation* 92:3006–3013
- Böhm M, Flesch M, Schnabel P (1996) Role of G-proteins in altered beta-adrenergic responsiveness in the failing and hypertrophied myocardium. *Basic Res Cardiol* 91 Suppl 2:47–51
- Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M, Erdmann E (1990) Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 82:1249–1265
- Boknik P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Muller T, Schmitz W, Schroder F, Neumann J (2000) Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:222–231
- Boknik P, Khorchidi S, Bodor GS, Huke S, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Schmitz W, Neumann J (2001) Role of protein phosphatases in regulation of cardiac inotropy and relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H786-94
- Bollmann P, Werner F, Jaron M, Bruns TA, Wache H, Runte J, Boknik P, Kirchhefer U, Müller FU, Buchwalow IB, Rothmund S, Neumann J, Gergs U (2020) Initial Characterization of Stressed Transgenic Mice With Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Protein Phosphatase 2C. *Front Pharmacol* 11:591773
- Boluyt M (2000) Matrix gene expression and decompensated heart failure The aged SHR model. *Cardiovasc Res* 46:239–249
- Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG (1994) Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* 75:23–32
- Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR (2006) Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res* 72:384–393
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Braunwald E, Bristow MR (2000) Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* 102:IV14-23
- Brichese L, Cazettes G, Valette A (2004) JNK is associated with Bcl-2 and PP1 in mitochondria: Paclitaxel induces its activation and its association with the phosphorylated form of Bcl-2. *Cell Cycle* 3:1312–1319
- 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

- Brodde OE (1991) Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43:203–242
- Bruchert N, Mavila N, Boknik P, Baba HA, Fabritz L, Gergs U, Kirchhefer U, Kirchhof P, Matus M, Schmitz W, DePaoli-Roach AA, Neumann J (2008) Inhibitor-2 prevents protein phosphatase 1-induced cardiac hypertrophy and mortality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H1539-46
- Buttrick P, Malhotra A, Factor S, Greenen D, Leinwand L, Scheuer J (1991) Effect of aging and hypertension on myosin biochemistry and gene expression in the rat heart. *Circ Res* 68:645–652
- Cain BS, Meldrum DR, Joo KS, Wang J-F, Meng X, Cleveland JC, Banerjee A, Harken AH (1998) Human SERCA2a levels correlate inversely with age in senescent human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 32:458–467
- Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ (2014) Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb Protoc* 2014:655–658
- Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing S-L, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA, Kranias EG (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22:4124–4135
- Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Assis JMF de, Padovani CR, Okoshi MP, Pai-Silva MD (2003) Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Pathol* 84:201–206
- Chaanine AH, Hajjar RJ (2011) AKT signalling in the failing heart. *Eur J Heart Fail* 13:825–829
- Chen MX, McPartlin AE, Brown L, Chen YH, Barker HM, Cohen PT (1994) A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *EMBO J* 13:4278–4290
- Chen MJ, Dixon JE, Manning G (2017) Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal* 10.
- Chiang C-W, Liu W-K, Chiang C-W, Chou C-K (2011) Phosphorylation-dependent association of the G4-1/G5PR regulatory subunit with IKK $\beta$  negatively modulates NF- $\kappa$ B activation through recruitment of protein phosphatase 5. *Biochem J* 433:187–196
- Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S (1991) Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 5:3037–3046
- Chien KR, Ross J, Hoshijima M (2003) Calcium and heart failure: the cycle game. *Nat Med* 9:508–509
- Chinkers M (1994) Targeting of a distinctive protein-serine phosphatase to the protein kinase-like domain of the atrial natriuretic peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11075–11079
- Chinkers M (2001) Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab* 12:28–32
- Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA (1997) Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 272:17223–17229

- Clark AR, Ohlmeyer M (2019) Protein phosphatase 2A as a therapeutic target in inflammation and neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 201:181–201
- Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58:453–508
- Cohen P (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences* 25:596–601
- Cohen P (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology* 4:E127 EP
- Collins KA, Korcarz CE, Lang RM (2003) Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics* 13:227–239
- Communal C, Colucci WS, Singh K (2000) p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta -adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. *J Biol Chem* 275:19395–19400
- Conde R, Xavier J, McLoughlin C, Chinkers M, Ovsenek N (2005) Protein phosphatase 5 is a negative modulator of heat shock factor 1. *J Biol Chem* 280:28989–28996
- Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH (1995) Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 91:161–170
- Cori GT, Green AA (1943) Crystalline muscle phosphorylase: II. prosthetic group. *Journal of Biological Chemistry* 151:31–38
- Cseh B, Doma E, Baccarini M (2014) "RAF" neighborhood: Protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Letters* 588:2398–2406
- Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429:403–417
- Cundell MJ, Hutter LH, Nunes Bastos R, Poser E, Holder J, Mohammed S, Novak B, Barr FA (2016) A PP2A-B55 recognition signal controls substrate dephosphorylation kinetics during mitotic exit. *J Cell Biol* 214:539–554.
- Czubryt MP, Hale TM (2021) Cardiac fibrosis: Pathobiology and therapeutic targets. *Cellular Signalling* 85:110066.
- Dagda RK, Zaucha JA, Wadzinski BE, Strack S (2003) A developmentally regulated, neuron-specific splice variant of the variable subunit Bbeta targets protein phosphatase 2A to mitochondria and modulates apoptosis. *J Biol Chem* 278:24976–24985
- Davare MA, Horne MC, Hell JW (2000) Protein phosphatase 2A is associated with class C L-type calcium channels (Cav1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275:39710–39717
- Davies TH, Ning Y-M, Sánchez ER (2005) Differential control of glucocorticoid receptor hormone-binding function by tetratricopeptide repeat (TPR) proteins and the immunosuppressive ligand FK506. *Biochemistry* 44:2030–2038
- DeGrande ST, Little SC, Nixon DJ, Wright P, Snyder J, Dun W, Murphy N, Kilic A, Higgins R, Binkley PF, Boyden PA, Carnes CA, Anderson ME, Hund TJ, Mohler PJ (2013) Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart. *J Biol Chem* 288:1032–1046

DePaoli-Roach AA (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem* 259:12144–12152

DePaoli-Roach AA, Park I-K, Cerovsky V, Csontos C, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin A, Zolnierowicz S (1994) Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Advances in Enzyme Regulation* 34:199–224

DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M (1997) A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 388:548–554

Dobrev D, Wehrens XHT (2014) Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease. *Circ Res* 114:1311-9; discussion 1319

Dörner M-F, Boknik P, Köpp F, Buchwalow IB, Neumann J, Gergs U (2021) Mechanisms of Systolic Cardiac Dysfunction in PP2A, PP5 and PP2A $\times$ PP5 Double Transgenic Mice. *Int J Mol Sci* 22.

duBell WH, Rogers TB (2004) Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type Ca<sup>2+</sup> current in mouse cardiac myocytes. *J Physiol (Lond)* 556:79–93

El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T (2006) Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346:700–706

El-Armouche A, Eschenhagen T (2009) Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14:225–241

El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T (2004) Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 61:87–93

El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann W-H, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T (2003) Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* 17:437–439

Elgenaidi IS, Spiers JP (2019) Hypoxia modulates protein phosphatase 2A through HIF-1 $\alpha$  dependent and independent mechanisms in human aortic smooth muscle cells and ventricular cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 176:1745–1763

Esler M, Hastings J, Lambert G, Kaye D, Jennings G, Seals DR (2002) The influence of aging on the human sympathetic nervous system and brain norepinephrine turnover. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R909-16

Fallach R, Shainberg A, Avlas O, Fainblut M, Chepurko Y, Porat E, Hochhauser E (2010) Cardiomyocyte Toll-like receptor 4 is involved in heart dysfunction following septic shock or myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 48:1236–1244

Fan WJ, van Vuuren D, Genade S, Lochner A (2010) Kinases and phosphatases in ischaemic preconditioning: a re-evaluation. *Basic Res Cardiol* 105:495–511

Feldman AM, McTiernan C (1999) New insight into the role of enhanced adrenergic receptor-effector coupling in the heart. *Circulation* 100:579–582

- Feldman RD, Gros R (2007) New insights into the regulation of cAMP synthesis beyond GPCR/G protein activation: implications in cardiovascular regulation. *Life Sci* 81:267–271
- Fenton RA, Dickson EW, Dobson JG (2005) Inhibition of phosphatase activity enhances preconditioning and limits cell death in the ischemic/reperfused aged rat heart. *Life Sci* 77:3375–3388
- Fernández JJ, Candenas ML, Souto ML, Trujillo MM, Norte M (2002) Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem* 9:229–262
- Fetrow JS, Siew N, Skolnick J (1999) Structure-based functional motif identifies a potential disulfide oxidoreductase active site in the serine/threonine protein phosphatase-1 subfamily. *FASEB J* 13:1866–1874
- Fischer EH, Krebs EG (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem* 216:121–132
- Fish KM, Ladage D, Kawase Y, Karakikes I, Jeong D, Ly H, Ishikawa K, Hadri L, Tilemann L, Muller-Ehmsen J, Samulski RJ, Kranias EG, Hajjar RJ (2013) AAV9.I-1c delivered via direct coronary infusion in a porcine model of heart failure improves contractility and mitigates adverse remodeling. *Circ Heart Fail* 6:310–317
- Flurkey K, Curren JM, and Harrison DE (2007) Mouse models in aging research:1685
- Fox JG (2007) *The mouse in biomedical research*, 2nd edn. American college of laboratory animal medicine series. Elsevier, AP, Amsterdam, Boston
- Frangogiannis NG (2017) The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest* 127:1600–1612
- Fuchs M, Drexler H (2004) Entzündliche Mechanismen bei Herzinsuffizienz (Mechanisms of inflammation in heart failure). *Herz* 29:782–787
- Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K (2000) Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 101:660–667
- Gergs U, Fahrion CM, Bock P, Fischer M, Wache H, Hauptmann S, Schmitz W, Neumann J (2017) Evidence for a functional role of calsequestrin 2 in mouse atrium. *Acta Physiol (Oxf)* 219:669–682
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J (2004) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 279:40827–40834
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow IB, Fabritz L, Grundker N, Kucerova D, Matus M, Werner F, Schmitz W, Neumann J (2012) Modulation of cardiac contractility by serine/threonine protein phosphatase type 5. *Int J Cardiol* 154:116–121
- Gergs U, Jahn T, Werner F, Köhler C, Köpp F, Großmann C, Neumann J (2019a) Overexpression of protein phosphatase 5 in the mouse heart: Reduced contractility but increased stress tolerance - Two sides of the same coin? *PLoS ONE* 14:e0221289
- Gergs U, Kirchhefer U, Bergmann F, Künstler B, Mißlinger N, Au B, Mahnkopf M, Wache H, Neumann J (2020) Characterization of Stressed Transgenic Mice Overexpressing H2-Histamine Receptors in the Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 374:479–488

- Gergs U, Mangold W, Langguth F, Hatzfeld M, Hauptmann S, Bushnaq H, Simm A, Silber R-E, Neumann J (2019b) Alterations of protein expression of phospholamban, ZASP and plakoglobin in human atria in subgroups of seniors. *Sci Rep* 9:5610
- Gergs U, Trapp T, Bushnaq H, Simm A, Silber R-E, Neumann J (2019c) Age-Dependent Protein Expression of Serine/Threonine Phosphatases and Their Inhibitors in the Human Cardiac Atrium. *Adv Med* 2019:2675972
- Ghigo A, Mika D (2019) cAMP/PKA signaling compartmentalization in cardiomyocytes: Lessons from FRET-based biosensors. *J Mol Cell Cardiol* 131:112–121
- Gilmore TD (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680–6684
- Golden T, Swingle M, Honkanen RE (2008) The role of serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) in the regulation of stress-induced signaling networks and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27:169–178
- Goldner J (1938) A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes\*. *Am J Pathol* 14:237–243
- Gombosova I, Boknik P, Kirchhefer U, Knapp J, Luss H, Muller FU, Muller T, Vahlensieck U, Schmitz W, Bodor GS, Neumann J (1998) Postnatal changes in contractile time parameters, calcium regulatory proteins, and phosphatases. *Am J Physiol* 274:H2123-32
- González A, López B, Ravassa S, San José G, Díez J (2019) The complex dynamics of myocardial interstitial fibrosis in heart failure. Focus on collagen cross-linking. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866:1421–1432
- González A, Schelbert EB, Díez J, Butler J (2018) Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol* 71:1696–1706
- Goodman LS (2018) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics: Laurence L. Brunton, Randa Hilal-Dandan, Björn C. Knollmann, 133rd edn. McGraw-Hill, New York
- Goroshi M, Chand D (2016) Myocardial Performance Index (Tei Index): A simple tool to identify cardiac dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Indian Heart J* 68:83–87
- Gorski PA, Ceholski DK, Hajjar RJ (2015) Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure--a rational approach for disease treatment. *Cell Metab* 21:183–194
- Götz J, Probst A, Ehler E, Hemmings B, Kues W (1998) Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12370–12375
- Green DD, Yang SI, Mumby MC (1987) Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4880–4884
- Grey EM, Chan CK, Chen Y, Hofmann PA (2003) Age-related functional effects linked to phosphatase activity in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H90-6
- Grote-Wessels S, Baba HA, Boknik P, El-Armouche A, Fabritz L, Gillmann H-J, Kucerova D, Matus M, Müller FU, Neumann J, Schmitz M, Stümpel F, Theilmeier G, Wohlschlaeger J, Schmitz W, Kirchhefer U (2008) Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 exacerbates progression of cardiac failure in a model with pressure overload. *Cardiovasc Res* 79:464–471

- Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J (1991a) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 266:9180–9185
- Gulick T, Pieper SJ, Murphy MA, Lange LG, Schreiner GF (1991b) A new method for assessment of cultured cardiac myocyte contractility detects immune factor-mediated inhibition of beta-adrenergic responses. *Circulation* 84:313–321
- Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Imai M, Habib O, Sabbah HN (2003) Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2373-81
- Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, Sabbah HN (2002) Inhibition of type 1 protein phosphatase activity by activation of beta-adrenoceptors in ventricular myocardium. *Biochem Pharmacol* 63:1069–1076
- Györke S, Stevens SCW, Terentyev D (2009) Cardiac calsequestrin: quest inside the SR. *J Physiol (Lond)* 587:3091–3094
- Györke S, Terentyev D (2008) Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res* 77:245–255
- Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG (2014) Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol* 77:160–167
- Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995) Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem* 270:2074–2081
- Hamdani N, Bishu KG, Frieling-Salewsky M von, Redfield MM, Linke WA (2013) Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* 97:464–471
- Hamstra SI, Whitley KC, Baranowski RW, Kurgan N, Braun JL, Messner HN, Fajardo VA (2020) The role of phospholamban and GSK3 in regulating rodent cardiac SERCA function. *Am J Physiol Cell Physiol* 319:C694-C699
- Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75:434–442
- Heijman J, Dewenter M, El-Armouche A, Dobrev D (2013) Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol* 64:90–98
- Herraiz-Martínez A, Álvarez-García J, Llach A, Molina CE, Fernandes J, Ferrero-Gregori A, Rodríguez C, Vallmitjana A, Benítez R, Padró JM, Martínez-González J, Cinca J, Hove-Madsen L (2015) Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 106:76–86
- Hertz EPT, Kruse T, Davey NE, López-Méndez B, Sigurðsson JO, Montoya G, Olsen JV, Nilsson J (2016) A Conserved Motif Provides Binding Specificity to the PP2A-B56 Phosphatase. *Mol Cell* 63:686–695
- Herzig S, Neumann J (2000) Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80:173–210
- Hinds TD, Sanchez ER (2008) Protein phosphatase 5. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2358–2362

Hirano S (2012) Western blot analysis. *Methods Mol Biol* 926:87–97

Hnasko TS, Hnasko RM (2015) The Western Blot. *Methods Mol Biol* 1318:87–96

Hoehn M, Zhang Y, Xu J, Gergs U, Boknik P, Werdan K, Neumann J, Ebel H (2015) Overexpression of protein phosphatase 2A in a murine model of chronic myocardial infarction leads to increased adverse remodeling but restores the regulation of beta-catenin by glycogen synthase kinase 3beta. *Int J Cardiol* 183:39–46

Honkanen RE, Golden T (2002) Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr Med Chem* 9:2055–2075

Hotta H, Uchida S (2010) Aging of the autonomic nervous system and possible improvements in autonomic activity using somatic afferent stimulation. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1:S127–36

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

Hunter JJ, Chien KR (1999) Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 341:1276–1283

Huysman J, Vliegen HW, van der Laarse A, Eulderink F (1989) Changes in Nonmyocyte Tissue Composition Associated with Pressure Overload of Hypertrophic Human Hearts. *Pathology - Research and Practice* 184:577–581

Imbalzano E, Mandraffino G, Casciaro M, Quartuccio S, Saitta A, Gangemi S (2016) Pathophysiological mechanism and therapeutic role of S100 proteins in cardiac failure: a systematic review. *Heart Fail Rev* 21:463–473

Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159:871–877

Jakes S, Mellgren RL, Schlender KK (1986) Isolation and characterization of an inhibitor-sensitive and a polycation-stimulated protein phosphatase from rat liver nuclei. *Biochim Biophys Acta* 888:135–142

Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: A highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353:417–439

Jideama NM, Crawford BH, Hussain AKMA, Raynor RL (2006) Dephosphorylation specificities of protein phosphatase for cardiac troponin I, troponin T, and sites within troponin T. *Int J Biol Sci* 2:1–9

Jones WK, Grupp IL, Doetschman T, Grupp G, Osinska H, Hewett TE, Boivin G, Gulick J, Ng WA, Robbins J (1996) Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart. *J Clin Invest* 98:1906–1917

Joulin O, Marechaux S, Hassoun S, Montaigne D, Lancel S, Neviere R (2009) Cardiac force-frequency relationship and frequency-dependent acceleration of relaxation are impaired in LPS-treated rats. *Crit Care* 13:R14

Junttila MR, Li S-P, Westermarck J (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* 22:954–965

- Kaikkonen L, Magga J, Ronkainen V-P, Koivisto E, Perjes Á, Chuprun JK, Vinge LE, Kilpiö T, Aro J, Ulvila J, Alakoski T, Bibb JA, Szokodi I, Koch WJ, Ruskoaho H, Kerkelä R (2014) p38 $\alpha$  regulates SERCA2a function. *J Mol Cell Cardiol* 67:86–93
- Kamp TJ, Hell JW (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 87:1095–1102
- Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 53:457–481
- Kelly E, Bailey CP, Henderson G (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S379-88
- Khew-Goodall Y, Mayer RE, Maurer F, Stone SR, Hemmings BA (1991) Structure and transcriptional regulation of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes. *Biochemistry* 30:89–97
- Khew-Goodall Y, Hemmings BA (1988) Tissue-specific expression of mRNAs encoding  $\alpha$ - and  $\beta$ -catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS Letters* 238:265–268
- Kimura T, Han W, Pagel P, Nairn AC, Caplan MJ (2011) Protein phosphatase 2A interacts with the Na,K-ATPase and modulates its trafficking by inhibition of its association with arrestin. *PLoS ONE* 6:e29269
- Kirchhefer U, Baba HA, Boknik P, Breeden KM, Mavila N, Bruchert N, Justus I, Matus M, Schmitz W, DePaoli-Roach AA, Neumann J (2005) Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res* 68:98–108
- Kirchhefer U, Brekle C, Eskandar J, Isensee G, Kučerová D, Müller FU, Pinet F, Schulte JS, Seidl MD, Boknik P (2014) Cardiac function is regulated by B56 $\alpha$ -mediated targeting of protein phosphatase 2A (PP2A) to contractile relevant substrates. *J Biol Chem* 289:33862–33873
- Kishi H, Nakagawa K, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Taya Y, Yamaizumi M (2001) Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J Biol Chem* 276:39115–39122
- Kiss E, Ball NA, Kranias EG, Walsh RA (1995) Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca(2+)-ATPase protein levels. Effects on Ca<sup>2+</sup> transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res* 77:759–764
- Knott A, Purcell I, Marston S (2002) In vitro motility analysis of thin filaments from failing and non-failing human heart: troponin from failing human hearts induces slower filament sliding and higher Ca(2+) sensitivity. *J Mol Cell Cardiol* 34:469–482
- Kockskamper J, Pieske B (2006) Phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: The dominating twin of protein kinase A? *Circ Res* 99:333–335
- Koga Y, Tsurumaki H, Aoki-Saito H, Sato M, Yatomi M, Takehara K, Hisada T (2019) Roles of Cyclic AMP Response Element Binding Activation in the ERK1/2 and p38 MAPK Signalling Pathway in Central Nervous System, Cardiovascular System, Osteoclast Differentiation and Mucin and Cytokine Production. *Int J Mol Sci* 20
- Kötter S, Gout L, Frieling-Salewsky M von, Müller AE, Helling S, Marcus K, Dos Remedios C, Linke WA, Krüger M (2013) Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 99:648–656

- Kränkel N, Adams V, Gielen S, Linke A, Erbs S, Schuler G, Hambrecht R (2003) Differential gene expression in skeletal muscle after induction of heart failure: impact of cytokines on protein phosphatase 2A expression. *Mol Genet Metab* 80:262–271
- Kray AE, Carter RS, Pennington KN, Gomez RJ, Sanders LE, Llanes JM, Khan WN, Ballard DW, Wadzinski BE (2005) Positive regulation of I $\kappa$ B kinase signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A. *J Biol Chem* 280:35974–35982
- Krebs EG, Fischer EH (1956) The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 20:150–157
- Krebs EG, Kent AB, Fischer EH (1958) The muscle phosphorylase b kinase reaction. *J Biol Chem* 231:73–83
- Krysiak J, Unger A, Beckendorf L, Hamdani N, Frieling-Salewsky M von, Redfield MM, Dos Remedios CG, Sheikh F, Gergs U, Boknik P, Linke WA (2018) Protein phosphatase 5 regulates titin phosphorylation and function at a sarcomere-associated mechanosensor complex in cardiomyocytes. *Nat Commun* 9:262
- Kubota T, Miyagishima M, Alvarez RJ, Kormos R, Rosenblum WD, Demetris AJ, Semigran MJ, Dec G, Holubkov R, McTiernan CF, Mann DL, Feldman AM, McNamara DM (2000) Expression of proinflammatory cytokines in the failing human heart: comparison of recent-onset and end-stage congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant* 19:819–824
- Kuster DWD, Bawazeer AC, Zaremba R, Goebel M, Boontje NM, van der Velden J (2012) Cardiac myosin binding protein C phosphorylation in cardiac disease. *J Muscle Res Cell Motil* 33:43–52
- Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F (2017) TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines (Basel)* 5
- Lakatta EG (1999) Cardiovascular aging research: the next horizons. *J Am Geriatr Soc* 47:613–625
- Lakatta EG (2000) Cardiovascular aging in health. *Clinics in Geriatric Medicine* 16:419–443
- Lakatta EG, Levy D (2003) Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* 107:346–354
- Lakatta EG, Sollott SJ (2002) Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 132:699–721
- Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: To TPR or not to TPR? *Trends in Biochemical Sciences* 20:257–259
- Lambrecht C, Haesen D, Sents W, Ivanova E, Janssens V (2013) Structure, regulation, and pharmacological modulation of PP2A phosphatases. *Methods Mol Biol* 1053:283–305
- Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt J-U (2015) Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 28:1-39.e14

- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MSJ, Stewart WJ (2005) Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 18:1440–1463
- Larsen K-O, Lygren B, Sjaastad I, Krobert KA, Arnkvaern K, Florholmen G, Larsen A-KR, Levy FO, Taskén K, Skjøsberg OH, Christensen G (2008) Diastolic dysfunction in alveolar hypoxia: a role for interleukin-18-mediated increase in protein phosphatase 2A. *Cardiovasc Res* 80:47–54
- Layland J, Solaro RJ, Shah AM (2005) Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res* 66:12–21
- Lei M, Wang X, Ke Y, Solaro RJ (2015) Regulation of Ca(2+) transient by PP2A in normal and failing heart. *Front Physiol* 6:13
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M (1990) Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 323:236–241
- Li M, Satinover DL, Brautigan DL (2007) Phosphorylation and functions of inhibitor-2 family of proteins. *Biochemistry* 46:2380–2389
- Ling S, Sun Q, Li Y, Zhang L, Zhang P, Wang X, Tian C, Li Q, Song J, Liu H, Kan G, Cao H, Huang Z, Nie J, Bai Y, Chen S, Li Y, He F, Zhang L, Li Y (2012) CKIP-1 inhibits cardiac hypertrophy by regulating class II histone deacetylase phosphorylation through recruiting PP2A. *Circulation* 126:3028–3040
- Little SC, Curran J, Makara MA, Kline CF, Ho H-T, Xu Z, Wu X, Polina I, Musa H, Meadows AM, Carnes CA, Biesiadecki BJ, Davis JP, Weisleder N, Györke S, Wehrens XH, Hund TJ, Mohler PJ (2015) Protein phosphatase 2A regulatory subunit B56 $\alpha$  limits phosphatase activity in the heart. *Sci Signal* 8:ra72
- Liu Q, Hofmann PA (2003) Modulation of protein phosphatase 2a by adenosine A1 receptors in cardiomyocytes: role for p38 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H97-103
- Liu Q, Hofmann PA (2004) Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H2204-12
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017) NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408
- Lohse MJ (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179:171–188
- Lohse MJ, Engelhardt S, Danner S, Böhm M (1996) Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization: from molecular biology to heart failure. *Basic Res Cardiol* 91 Suppl 2:29–34
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003) What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93:896–906

- Lompré AM, Lambert F, Lakatta EG, Schwartz K (1991) Expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging. *Circ Res* 69:1380–1388
- Lompré A-M, Hajjar RJ, Harding SE, Kranias EG, Lohse MJ, Marks AR (2010) Ca<sup>2+</sup> cycling and new therapeutic approaches for heart failure. *Circulation* 121:822–830
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Lu G, Ren S, Korge P, Choi J, Dong Y, Weiss J, Koehler C, Chen J, Wang Y (2007) A novel mitochondrial matrix serine/threonine protein phosphatase regulates the mitochondria permeability transition pore and is essential for cellular survival and development. *Genes Dev* 21:784–796
- Lubbers ER, Mohler PJ (2016) Roles and regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 101:127–133
- Luo Z, Zheng J, Lu Y, Bregman DB (2001) Ultraviolet radiation alters the phosphorylation of RNA polymerase II large subunit and accelerates its proteasome-dependent degradation. *Mutat Res* 486:259–274
- Luss H, Klein-Wiele O, Boknik P, Herzig S, Knapp J, Linck B, Muller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W, Neumann J (2000) Regional expression of protein phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 32:2349–2359
- MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196:725–734
- MacLennan DH, Kranias EG (2003) Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:566–577
- Mamuya W, Chobanian A, Brecher P (1992) Age-related changes in fibronectin expression in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto, and Wistar rat hearts. *Circ Res* 71:1341–1350
- Mann DL (2015) Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circ Res* 116:1254–1268
- Marchant DJ, Boyd JH, Lin DC, Granville DJ, Garmaroudi FS, McManus BM (2012) Inflammation in myocardial diseases. *Circ Res* 110:126–144
- Marshall M, Anilkumar N, Layland J, Walker SJ, Kentish JC, Shah AM, Cave AC (2009) Protein phosphatase 2A contributes to the cardiac dysfunction induced by endotoxemia. *Cardiovasc Res* 82:67–76
- Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin M-L, Yardin C, Terro F (2013) Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 12:289–309
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosembliit N, Marks AR (2001) Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol* 153:699–708
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101:365–376

- Mattiazzi A, Mundinaweilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E (2005) Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res* 68:366–375
- McConnell BK, Moravec CS, Morano I, Bond M (1997) Troponin I phosphorylation in spontaneously hypertensive rat heart: effect of beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol* 273:H1440-51
- McConnell JL, Wadzinski BE (2009) Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development. *Mol Pharmacol* 75:1249–1261
- Mishra S, Gupta RC, Tiwari N, Sharov VG, Sabbah HN (2002) Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake in human failing left ventricular myocardium. *J Heart Lung Transplant* 21:366–373
- Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA (2000) Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 86:386–390.
- Morita K, Saitoh M, Tobiume K, Matsuura H, Enomoto S, Nishitoh H, Ichijo H (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J* 20:6028–6036
- Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR (1994) Ca<sup>2+</sup>-transporting ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation* 90:653–657
- Mumby MC, Walter G (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 73:673–699
- Mumby M (2007) PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* 130:21–24
- Münch G, Bölc 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
- Mustapha S, Kirshner A, Moissac D de, Kirshenbaum LA (2000) A direct requirement of nuclear factor-kappa B for suppression of apoptosis in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H939-45
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2013) Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie, 10th edn. WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh Y-H (2007) Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 87:425–456
- Neumann J (2002) Altered phosphatase activity in heart failure, influence on Ca<sup>2+</sup> movement. *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1:I91-5
- Neumann J, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC, Watanabe AM (1993) Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: Evaluation with okadaic acid. *Am J Physiol* 265:H257-66
- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29:265–272

- Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM (1991) Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 69:1450–1457
- Neumann J, Maas R, Boknik P, Jones LR, Zimmermann N, Scholz H (1999) Pharmacological characterization of protein phosphatase activities in preparations from failing human hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 289:188–193
- Neumann J, Boknik P, Kirchhefer U, Gergs U (2021) The role of PP5 and PP2C in cardiac health and disease. *Cellular Signalling* 85:110035
- Nicolaou P, Kranias EG (2009) Role of PP1 in the regulation of Ca cycling in cardiac physiology and pathophysiology. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:3571–3585
- O'Brien F, Venturi E, Sitsapesan R (2015) The ryanodine receptor provides high throughput Ca<sup>2+</sup>-release but is precisely regulated by networks of associated proteins: A focus on proteins relevant to phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 43:426–433
- Oh JK, Hatle L, Tajik AJ, Little WC (2006) Diastolic heart failure can be diagnosed by comprehensive two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 47:500–506
- Ojamaa K, Klein I (1991) Thyroid hormone regulation of alpha-myosin heavy chain promoter activity assessed by in vivo DNA transfer in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 179:1269–1275
- Ommen SR, Nishimura RA, Appleton CP, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, Tajik AJ (2000) Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation* 102:1788–1794
- O'Neill L, Holbrook NJ, Fargnoli J, Lakatta EG (1991) Progressive changes from young adult age to senescence in mRNA for rat cardiac myosin heavy chain genes. *Cardioscience* 2:1–5
- Pagani FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner MS (1992) Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs. *J Clin Invest* 90:389–398
- Paroni G, Cernotta N, Dello Russo C, Gallinari P, Pallaoro M, Foti C, Talamo F, Orsatti L, Steinkühler C, Brancolini C (2008) PP2A regulates HDAC4 nuclear import. *Mol Biol Cell* 19:655–667
- Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, Keulenaer G de, Leite-Moreira AF, Borbély A, Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL (2007) How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 28:2539–2550
- Pearlman ES, Weber KT, Janicki JS, Pietra GG, Fishman AP (1982) Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest* 46:158–164
- Pitcher JA, Payne ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8343–8347

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 37:2129–2200

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

Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM (2009) Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*:341–366

Prickett TD, Brautigan DL (2007) Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Mol Cell Biol* 27:4217–4227

Rahimi N, Costello CE (2015) Emerging roles of post-translational modifications in signal transduction and angiogenesis. *Proteomics* 15:300–309

Rai V, Sharma P, Agrawal S, Agrawal DK (2017) Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol Cell Biochem* 424:123–145

Ram R, Mickelsen DM, Theodoropoulos C, Blaxall BC (2011) New approaches in small animal echocardiography: Imaging the sounds of silence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H1765–80

Ramirez-Correa GA, Cortassa S, Stanley B, Gao WD, Murphy AM (2010) Calcium sensitivity, force frequency relationship and cardiac troponin I: Critical role of PKA and PKC phosphorylation sites. *J Mol Cell Cardiol* 48:943–953

Ramos GC, van den Berg A, Nunes-Silva V, Weirather J, Peters L, Burkard M, Friedrich M, Pinnecker J, Abeßer M, Heinze KG, Schuh K, Beyersdorf N, Kerkau T, Demengeot J, Frantz S, Hofmann U (2017) Myocardial aging as a T-cell-mediated phenomenon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E2420–E2429

Ramsey AJ, Russell LC, Whitt SR, Chinkers M (2000) Overlapping sites of tetratricopeptide repeat protein binding and chaperone activity in heat shock protein 90. *J Biol Chem* 275:17857–17862

Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ, Marks AR (2003) Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem* 278:444–453

Reiser PJ, Kline WO (1998) Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species. *Am J Physiol* 274:H1048–53

Reynhout S, Janssens V (2019) Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866:31–50

Rossi D, Gamberucci A, Pierantozzi E, Amato C, Migliore L, Sorrentino V (2020) Calsequestrin, a key protein in striated muscle health and disease. *J Muscle Res Cell Motil*

- Ruvolo PP, Clark W, Mumby M, Gao F, May WS (2002) A functional role for the B56 alpha-subunit of protein phosphatase 2A in ceramide-mediated regulation of Bcl2 phosphorylation status and function. *J Biol Chem* 277:22847–22852
- Sabbah HN (2020) Targeting the Mitochondria in Heart Failure: A Translational Perspective. *JACC Basic Transl Sci* 5:88–106
- Sainte Beuve C, Allen PD, Dambrin G, Rannou F, Marty I, Trouvé P, Bors V, Pavie A, Gandjbakch I, Charlemagne D (1997) Cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in control and cardiomyopathic human hearts: mRNA and protein contents are differentially regulated. *J Mol Cell Cardiol* 29:1237–1246
- Schaefer A, Meyer GP, Hilfiker-Kleiner D, Brand B, Drexler H, Klein G (2005) Evaluation of Tissue Doppler Tei index for global left ventricular function in mice after myocardial infarction: comparison with Pulsed Doppler Tei index. *Eur J Echocardiogr* 6:367–375
- Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ (2000) Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Circulation* 101:790–796
- Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK (1999) Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca(2+)-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am J Physiol* 277:H474-80
- Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C, Murphy E (2001) Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H499-508
- Schröder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwinger RH, Weil J, Herzig S (1998) Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 98:969–976
- Schulz N, Gergs U, Neumann J (2007) Heart-specific overexpression of PP2A leads to impaired contractility but protects against ischemia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 375:62 (abstract)
- Schulz N, Gergs U, Neumann J (2008) Increased expression of PP2A protects against lipopolysaccharide-induced stress. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377:56 (abstract)
- Schwartz K, Chassagne C, Boheler KR (1993) The molecular biology of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 22:A30-A33
- Schwinger RH, Böhm M, Schmidt U, Karczewski P, Bavendiek U, Flesch M, Krause EG, Erdmann E (1995) Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca<sup>2+</sup> uptake and Ca(2+)-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation* 92:3220–3228
- Schwinger RH, Münch G, Bölck 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
- Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, Batra SK (2013) Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett* 335:9–18
- Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL (1996) Basic mechanisms in heart failure: The cytokine hypothesis. *Journal of Cardiac Failure* 2:243–249

- Seumen CHT, Grimm TM, Hauck CR (2021) Protein phosphatases in TLR signaling. *Cell Commun Signal* 19:45
- Shi Y (2009) Serine/threonine phosphatases: Mechanism through structure. *Cell* 139:468–484
- Shinmura K (2016) Cardiac Senescence, Heart Failure, and Frailty: A Triangle in Elderly People. *Keio J Med* 65:25–32
- Shirazi LF, Bissett J, Romeo F, Mehta JL (2017) Role of Inflammation in Heart Failure. *Curr Atheroscler Rep* 19:27
- Silverstein AM, Galigniana MD, Chen MS, Owens-Grillo JK, Chinkers M, Pratt WB (1997) Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem* 272:16224–16230
- Simmerman HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78:921–947
- Sipido KR, Volders PGA, Vos MA, Verdonck F (2002) Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res* 53:782–805
- Skinner J, Sinclair C, Romeo C, Armstrong D, Charbonneau H, Rossie S (1997) Purification of a fatty acid-stimulated protein-serine/threonine phosphatase from bovine brain and its identification as a homolog of protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 272:22464–22471
- Solaro RJ (2011) Modulation of Cardiac Myofilament Activity by Protein Phosphorylation. In: Terjung R (ed) *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA
- Solaro RJ, Kobayashi T (2011) Protein phosphorylation and signal transduction in cardiac thin filaments. *J Biol Chem* 286:9935–9940
- Squire J (2019) Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. *Int J Mol Sci* 20
- Steenbergen C (2002) The role of p38 mitogen-activated protein kinase in myocardial ischemia/reperfusion injury; relationship to ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 97:276–285
- Stensløkken K-O, Rutkovskiy A, Kaljusto M-L, Hafstad AD, Larsen TS, Vaage J (2009) Inadvertent phosphorylation of survival kinases in isolated perfused hearts: a word of caution. *Basic Res Cardiol* 104:412–423
- Stone SR, Hofsteenge J, Hemmings BA (1987) Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* 26:7215–7220
- Sun H, Wang Y (2012) Novel Ser/Thr protein phosphatases in cell death regulation. *Physiology (Bethesda)* 27:43–52
- Sun SC, Maggirwar SB, Harhaj E (1995) Activation of NF-kappa B by phosphatase inhibitors involves the phosphorylation of I kappa B alpha at phosphatase 2A-sensitive sites. *J Biol Chem* 270:18347–18351
- Swingle MR, Honkanen RE, Ciszak EM (2004) Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5. *J Biol Chem* 279:33992–33999

- Tachibana K, Scheuer PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, van Engen D, Clardy J, Gopichand Y, Schmitz FJ (1981) Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* 103:2469–2471
- Tamura Y, Simizu S, Osada H (2004) The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Letters* 569:249–255
- Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ (1997) Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *J Am Soc Echocardiogr* 10:169–178
- Terentyev D, Hamilton S (2016) Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release by serine-threonine phosphatases in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 101:156–164
- Terjung R (ed) (2011) *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA
- Tiemann K, Weyer D, Djoufack PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohe C, Fink KB (2003) Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H464-74
- Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL (1996) Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: A report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 27:1201–1206
- Totzeck A, Boengler K, van de Sand A, Konietzka I, Gres P, Garcia-Dorado D, Heusch G, Schulz R (2008) No impact of protein phosphatases on connexin 43 phosphorylation in ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H2106-12
- Turowski P, Fernandez A, Favre B, Lamb NJ, Hemmings BA (1995) Differential methylation and altered conformation of cytoplasmic and nuclear forms of protein phosphatase 2A during cell cycle progression. *J Cell Biol* 129:397–410
- Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, Obata T, Ebina Y, Kashiwagi A, Olefsky JM (2004) Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 24:8778–8789
- Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993) Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87:454–463
- Ungerer M, Parruti G, Böhm M, Puzicha M, DeBlasi A, Erdmann E, Lohse MJ (1994) Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 74:206–213
- van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, Jong JW de, Owen VJ, Burton PBJ, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJM (2003) Increased Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 57:37–47
- Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Shay CM, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, VanWagner LB, Tsao CW (2020) Heart Disease and

- Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 141:e139-e596
- Weber KT, Brilla CG (1991) Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83:1849–1865
- Weber KT, Brilla CG, Campbell SE, Guarda E, Zhou G, Sriram K (1993) Myocardial fibrosis: role of angiotensin II and aldosterone. *Basic Res Cardiol* 88 Suppl 1:107–124
- Weber S, Meyer-Roxlau S, El-Armouche A (2016) Role of protein phosphatase inhibitor-1 in cardiac beta adrenergic pathway. *J Mol Cell Cardiol* 101:116–126
- Weber S, Meyer-Roxlau S, Wagner M, Dobrev D, El-Armouche A (2015) Counteracting Protein Kinase Activity in the Heart: The Multiple Roles of Protein Phosphatases. *Front Pharmacol* 6:270
- Weber T, Neumann J, Meissner A, Grosse Hartlage M, van Aken H, Hanske G, Schmitz W, Boknik P (2006) Reduced serine-16 and threonine-17 phospholamban phosphorylation in stunning of conscious dogs: No evidence for any involvement of protein kinase A or protein phosphatases. *Basic Res Cardiol* 101:253–260
- Weinbrenner C, Baines CP, Liu GS, Armstrong SC, Ganote CE, Walsh AH, Honkanen RE, Cohen MV, Downey JM (1998) Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* 98:899–905
- Weiss A, Leinwand LA (1996) The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:417–439
- Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han J, Kähäri VM (2001) p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol Cell Biol* 21:2373–2383
- Wijnker PJM, Boknik P, Gergs U, Muller FU, Neumann J, dos Remedios C, Schmitz W, Sindermann JR, Stienen GJM, van der Velden J, Kirchhefer U (2011) Protein phosphatase 2A affects myofilament contractility in non-failing but not in failing human myocardium. *J Muscle Res Cell Motil* 32:221–233
- Wlodarchak N, Xing Y (2016) PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 51:162–184
- Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G (1960) A simple technic for extremely rapid freezing of large pieces of tissue. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 270:399–412
- Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey PD, Chao Y, Lin Z, Li Z, Strack S, Stock JB, Shi Y (2006) Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell* 127:341–353
- Xu A, Narayanan N (1998) Effects of aging on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-cycling proteins and their phosphorylation in rat myocardium. *Am J Physiol* 275:H2087-94
- Yamada M, Ikeda Y, Yano M, Yoshimura K, Nishino S, Aoyama H, Wang L, Aoki H, Matsuzaki M (2006) Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy. *FASEB J* 20:1197–1199

- Yamaguchi F, Umeda Y, Shimamoto S, Tsuchiya M, Tokumitsu H, Tokuda M, Kobayashi R (2012) S100 proteins modulate protein phosphatase 5 function: a link between  $Ca^{2+}$  signal transduction and protein dephosphorylation. *J Biol Chem* 287:13787–13798
- Yang J, Roe SM, Cliff MJ, Williams MA, Ladbury JE, Cohen PTW, Barford D (2005) Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *EMBO J* 24:1–10
- Yang Y, Lv J, Jiang S, Ma Z, Wang D, Hu W, Deng C, Fan C, Di S, Sun Y, Yi W (2016) The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis* 7:e2234
- Yokota T, Wang Y (2016) p38 MAP kinases in the heart. *Gene* 575:369–376
- Yokoyama T, Arai M, Sekiguchi K, Tanaka T, Kanda T, Suzuki T, Nagai R (1999) Tumor necrosis factor- $\alpha$  decreases the phosphorylation levels of phospholamban and troponin I in spontaneously beating rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31:261–273
- Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL (1993) Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* 92:2303–2312
- Yu J, Lu Y, Li Y, Xiao L, Xing Y, Li Y, Wu L (2015) Role of S100A1 in hypoxia-induced inflammatory response in cardiomyocytes via TLR4/ROS/NF- $\kappa$ B pathway. *J Pharm Pharmacol* 67:1240–1250
- Zakhary DR, Moravec CS, Stewart RW, Bond M (1999) Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 99:505–510
- Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, Ross J, Brown JH (2002) The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277:1261–1267
- Zhihao L, Jingyu N, Lan L, Michael S, Rui G, Xiyun B, Xiaozhi L, Guanwei F (2020) SERCA2a: a key protein in the  $Ca^{2+}$  cycle of the heart failure. *Heart Fail Rev* 25:523–535
- Zhu X, Altschafel BA, Hajjar RJ, Valdivia HH, Schmidt U (2005) Altered  $Ca^{2+}$  sparks and gating properties of ryanodine receptors in aging cardiomyocytes. *Cell Calcium*:583–591
- Zipes DP (2019) Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine, 11th edn. Elsevier, Philadelphia, PA
- Zwiener I, Blettner M, Hommel G (2011) Survival Analysis. *Deutsches Aerzteblatt Online*.

## 7 Anhang

### 7.1 Material

#### Oligonukleotide

Tabelle 9: Oligonukleotide (PCR- und qPCR-Primer)

Gen	Bezeichnung	Sequenz
MHC	MHC-SEQ-P1	5'-acccttaccacatagacc-3'
PP5	rPP5-SEQ-P3R	5'-gcttcacctcaccaccgtc-3'
PP2Ac $\alpha$	PP2A-SEQ-P1R	5'-cttaaacactcgcgtagaacc-3'
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GAPDH	5'-atgcatcctgcaccaccaac-3'
		5'-atgcctgcttcacaccttc-3'
Interleukin-6	IL-6	5'-ccggagaggagacttcacag-3'
		5'-ttctgcaagtgcacatcgt-3'
Nukleärer Faktor $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B	5'-gaaattcctgatccagacaaaaac-3'
		5'-atcactcaatggcctctgtgtag-3'
Tumornekrosefaktor- $\alpha$	TNF- $\alpha$	5'-cactcagatcatcttcaaaa-3'
		5'-gtagacaaggtagaaccatcg-3'
Atriales natriuretisches Peptid/natriuretisches Peptid Typ A (Nppa)	ANP	5'-gtgcggtgccaacacagat-3'
		5'-gcttcctcagtctgctcactca-3'
Natriuretisches Peptid Typ B (Nppb)	BNP	5'-ccagtctccagagcaattcaa-3'
		5'-agctgtctctgggcccatttc-3'
Fibronectin 1 (Fn1)	Fn1	5'-ttaagctcacatgccagtgc-3'
		5'-tcgtcatagcacgttgcttc-3'
Myosin, schwere Kette 6, $\alpha$ -Isoform (Myh6)	$\alpha$ -MHC	5'-gctgacagatcgggagaatcag-3'
		5'-cccctatggctgcaatgc-3'
Myosin, schwere Kette 7, $\beta$ -Isoform (Myh7)	$\beta$ -MHC	5'-actcaagcgggagaacaaga-3'
		5'-acctgggacaactccaactg-3'
Kollagen Typ 1, Subtyp $\alpha$ 1 (Col1 $\alpha$ 1)	Col1 $\alpha$ 1	5'-acatgttcagcttggacc-3'
		5'-taggccattgtgtatgcagc-3'
Kollagen Typ 3, Subtyp $\alpha$ 1 (Col3 $\alpha$ 1)	Col3 $\alpha$ 1	5'-tgtagaaaaggacacagaggc-3'
		5'-tccaactcacccttagcacc-3'
PP5	Gesamt-PP5	5'-ggatcagaagaactgcacc-3'
		5'-ttggtctctctgagggtaaacc-3'
PP2Ac $\beta$	PP2Ac $\beta$	5'-tgcaagaagttccacatgag-3'
		5'-tggcaccagttatatcctcc-3'
PP2Ac $\alpha$	Gesamt-PP2Ac $\alpha$	5'-atcttctcactgccttg-3'
		5'-aagggtataaccagctccccg-3'

**Substanzen und Chemikalien**

Tabelle 10: Lösungen, Substanzen und Chemikalien

<b>Lösung/Substanz/Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Isoprenalinhydrochlorid	Sigma Aldrich
Narcoren® (Pentobarbital-Natrium)	Merial GmbH
Forene® (Isofluran)	Abbvie Dtl. GmbH & Co. KG
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Serva Electrophoresis GmbH
Glycerol (wasserfrei)	Carl Roth GmbH
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH
Ponceau S	Sigma Aldrich
DTT	Thermo Scientific
SDS	Bio Rad Laboratories
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH
Chloroform	Carl Roth GmbH
TRIZOL™	Invitrogen™
Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml)	ratiopharm GmbH, Ulm
Benzamidin	Carl Roth GmbH
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH
Dimethylsulfonsäureoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Percoll®	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Bio Rad Proteinassay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH
Tris-HCl	Sigma Aldrich
Tris	Carl Roth GmbH
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex II)	Carl Roth GmbH
Polyacrylamid	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH
Tween® 20	Merck KgaA, Darmstadt
Triethanolamin	Carl Roth GmbH
NaCl	AppliChem GmbH
HBSS	GIBCO®
BSA	Serva Electrophoresis GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Trichloressigsäure	Merck KgaA, Darmstadt
L-(+)-Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich
EDTA 2*H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH
D(-)-Mannitol	Merck KgaA, Darmstadt
Sucrose	Serva Electrophoresis GmbH
KCl	Carl Roth GmbH
NaCl 0,9 %	Braun Melsungen AG
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH
EGTA	Sigma Aldrich
Hepes	Sigma Aldrich

MOPS	Carl Roth GmbH
Ethanol 99,8 %	Sigma Aldrich
NaHCO <sub>3</sub>	Merck KgaA, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	Merck KgaA, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KgaA, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH
Ribolock Rnase Inhibitor	Thermo Scientific
Formaldehyd	Sigma Aldrich
Formamid	Carl Roth GmbH
Maxima First Strand DNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase	Thermo Scientific
RedSafe™	iNtRON Biotechnology
Natriumacetat	Carl Roth GmbH
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio Rad Laboratories
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH
“Complete Mini” Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH
ATP-Dinatriumsalz	Sigma Aldrich
Bakterielle Proteinase Typ 24 (Nargase)	Sigma Aldrich
DEPC	Carl Roth GmbH
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
GE Healthcare Amersham™ ECF™ Substrate for Western Blotting	GE Healthcare
Natriumazid	Carl Roth GmbH
Benzamidin	Carl Roth GmbH
Carbogen	Linde Healthcare
Stickstoff	Linde Healthcare
γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP	NEN-DuPont
Koffein	Sigma Aldrich
Phosphorylase b	Sigma Aldrich
Phosphorylase-Kinase	Sigma Aldrich
Okadasäure	ICN Biomedicals
PP1α	Sigma Aldrich
ROTI® Cell RPMI-1640	Carl Roth

## **Materialien**

Tabelle 11: Materialien

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Präparationsbesteck (Pinzette, Schere, Klemme)	Geuder, Deutschland Aesculap, Braun Melsungen
Nitrocellulose Blotting Membran	Amersham™ Protran™, GE Healthcare
Enthaarungscreme	Veet for Men, Reckitt Benckiser Dtl. GmbH
Ultraschallkontaktgel	Caesar & Loretz GmbH
CV-Tronic Elektrodengel	C+V Pharma-Depot GmbH
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Ultra Clear Tubes	Beckman

Sorvall Zentrifugen Tubes	Thermo Fisher Scientific
BD-Microtainer K2E Tubes	Becton Dickinson
Kanüle BD Microfine™ 3	BD-Biosciences, Becton Dickinson
BD Plastipak™ 1 ml Spritzen	Becton Dickinson
Wollenberger Zange	Geuder, Deutschland Aesculap, Braun Melsungen
Rotilabo®-Spritzenfilter 0,2 µm	Carl Roth GmbH
Spritzen Injekt® Solo 20 ml	B. Braun
Bio-Rad Hard-Shell PCR Plates, 96 well, thin-wall	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Rad Micorseal® 'B' seal Seals	Bio-Rad Laboratories GmbH
epT.I.P.S.® Standard, Eppendorf Quality™	Eppendorf AG Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tubes, Eppendorf Quality™	Eppendorf AG Hamburg
Eppendorf Research® Pipetten	Eppendorf AG Hamburg
Dialyseschlauch	Servapor®, Serva

### Puffer und Lösungen

Tabelle 12: Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung

Name	Zusammensetzung
Tyrode-Lösung	119,9 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 22,6 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 1,1 mM MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O; 0,28 mM Ascorbinsäure; 5,05 mM Glucose; 0,05 mM EDTA; 0,42 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O; 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O
SDS-Homogenisationspuffer	10 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 10 % SDS
FACS-Puffer	1 mM EDTA; 1 % BSA; 0,01 % NaN <sub>3</sub> in PBS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-Base; 0,4 % SDS
10x Elektrophoresepuffer	0,4 M Tris-Base; 1,2 M Glycin; 0,4 % SDS
Porziopuffer	0,2 M Tris-Base; 0,6 M Glycin; 0,12 M EDTA Titriplex III; 0,2 % SDS; 10 % Glycerol; 0,4 % Polyacrylamid
Ponceau-Rot	0,2 % Ponceau S; 2 % Trichloressigsäure
10x TBST-Puffer	100 mM Tris-Base; 1500 mM NaCl; 0,1 % Tween® 20; pH 7,4
AP-Puffer	100 mM Triethanolamin; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O; pH 9,4
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O
HBSS/BSA-Puffer	HBSS, 1 % BSA
Homogenisationspuffer	100 mM KCl; 50 mM MOPS; 5 mM MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O; 1 mM EGTA; pH 7,4
Mitochondrienisolationspuffer	250 mM Sucrose; 10 mM Hepes; 1 mM EGTA; pH 7,4

Transferpuffer	40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O; 7,9 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O
4x SDS-PAGE-Probenpuffer	0,25 M Tris-Base; 8 % SDS; 40 % Glycerol; 0,004 % Bromphenolblau; 77 mM DTT; pH 6,8
Extraktionslösung-1	1 M NaOH; 10 mM EDTA
Extraktionslösung-2	2,9 mM Tris-HCl
5x RNA-Ladepuffer	16 µl gesättigte Bromphenolblaulösung; 100 µl 0,5 M EDTA; 800 µl Formaldehyd; 2 ml Glycerol; 3,1 ml Formamid; 4 ml 10X FA- Puffer
DEPC-Wasser	0,1 % DEPC in dH <sub>2</sub> O
10x FA-Puffer	200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; pH 7,0
50x TAE-Puffer	50 mM EDTA; 2 M Tris; mit Essigsäure auf pH 8,4
TE-Puffer	10 mM Tris-Base pH 8,0; 0,25 mM EDTA
Phosphorylase-Kinase-Lösung	20 mM MgCl <sub>2</sub> ; 50 mM Tris; 1 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1 mg BSA; 20 mg Phosphorylase b; 333 IU Phosphorylase-Kinase; 33 mM β- Mercaptoethanol; 1 mM ATP
Dialysepuffer	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,4
Reaktionsansatz für PP-Assay	20 mM Tris; 5 mM Coffein; 0,1 mM EDTA; 0,1 % β-Mercaptoethanol; 25 % [ <sup>32</sup> P]- Phosphorylase a; pH 7.4
M1-Puffer	4 mM EDTA, 0,1 % (V/V) β-Mercaptoethanol

## **Marker**

Tabelle 13: Verwendete Marker

Name	Hersteller
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific

## **Antikörper**

### ➤ Primärantikörper

Tabelle 14: Primärantikörper

Name	Zielprotein	Art.-Nr.	Hersteller
Anti-Calsequestrin antibody	CSQ	ab3516	abcam
Recombinant Anti-PP2A alpha + beta antibody [Y119]	PP2Ac	ab32141	abcam
Purified Mouse Anti-PP5	PP5	611021	BD Biosciences

Troponin I Antibody	Tnl	4002S	Cell Signaling
PP2A-A $\beta$ Antikörper (C-20)	PP2A-A	sc-6113	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SERCA2 ATPase antibody [2A7-A1]	SERCA	ab2861	abcam
Phospholamban (PLN, PLB) mAb (clone A1)	PLB	A010-14	Badrilla
Phospho-Akt (Thr308) (244F9) Rabbit mAb	pAkt	4056S	Cell Signaling
Akt (pan) (40D4) Mouse mAb	Akt	2920S	Cell Signaling
Phospho-Troponin I (Cardiac) (Ser23/24) Antibody	pTnl	4004S	Cell Signaling
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP $\text{\textcircled{R}}$ Rabbit mAb	p-p38	4511S	Cell Signaling
p38 MAPK Antibody	p38	9212S	Cell Signaling
Phospholamban (PLN, PLB) (pSer16) pAb serum	p-Ser16-PLB	A010-12	Badrilla
Citrate synthase Antikörper	CS	sc-390693	Santa Cruz Biotechnology

➤ **Sekundärantikörper**

Tabelle 15: Sekundärantikörper

Name	Hersteller
Anti-rabbit IgG Alkaline Phosphatase antibody	Sigma
Anti-mouse IgG Phosphatase antibody	Sigma
Anti-goat IgG Phosphatase antibody	Sigma

## 7.2 Geräte und Software

### Geräte

Waagen	XS205 DualRange, Mettler Toledo AG, Laboratory & Weighing Technologies, Greifensee, Switzerland Typ PM 300/9, Mettler Toledo AG, Laboratory & Weighing Technologies, Greifensee, Switzerland
Herzultraschall	Vevo 2100, VisualSonics Inc., Canada mit Hochfrequenz- Ultraschallkopf (MS 550D) Sauerstoff konzentriert, Praxair Dtl. GmbH
Elektrophorese	Elektrophorese-Einheit SE 600 Hoefer, San Francisco

	Stromgerät Biometra Standard Power Pack 25, Biometra GmbH, Göttingen
Western Blot	Hoefer TE62 Tank-Transfer-Einheit, Hoefer, San Francisco Stromquelle Biorad Modell 200/2.0, Biorad, München Typhoon™ 9410 Variable Mode Imager, Molecular Dynamics (GE)
Zentrifugen	Centrifuge 5424R mit Rotor FA-45-24-11, Eppendorf, Deutschland Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments, Rotor SM-24 Optima L-100 XP Ultrazentrifuge, Beckmann Coulter, SW 40-Ti VortexGenie2; Scientific Industries
Vorhofpräparation	Verstärker EXP-ST-A4, Measuring Development Engineering Impulsgenerator EXP-MPU, Measuring Development Engineering
Thermoschüttler	Thermomixer 5436, Eppendorf
Photometer	Biophotometer, Eppendorf
PCR	TGradient Thermocycler, Biometra Bio-Rad CFX Connect™ Real-Time PCR Detektion System
Homogenisierung	Mikro-Dismembrator S, Sartorius Bandelin electronic UW 2070 Gewebehomogenisator nach Potter-Elvehjem; Zylinder aus Borosilikatglas, PTFE-Pistillkopf mit Edelstahl-Schaft
Autoklav	Varioklav 25 T, Thermo Scientific

### **Software**

- LabChart 8, ADInstruments
- GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc.
- Vevo 2100 4.1.0, VisualSoncis Inc.
- ImageJ 1.51F
- ImageQuant 5.0, Molecular Dynamics
- AlphaDigiDoc® Gel Dokumentationssystem
- ImageQuant 1D Gel Image Analysis Software
- Bio-Rad CFX Manager™ 3.1
- AxioVision Software, Carl Zeiss Microscopy GmbH

### 7.3 Berechnungen

Wert	Formel
MPI	$(IVCT + IVRT)/ET$
Vcf	FS/ET
EF	$100 * ((LV\ Vol;d - LV\ Vol;s) / LV\ Vol;d)$
FS	$100 * ((LVID;d - LVID;s) / LVID;d)$
LV Vold	$7.0 / (2.4 + LVID;d) * LVID;d$
LV Vols	$7.0 / (2.4 + LVID;s) * LVID;s$

## 7.4 Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind, sind als solche gekennzeichnet.

Die Zeichnungen oder Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen.

Diese Arbeit ist in gegenwärtiger oder anderer Fassung bei keiner anderen Fakultät vorgelegt worden. Außerdem erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Halle (Saale), den 25.08.2022

Mara-Francine Dörner

## 7.5 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Joachim Neumann für die Auswahl des interessanten Themas bedanken. Seine zahlreichen wertvollen Anregungen, fachlichen Ratschläge und stetige Unterstützung verhalfen mir zum Gelingen dieser Arbeit. Vielen Dank für die unzähligen Diskussionen und neuen Erfahrungen, die ich sammeln durfte.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf Benndorf für die Übernahme der naturwissenschaftlichen Betreuung und das entgegengebrachte Interesse dieser Arbeit danken.

Ich danke Herrn Dr. Peter Boknik für die Durchführung der Aktivitätsmessungen und Herrn Prof. Igor Buchwalow für die histologischen Aufnahmen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ulrich Hofmann für die Zelluntersuchungen. Herzlichen Dank an Herrn Dr. Gustavo Ramos und Herrn Dr. Max Rieckmann vom Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III (Kardiologie und Angiologie) des Universitätsklinikums Halle für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des gesamten Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für das stetig freundliche Arbeitsklima und die gegenseitige Unterstützung.

Besonders Herr Dr. Ulrich Gergs stand mir mit seinen hilfreichen Ideen und viel Einsatzbereitschaft jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Vielen Dank an Pia Willmy und Sonja Reber, die mit enormen Engagement das Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt auch Stephanie Simmrodt, mit deren Unterstützung ein optimales Zeitmanagement möglich war.

Vielen Dank auch an Paula Bollmann und Dr. Janine Fröba, die immer ein offenes Ohr hatten.

Der Dank gilt auch meinen Freunden, die mir stets den Rücken gestärkt haben.

Zuletzt danke ich meiner Familie für die langjährige moralische Unterstützung.

## 7.6 Veröffentlichungen

Dörner MF, Boknik P, Köpp F, Buchwalow IB, Neumann J, Gergs U. Mechanisms of Systolic Cardiac Dysfunction in PP2A, PP5 and PP2AxPP5 Double Transgenic Mice. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9448. Published 2021 Aug 31. doi:10.3390/ijms22179448

### Konferenzbeiträge / Abstracts:

M. Dörner, U. Gergs, J. Neumann (2018) Influence of aging on cardiac hypoxia in PP2A overexpressing mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 391 (Suppl 1): 30 (Poster)

M. Dörner, U. Gergs, J. Neumann (2019) Cardiac function in young and old PP2AxPP5 overexpressing mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 392 (Suppl 1): 41 (Poster)

M. Dörner, F. Köpp, U. Gergs, J. Neumann (2019) Cardiac regulation and systolic function of PP2A and PP5 in PP2AxPP5 double-transgenic mice. *Clin Res Cardiol* 108 (Suppl 1): P1241 (Poster)

F. Köpp, M. Dörner, J. Runte, U. Gergs, J. Neumann (2018) Mechanisms of cardiac hypertrophy in PP2AxPP5 double transgenic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 391 (Suppl 1): 29 (Poster)

J. Neumann, F. Köpp, M. Dörner, U. Gergs (2019) Cardiac dysfunction in mice overexpressing both PP2A and PP5. *Europhosphatase From Molecular Mechanisms to System-wide Responses* 96: P27 (Poster)

## 7.7 Lebenslauf

### Mara-Francine Dörner

#### Persönliche Daten

---

Geburtsdatum 02.05.1991  
Geburtsort Leipzig

#### Berufliche Tätigkeiten

---

seit 10/2019 Projektleiterin, Analytische Entwicklung  
mibe GmbH Arzneimittel, Brehna  
10/2016 – 10/2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische  
Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
07/2018 – 09/2019 Apothekerin, Apotheke im HEP, Halle (Saale)  
07/2016 – 06/2018 Apothekerin, Balthasar-Apotheke, Leipzig

#### Studium

---

07/2016 Approbation  
Abschluss: Apothekerin  
11/2015 – 04/2016 Zweiter Teil des Praktischen Jahres, Balthasar-Apotheke,  
Leipzig  
10/2014 – 08/2015 Diplomarbeit, Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie,  
Universität Leipzig  
Thema „Untersuchungen zur Zusammensetzung und  
Biosynthese methylierter Sekundärstoffe der Kannenflüssigkeit  
aus *Nepenthes* spp.“  
Abschluss: Dipl.-Pharmazeutin  
10/2010 – 09/2014 Studium der Pharmazie (Staatsexamen), Universität Leipzig;  
Abschluss: 2. Staatsexamen

#### Schulausbildung

---

03/2006 - 06/2010 Sportgymnasium Leipzig - Eliteschule des Sports  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
08/2001 – 02/2006 Gymnasium Brandis