

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Urocortin 2

Aktivierte Signalwege in isolierten Kaninchen-Ventrikelmyozyten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Susanne Renz

aus

Worms

Göttingen 2011

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. J. Kockskämper
2. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. T. Meyer
3. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
Tag der mündlichen Prüfung:	31.07.2012

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	11
1. Einleitung	12
1.1. Herzinsuffizienz	12
1.2. Kompensationsmechanismen bei Herzinsuffizienz.....	13
1.2.1. Das sympathische Nervensystem	13
1.2.2. Das Renin-Angiotensin-System (RAS).....	14
1.2.3. Das Endothelin-System	14
1.2.4. Die natriuretischen Peptide	15
1.3. Neue Ansätze zur Behandlung der Herzinsuffizienz	15
1.4. Das kardiale Urocortin-System	15
1.4.1. CRF-Rezeptoren	16
1.4.2. Expression der Urocortine	16
1.4.3. Kardiovaskuläre Wirkungen der Urocortine.....	16
1.4.4. Kardiovaskuläre Wirkungen der Urocortine bei Ischämie/Reperfusion.....	17
1.4.5. Kardiovaskuläre Wirkungen der Urocortine bei Herzinsuffizienz	17
1.4.6. Zelluläre Mechanismen der Urocortine am Herzen.....	18
1.4.6.1. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	18
1.4.6.1.1. Urocortine aktivieren die P44/42-MAPK.....	19
1.4.6.2. Urocortine aktivieren den PI3K/Akt/eNOS-Signalweg.....	19
1.4.6.3. NO-Synthasen (NOS).....	20
1.4.6.3.1. Die Aktivierung und Regulation der eNOS.....	20
1.4.6.3.2. Allgemeine Wirkungen der NO	21
1.4.6.3.3. Kardiomyozytäre Wirkungen der NO	21
1.4.6.3.4. NO und die elektromechanische Kopplung.....	21
1.4.6.3.5. Die kardioprotektive Rolle der eNOS	22
1.4.6.4. Urocortine aktivieren den AC/cAMP/PKA-Signalweg und erhöhen den [Ca ²⁺] _i - Transienten.....	22
1.4.6.4.1. PLB	23
1.4.6.4.2. Regulation der PLB-Expression	23

1.4.6.4.3. Regulierung der PLB-Phosphorylierung.....	23
1.5. Proteinphosphatasen.....	24
1.5.1. PP1 und PP2A.....	24
1.5.2. Calcineurin (PP2B).....	25
1.6. Signaltransduktionswege der CRF₂-R in Kardiomyozyten	26
1.7. Ziele der Arbeit	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Materialien, alphabetisch.....	28
2.1.1. Chemikalien.....	28
2.1.2. Markerproteine, Kits	29
2.1.3. Antikörper	29
2.1.4. Technische Geräte	30
2.2. Isolierung von Kaninchen-Kardiomyozyten	30
2.2.1. Lösungen für die Zellisolierung.....	31
2.2.1.1. HEPES-gepufferte Tyrodelösung.....	31
2.2.1.2. Enzymlösung	31
2.2.1.3. Stopplösung.....	32
2.2.1.4. Lösungen zum Waschen und Kalziumaufbau.....	32
2.2.1.5. Nährlösung	33
2.2.2. Kardiomyozyten-Isolierung	33
2.2.3. Laminieren und Ausplattieren der isolierten Kardiomyozyten.....	34
2.2.4. Pharmaka	34
2.2.4.1. Urocortin 2 (Ucn 2).....	34
2.2.4.2. Forskolin	34
2.2.4.3. Okadasäure.....	34
2.2.4.4. Cyclosporin A, <i>Tolypocladium inflatum</i>	35
2.2.4.5. Übersicht der verwendeten Pharmaka und deren Konzentrationen	35
2.3. Messprotokolle an isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten	35
2.3.1. Ucn 2-Messprotokoll.....	35
2.3.2. Forskolin-Messprotokoll	35
2.3.3. Messprotokoll von Okadasäure mit und ohne Ucn 2	36

2.3.4. Messprotokoll von Cyclosporin A mit und ohne Ucn 2	36
2.4. Ernten der Kaninchen-Kardiomyozyten	36
2.5. Proteinkonzentrationsbestimmung	37
2.6. SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese	37
2.6.1. Auswahl und Herstellung der SDS-Polyakrylamid-Gele	37
2.6.2. Probenvorbereitung	38
2.6.3. Gelbeladung und Gelelektrophorese	40
2.7. Proteintransfer auf die Nitrozellulose-Membran – Blotten.....	40
2.8. Färben und Blocken der Membran	40
2.9. Immunodetektion.....	41
2.10. Auswertung der Western-Immunoblots	43
2.11. Statistische Auswertung.....	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Western-Blot-Untersuchungen zur Ucn-2-vermittelten Phosphorylierung von Akt, eNOS, p44/42-MAPK und PLB.....	44
3.1.1. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von p44/42-MAPK nach Ucn-2-Gabe.....	44
3.1.2. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von Akt am Thr-308 nach Ucn-2-Gabe	46
3.1.4. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von eNOS am Ser-1177 nach Ucn-2-Gabe	48
3.1.5. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von PLB am Ser-16 nach Ucn-2-Gabe.....	49
3.1.6. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von PLB am Thr-17 nach Ucn-2-Gabe.....	51
3.2. Western-Blot-Untersuchungen zur FSK-vermittelten Phosphorylierung von Akt, eNOS, p44/42-MAPK und PLB.....	52
3.2.1. Phosphorylierung von p44/42-MAPK nach FSK-Gabe	52
3.2.2. Phosphorylierung von Akt am Ser-473 nach FSK-Gabe.....	53
3.2.3. Phosphorylierung von eNOS am Ser-1177 nach FSK-Gabe	54
3.2.4. Phosphorylierung von PLB am Ser-16 nach FSK-Gabe	55
3.2.5. Phosphorylierung von PLB am Thr-17 nach FSK-Gabe	56
3.3. Western-Blot-Untersuchungen zur Änderung der Ucn-2-vermittelten Phosphorylierung von PLB nach OA- und CsA-Gabe	57
3.3.1. Wirkung von OA und CsA auf die Ucn-2-induzierte PLB-Phosphorylierung am Ser-16.....	57
3.3.2. Wirkung von OA und CsA auf die Ucn-2-induzierte PLB-Phosphorylierung am Thr-17	58

4. Diskussion	60
4.1. Signalwege.....	60
4.1.1. Der PI3K/Akt/eNOS-Signalweg	60
4.1.1.1. Hemmstoffe des PI3K/Akt/eNOS-Signalweges.....	61
4.1.1.2. Vergleich von Substanzen, die den PI3K/Akt/eNOS-Signalweg aktivieren	61
4.1.2. Der cAMP/PKA-Signalweg	62
4.1.3. Der Ca ²⁺ -Calmodulin/CaMKII-Signalweg	63
4.1.4. Der MEK1/2-p44/42-MAPK-Signalweg	63
4.2. Interaktionen der Signalwege	64
4.2.1. Der cAMP/PKA- und der Akt/eNOS-Signalweg	64
4.2.2. Der MEK1/2-p44/42-MAPK- und der Akt/eNOS-Signalweg.....	65
4.2.3. Der MEK1/2-p44/42-MAPK- und der cAMP/PKA-Signalweg	66
4.2.4. Der cAMP/PKA- und der Ca ²⁺ /Calmodulin-CaMKII-Signalweg	66
4.2.5. Der PI3K/Akt- und der Ca ²⁺ /Calmodulin/CaMKII-Signalweg	67
4.3. Die Signalweginaktivierung.....	67
4.3.1. Mögliche Mechanismen für den zeitabhängigen Rückgang der Ucn-2-vermittelten p44/42-MAPK-Phosphorylierung.....	68
4.4. Phosphatasen	69
4.4.1. Okadasäure-sensitive Phosphatasen dephosphorylieren PLB	69
4.4.2. Eine cAMP-Erhöhung erhöht die PP2A-Aktivität.....	69
4.4.3. Cyclosporin-A-sensitive Phosphatasen haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von PLB	70
4.5. Physiologische Bedeutung von Ucn 2	70
5. Zusammenfassung	73
6. Literaturverzeichnis.....	75

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Akt	Proteinkinase B (PKB)
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
AT-R	Angiotensin-Rezeptor
β -AR	β -Adrenorezeptor
BNP	natriuretisches Peptid (B-Typ)
Ca^{2+}	Kalzium
CaMKII	Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	natriuretisches Peptid (C-Typ)
CRF	Corticotropin-Releasing-Faktor
CRF-R	Corticotropin-Releasing-Faktor-Rezeptor
CsA	Cyclosporin A
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
eNOS	endotheliale NO-Synthase (NOS 3)
ERK 1/2	extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (p44/42-MAPK)
ET-1	Endothelin-1
ET-R	Endothelin-Rezeptor
FSK	Forskolin

G _i -Protein	inhibierendes Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
G _s -Protein	stimulierendes Guaninnukleotid-bindendes Protein
iNOS	induzierbare NO-Synthase (NOS 2)
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK 1/2	MAPK-Kinase 1/2
MKK	MAP-Kinase-Kinase
MKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
nNOS	neuronale NO-Synthase (NOS 1)
NO	Stickstoffmonoxid
NT-pro-BNP	N-terminales pro-BNP
NYHA I-IV	New York Heart Association Stadium I – IV
OA	Ocadiac acid, Okadasäure
p44/42-MAPK	44-kDa-(ERK1) und 42-kDa-(ERK-2)-Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PDE	Phosphodiesterase
PDK1	PtdIns(3,4,5)P ₃ -dependent Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G

Abkürzungsverzeichnis

PLB	Phospholamban
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP2B	Calcineurin
Raf	MKKK der p44/42-MAPK
Ras	G-Protein
RAS	Renin-Angiotensin-System
RyR	Ryanodinrezeptor
SERCA2a	Sarkoplasmatische/endoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Ucn (1, 2, 3)	Urocortin (1, 2, 3)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1. Signaltransduktionswege der CRF ₂ -R in Kardiomyozyten	26
Abb. 3.1. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten p44/42-MAPK-Phosphorylierung.....	44
Abb. 3.2. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten Akt-Phosphorylierung am Threonin-308.....	46
Abb. 3.3. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten eNOS-Phosphorylierung am Serin-1177	48
Abb. 3.4. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten PLB-Phosphorylierung am Serin-16.....	49
Abb. 3.5. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten PLB-Phosphorylierung am Threonin-17	51
Abb. 3.6. p44/42-MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von FSK.....	52
Abb. 3.7. Akt-Phosphorylierung am Serin-473 in Gegenwart von FSK	53
Abb. 3.8. eNOS-Phosphorylierung am Serin-1177 in Gegenwart von FSK.....	54
Abb. 3.9. PLB-Phosphorylierung am Serin-16 in Gegenwart von FSK.....	55
Abb. 3.10. PLB-Phosphorylierung am Threonin-17 in Gegenwart von FSK.....	56
Abb. 3.11. Einfluss von OA und CsA auf die Ucn-2-vermittelte PLB-Phosphorylierung am Ser-16	57
Abb. 3.12. Einfluss von OA und CsA auf die Ucn-2-vermittelte PLB-Phosphorylierung am Thr-17	58
Abb. 4.1. Schematische Darstellung der Ucn-2-induzierten Signalkaskaden im Kardiomyozyten	70

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1. HEPES-gepufferte Tyrodelösung.....	31
Tab. 2.2. Enzymlösung.....	31
Tab. 2.3. Stopplösung	32
Tab. 2.4. Nährlösung	33
Tab. 2.5. Pharmaka und deren Konzentrationen	35
Tab. 2.6. Homogenisierungspuffer	36
Tab. 2.7. Proteine und deren Massen	39
Tab. 2.8. Phospho-Antikörper und verwendete Verdünnungen	41
Tab. 2.9. Antikörper und Verdünnungen	42

1. Einleitung

1.1. Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz betrifft 1-2% der erwachsenen Bevölkerung und ist eine der häufigsten Todesursachen in Industrieländern (McMurray und Pfeffer 2005). Die Inzidenz und Prävalenz sind altersabhängig und steigen mit zunehmendem Lebensalter stark an. So sind im Alter zwischen 45-55 Jahren weniger als 1% davon betroffen, zwischen 65-75 Jahren bereits 2-5% und bei den über 80-Jährigen sind es fast 10% (Hoppe und Erdmann 2001). Das Risiko, in seinem Leben eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, beträgt ca. 20% (Lloyd-Jones et al. 2002). Als Herzinsuffizienz wird eine Funktionsstörung des Herzens bezeichnet, welche zu einer Minderperfusion der Organe führt. Unter ihr versteht man ein klinisches Syndrom, das verschiedene kardiale und extrakardiale Ursachen haben kann. In etwa 50% der Fälle ist die Herzinsuffizienz bedingt durch eine Muskelhypertonie, die zur koronaren Herzkrankheit und anschließend zum Myokardinfarkt führt. Weitere kardiale Ursachen sind Myokarditiden, dilatative, ischämische, hypertroph-obstruktive und restriktive Kardiomyopathien und Herzklappenfehler. Bei den extrakardialen Ursachen ist z. B. die pulmonal-arterielle Hypertonie zu nennen. Im Vordergrund bei einer Herzinsuffizienz stehen folgende Symptome: verminderte Leistungsfähigkeit, Dyspnoe bis hin zur Orthopnoe mit Lungenödem und Stauungszeichen (Ödeme). Zusätzlich besteht meist eine Kardiomegalie (Hoppe und Erdmann 2001) und eine sympathikotone Überaktivität, welche Tachykardie und Herzrhythmusstörungen bedingt. Eingeteilt wird die Herzinsuffizienz in die Stadien I bis IV der New York Heart Association (NYHA), wobei NYHA I einer subjektiven Beschwerdefreiheit entspricht und NYHA IV Beschwerden in Ruhe. Um der chronischen mechanischen Druck- und/oder Volumenüberlast des Herzens entgegenzuwirken, werden kompensatorische Prozesse in Gang gesetzt, die die kardiale Kontraktilität und somit die kardiale Auswurfleistung steigern. Hierzu zählen das sympathische Nervensystem sowie lokale Peptidsysteme wie das Renin-Angiotensin-System (RAS), das Endothelinsystem und die natriuretischen Peptide. Anfangs zeigen die Aktivierung dieser Systeme, insbesondere der gesteigerte Sympathikotonus, das Endothelinsystem und das RAS, die gewünschte förderliche Wirkung (Francis et al. 1993). Langfristig kommt es aber zu einer Fehlanpassung des Herzens in Form einer verminderten β -adrenergen Ansprechbarkeit, maladaptiver Hypertrophie und Fibrose, welche in einer manifesten Herzinsuffizienz münden. Deshalb bildet die Behandlung mit β -Rezeptorblockern und Angiotensin-Konversions-Enzym(ACE)-Hemmern oder AT_1 -Rezeptor (AT_1R)-Antagonisten eine tragende Säule in der Herzinsuffizienztherapie. Der Einsatz von ACE-Inhibitoren (Swedberg et al. 1987, CONSENSUS-Studie), AT_1 -Rezeptor-Antagonisten (Granger CB et al. 2003, CHARM-Alternative) und β -Blockern (MERIT-HF Study Group 1999, MERIT-HF-Studie) verbessert das Überleben der herzinsuffizienten Patienten. Trotz dieser Verbesserung besteht noch viel Forschungs- und Handlungsbedarf in der Herzinsuffizienztherapie, da in Zukunft durch die immer älter werdende Bevölkerung auch immer mehr Menschen eine Herzinsuffizienz entwickeln werden. Außerdem ist die Prognose der Herzinsuffizienz nach wie vor sehr schlecht, da nach Diagnosedstellung 30-40% der Patienten innerhalb des ersten Jahres und 60-70% innerhalb von 5 Jahren versterben (McMurray und Pfeffer 2005). In der

Todesursachenstatistik Deutschlands des statistischen Bundesamtes von 2010 liegen Herz-/Kreislaufkrankungen auf Platz eins noch vor Krebserkrankungen wie Brust-, Lungen- oder Darmkrebs (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2007).

1.2. Kompensationsmechanismen bei Herzinsuffizienz

Zu den Kompensationsmechanismen des Herzens bei einer Anpassung an eine erhöhte Last zählt der Frank-Starling-Mechanismus, der bei Herzmuskeldehnung zu einer sofortigen Steigerung der Kontraktilität führt. Um einer dauerhaften Druck- und/oder Volumenüberlast des Herzens gerecht zu werden, werden das sympathische Nervensystem sowie die lokalen Peptidsysteme als Kompensationsmechanismen aktiviert. Im Folgenden wird genauer auf das sympathische Nervensystem und die lokalen Peptidsysteme eingegangen.

1.2.1. Das sympathische Nervensystem

Die Aktivität des sympathischen Nervensystems ist bei Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz gesteigert (Cohn et al. 1984). Eine gesteigerte Sympathikusaktivität zeigt sich bereits bei Patienten mit milder oder asymptomatischer Herzinsuffizienz (Francis et al. 1990). Plasmakatecholaminspiegel korrelieren dabei sowohl mit dem Schweregrad als auch der Prognose der Erkrankung (Cohn et al. 1984). Der sympathische Transmitter, das Katecholamin Noradrenalin, stimuliert β -Rezeptoren im Herzen, die zu positiv-inotropen und positiv-chronotropen Effekten führen. Jedoch kommt es bei chronischer Stimulation zu einer Desensibilisierung und Reduktion der myokardialen Rezeptordichte, v. a. der β_1 -Rezeptoren. Somit besteht bei einer Herzinsuffizienz eine „Katecholaminrefraktärität“, so dass bei Belastung die benötigte Herzauswurfleistung nicht mehr ausreichend gesteigert werden kann. Die Reduktion der Rezeptoren lässt sich durch einen β_1 -selektiven Antagonisten aufheben, was eine mögliche Erklärung für die Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion und Katecholaminsensitivität bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist, die mit β -Blockern behandelt werden (Flesch et al. 1999). Zusätzlich wurde als Grund für die Desensibilisierung der myokardialen β -Rezeptoren ein Signaltransduktionsdefekt erkannt. Dieser besteht einerseits in der vermehrten β -Rezeptor-Phosphorylierung nach Ligandenbindung, was zur Abkopplung des G_s -Proteins führt, und andererseits in der vermehrten Expression des antagonistisch wirkenden G_i -Proteins (Feldman et al. 1988). In der Summe wird dadurch die Bildung des Botenstoffes cAMP reduziert, was sich negativ auf die durch die β -Rezeptoren hervorgerufene Kontraktilitätssteigerung auswirkt, die weitgehend cAMP-abhängig ist.

1.2.2. Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

Das RAS wird u.a. durch mechanische Herzüberlastung aktiviert. Es besteht aus in der Leber synthetisiertem Angiotensinogen, das von aus der Niere stammendem Renin in Angiotensin I umgewandelt wird. Mit Hilfe des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE) aus dem Gefäßendothel wird Angiotensin I anschließend in Angiotensin II überführt. Zudem können Kardiomyozyten als Antwort auf mechanische Last (Dehnung) selbst Angiotensin II freisetzen (Sadoshima et al. 1993). Angiotensin II bindet sowohl an AT₁- (AT₁R) als auch an AT₂-Rezeptoren (AT₂R). Der AT₁R ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der u.a. zur Phospholipase-C-Aktivierung und intrazellulärer Ca²⁺-Freisetzung führt, wohingegen der AT₂R eine Aktivierung von Tyrosin- oder Serin/Threonin-Proteinphosphatasen bewirkt (Ichiki et al. 1995). AT₁-Rezeptoren im insuffizienten Herzen bewirken neben einer verstärkten Noradrenalinfreisetzung und einer Vasokonstriktion eine myokardiale Apoptose, eine Myokardfibrose und die Induktion einer maladaptiven Hypertrophie. Diese Wirkungen stellen eine Fehlanpassung dar. Die Verhinderung der Angiotensin-II-Bildung und/oder -Wirkung durch ACE-Hemmer und AT₁-Antagonisten ist daher eines der Hauptprinzipien in der Basistherapie der Herzinsuffizienz.

1.2.3. Das Endothelin-System

Herzinsuffiziente Patienten haben bei erhöhtem Endothelin-1(ET-1)-Plasmaspiegel eine schlechtere Prognose als Patienten mit niedrigen oder normalen ET-1-Plasmaspiegeln (Pousset et al. 1997, Hülsman et al. 1998). Ursachen für den erhöhten ET-1-Plasmaspiegel können eine RAS-Aktivierung, Hypoxie, Ischämie und Zytokine sein. ET-1 wirkt über ET_A- und ET_B-Rezeptoren und führt zu einer Myokardhypertrophie und -fibrose, sowie zu einer Vasokonstriktion u.a. auch der Koronargefäße. Die Gabe von unselektiven ET-Rezeptor-Antagonisten zeigte nicht den erhofften Behandlungserfolg in der Herzinsuffizienztherapie. Heute wird der duale ET_A/ET_B-Antagonist Bosentan für die Therapie von pulmonalerterieller Hypertonie empfohlen, da das pulmonale Endothelin-System eine Schlüsselrolle für die Pathogenese dieser Erkrankung spielt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl im Plasma als auch im Lungengewebe von Patienten mit pulmonalerterieller Hypertonie die ET-1-Werte erhöht sind (Stewart et al. 1991, Giaid et al. 1993). Verabreichte man diesen Patienten ET-1-Antagonisten, so zeigte sich eine Verbesserung der körperlichen Belastbarkeit, der pulmonalen Funktion, der Hämodynamik, diagnostischer Parameter (Echokardiographie, Doppler) und der Zeit bis zur klinischen Verschlechterung (Galie et al. 2003, Channick et al. 2001, Rubin et al. 2002). Daher wird in den ESC-Leitlinien für pulmonalerterielle Hypertonie ab Stadium NYHA III Bosentan als Medikation empfohlen.

1.2.4. Die natriuretischen Peptide

Zu den natriuretischen Peptiden gehören das Atriale Natriuretische Peptid (ANP), das Natriuretische Peptid des B-Typs (BNP) und das Natriuretische Peptid des C-Typs (CNP). Alle drei Peptide werden als Prohormone synthetisiert. Stimuli für die Produktion und Sekretion von ANP im Vorhofmyokard und BNP im Ventrikelmuskel sind eine gesteigerte Volumen- und Druckbelastung des Herzens, sowie Tachykardie, Glukokortikoide, Schilddrüsenhormone, Endothelin und Angiotensin II. Alle natriuretischen Peptidrezeptoren werden u.a. im kardiovaskulären, renalen und zerebralen Gewebe exprimiert (Maack 2006). ANP und BNP binden vorwiegend an den NP_A-R (natriuretischer Peptid-Rezeptor Typ A), was zu Natriurese, Diurese, Vasodilatation, Unterdrückung des RAS, antihypertrophen Effekten und einer Steigerung der Koronardurchblutung führt. Versuche mit NP_A-R-defizienten Mäusen zeigten, dass diese vermehrt Hypertonus, kardiale Hypertrophie und Fibrose aufwiesen (Vanderheyden et al. 2004, Maack 2006). Das derzeit klinisch bedeutendste natriuretische Peptid ist das BNP und dessen Fragment, das NT-pro-BNP. NT-pro-BNP ist von besonderer diagnostischer und prognostischer Relevanz bei Herzinsuffizienz (Maisel et al. 2002, Val-HeFT-Studie (Valsartan in Heart Failure Trial)). Hohe NT-pro-BNP-Spiegel gehen mit einer schlechten Prognose einher. Umgekehrt haben Patienten, die auf eine Behandlung mit Valsartan, einem AT₁-R-Antagonisten, mit einer deutlichen Reduktion der BNP-Spiegel antworten, eine wesentlich günstigere Prognose als solche, bei denen die BNP-Spiegel nicht zurückgingen (Latini et al. 2002).

1.3. Neue Ansätze zur Behandlung der Herzinsuffizienz

Die Prognose der Herzinsuffizienz ist trotz Therapieerfolgen mit z.B. ACE-Inhibitoren/AT₁-R-Antagonisten und β -Rezeptorblockern nach wie vor sehr schlecht. Nach Diagnosestellung versterben 30-40% der Patienten innerhalb des ersten Jahres und 60-70% innerhalb von 5 Jahren (McMurray und Pfeffer 2005). Vielversprechende Ansätze für weitere Therapieoptionen bietet momentan neben anderen neurohumoralen Systemen das Urocortin-System.

1.4. Das kardiale Urocortin-System

Die Urocortine gehören zur Familie der Corticotropin-Freisetzungsfaktoren (Corticotropin-Releasing-Faktor, CRF). Der CRF ist ein 41 Aminosäuren langes Peptid, das eine wichtige Rolle in der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse spielt und als Antwort des Körpers auf Stress gilt (Vale et al. 1981, Koob und Heinrichs 1999). Die Urocortine sind Analoga des CRF und untergliedern sich in das Urocortin 1 (Ucn 1), das Urocortin 2 (Ucn 2) und das Urocortin 3 (Ucn 3).

1.4.1. CRF-Rezeptoren

Es sind zwei Isoformen des CRF-Rezeptors (CRF-R) im Menschen bekannt, der CRF₁- (CRF₁-R) und der CRF₂-Rezeptor (CRF₂-R). Sie gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen aus sieben Transmembrandomänen. Der CRF₁-R findet sich v.a. im zentralen und peripheren Nervensystem (Vita et al. 1993, Palchadhuri et al. 1998, Nappi und Rivest, 1995) und in sehr geringer Zahl auch im menschlichen Herzen (Kimura et al. 2002). Der CRF₂-R lässt sich in die Splicevarianten CRF₂(a)-R, den CRF₂(b)-R und den CRF₂(c)-R unterteilen (Spiess et al. 1998). Der humane CRF₂(a)-R wird sowohl in peripheren Organen als auch im ZNS, der CRF₂(b)-R hauptsächlich im Gehirn exprimiert (Valdenaire et al. 1997, Kostich et al. 1998, Perrin und Vale 1999). Im humanen Herzen wird der CRF₂(a)-R in allen vier Kammern und der CRF₂(b)-R hauptsächlich im linken Atrium exprimiert (Kimura et al. 2002). Die Rezeptoren finden sich vor allem in den Koronarien, intramyokardialen Gefäßen sowie in den Kardiomyozyten (Wiley und Davenport 2004). Alle CRF-R koppeln an das G_s-Protein und stimulieren die Adenylatzyklase, welche wiederum den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht (Brar et al. 2004). Daneben werden weitere Signalkaskaden aktiviert (s.u.).

1.4.2. Expression der Urocortine

Die Ucn-Isoformen unterscheiden sich in der Zusammensetzung und Anzahl der Aminosäuren. Ucn 1 und Ucn 2 werden im kardiovaskulären System, aber auch in Nebenniere, Plazenta, Endometrium, im Immunsystem und im Verdauungsapparat exprimiert (Fekete und Zorilla 2007). Ucn-3-Expression findet vorwiegend in Hirn, Verdauungsapparat, Herz- und Muskelgewebe statt (Hsu und Hsueh 2001, Lewis et al. 2001). Ucn 1 bindet mit hoher Affinität an beide CRF-Rezeptor-Isoformen, während Ucn 2 und Ucn 3 als CRF₂-R-selektiv betrachtet werden (Fekete und Zorilla 2007).

1.4.3. Kardiovaskuläre Wirkungen der Urocortine

Urocortine führen im gesunden Schaf *in vivo* zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks, des koronaren Blutflusses, der Herzfrequenz (positiv-chronotroper Effekt) sowie der kardialen Kontraktilität (positiv-inotroper Effekt) und somit zu einem erhöhten Herzzeitvolumen (Parkes et al. 1997). Ucn 2 kann auch neurohumorale und renale Effekte hervorrufen (Davis et al. 2007a). Unter dem Einfluss von Ucn 2 und Ucn 3 konnte man einen deutlich erniedrigten Plasmaspiegel dieser Hormone (ET-1, RAS, ANP und Adrenalin) nachweisen (Rademaker et al. 2005, Rademaker et al. 2006). Unter Einfluss von Ucn 2 zeigten sich natriuretische und diuretische Effekte kombiniert mit einem Anstieg der Kreatinin-Clearance (Rademaker et al. 2005). Dies würde eine Vorlastsenkung für das Herz sowie eine Verbesserung der Ausscheidungsfunktion der Nieren bedeuten. Am gesunden Menschen konnte im Gegensatz dazu bei hoher Ucn-2-Konzentration eine Steigerung der neurohumoralen Hormone und renal eine Verringerung der Natrium-Kaliumausscheidung, der Kreatinin-Clearance und des Urinvolumens beobachtet werden. Jedoch ist nicht geklärt, ob dies Effekte einer direkten Beeinflussung durch Ucn 2 sind oder auch durch z.B. einen erniedrigten Perfusionsdruck der Nieren

bedingt sein könnten (Davis et al. 2007a). Die kardiale Wirkung der Urocortine wird vorwiegend über den CRF₂-R vermittelt. Indirekte Wirkungen über das autonome Nervensystem und β -Rezeptor-induzierte Effekte konnten ausgeschlossen werden (Parkes und May 2000, Bale et al. 2004). Weiterhin werden im Herzen hauptsächlich CRF₂-R exprimiert (Kimura et al. 2002). In CRF₂-R-Knockout-Mäusen zeigte Urocortin keine kardiale Wirkung (Bale et al. 2004). Weiterhin steigert Ucn 1 die Ausschüttung der kardioprotektiv wirksamen natriuretischen Peptide während Hypoxie und Ischämie und verhindert damit indirekt den Untergang von Kardiomyozyten (Ikeda et al. 1998, Parkes und May 2000, Ng et al. 2004).

1.4.4. Kardiovaskuläre Wirkungen der Urocortine bei Ischämie/Reperfusion

Die kardioprotektive Wirkung der Urocortine v.a. bei Ischämie und Reperfusion stellte den Gegenstand mehrerer Studien dar. Die Behandlung von isolierten neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten in vitro mit Urocortinen führte zu einem Schutz vor einer Ischämie-/Reperfusionsverletzung (Townsend et al. 2007, Okosi et al. 1998, Brar et al. 2004). Direkte kardioprotektive Effekte werden möglicherweise über die Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) vermittelt, wobei Ucn zuerst den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, welcher dann über die p44/42-MAPK-Aktivierung das Absterben von Kardiomyozyten verhindert (Brar et al. 2000, Brar et al. 2002). Auch die Aktivitätshemmung freier Radikale bei Ischämie-/Reperfusionsverletzungen durch Ucn war kardioprotektiv (Liu CN et al. 2005). Das CRF-R-unselektive Ucn 1 bewirkte jedoch zusätzlich über die zentrale Aktivierung der CRF₁-R eine Hypothalamus-Hypophysen-Achsen-Aktivierung, die über eine ACTH-Ausschüttung den Kortisolspiegel erhöhte, welcher zu dem nachteiligen Effekt eines erhöhten Blutdruckes führte (Turnbull et al. 1999, Traustadottir et al. 2003, Koertge et al. 2002, Whitworth 1992). Daher sind die CRF₂-R-selektiven Urocortine Ucn 2 und Ucn 3 besser geeignet, da sie über den CRF₂-R vorwiegend am Herzen wirken.

1.4.5. Kardiovaskuläre Wirkungen der Urocortine bei Herzinsuffizienz

Die kardioprotektiven Effekte des Urocortinsystems sind sehr vielversprechend und lassen auf neue Möglichkeiten in der Diagnose, Prognose und Therapie der Herzinsuffizienz hoffen, weshalb das Urocortinsystem zurzeit Gegenstand vieler Studien ist. Herzinsuffizienzpatienten und Myokardinfarktpatienten zeigen deutlich erhöhte Ucn-Plasmaspiegel (Ng et al. 2004, Wright et al. 2009, Knight et al. 2008). Dies deutet auf eine unabhängige Voraussagekraft des Urocortins für Herzinsuffizienz hin, insbesondere in Kombination mit BNP. Es wurde hierbei beobachtet, dass der Plasmaurocortinspiegel mit der Schwere der Herzinsuffizienz (NYHA I – IV) anstieg und die LVEF sich verringerte. Es ließ sich weiterhin eine Geschlechts-, aber keine Altersabhängigkeit der Ucn-Spiegel erkennen (Wright et al. 2009). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten Ng et al. den höchsten Ucn-Plasmaspiegel in NYHA-Stadium I und II, eine inverse Korrelation zwischen LVEF und Ucn-Plasmaspiegel und zwischen Patientenalter und Ucn-

Plasmaspiegel (Ng et al. 2004). Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse ist noch viel Forschungsarbeit zu leisten, um Abhängigkeiten der Ucn-Plasmaspiegelhöhe sowie eventuelle Störgrößen besser einschätzen zu können und somit den prognostischen Wert von Ucn zu erhöhen. Die CRF₂-R-Expression war bei humanem Herzversagen (DCM) unverändert (Wiley und Davenport 2004). Im Herzinsuffizienz-Modell konnten verschiedenste kardiovaskuläre Effekte nachgewiesen werden. Hierzu gehören die dramatische Verbesserung der kardialen Auswurfleistung und der LVEF, die Senkung des peripheren Widerstandes, die Verringerung des arteriellen Mitteldruckes, die Verbesserung der renalen Funktion und die Suppression der schädlichen neurohumoralen Aktivierung. Dies wurde sowohl für Ucn 1, Ucn 2 und Ucn3 in Schafen mit Tachykardie-induziertem Herzversagen nachgewiesen (Rademaker et al. 2002, Rademaker et al. 2005, Rademaker et al. 2006). Basierend auf den vielversprechenden Effekten in Tiermodellen wurde 2007 erstmals eine Studie an Herzinsuffizienzpatienten *in vivo* durchgeführt. Dabei wurden acht männlichen Herzinsuffizienzpatienten (NYHA II-III) für eine Stunde eine Ucn-2-Infusion verabreicht, woraufhin man einen signifikanten Anstieg der Herzauswurfleistung und der LVEF, sowie eine Abnahme des arteriellen Blutdrucks, des systemischen Gefäßwiderstandes als auch der kardialen Arbeit beobachtet. Renal wurde eine Senkung des Urinvolumens und der Natriumausscheidung festgestellt. Eine neurohumorale Aktivierung konnte nicht beobachtet werden (Davis et al. 2007b). Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu den Wirkungen des Ucn 2 in gesunden Probanden dar, da bei gleicher Versuchsdurchführung dort diuretische und natriuretische Effekte und bei hoher Dosierung eine Aktivierung von Renin, Angiotensin II und Noradrenalin erkennbar waren (Davis et al. 2007a).

1.4.6. Zelluläre Mechanismen der Urocortine am Herzen

Urocortine stimulieren in Kardiomyozyten mehrere Signalkaskaden, die u.a. die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K), der Proteinkinase A (PKA), der Proteinkinase B (PKB)/Akt, der Proteinkinase C (PKC) und von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) beinhalten (Lawrence und Latchman 2006). Die Aktivierung dieser Kinasen verändert die Aktivität verschiedener Proteine, die an der Regulation der Ca²⁺-Homöostase und des Überlebens der Zellen bzw. an der Zelltodinduktion beteiligt sind (Townsend et al. 2007, Baines 2007). Im Folgenden wird auf einige dieser Signalwege einzeln eingegangen.

1.4.6.1. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung von Serin- oder Threonin-Resten die Aktivität von Zielproteinen beeinflussen. Allen MAPK liegt das gleiche Aktivierungsmodell zugrunde, bestehend aus MAPK-Kinase-Kinase (MKKK), MAPK-Kinase (MKK) und MAPK. Durch Phosphorylierung oder Interaktion mit G-Proteinen, wird die MKKK aktiviert, welche dann die MKK phosphoryliert, die wiederum die MAPK phosphoryliert und

damit aktiviert (Michel CM et al. 2001). Die MAPK untergliedern sich in 5 Untergruppen, zu denen die p44/42- (ERK1/2), die p38-, die JNK-, die ERK3/4- und die ERK5-Familie gehören.

1.4.6.1.1. Urocortine aktivieren die p44/42-MAPK

Kardiomyozyten, kardiale Fibroblasten und koronare Blutgefäße exprimieren die 44-kDa- (ERK1) und die 42-kDa-MAPK (ERK-2) (El-Mowafy und White 1999, Michel CM et al. 2001). Im Weiteren werden diese als p44/42-MAPK bezeichnet. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gehören zu den wichtigsten p44/42-MAPK-Aktivatoren (Sugden und Clark 1997). Hierzu zählen auch die CRF-R. CRF₂-R führen zu einer PI3K-vermittelten Aktivierung des Ras/Raf-1-Kinase-Signalweges und anschließend zur Aktivierung der MEK1/2, welche die p44/42-MAPK phosphoryliert. In neonatalen Maus- und Rattenkardiomyozyten geschieht dies unabhängig von einer cAMP-Erhöhung (Brar et al. 2004). Grossini et al. konnten in Endothelzellen jedoch eine CRF₂-R-vermittelte cAMP- und Ca²⁺-abhängige Phosphorylierung von p44/42- und p38-MAPK sowie Akt nachweisen (Grossini et al. 2009). Viele Studien legen nahe, dass der p44/42-MAPK-Signalweg kardioprotektiv wirkt und das Überleben der Zellen fördert. In Übereinstimmung damit war der kardioprotektive Effekt der Urocortine bei Ischämie/Reperfusion durch Hemmung der MEK1/2 und des CRF₂-R verringert (Brar et al. 2000). Die Inhibition von PKC und PKA hatte keine Effekte auf die kardioprotektive Wirkung von Ucn 1, 2 und 3 oder auf die p44/42-Phosphorylierung (Brar et al. 2004). Jedoch konnten Lawrence et al. eine Beteiligung von PKC und Kir 6.1 an der Ucn-1-vermittelten kardioprotektiven Wirkung nachweisen (Lawrence et al. 2002). Nicht nur die kardioprotektiven Wirkungen, sondern auch der positiv inotrope und lusitrope Effekt von Ucn wird offenbar zumindest teilweise durch den p44/42-MAPK-Signalweg vermittelt (Calderon-Sanchez et al. 2009).

1.4.6.2. Urocortine aktivieren den PI3K/Akt/eNOS-Signalweg

Die PI3K führt auch zur Aktivierung der Proteinkinase B (Akt). Beide Enzyme sind wichtig für die Ucn-vermittelte Kardioprotektion (Brar et al. 2002). Bei einer Akt-Aktivierung wird sowohl dessen Threonin-308 (in der Kinase-Domäne) als auch dessen Serin-473 (in der regulatorischen Domäne) phosphoryliert (Davidson et al. 2009). Die beiden Reste werden unabhängig voneinander reguliert (Alessi et al. 1996), wobei Thr-308 über den PI3K/PIP₃/PDK1-Signalweg phosphoryliert wird (Coffer et al. 1998, Williams et al. 2000) und Ser-473 unabhängig davon (Feng et al. 2004). Die Akt selbst phosphoryliert Serinreste verschiedener Proteine. Inhibitoren der PI3K, wie Wortmannin und LY294002, blockieren die Ucn-1-vermittelte Kardioprotektion in neonatalen und adulten Kardiomyozyten (Brar et al. 2002). Überexpression der aktiven PI3K wirkt kardioprotektiv. Auch Ucn 2 und 3 aktivieren den PI3K-Signalweg (Brar et al. 2004). Ein wichtiges Zielprotein der Akt ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die von Akt am Serin-1177 phosphoryliert wird (Dimmeler et al. 1999).

1.4.6.3. NO-Synthasen (NOS)

Die NO-Synthasen lassen sich in konstitutive NO-Synthasen, wie die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS 1) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS 3), und in die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS 2) untergliedern (Hare 2003). Sie oxidieren L-Arginin am terminalen Guanidin-Stickstoff mit Hilfe von Sauerstoff und NADPH zu L-Citrullin und NO (Michel T und Feron 1997). Die konstitutiven NO-Synthasen werden Ca^{2+} -Calmodulin- und phosphorylierungsabhängig aktiviert (Bredt und Snyder 1990) und produzieren kleine Mengen von NO, welche z.B. vasodilatierend oder thrombozytenaggregationshemmend wirken (Pollock et al. 1991). Große NO-Mengen zur Immunabwehr werden hingegen von der durch Zytokine induzierbaren iNOS synthetisiert (Kleinert et al. 2003). Einen unspezifischen toxischen Effekt kann NO durch seine Reaktion mit Superoxidanionen zu Peroxynitrit auslösen (Beckmann und Koppenol 1996).

1.4.6.3.1. Die Aktivierung und Regulation der eNOS

Die eNOS besteht aus einer amino-terminalen Oxygenase-Domäne, einer carboxyl-terminalen Reduktase-Domäne und einer Ca^{2+} /Calmodulin-Bindungsdomäne (McCabe et al. 2000). Phosphoryliert werden kann die eNOS u.a. in der carboxyl-terminalen Domäne am Serin-1177 und in der Ca^{2+} /Calmodulin-Bindungsdomäne am Threonin-495, sowie am Serin-633, am Serin-613, am Serin-615 und am Serin-114 (Mount et al. 2007, Fleming et al. 2001). Die eNOS-Aktivität kann durch Proteinkinasen, wie z.B. PKA, Akt, PKC und CaMKII, moduliert werden, indem diese eine Phosphorylierung am Serin-1177 und/oder eine Dephosphorylierung am Threonin-495 bewirken (Zhang XP und Hintze 2006). Durch die Serin-1177-Phosphorylierung wird die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Enzyms reduziert (Chen et al. 1999), der Elektronenfluss aus der Reduktase-Domäne gesteigert (McCabe et al. 2000) und die Enzymaktivität erhöht (Dimmeler et al. 1999). Wird jedoch Threonin-495 phosphoryliert, so hat dies eine Steigerung der Ca^{2+} -Calmodulin-Abhängigkeit der eNOS zur Folge und dadurch eine verringerte eNOS-Aktivität (Fleming et al. 2001, Michell et al. 2001). Jegliche Form der intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung, die zu einer Bindung mit Ca^{2+} /Calmodulin führt, gleich ob durch rezeptorabhängige oder -unabhängige Mechanismen ausgelöst, steigert die eNOS-Aktivität (Zhang XP und Hintze 2006). Die kardiale eNOS ist gekoppelt an eine Vielzahl von Rezeptoren, wie z.B. muskarinerge, β -adrenerge und Bradykinin-Rezeptoren. Die eNOS findet sich in den Caveolae des Sarkolemmes sowie der T-Tubuli. Sie wird durch Caveolin gehemmt (Hare 2003, Feron et al. 1998). Die Aktivierung der eNOS kann einerseits direkt durch Akt-Phosphorylierung am Serin-1177 vermittelt werden (Fulton et al. 1999, Dimmeler et al. 1999) oder andererseits über eine Verdrängung von Caveolin durch Ca^{2+} /Calmodulin bei einer Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst werden (Zhang XP und Hintze 2006). Das durch die eNOS produzierte NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC) und erhöht dadurch die intrazelluläre cGMP-Konzentration.

1.4.6.3.2. Allgemeine Wirkungen von NO

Das Radikal NO hat im menschlichen Organismus viele verschiedene Funktionen. Es wirkt beispielsweise vasodilatierend, inhibierend auf die Thrombozytenadhäsion und -aggregation (Pinsky et al. 1997, Maisson et al. 2003), hemmend auf die Leukozytenadhäsion (Moncada und Higgs 1993) und unspezifisch toxisch auf Bakterien (Granger DM und Hibbs 1996).

1.4.6.3.3. Kardiomyozytäre Wirkungen von NO

Eine Aktivierung der eNOS führt zur Produktion von NO. Kleine Mengen von NO (EC_{50} von 100 nM) aktivieren die sGC, erhöhen die cGMP-Konzentration und stimulieren dadurch die Proteinkinase G (PKG), welche eine Vielzahl von Zielproteinen phosphoryliert (Hare 2003). Eine PKG-induzierte Phosphorylierung von Troponin I führt zu einem positiv-lusitropen Effekt (Layland et al. 2002). PKG kann auch eine Hemmung des L-Typ- Ca^{2+} -Einstroms bewirken und damit die Effekte einer β -adrenergen Stimulation vermindern (Han et al. 1994, Maisson et al. 2003). cGMP stimuliert einerseits die Phosphodiesterase II (PDE II), welche durch cAMP-Abbau zu einer cAMP-Verminderung führt, und hemmt andererseits die Phosphodiesterase III (PDE III), was in einer cAMP-Erhöhung resultiert (Han et al. 1994, Fischmeister und Mery 1996). Welche PDE aktiviert bzw. gehemmt wird, bestimmt hierbei die NO-Menge. Viel NO bewirkt eine Stimulation der PDE II mit der Folge einer Abschwächung des β -adrenergen Effektes, im Gegensatz zu wenig NO, was die PDE III inhibiert und damit die β -adrenerge Wirkung verstärkt (Mery et al. 1993, Layland et al. 2002, Maisson et al. 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass NO über GC/cGMP-unabhängige Mechanismen, die die Aktivierung von Adenylatzyklase und cAMP-abhängigen Proteinkinasen beinhalten, wirkt (Vila-Petroff et al. 1999). NO bewirkt nicht nur eine Aktivierung der cGMP/PKG-Signalkaskade, sondern auch eine S-Transnitrosylierung von Zielproteinen, wie z.B. von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und Ryanodin-Rezeptoren (Hare 2003).

1.4.6.3.4. NO und die elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung beruht auf einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in Kardiomyozyten. Die Kontraktion wird von einer Membrandepolarisation eingeleitet, die zu einem transsarkolemalem Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle führt (Bers 2002a). Dieser Ca^{2+} -Einstrom stimuliert eine größere Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch den Ryanodinrezeptor (RyR). Diese Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bewirkt eine Aktivierung der Myofilamente (Bers 2002a, Bers 2002b). Die Beseitigung des intrazellulären Ca^{2+} durch die Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA2a) und den sarkolemalem Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) führt zur myozytären Relaxation (Hobai und O'Rourke 2000, 2001). Der sarkolemme L-Typ- Ca^{2+} -Kanal kann direkt und indirekt durch NO reguliert werden. NO moduliert direkt durch Transnitrosylierung der $\alpha 1$ -Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals und stimuliert damit den Ca^{2+} -Einstrom über diesen Kanal (Campbell et al. 1996). NO ist ferner in der Lage, direkt die SERCA-Aktivität zu vermindern, wodurch

weniger Ca^{2+} in das SR aufgenommen wird (Xu KY et al. 1999). Auch Phospholamban, ein Schlüsselregulator der SERCA, wird durch NO beeinflusst. Steigt der NO- und damit auch der cGMP-Spiegel, so führt dies zu einer verminderten PLB-Phosphorylierung (Stojanovic et al. 2001). Andere Experimente zeigten jedoch eine nNOS/NO-abhängige Phosphorylierungszunahme von PLB (Zhang YH et al. 2008). Auch der RYR kann durch NO beeinflusst werden. NO, vermutlich produziert durch nNOS, erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des RyR und moduliert so den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten und die Ca^{2+} -Beladung des SR (Khan et al. 2003, Hare 2003).

1.4.6.3.5. Die kardioprotektive Rolle der eNOS

Die eNOS könnte eine kardioprotektive Rolle spielen. Denn sie schützt das Myokard vor arrhythmogener Aktivität während einer β -Adrenorezeptorstimulation (Wang H et al. 2008a). Kardioprotektiv wirkt die eNOS weiterhin dadurch, dass sie myokardiale Umbauprozesse begrenzt (Ziolo et al. 2008). Eine kardiale eNOS-Überexpression verringert die Entwicklung von Hypertrophie und kardialer Dysfunktion (Janssens et al. 2004, Buys et al. 2007). Verantwortlich hierfür ist der anti-adrenerge Effekt der eNOS, die man auch als endogenen β -Blocker ansehen könnte (Ziolo et al. 2008). Umgekehrt fördert eine eNOS-Deletion die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und steigert das Mortalitätsrisiko bei Mäusen (Barouch et al. 2003). Im insuffizienten Herzen könnte der eNOS-Signalweg verstärkt sein aufgrund einer gesteigerten Expression von Caveolin 3 (Hare et al. 2000) und des β_3 -Adrenorezeptors (Monoitte et al. 2001) sowie einer Dysregulation der cGMP-metabolisierenden Phosphodiesterase 5 (Senzaki et al. 2001). Ist das Herz jedoch vorgeschädigt, so kann die eNOS außer Kontrolle geraten und erhöhte Superoxidmengen produzieren sowie pathophysiologische Umbauprozesse fördern (Takimoto et al. 2000).

1.4.6.4. Urocortine aktivieren den AC/cAMP/PKA-Signalweg und erhöhen den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten

Urocortine wirken positiv-inotrop und positiv-lusitrop (Bale et al. 2004, Yang et al. 2006, Calderon-Sanchez et al. 2009). Diese Effekte werden vom $\text{CRF}_2\text{-R}$ vermittelt, der G_s -Protein gekoppelt den AC/cAMP/PKA-Signalweg stimuliert (Yang et al. 2006). PKA wiederum erhöht den L-Typ- Ca^{2+} -Einstrom und den Ca^{2+} -Gehalt des SRs über eine gesteigerte SERCA-Aktivität, was den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten und damit die kardiale Kontraktilität steigert (Yang et al. 2006). Die kardiale SERCA2a wird reguliert von Phospholamban (PLB): dephosphoryliertes PLB hemmt die SERCA2a, nach Phosphorylierung des PLB ist diese Hemmung aufgehoben (Hagemann und Xiao 2002).

1.4.6.4.1. PLB

Phospholamban ist ein kleines Typ 2 Membranprotein, bestehend aus 52 Aminosäuren (Fujii et al. 1987), welches mit dem SR und der SERCA2a assoziiert ist (Fujii et al. 1990). Das PLB kann untergliedert werden in zwei Hauptdomänen: eine hydrophile zytoplasmatische Domäne und eine hydrophobe membrandurchspannende Domäne (Fujii et al. 1987, Simmermann et al. 1986, Wegener et al. 1986). Zwei benachbarte Reste in der zytoplasmatische Domäne, Serin-16 (Ser-16) und Threonin-17 (Thr-17), wurden als Phosphorylierungsstellen der PKA und der CaMKII identifiziert (Karczewski et al. 1990, Lindemann et al. 1983, Simmermann et al. 1986, Wegener et al. 1989).

1.4.6.4.2. Regulation der PLB-Expression

Als SERCA-Inhibitor kann PLB durch eine veränderte Expression und durch seinen Phosphorylierungsstatus direkt die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Aufnahme und somit die Herzmuskelkontraktilität beeinflussen. Es wird in beiden Vorhöfen und Kammern des Herzens exprimiert, allerdings in niedrigerem Maße in den Vorhöfen. Wie auch die Expression der SERCA2a ist die PLB-Expression bei Herzerkrankungen verändert (Periasamy et al. 2008). Beispielsweise ist die PLB-Expression erhöht bei Hyperthyreodismus und erniedrigt bei Hypothyreodismus (Kiss et al. 1994). Eine Änderung der PLB-Expression, wie sie z.B. beim PLB-Knockout vorkommt, erhöht die Kontraktilität und kann im Myopathiemodell in der Maus vor einer Herzinsuffizienz schützen (Sato et al. 2001), jedoch induziert eine PLB-Mutation, die die SERCA-Aktivität steigert, im Menschen eine Kardiomyopathie (Schmitt et al. 2003).

1.4.6.4.3. Regulierung der PLB-Phosphorylierung

Der inhibitorische Effekt von PLB auf die SERCA2a wird durch seine Phosphorylierung aufgehoben. Dies führt zu einer vermehrten Ca^{2+} -Aufnahme ins SR und zu einer beschleunigten Relaxation (Frank et al. 2000, Kranias et al. 1988, Simmermann et al. 1986). Als Antwort auf eine β -adrenerge Stimulation *in vivo* wird PLB am Ser-16 und am Thr-17 phosphoryliert (Wegener et al. 1989). Das Ser-16 wird von der PKA (Laraia und Morkin 1974) und das Thr-17 von der CaMKII phosphoryliert (Le Peuch et al. 1979). Beide Reste können unabhängig voneinander phosphoryliert werden. Aktuelle Studien zeigen, dass auch Akt PLB am Ser-16 und Thr-17 phosphorylieren kann (Gao et al. 2008, Catalucci et al. 2009). PLB stellt weiterhin ein Schlüsselziel für NO und die nNOS dar (Wang H et al. 2008b, Zhang YH et al. 2008). Einerseits konnte eine NO-abhängige Abnahme der PLB-Phosphorylierung gezeigt werden (Stojanovic et al. 2001) und andererseits eine nNOS/NO-abhängige Zunahme der PLB-Phosphorylierung (Zhang YH et al. 2008). Sowohl die Phosphorylierung vom Ser-16 als auch vom Thr-17 führen zur Aufhebung des inhibitorischen Effektes von PLB auf die SERCA2a (Jackson und Colyer 1996). Die PKA-abhängige Phosphorylierung am Ser-16 erhöht die Ca^{2+} -Affinität der SERCA2a (Reddy et al. 1996, Schwinger et al. 1999), wohingegen die CaMKII-abhängige Phosphorylierung am Thr-17 die maximale Geschwindigkeit der SERCA 2a steigert (Brixius et al.

2003). Der Phosphorylierungsgrad von PLB wurde bei Herzinsuffizienz bis hin zum terminalen Herzversagen untersucht. Die Studien zeigten widersprüchliche Ergebnisse, da einerseits eine Steigerung (Boknik et al. 2001, Currie und Smith 1999) und andererseits eine Senkung (Mills et al. 2006, Sande et al. 2002) der PLB-Phosphorylierung bei Herzinsuffizienz beobachtet werden konnte. Herzinsuffizienz-Studien zeigten eine Reduktion der Phosphorylierung am Serin-16, jedoch keine Veränderung des Thr-17-Phosphorylierungsstatus. Dies korrelierte gut mit der sinkenden Ca^{2+} -Sensitivität von SERCA2a bei Herzinsuffizienz (Sande et al. 2002, Schmidt et al. 1999, Schwinger et al. 1999, Brixius et al. 2003, El-Armouche et al. 2004). Hieraus könnte man den Schluss ziehen, dass der Phosphorylierungsgrad von PLB sich abhängig von der Schwere der Herzinsuffizienz verändert und von β -adrenergen Signalwegen beeinflusst werden könnte (Periasamy et al. 2008). Weiterhin konnte im erkrankten Herzen (kompensierte linksventrikuläre Hypertrophie und frühe Herzinsuffizienz) eine unterdrückte adrenerge Ansprechbarkeit verbunden mit einer gesteigerten basalen Thr-17-Phosphorylierung beobachtet werden. Dies legt nahe, dass die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen mit der unterdrückten kontraktilen Reserve und der daraus resultierenden Herzinsuffizienz in Verbindung zu bringen ist (Mills et al. 2006).

1.5. Proteinphosphatasen

1.5.1. PP1 und PP2A

Proteinphosphatasen stellen die Gegenspieler der Proteinkinasen dar. Sie dephosphorylieren die Zielproteine. Aus diesem Grunde fällt ihnen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Herzfunktion zu. Die Expression der Proteinphosphatasen im Herzen ist altersabhängig rückläufig und regional unterschiedlich mit einer größeren Phosphataseaktivität im Ventrikel als im Atrium (Gombosova et al. 1998, Huang et al. 1999, Lu et al. 1994). Die Serin/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A finden sich im Herzen (Herzig und Neumann 2000), wobei die Expression der PP2A dreifach höher ist als die der PP1 (Ingebritsen et al. 1983). Diese beiden Phosphatasen sind für mehr als 90% aller Serin-/Threonin-Dephosphorylierungen im Herzen verantwortlich (Cohen P und Cohen PT 1989). Die Phosphataseaktivität ist erhöht nach Langzeitstimulation der β -Adrenorezeptoren (Boknik et al. 2000) und bei kompensierter Hypertrophie (Huang et al. 1999). Bei der humanen Herzinsuffizienz wurde eine erhöhte Aktivität der PP1 beobachtet (Neumann et al. 1997). Die Hemmung der PP1 und der PP2A durch Okadasäure in Papillarmuskeln führte zu einer Relaxation sowie zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft (Neumann et al. 1993). Die MAPK-Signalwege werden von Proteinphosphatasen reguliert (Juntilla et al. 2008). Die PP2A reguliert einerseits den pro-apoptotischen p38-MAPK-Signalweg (Prickett und Brautigan 2007) und andererseits den anti-apoptotischen p44/42-MAPK- sowie den Akt-Signalweg (Adams et al. 2005, Ugi et al. 2004).

Auch die PLB-Phosphorylierung wird durch Proteinphosphatasen reguliert. Die PP1 und die PP2A dephosphorylieren PLB am Thr-17 (MacDougall et al. 1991). Aber auch die Reduktion am Ser-16 phosphorylierten PLB bei Herzinsuffizienz könnte das Resultat einer erhöhten Menge von PP sein (Sande et al. 2001). Es könnte eine Erniedrigung des basal phosphorylierten PLB (am Ser-16 und Thr-

17) in Rattenkardiomyozyten nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden, was auf eine erhöhte Dephosphorylierungsrate von aktivierter PP1 zurückzuführen war. Dies konnte mit dem PP-Inhibitor Okadasäure nachgewiesen werden, dessen Einsatz eine starke Erhöhung der PLB-Phosphorylierung am Ser-16- und Thr-17 zeigte (Huang et al. 1999). Die dem sarkoplasmatischen Retikulum zugehörige „PLB-Phosphatase“, die mit der PP1 vergleichbar ist, wird durch den Inhibitor-1 gehemmt (Steenart et al. 1992, MacDougall et al. 1991). Die Erhöhung der PLB-Phosphorylierung am Ser-16 und Thr-17-Spiegel nach Forskolingabe könnte (neben einer Aktivierung von PKA) u.a. durch die Aktivierung von Inhibitor-1 erklärt werden (Huang et al. 1999).

1.5.2. Calcineurin (PP2B)

Calcineurin (PP2B) ist eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase, die eine bedeutende Rolle bei Entzündung und kardialer Hypertrophie spielt (Molkentin et al. 1998, Ritter et al. 2002). Calcineurin besteht aus einer katalytischen Untereinheit A und einer Ca^{2+} /Calmodulin-bindenden regulatorischen Untereinheit B. Die durch Calcineurin verursachte Hypertrophie ist abhängig von Transkriptionsfaktoren der NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)-Familie (Molkentin et al. 1998). Cyclosporin A (CsA), welches im Komplex mit Cyclophilin Calcineurin hemmt, verhindert eine linksventrikuläre Hypertrophie und bewirkt eine Regression einer bestehenden Hypertrophie (Lim et al. 2000). Die CaMKII wird ebenfalls von Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert und hat mit Calcineurin eine gemeinsame Endstrecke bei der Beeinflussung der Genexpression (Bueno et al. 2002). Unterschiedlich ist jedoch die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Moduls und der CaMKII. Bei einem niedrigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten wird Calcineurin/NFAT aktiviert und bei einem hohen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten die CaMKII (Dolmetsch et al. 1997, Passier et al. 2000). NO und die cGMP-abhängige PKG Typ I bewirken über die Hemmung des Calcineurin-NFAT-Signalweges eine Inhibition der kardialen Hypertrophie (Fiedler et al. 2002). Eine Überexpression von Calcineurin in Kardiomyozyten führte zu einer Dephosphorylierung und Anhäufung von NFATc1 im Zellkern. Dies führte zu einer starken iNOS-Expression, was protektiv bei Ischämie-/Reperfusionverletzungen von Kardiomyozyten war (Obasanjo-Blackshire et al. 2006). Calcineurin wirkt ebenfalls auf die MAP-Kinasen. Die Aktivierung von Calcineurin fördert die p44/42-MAPK-Aktivierung und hemmt die p38-MAPK. Die MAP-Kinasen JNK und p38-MAPK sind partielle Antagonisten von Calcineurin durch eine direkte Inhibition von NFAT, während die p44/42-MAPK die Calcineurin/NFAT-Aktivierung potenziert. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar (Molkentin 2004).

1.6. Signaltransduktionswege der CRF₂-R in Kardiomyozyten

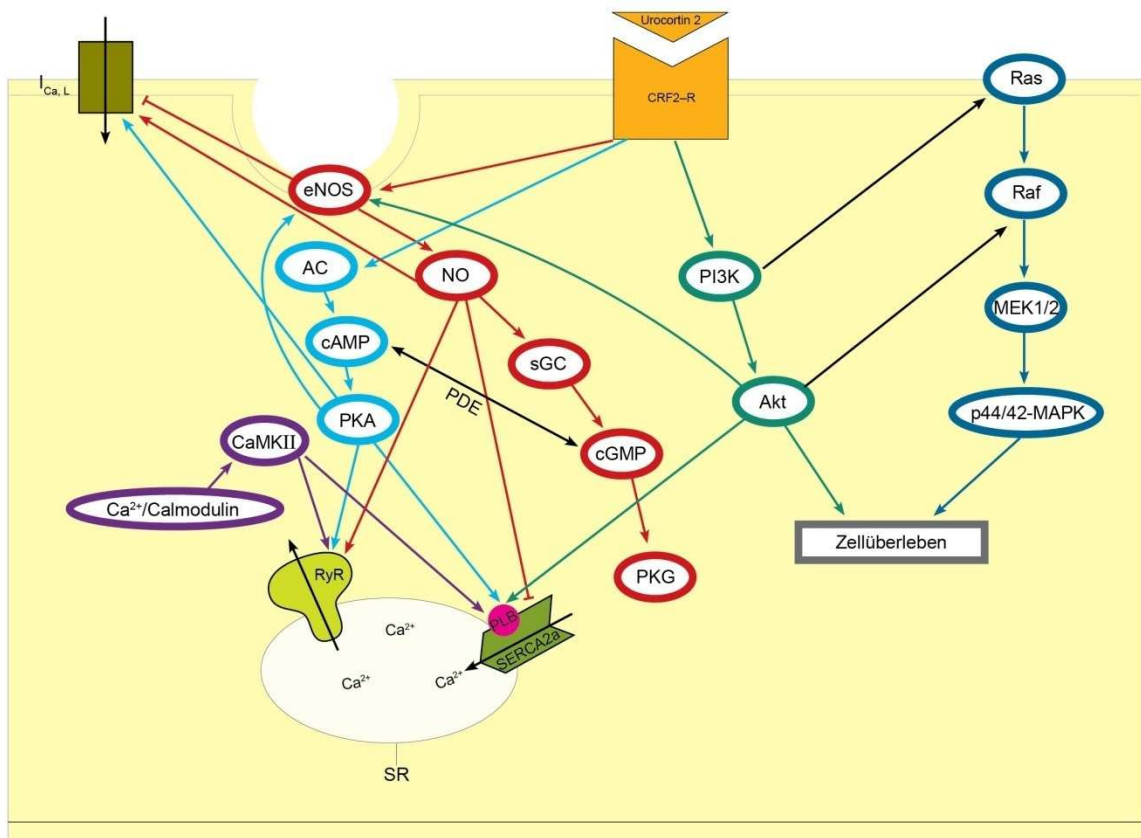


Abb. 1.1. Signaltransduktionswege der CRF₂-R in Kardiomyozyten

Abkürzungen: AC: Adenylatzyklase, Akt: Proteinkinase B, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, CaMKII: Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2, CRF₂-R: Corticotropin-Releasing-Faktor-Rezeptor Typ 2, eNOS: endotheliale NO-Synthase, I_{Ca,L}: L-Typ-Ca²⁺-Kanal, MEK1/2: MAPK-Kinase der p44/42-MAPK, NO: Stickstoffmonoxid, PDE: Phosphodiesterase, PI3K: Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase, PKA: Proteinkinase A, PKG: Proteinkinase G, p44/42-MAPK: p44/42-Mitogen-aktivierte Proteinkinase, PLB: Phospholamban, Raf: MKKK der p44/42-MAPK, Ras: G-Protein, RyR: Ryanodinrezeptor, SERCA 2a: Ca²⁺-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums, SR: Sarkoplasmatisches Retikulum, sGC: lösliche Guanylatzyklase, Ucn 2: Urocortin 2

In der Abb. 1.1. sind die bekannten Signaltransduktionswege des CRF₂-R in Kardiomyozyten zusammengefasst. Ucn 2 bewirkt über den G-Protein-gekoppelten CRF₂-R eine Stimulierung des AC/cAMP/PKA-Signalweges. Die PKA phosphoryliert Zielproteine, die an der Regulation der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind, u.a. PLB am Ser-16, den RyR und den L-Typ-Ca²⁺-Kanal. Dadurch wird der [Ca²⁺]_i-Transient erhöht. Auch der PI3K/Akt/eNOS-Signalweg wird vom CRF₂-R aktiviert sowie der Ras/Raf/MEK1/2-p44/42-MAPK-Signalweg. Das durch die eNOS produzierte NO bewirkt eine cGMP-Erhöhung, die über Modulation von PDEs mit dem cAMP/PKA-Signalweg interagiert. Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige CaMKII, die durch den erhöhten [Ca²⁺]_i-Transienten aktiviert wird, führt zur Phosphorylierung von PLB am Thr-17.

1.7. Ziele der Arbeit

Studien an Tiermodellen wie lebenden Menschen in vivo zeigen positive Wirkungen der Urocortine auf die kardiale Funktion. Daher werden die Urocortine als Therapieoption für die Herzinsuffizienz immer interessanter. Gleichzeitig sind die zellulären Wirkungen der Urocortine in Herzmuskelzellen – trotz der Kenntnis mehrerer aktivierter Signalkaskaden – noch nicht hinreichend verstanden. Wie schnell und in welcher Reihenfolge die einzelnen Signaltransduktionswege aktiviert werden und inwieweit eine Abhängigkeit bzw. eine Querverbindung dieser Kaskaden untereinander besteht, ist nicht bekannt. Gegenstand dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der zeitabhängigen Aktivierung des AC/cAMP/PKA, des Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII, des MEK1/2-p44/42-MAPK- und des PI3K/Akt/eNOS-Signalweges durch Ucn 2.

Neben der Aktivierung von Proteinkinasen ist die Aktivität von Proteinphosphatasen ausschlaggebend für die Phosphorylierung und damit die Funktion von Zielproteinen. Die Bedeutung von Proteinphosphatasen für die zellulären Wirkungen der Urocortine in Herzmuskelzellen wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Ein zweites grundlegendes Ziel dieser Arbeit ist daher die Charakterisierung der Rolle von Proteinphosphatasen für die Ucn-2-induzierte Phosphorylierung kardialer Proteine.

Als Nachweis für die Aktivierung der genannten Signalkaskaden und die Rolle der Phosphatasen diente die Phosphorylierung definierter Zielproteine, die mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern bestimmt wurde. Die Beteiligung von Phosphatasen wurde durch den Einsatz von Phosphatase-Hemmstoffen überprüft.

Folgende spezifische Fragestellungen wurden daher untersucht:

1. Wie ist der Zeitverlauf der Ucn-2-abhängigen Phosphorylierung von Akt, eNOS, p44/42-MAPK und PLB in isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten?
2. Wie wirkt im Vergleich dazu eine selektive Aktivierung des AC/PKA/cAMP-Signalweges durch den AC-Aktivator Forskolin auf den Zeitverlauf der Aktivierung von Akt, eNOS, p44/42-MAPK und PLB?
3. Welche Bedeutung kommt den Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2B für die Ucn-2-induzierten Änderungen der Phosphorylierung von Akt, eNOS, p44/42-MAPK und PLB zu?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien, alphabetisch

2.1.1. Chemikalien

Akryl-, Bisakrylamid Lösung (Roth, Karlsruhe # 3029.1)

Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma, Steinheim # A3678)

Aprotinin (Boehringer Mannheim, Mannheim # A3428)

Bromphenolblau-Natriumsalz (AppliChem, Darmstadt # A3650)

Butanol (Merck, Darmstadt # 1.00988.1000)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma, Steinheim # D9163)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, Steinheim # D5879)

Ethanol (Merck, Darmstadt # 1.590100.500)

Ethylendiamintetraazetat (EDTA) (Sigma, Steinheim # E-5134)

Ethylenglykol-bis (β -aminoethyl)-tetraazetat (EGTA) (Sigma, Steinheim # E-0396)

β -Glyzerolphosphat (Sigma, Steinheim # G-6251)

Glyzerol (Sigma, Steinheim # G-5516)

Glyzin (Roth, Karlsruhe # 3908.3)

Leupeptin (Sigma, Steinheim # L-2023)

Magermilchpulver (MP) (AppliChem, Darmstadt # A0830.0500)

Methanol (Merck, Darmstadt #1.06012.1000)

Natriumchlorid (NaCl) (Fluka, Buchs, Schweiz # 71381)

Natriumdodecylsulfat 20% (SDS) (Serva, Heidelberg # 39575)

Natriumfluorid (NaF) (Sigma, Steinheim # S-7920)

Natriumorthovanadat (Sigma, Steinheim # S-6508)

Natriumpyrophosphat (Sigma, Steinheim # S-6422)

NP 40 (IGEPAL CA-630) (Sigma, Steinheim # I-3021)

Dulbecco's PBS (10x ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) (PAA, Pasching, Österreich # H15-011)

Ponceau S-Lösung (Sigma, Steinheim # P-7170)

Pepstatin A (Sigma, Steinheim # P-4265)

Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) (Sigma, Steinheim # P-7626)

Polyoxyethylen (20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20) (Sigma, Steinheim # P-1379)

Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma, Steinheim # A-7906)

Röntgen-Entwickler LX 24 (Kodak, Paris, Frankreich # 5070933)

Röntgen-Fixierlösung (Tetenal, Norderstedt # 101043)

TEMED (Sigma, Steinheim # T-9281)

Tris-(hydroxymethyl) aminomethan (Tris) (Roth, Karlsruhe # 4855.2)

2.1.2. Markerproteine, Kits

BCA Protein Assay Kit (PIERCE, Rockford, USA # 23225)

Precision Plus Protein Standard Marker (Bio-Rad, München # 161-0373)

Supersignal® West Pico (PIERCE, Rockford, USA)

Chemilumineszenz-Substrat (# 34080.02 CG 5045 3A)

2.1.3. Antikörper

Primärantikörper:

Polyklonaler Anti-phospho-p44/42 MAP-Kinase-Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA # 9106)

Monoklonaler Anti-p44/42 MAP-Kinase-Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA # 9102)

Polyklonaler Anti-Akt-Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA # 9272)

Polyklonaler Anti-phospho-Akt-(Ser473)-Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA# 9271)

Polyklonaler Anti-phospho-Akt-(Thr308)-Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA# 9275)

Polyklonaler Anti-NOS3-Antikörper (C20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA # sc-654)

Polyklonaler Anti-phospho-eNOS-(Ser1177)-Antikörper (Cell Signaling, Beverly, USA# 9571)

Monoklonaler Anti-GAPDH-Antikörper (Bio Trend, Köln # 4699-9555)

Polyklonaler Anti-phospho-PLB (ser.16)-Antikörper (Badrilla, Leeds, UK, A 010-12)

Polyklonaler Anti-phospho-PLB (thr.17)-Antikörper (Badrilla, Leeds, UK, A 010-13)

Monoklonaler Anti-PLB-Antikörper A1 (Badrilla, Leeds, UK, A 010-14)

Sekundärantikörper:

HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper (Amersham, Freiburg # NA 934)

HRP-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (Amersham, Freiburg # NA 931)

2.1.4. Technische Geräte

Ray Film (13x18cm) (Fuji Film, Chicago, USA # 4014403)

Gelelektrophoreseapparatur Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad, München)

Gelgießapparatur (Bio-Rad, München)

Dry Block Heater HBS 130 (Star Laboratory, Menlo Park, USA)

Multi Imager™, Light Cabinet System (Alpha Innotech Corp., San Leandro, USA)

Nitrozellulose-Transfermembran (pore size 0,45µm) (Schleicher & Schuell, Dassel # 10 401 196)

Tischschüttler Polymax 1040 (Heidolph, Kerlheim)

Transferkammer Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad, München)

Transformator Power Pac 300 (Bio-Rad, München)

Zentrifuge 1-15 (Sigma, Steinheim)

2.2. Isolierung von Kaninchen-Kardiomyozyten

Sämtliche Western Blots wurden mit Homogenaten aus adulten enzymatisch-isolierten Kaninchen-Ventrikelmiozyten durchgeführt.

2.2.1. Lösungen für die Zellisolierung**2.2.1.1. Hepes-gepufferte Tyrodelösung**

Zunächst wurde eine Hepes-gepufferte Tyrodelösung hergestellt. Aus dieser wurden weitere Lösungen für die Zellisolierung abgeleitet. Die Hepes-gepufferte Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung:

Substanz	Konzentration	MW g/mol	Firma / Bestellnummer
NaCl	137 mM	58,44	Merck / 1.06404.1000
KCl	5,4 mM	74,55	Merck / 1.04936.1000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 mM	246,48	Merck / 1.05886.0500
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,2 mM	358,14	Merck / 1.06573.1000
Hepes	20 mM	238,21	Sigma / H-3375
D(+)-Glucose	30 mM	180,16	Merck / 1.08337.1000

Tab. 2.1. Hepes-gepufferte Tyrodelösung

Mit dieser Hepes-gepufferten Tyrodelösung und einer 1M CaCl₂-Lösung (Fluka 21115) wurde noch eine Ca²⁺-haltige Hepes-gepufferte Tyrodelösung hergestellt.

2.2.1.2. Enzymlösung

Substanz	Konzentration	MW g/mol	Firma / Bestellnummer
Taurin	7,5 mg/ml	125,15	Sigma / T 0625-100G
DL-Glutaminsäure	1,175 mg/ml	147,1	Sigma / G 1126
L-Carnitin	0,388 mg/ml	197,66	Sigma / C 0283-25G
Kollagenase Typ CLS II	1 mg/ml	254 U/mg	Biochrom AG
Protease XIV	0,04 mg/ml	5,2 U/mg	Sigma / P 5147
CaCl ₂ 1M	0,025 µl/ml	110,99	Fluka 21115

Tab. 2.2. Enzymlösung

Die Substanzen wurden in Hepes-gepufferten Tyrodelösung ohne CaCl₂ gelöst.

2.2.1.3. Stopplösung

Substanz	Konzentration	MW g/mol	Firma / Bestellnummer
Albumin (Rinderserum)	20 mg/ml	66,3	Sigma / A 2153
2,3-Butandion- Monoxim (BDM)	2,025 mg/ml	101,1	Sigma / B 0753
CaCl ₂ 1M	0,05 µl/ml	110,99	Fluka / 21115

Tab. 2.3. Stopplösung

Anschließend erfolgte die Lösung der Substanzen in Hepes-gepufferter Tyrodelösung ohne CaCl₂.

2.2.1.4. Lösungen zum Waschen und Kalziumaufbau

Die Lösungen zum Waschen und für den Kalziumaufbau enthielten unterschiedliche Konzentrationen an 1M CaCl₂:

	1M CaCl ₂	BDM
1. Waschlösung	0,05 µl/ml	2,2 mg/ml
2./3. Waschlösung	0,05 µl/ml	(=50 µM CaCl ₂)
1. Schritt des Kalziumaufbaus	0,125 µl/ml	(=125 µM CaCl ₂)
2. Schritt des Kalziumaufbaus	0,25 µl/ml	(=250 µM CaCl ₂)
3. Schritt des Kalziumaufbaus	0,5 µl/ml	(= 500 µM CaCl ₂)
4. Schritt des Kalziumaufbaus	1,0 µl/ml	(= 1000 µM CaCl ₂)

2.2.1.5. Nährlösung

Nach erfolgreicher Zellisolierung wurden die Kardiomyozyten in eine Nährlösung mit 60 mg/ml Albumin (Sigma A2153-500G) überführt. Die Nährlösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

Substanz	Konzentration	MW g/mol	Firma / Bestellnummer
Medium 199	-	-	GIBCO 22350
Taurin	5 mM	125,15	Sigma / T 0625
L-Carnitin	5 mM	197,66	Sigma / C 0283
DL-Kreatin	5 mM	131,1	Sigma / C 0780
Penicillin/Streptomycin 100x	0,01 ml/ml	-	Biochrom AG A 2213
L-Glutamin (200 mM)	1 ml/ml	-	Biochrom AG K 0283

Tab. 2.4. Nährlösung

Nach steriler Filtration des Mediums wurde es bei 4°C gelagert.

2.2.2. Kardiomyozyten-Isolierung

Zunächst wurden die Kaninchen über die Ohrvene mit 50 mg/kg i.v. Thiopental (Nycomed, Konstanz # 132281) anästhesiert. Zusätzlich verabreichte man 25 I.E. Heparin-Natrium (Ratiopharm, Ulm #, PZN 3029843) als Antikoagulans, um einer Thrombenbildung im Herzen vorzubeugen. Anschließend wurde zügig der Thorax eröffnet und das Herz entnommen. Dies führte zum Tode des Kaninchens. Das Herz wurde über die Aorta mit circa 400 ml kalziumhaltiger Tyrodelösung perfundiert, um sich zu vergewissern, dass die Kardiomyozyten funktionstüchtig waren. Daraufhin wurde das Herz zwischen 7 und 13 Minuten mit nominell Ca^{2+} -freier Tyrodelösung perfundiert, um die Kontraktion zu stoppen und die extrazelluläre Matrix zu lockern. Durch die kontinuierliche Perfusion für 20 bis 30 Minuten mit der Enzymlösung, welche 1mg/ml Kollagenase und 0,04 mg/ml Protease enthielt, wurde das Herz verdaut. Zum Stoppen der Kollagenase- und Proteaseaktivität wurde das Herz in die Stopplösung überführt. Das Ventrikelgewebe wurde in ein Becherglas mit BDM-haltiger Waschlösung gegeben, zerkleinert und anschließend filtriert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal in der Waschlösung ohne BDM wiederholt. Danach erfolgte der langsame Kalziumaufbau. Dafür wurde zuerst die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Tube filtriert und der Überstand nach 6 bis 10 Minuten Sedimentation abgesaugt. Danach wurde als erster Schritt 125 μM Kalziumaufbaulösung zugesetzt. Nach 10-minütiger Sedimentation wurde der Überstand wieder abgesaugt und als zweiter Schritt die 250 μM Kalziumaufbaulösung zugeführt. Dieser Vorgang wiederholte sich im dritten und vierten Schritt

des Kalziumaufbaus bis zu einer Kalziumkonzentration von 1000 μM . Anschließend wurde die Kardiomyozytensuspension in die Nährlösung überführt.

2.2.3. Laminieren und Ausplattieren der isolierten Kardiomyozyten

Zunächst wurde den Kulturschalen (100 mm x 20 mm, Sarstedt, Newton, USA 831802) 3 ml Nährlösung ohne Albumin mit 10 $\mu\text{l/ml}$ Laminin (Maus-Laminin, Tebu-Bio, Offenbach # 0172005; Lagerung bei 70°C) zugegeben und für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 oder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig abgesaugt. Das Laminin diente der besseren Anheftung der Kardiomyozyten an den Schalenboden. Nun wurden 500.000 Kardiomyozyten in 5 ml Nährlösung zugegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

2.2.4. Pharmaka

2.2.4.1. Urocortin 2 (Ucn 2)

Urocortin 2 (MW 4152,9 g/mol; Sigma / U9507) gehört zur Familie der Corticotropin-Freisetzungsfaktoren (Corticotropin-Releasing-Faktor, CRF). Es wurde eine 10^{-5}M Ucn-2-Stammlösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ hergestellt und bei -20°C gelagert. Alle Versuche wurden an isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten mit einer Ucn-2-Konzentration von 100 nM in den Zellkulturschalen durchgeführt, da hierfür bereits zuvor eine maximale Wirkung nachgewiesen werden konnte (Yang et al. 2006).

2.2.4.2. Forskolin

Forskolin (MW 410,5 g/mol; Calbiochem / 344270) ist ein Diterpen, welches aus der Pflanze *Coleus forskohlii* gewonnen wird. Es ist ein direkter Stimulator der Adenylatzyklen und erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Es wurde eine 10 mM Forskolin-Stammlösung in DMSO angesetzt und bei 4°C gelagert. Für die Konzentration von 10 μM konnte eine maximale Wirkung gezeigt werden (Traebert et al. 1998). Daher wurde eine Endkonzentration von 10 μM Forskolin in der Zellkulturschale eingesetzt.

2.2.4.3. Okadasäure

Okadasäure (MW 843,1 g/mol; Calbiochem / 459618) ist ein Toxin mariner Dinoflagellaten. Sie inhibiert die Proteinphosphatasen 1 und 2A. Es wurde eine 100 μM Okadasäure-Stammlösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ angesetzt und bei -20°C aufbewahrt. Die Endkonzentration in der Zellkulturschale betrug 1 μM . Dies wurde in vorhergehenden Studien als die maximal wirksame Konzentration definiert (Steenart et al. 1991, Huang et al. 1999).

2.2.4.4. Cyclosporin A, *Tolypocladium inflatum*

Cyclosporin A (MW 1202,6 g/mol; Calbiochem / 239835) ist ein zyklisches Peptid aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum*. Es bildet mit dem intrazellulären Protein Cyclophilin einen Komplex, welcher die Aktivität der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin (Proteinphosphatase 2B, PP2B) hemmt. Es wurde eine 10 mM Cyclosporin-A-Stammlösung in DMSO angesetzt, auf eine Konzentration von 0,1 mM mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt und bei -20°C gelagert. Es wurde ein Endkonzentration von 0,1 μM Cyclosporin A in der Zellkulturschale eingesetzt. Diese Endkonzentration entspricht der maximal wirksamen Konzentration und der therapeutischen Konzentration, die nach Organtransplantationen verabreicht wird (Swanson et al. 1992, de Groot-Krusemann et al. 2001).

2.2.4.5. Übersicht der verwendeten Pharmaka und deren Konzentrationen

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Ucn 2	10^{-5} M $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	1×10^{-7} M
Forskolin	10^{-2} M DMSO	1×10^{-5} M
Okadasäure	10^{-4} M $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	1×10^{-6} M
Cyclosporin A	10^{-4} M DMSO/ H_2O	1×10^{-7} M

Tab. 2.5. Pharmaka und deren Konzentrationen

2.3. Messprotokolle an isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten**2.3.1. Ucn 2-Messprotokoll**

Für die Zeitreihe mit Ucn 2 wurden 6 Kulturschalen vorbereitet. Schale 1 diente als unbehandelte Kontrolle. Die Zellen wurden nach 15 Minuten geerntet. In Schale 2 bis 6 wurden jeweils 100 nM Ucn 2 zugegeben. Die Zellen in Schale 2 wurden nach 5 Minuten, in Schale 3 nach 10 Minuten, in Schale 4 nach 15 Minuten, in Schale 5 nach 30 Minuten und in Schale 6 nach 180 Minuten geerntet.

2.3.2. Forskolin-Messprotokoll

Die Schale 1 diente als Kontrolle. Die Zellen wurden 15 Minuten nach Zugabe von 1:10 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünntem DMSO geerntet. Schale 2 wurde mit 10 μM Forskolin behandelt. Die Zellen in Schale 2 wurden nach 30 Minuten geerntet.

2.3.3. Messprotokoll von Okadasäure mit und ohne Ucn 2

Die Zellen in Schale 1 dienen als Kontrolle und wurden nach 15 Minuten geerntet. Schale 2 und 3 wurde 1 μM Okadasäure hinzugegeben. Nach 30 Minuten wurde Schale 2 geerntet und in Schale 3 100 nM Ucn 2 zugegeben. Schale 3 wurde nach 30 Minuten weiterer Inkubation geerntet.

2.3.4. Messprotokoll von Cyclosporin A mit und ohne Ucn 2

Die mit 1:100 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünntem DMSO versetzten Zellen der Schale 1 dienen als Kontrolle. Sie wurden nach 30 Minuten geerntet. In Schale 2 und 3 wurden 0,1 μM Cyclosporin A zugegeben. Nach 30 Minuten wurde Schale 2 geerntet und zur Schale 3 100 nM Ucn 2 zugegeben. Schale 3 wurde nach 30 Minuten weiterer Inkubation geerntet.

2.4. Ernten der Kaninchen-Kardiomyozyten

Zunächst wurde die Inkubationslösung abgesaugt. Alle folgenden Schritte wurden unter Kühlung durchgeführt. Anschließend wurden die Schalen mit 5 ml PBS abgewaschen. Es wurden zwischen 80 und 200 μl Homogenisationspuffer gleichmäßig auf die Schalenböden geträufelt. Mit einem Zellschaber wurden dann die am Boden anhaftenden Myozyten abgeschabt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und in diesem durch Aufziehen in eine 27G-Spritze zerkleinert. Anschließend wurde das Zellhomogenat im Kühlraum bei 4°C für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und bei -80°C eingefroren.

Der Homogenisationspuffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

Homogenisationspuffer		
Substanz	Konzentration	MW g/mol
NP 40 (IPEGAL CA-630)	1%	
Glycerol	10%	
Natriumchlorid	137 mM	58,44
Tris-HCl pH 7,4	20 mM	121,14
Natriumfluorid	20 mM	41,99
Natrium-Orthovanadat	1 mM	183,9
Natrium-Pyrophosphat	1 mM	446,1
β -Glycerolphosphat	50 mM	216
EDTA pH 8	10 mM	372

EGTA pH 7	1 mM	380,4
Aprotinin	4 µg/ml	651,2
Leupeptin	4 µg/ml	475,6
Pepstatin A	4 µg/ml	685,9
PMSF	1 mM	174,2

Tab. 2.6. Homogenisierungspuffer

2.5. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zunächst wurde eine Rinderserumalbumin-Stammlösung von 3 µg/µl angesetzt, um aus dieser eine Verdünnungsreihe (Leerwert – 0,5 – 1 – 1,5 – 2 – 2,5 – 3 µg/µl) für die Eichkurve herzustellen. Diesen Ansätzen sowie 10 µl der zu bestimmenden Probe wurde dann 500 µl BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure – Protein Assay Reagenz A # 23223, Reagenz B # 23224) zugegeben im Verhältnis Reagenz A zu Reagenz B von 50:1. Anschließend wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Dabei liefen folgende Reaktionen ab: Die Cu²⁺-Ionen des Reagenz reagierten mit dem Protein der Probe im alkalischen Milieu und wurden zu Cu⁺ reduziert. Die Bicinchoninsäure interagiert mit dem Protein-Cu⁺-Komplex und bildete einen violetten wasserlöslichen Komplex. Die Extinktion dieses Komplexes ist bei 562 nm direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die Extinktionen der Proben der Verdünnungsreihe sowie der Myozytenhomogenate wurden dann photometrisch gegen den Leerwert bestimmt. Anschließend wurde eine Eichgerade bestimmt. Aus dieser konnte man mittels linearer Regression den Proteingehalt der Homogenate errechnen.

2.6. SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese

2.6.1. Auswahl und Herstellung der SDS-Polyakrylamid-Gele

Für die SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) wurden Tris/SDS-gepufferte Trenngele mit einer Konzentration von 10% Polyakrylamid (für p44/42-MAPK, eNOS und Akt) und mit einer Konzentration von 12% Polyakrylamid (für PLB und GAPDH) sowie Sammelgele angefertigt.

Trenngelzusammensetzung:

	10%	12%
Akryl-/Bisakrylamid	7,5 ml	9,0 ml
4x Tris/SDS pH 8,8	5,63 ml	5,63 ml
10% APS	75 μ l	75 μ l
TEMED	15 μ l	15 μ l
H ₂ O _{bidest.}	9,38 ml	7,88 ml.

Sammelgelzusammensetzung:

Akryl-/Bisakrylamid	1,00 ml
4x Tris/SDS pH 6,8	1,88 ml
10% APS	37,50 μ l
TEMED	15,00 μ l
H ₂ O _{bidest.}	4,62 ml.

Die polymerisierten SDS-Gele wurden dann in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, die mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt wurde. Das SDS (Natriumdodecylsulfat) diente hierbei der Auflösung der Tertiär- und Quartärstruktur der zu bestimmenden Proteine. Es überdeckte als anionisches Tensid die Ladung der Proteine, wodurch diese bei konstanter Spannung im Gel ihrer Größe nach aufgetrennt werden konnten.

2.6.2. Probenvorbereitung

Eine definierte Menge an Gesamtprotein der Proben, abhängig davon welches Protein man nachweisen wollte, wurde mit Homogenisationspuffer (siehe 2.4.1) verdünnt, so dass alle Proben das gleiche Volumen aufwiesen. Zu jeder Probe wurde dann 1/3 Laemmli-Puffer zugegeben.

Zusammensetzung des Laemmli-Puffers:

EGTA	16 mM
SDS	4%
Tris-HCl pH 6,8	40 mM
DTT	16 mM
Glycerol	47%
Bromphenolblau	0,05%.

Teilweise wurden die Proben bei 95°C für 5 Minuten gekocht. Alle Proben wurden zentrifugiert und bis zum Auftragen auf Eis gelagert.

Proteine	Gesamtprotein (µg)	95°C für 5 min.	Proteinmasse (kDa)
p44/42-MAPK	30	X	42 und 44
Akt	30	X	60
eNOS	30	X	140
p-PLB (Ser-16) und PLB	20	-	25
p-PLB (Thr-17) und PLB	30	-	25
GAPDH	20 / 30	-	32

Tab. 2.7. Proteine und deren Massen

Der Proteinmarker (Precision Plus Protein Standards, BIO-RAD, #161-0232), der gefärbte Proteine der Masse 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa enthält, wurde verwendet, um später die Proteine der Proben anhand ihrer molekularen Masse identifizieren zu können. Wurden die Proben bei 95°C für 5 Minuten erhitzt, so wurde mit dem Marker genauso verfahren.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Western Blots untereinander wurde eine Konzentrationsreihe aus unbehandelten gepoolten Kaninchen-Kardiomyozyten aufgetragen. Bei den Messreihen mit Ucn 2 und Forskolin wurde mit 15, 30 und 60 µg Pool gearbeitet und bei den Messreihen mit Okadasäure und Cyclosporin A mit 30 und 60 µg Pool.

2.6.3. Gelbeladung und Gelelektrophorese

Der Proteinmarker, die Konzentrationsreihe (Pool) und die Proben wurden vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert. Bei der Gelelektrophorese mit konstanter Spannung von 80 Volt im Sammelgel und 120 Volt im Trenngel wurden die Proteine solange aufgetrennt, bis die Lauffront aus dem Unterrand des Gels ausgetreten war.

2.7. Proteintransfer auf die Nitrozellulose-Membran – Blotten

Als Vorbereitung hierfür wurden zunächst die Nitrozellulose-Membran der Porengröße 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, #10401 196), 4 dünne Filterpapiere, sowie 2 Schwämmchen in Transferpuffer eingeweicht, was dazu diente, die Bindungsstellen der Membran für die Proteine der Gels zu aktivieren.

Der Transferpuffer wurde folgendermaßen hergestellt:

Als erstes wurde eine 5fach konzentrierte Stammlösung hergestellt, bestehend aus 78,8 g Tris-Base, und 28,8 g Glycin in 2 l H₂O_{bidest.}. Bei der Verdünnung dieser Stammlösung zu einfachem Transferpuffer wurden 20 % Methanol hinzugefügt.

Als nächster Schritt wurden ein Schwämmchen, 2 Filterpapiere und die Nitrozellulose-Membran in die Plastikkammer gelegt. Das Gel wurde mit Hilfe eines Schabers aus der Gelapparatur gelöst und auf die Membran gelegt, welche anschließend noch von 2 Filterpapieren und einem Schwämmchen überdeckt wurden. Nach dem Schließen der Plastikklammer wurde diese in eine Box mit der Blotapparatur eingehängt, die mit Transferpuffer gefüllt wurde. Unter Kühlung wurde dann bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA/cm² über Nacht geblottet.

2.8. Färben und Blocken der Membran

Nachdem die Proteine des Gels auf die Membran transferiert worden waren, wurde diese mit Ponceau S-Lösung rot eingefärbt, womit man den erfolgreichen Transfer anhand von Proteinbanden auf der Membran erkennen konnte. Dann wurde die Membran geschnitten. Dies war notwendig, um gleichzeitig mehrere Proteine in einer Probe nachzuweisen. In dieser Arbeit wurden die Proteine eNOS (ca. 140 kDa), Akt (ca. 60 kDa), p44/42-MAPK (ca. 44 und 42 kDa), GAPDH (ca. 32 kDa) und PLB (ca. 25 kDa) nachgewiesen. Anschließend wurde die Farbe mit destilliertem Wasser wieder heruntergewaschen.

Als nächster Schritt wurde die Membran für 1 Stunde in Blockpuffer (5% Milchpulver in 1xTBST-Puffer) gelegt. Der Blockpuffer diente hierbei der Absättigung der freien Bindungsstellen der Membran, um einen gezielten Einsatz der später zur Verwendung kommenden Antikörper zu gewährleisten. Danach wurden 2 Waschgänge von jeweils 10 Minuten mit TBST-Puffer durchgeführt, um die nicht festhaftenden Milchpulverbestandteile zu entfernen.

Zusammensetzung des TBST-Puffers (2 l), pH 7,5:

NaCl	19,82 g
Tris-Base	2,42 g
Tween 20	2,00 ml.

2.9. Immunodetektion

Anschließend wurde der in TBST-Puffer verdünnte Primärantikörper (siehe 2.5.1.3) über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert.

Verdünnungen der phospho-spezifischen Primärantikörper und des GAPDH-Antikörpers:

Primärantikörper	Verdünnung	Verdünnungslösung	Sekundär-Antikörper-Verdünnung
Phospho-p44/42-MAPK-Antikörper	1:7000	TBST	Anti-rabbit, 1:3000
Phospho-Akt-(Ser473)-Antikörper	1:1000	TBST	Anti-rabbit, 1:3000
Phospho-Akt-(Thr308)-Antikörper	1:1000	TBST	Anti-rabbit, 1:3000
Phospho-eNOS-(Ser1177)-Antikörper	1:750	TBST	Anti-rabbit, 1:3000
Phospho-PLB-(Ser16)-Antikörper	1:1000	TBST mit 1% MP	Anti-rabbit, 1:3000
Phospho-PLB-(Thr17)-Antikörper	1:1000	TBST mit 1% MP	Anti-rabbit, 1:3000
GAPDH-Antikörper	1:40000	TBST mit 0,5% MP	Anti-mouse, 1:10000

Tab. 2.8. Phospho-Antikörper und verwendete Verdünnungen

Es folgten 3 Waschvorgänge für jeweils 10 Minuten mit TBST-Puffer, um die nicht haftenden Antikörper zu entfernen. Nun wurden die Sekundärantikörper für eine Stunde zugegeben. Danach wurden die ungebundenen Sekundärantikörper 4-mal für 10 Minuten mit TBST-Puffer ausgewaschen. An den Sekundärantikörper war das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt.

Auf die Membran wurden dann 4 ml ECL-Lösung (Luminol-H₂O₂ 1:1) aufgetragen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Membran vollständig mit der Lösung benetzt wurde. Da das Luminol Substrat der Meerrettich-Peroxidase ist und sich bei dessen Umsetzung eine Lumineszenz entwickelt, konnten so die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Ein Röntgenfilm wurde mit der Membran belichtet, wobei die Lumineszenz sich als Schwärzung der Banden niederschlägt. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt.

Danach wurden die Primär- und Sekundärantikörper durch Waschen für 4 Minuten mit H₂O_{bidest.}, 8 Minuten mit 2 N NaOH und nochmals 4 Minuten mit H₂O_{bidest.} von der Membran entfernt. Anschließend wurde das gesamte Procedere ab dem Blocken wiederholt, wobei nun folgende Primärantikörper zum Einsatz kamen:

Primärantikörper	Verdünnung	Verdünnungslösung	Sekundär-Antikörper-Verdünnung
p44/42 MAPK-Antikörper	1:1000	TBST	Anti-rabbit 1:3000
Akt-Antikörper	1:1000	TBST	Anti-rabbit 1:3000
eNOS-Antikörper	1:1000	TBST	Anti-rabbit 1:3000
PLB-A1-Antikörper	1:1000	TBST	Anti-mouse 1:5000

Tab. 2.9. Antikörper und Verdünnungen

2.10. Auswertung der Western-Immunoblots

Die schwarzgefärbten Proteinbanden des Röntgenfilmes wurden mit Hilfe des Multi Imager Light Cabinet-Systems densitometrisch erfasst. Für die Konzentrationsreihe der Kontroll-(Pool)-Homogenate wurde eine lineare Regression ermittelt. Die Werte für die aufgetragenen Proben wurden mit Hilfe der Regressionsgraden bestimmt, um einer Vergleichbarkeit unter den Blots herzustellen. Anschließend wurde der Quotient aus phosphoryliertem Protein zu Gesamtprotein gebildet (p-Akt/Akt, p-eNOS/eNOS, p-p44/42-MAPK/p44/42-MAPK, p-PLB/PLB), um den Phosphorylierungsgrad der untersuchten Proteine zu ermitteln. Der Wert der mit Ucn 2, FSK, Okadasäure und Cyclosporin A behandelten Proben wurde auf den Wert der unbehandelten Proben (Kontrollhomogenat = 100%) normalisiert.

2.11. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse der Western-Immunoblots wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Daten wurden mit dem Student-t-Test (FSK-Experimente) oder einer Varianzanalyse (ANOVA) (übrige Experimente) auf signifikante Unterschiede getestet. Bei der Ucn-2-Zeitreihe wurde eine Einweg-Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt, gefolgt von einem Test nach Dunnett mit der unbehandelten Probe als Kontrolle. Bei den Experimenten mit Okadasäure und Cyclosporin A wurde eine Einweg-Varianzanalyse gefolgt von einem Newman-Keuls-Test durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

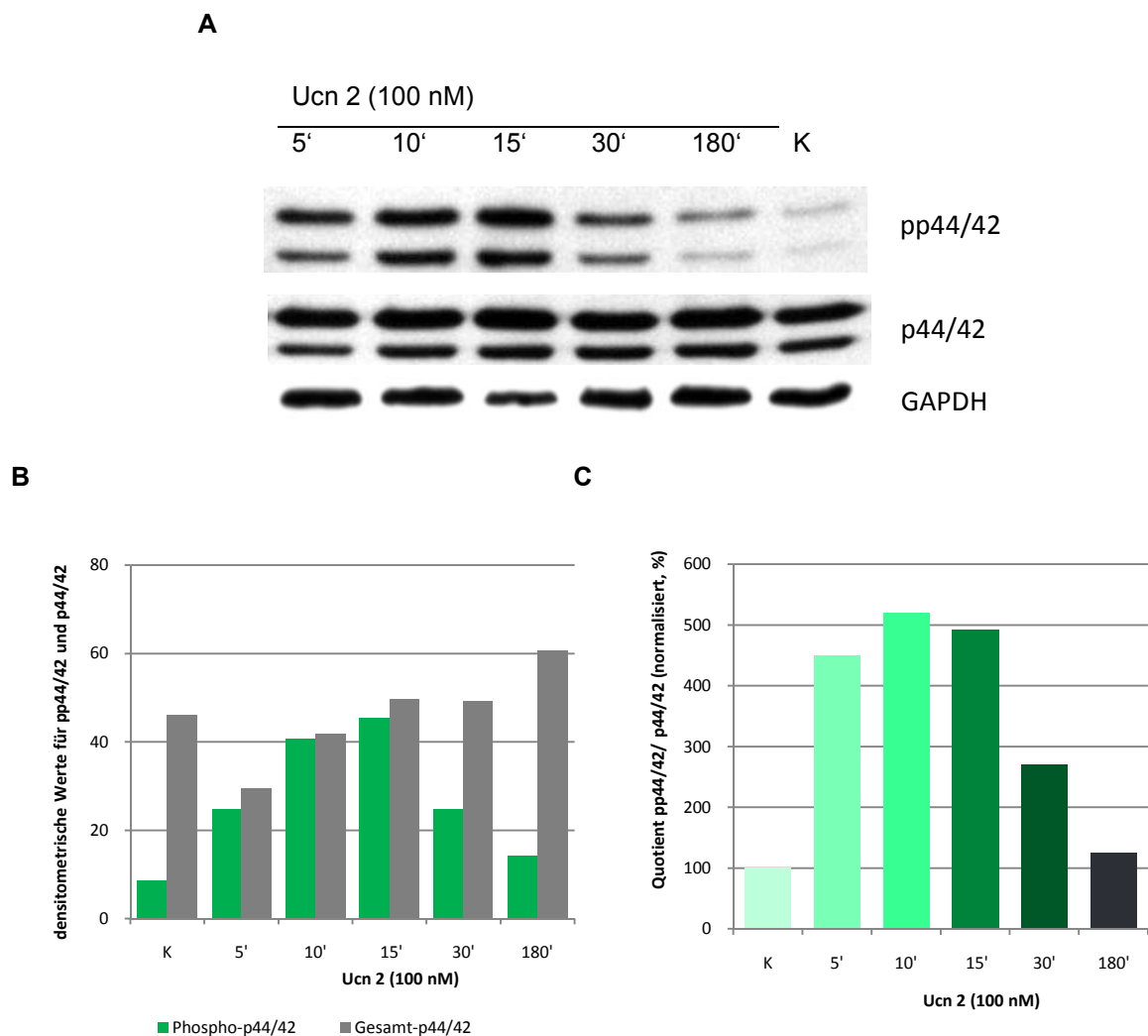
3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass Ucn 2 den MEK1/2-p44/42-MAPK-, den Akt/eNOS-, den cAMP/PKA- und den Ca^{2+} /Calmodulin/CaMKII-Signalweg aktiviert. Weiterhin wurde die Bedeutung der Protein-Phosphatasen PP1, PP2A und PP2B für die Ucn-2-vermittelte Phosphorylierung von Zielproteinen untersucht.

3.1. Western-Blot-Untersuchungen zur Ucn-2-vermittelten Phosphorylierung von Akt, eNOS, p44/42-MAPK und PLB

Für die Versuchsreihen wurden die Kaninchen-Kardiomyozyten für unterschiedliche Zeiten mit 100 nM Ucn 2 behandelt

3.1.1. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von p44/42-MAPK nach Ucn-2-Gabe



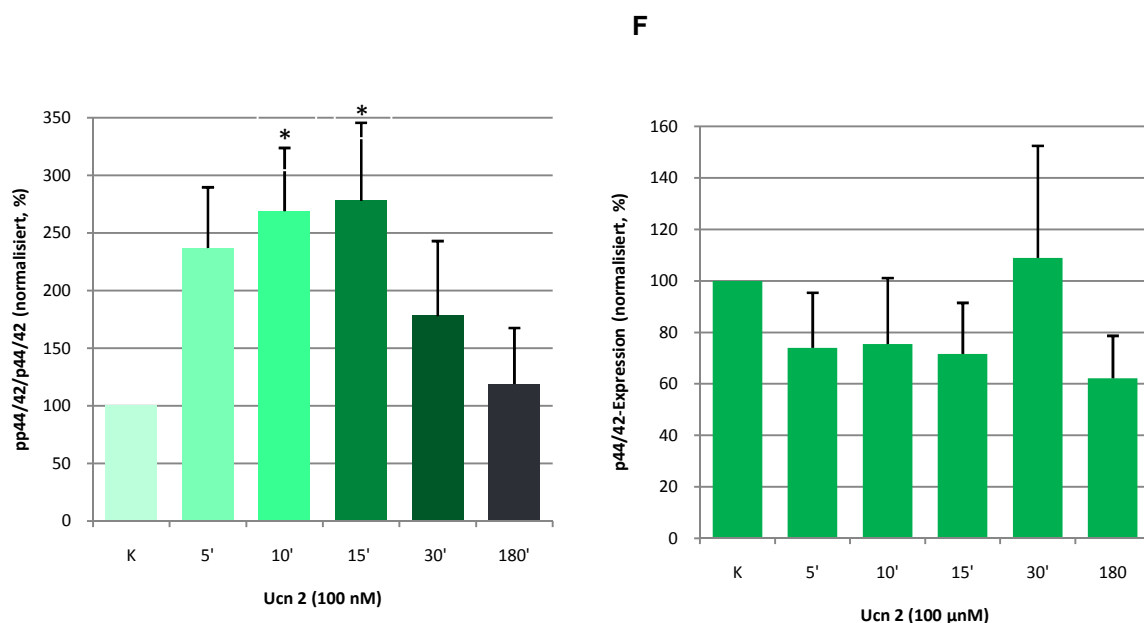


Abb. 3.1. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten p44/42-MAPK-Phosphorylierung

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphorylierte p44/42-MAPK (obere Bande, pp44/42-MAPK), Gesamt-p44/42 (mittlere Bande, p44/42-MAPK) und Gesamt-GAPDH (untere Bande). (B) Auftragung der densitometrisch ermittelten Werte für Phospho-p44/42 (grüner Balken) und Gesamt-p44/42 (grauer Balken). (C) Auftragung der Quotienten Phospho-p44/42/Gesamt-p44/42. (D) Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten p44/42-MAPK -Phosphorylierung von isolierten Kaninchenkardiomyozyten (MW±SEM, n=8). * p<0,05 vs. Kontrolle. (E) Zeitabhängigkeit der p44/42-MAPK-Expression in Gegenwart von Ucn 2

Abb. 3.1.A zeigt einen Original-Western-Blot. Die obere Bande zeigt die Färbung der Membran mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen p44/42-MAPK (pp44/42). In der mittleren Reihe wurde die Bande derselben Membran mit einem Antikörper gegen p44/42-MAPK gefärbt, der nicht zwischen phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Protein unterscheidet und somit die Gesamtproteinmenge von p44/42-MAPK bestimmt. Die mittlere Gesamtproteinbande war nahezu gleich stark, d.h. dass die p44/42-MAPK-Expression durch Ucn 2 nicht verändert wurde. Die Phosphorylierung änderte sich zeitabhängig während der Inkubationszeit mit Ucn 2. Es lässt sich ein kontinuierlicher Anstieg mit einem Maximum nach 15 Minuten erkennen mit einem anschließenden Abfall nach 30 und 180 Minuten.

Als Kontrolle wurde der untere Teil derselben Membran mit einem Antikörper gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gefärbt. GAPDH, ein Enzym der Glykolyse, kommt ubiquitär in allen Geweben vor. Seine Expression wird kaum reguliert und dient daher bei Western-Blot-Untersuchungen als Kontrolle für die Proteinbeladung. Die GAPDH-Banden waren ebenfalls nahezu gleich stark, d.h. dass die GAPDH-Expression durch Ucn 2 ebenfalls nicht beeinflusst wurde und dass die Proteinbeladung der einzelnen Proben gleichmäßig war.

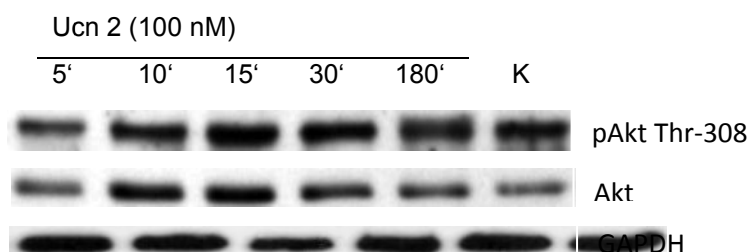
Die unterschiedlichen Schwärzungsgrade der p44/42-Banden dieses Versuches wurden densitometrisch erfasst. Sie sind exemplarisch in Abb. 3.1.B dargestellt. Man erkennt, dass der Gesamt-p44/42-Gehalt (graue Balken) der einzelnen Proben etwa gleich groß war. Weiterhin zeigt sich die zeitabhängige Phosphorylierungserhöhung durch Ucn 2 (grüne Balken). Zur Quantifizierung der Ucn-2-induzierten Phosphorylierung von p44/42-MAPK wurde der Quotient aus phosphoryliertem p44/42-MAPK zu Gesamt-p44/42-MAPK gebildet (Abb. 3.1.C).

In Abb. 3.1.D sind die Daten von 8 verschiedenen Isolierungen zusammengefasst. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Die Ucn-2-Gabe führte zu einem zeitabhängigen Anstieg der Phosphorylierung von p44/42-MAPK. Nach 5-15 Minuten zeigte sich eine Phosphorylierungserhöhung auf max. $269 \pm 55\%$ ($n=8$, $p < 0,05$), dann eine Verringerung nach 30 Minuten bis hin zum Ausgangswert nach 180 Minuten ($119 \pm 49\%$, $n=8$, $p = \text{N. S.}$).

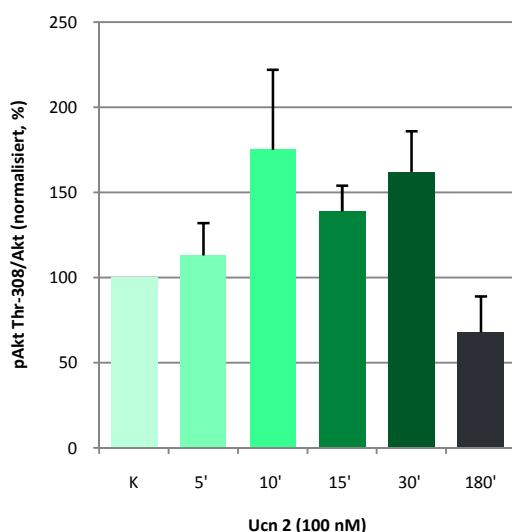
In Abb. 3.1.E sind die relativen Änderungen der p44/42-MAPK-Expression, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle, dargestellt. Es ist keine Ucn 2-vermittelte Änderung der Expression erkennbar.

3.1.2. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von Akt am Thr-308 nach Ucn-2-Gabe

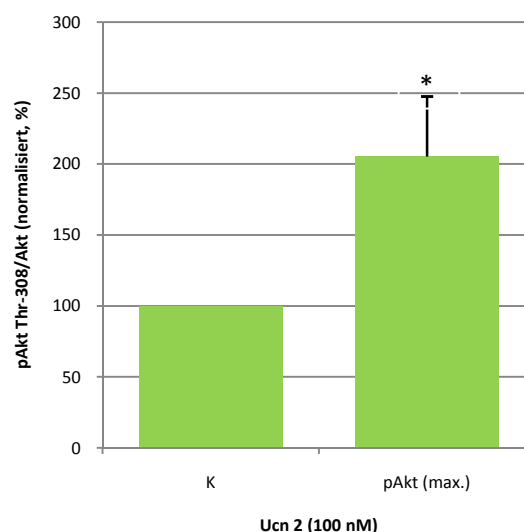
A



B



C



D

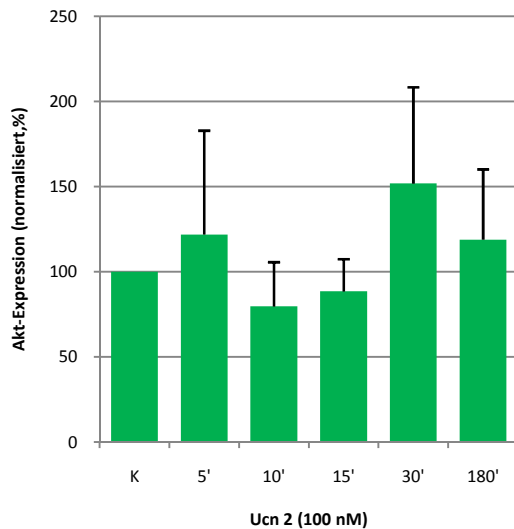


Abb. 3.2. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten Akt-Phosphorylierung am Threonin-308

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Akt (obere Bande, pAkt Threonin-308) und Gesamt-Akt (untere Bande, Akt) (B) Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten Akt-Phosphorylierung am Threonin-308 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten ($MW \pm SEM$, $n=7$) (C) Maximale Akt-Phosphorylierung am Threonin-308. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (D) Zeitabhängigkeit der Akt-Expression in Gegenwart von Ucn 2

Abb. 3.2.A zeigt einen Original-Western-Blot. Die obere Bande zeigt die Färbung mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen Akt Thr-308 (pAkt; Phosphorylierungsstelle Threonin-308). In der unteren Reihe wurde mit einem Antikörper gefärbt, der die Gesamtproteinmenge von Akt anzeigt. Die Phosphorylierung des Threonin-308 veränderte sich mit der Dauer der Ucn-2-Gabe. Die Phosphorylierung nahm zunächst mit steigender Inkubationsdauer zu. Nach 10-30 Minuten wurde ein Maximum erreicht und nach 180 Minuten sank die Phosphorylierung ab.

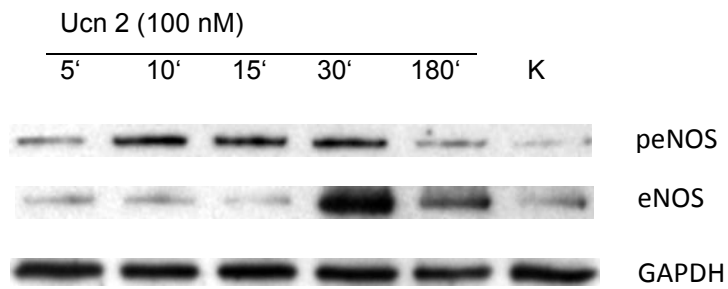
In Abb. 3.2.B sind die Daten von 7 verschiedenen Isolierungen zusammengefasst. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Die Ucn 2-Gabe führte zu einer zeitabhängigen Steigerung der Phosphorylierung am Thr-308 nach 10-180 Minuten mit einem maximalen Wert nach 10 Minuten von $175 \pm 47\%$ ($n=7$, $p \geq 0,05$).

Abb. 3.2.C zeigt die maximalen Phosphorylierungswerte von pAkt am Threonin-308. Diese Darstellungsweise wurde gewählt, da der zeitabhängige Anstieg der Akt-Phosphorylierung variabel war. In den 7 Messreihen wurde zweimal ein Maximum nach 10 Minuten, dreimal ein Maximum nach 15 Minuten und in zweimal ein Maximum nach 30 Minuten beobachtet und in die Wertung mit einbezogen. Das Ergebnis zeigt, dass Ucn 2 die Akt-Phosphorylierung am Thr-308 signifikant auf $203 \pm 43\%$ ($n=7$, $p \leq 0,05$) erhöhte.

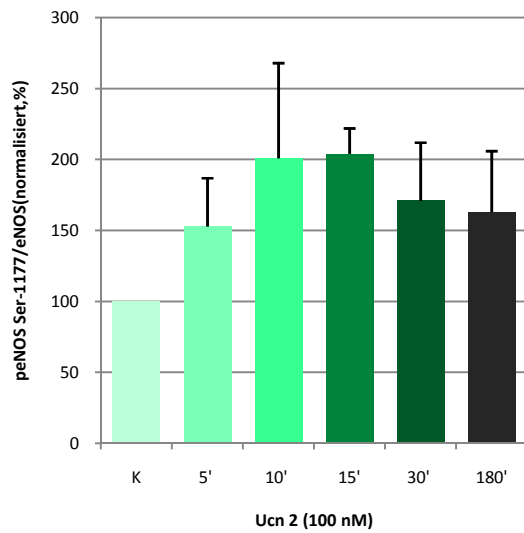
In Abb. 3.2.D sind die relativen Änderungen der Akt-Expression, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle, dargestellt. Es ist keine wesentliche Änderung der Expression nach Ucn-2-Gabe erkennbar.

3.1.4. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von eNOS am Ser-1177 nach Ucn-2-Gabe

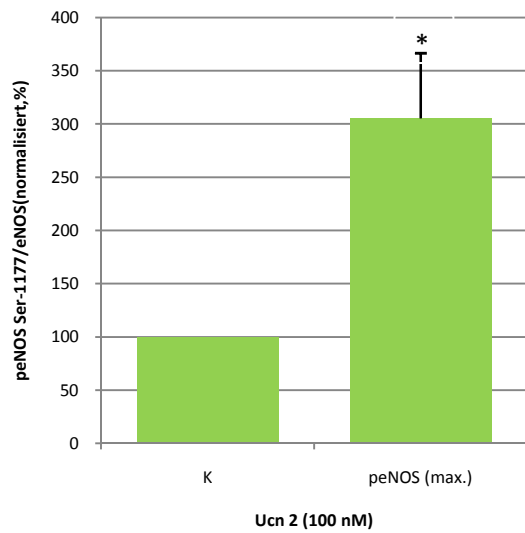
A



B



C



D

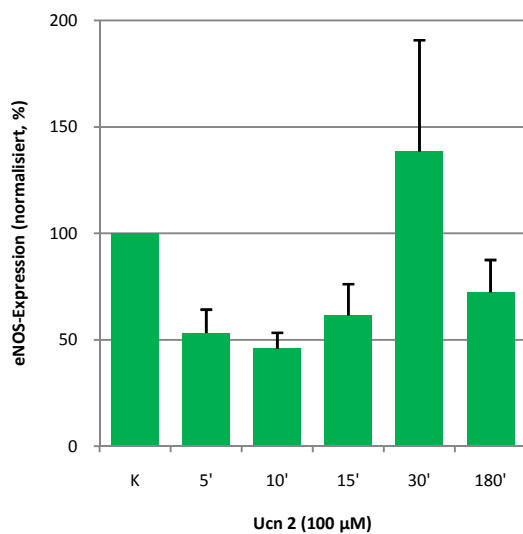


Abb. 3.3. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten eNOS-Phosphorylierung am Serin-1177

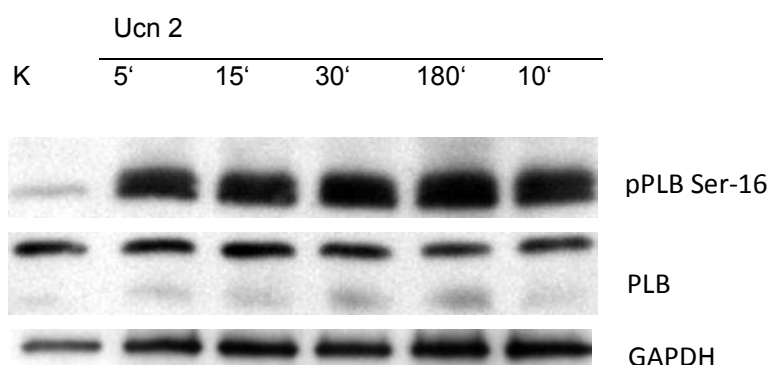
(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphoryliertes eNOS (obere Bande, peNOS Ser-1177) und Gesamt-Akt (untere Bande, eNOS). (B) Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten eNOS-Phosphorylierung am Serin-1177 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten ($MW \pm SEM$, $n=5$). (C) Maximale eNOS-Phosphorylierung am Ser-1177. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (D) Zeitabhängigkeit der eNOS-Expression in Gegenwart von Ucn 2

In Abb. 3.3.A ist einen Original-Blot des eNOS-Proteins zu sehen. Die obere Bande zeigt die phosphorylierte eNOS (peNOS; Phosphorylierungsstelle am Serin-1177). In der unteren Bande ist das Gesamtprotein (eNOS) dargestellt. Ucn 2 führte zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung des Serin-1177 mit einem maximalen Anstieg nach 10-30 Minuten und einer Abnahme nach 180 Minuten.

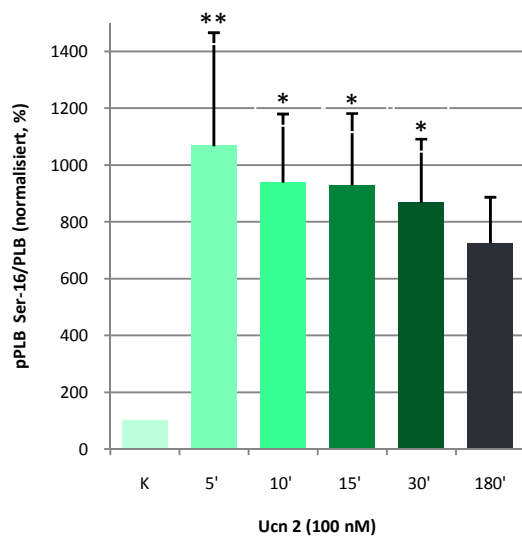
Abb. 3.3.B fasst die Daten von 5 verschiedenen Experimenten zusammen. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Es zeigte sich, dass die Ucn-2-Gabe zu einem zeitabhängigen Phosphorylierungsanstieg der eNOS führte mit einem Maximum nach 10 bis 30 Minuten von etwa 200%. Dieser Anstieg war jedoch statistisch nicht signifikant, vermutlich aufgrund des variablen zeitlichen Verlaufs in den einzelnen Messreihen.

Abb. 3.3.C zeigt die maximale Phosphorylierung von eNOS am Ser-1177. Hierbei wurde in den 5 Messreihen einmal die maximale Phosphorylierung nach 5 Minuten, zweimal nach 10 Minuten, einmal nach 15 Minuten und einmal nach 30 Minuten beobachtet und in die Wertung miteinbezogen. Ucn 2 bewirkte einen signifikante Phosphorylierungsanstieg von eNOS am Ser-1177 auf $306 \pm 67\%$ ($n=5$, $p \leq 0,05$).

Abb. 3.3.D stellt die entsprechenden Daten der eNOS-Expression in Gegenwart von Ucn 2 dar. Die relative Änderung der Expression wurde auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Es ist zu erkennen, dass es keine signifikanten Änderungen gibt.

3.1.5. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von PLB am Ser-16 nach Ucn-2-Gabe**A**

B



C

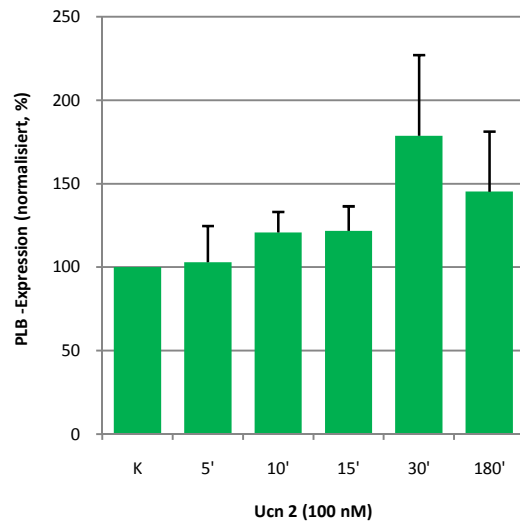


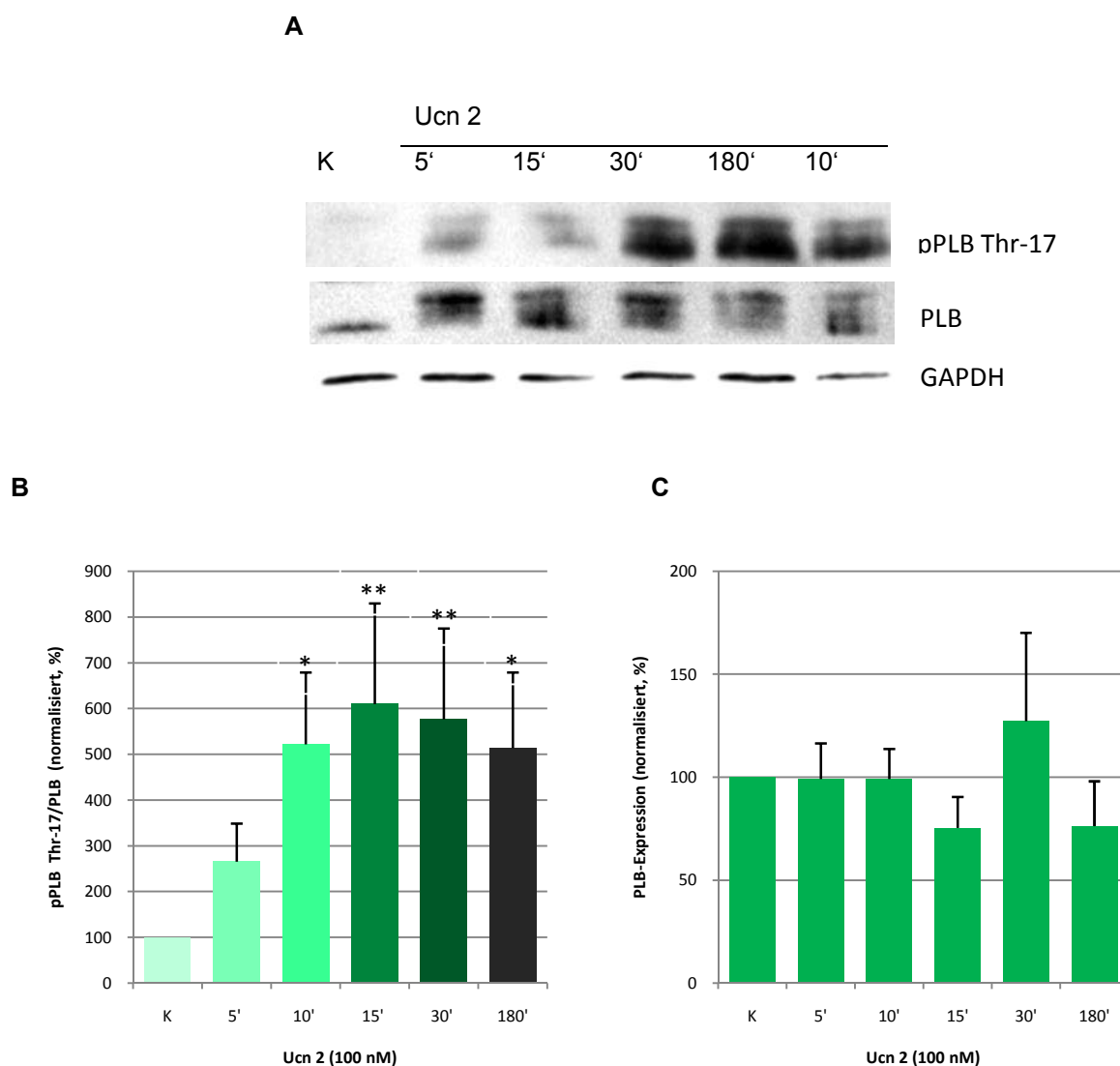
Abb. 3.4. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten PLB-Phosphorylierung am Serin-16

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphoryliertes PLB (obere Bande, pPLB Ser-16), Gesamt-PLB (mittlere Bande, PLB) und Gesamt-GAPDH (untere Bande) (B) Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten PLB-Phosphorylierung am Serin-16 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten ($MW \pm SEM$, $n=8$). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle. (C) Zeitabhängigkeit der PLB-Expression in Gegenwart von Ucn 2

Abb. 3.4.A zeigt einen Original-Western-Blot. Die obere Bande zeigt das phosphorylierte PLB Ser-16 (pPLB; Phosphorylierungsstelle am Serin-16). Ucn 2 bewirkte eine zeitabhängige starke Phosphorylierungszunahme über den gesamten Zeitraum. In der mittleren Bande ist das Gesamtprotein (PLB) dargestellt. Diese Gesamtproteinbande war nahezu gleich stark, d.h. dass die PLB-Expression durch Ucn 2 nicht verändert wurde. Die GAPDH-Banden waren ebenfalls nahezu gleich stark, d.h. dass die GAPDH-Expression durch Ucn 2 ebenfalls nicht beeinflusst wurde und dass die Proteinbeladung der einzelnen Proben gleichmäßig war.

Abb. 3.4.B fasst die Daten von 8 verschiedenen Experimenten zusammen. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Es zeigte sich, dass die Ucn-2-Gabe zu einem sehr starken Anstieg der Phosphorylierung des PLB am Ser-16 über den gesamten Zeitraum auf etwa 700-1100% der Kontrolle führte.

Abb. 3.4.C stellt die entsprechenden Daten der PLB-Expression in Gegenwart von Ucn 2 dar. Die relative Änderung der Expression wurde auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Es ist keine Änderung der Expression erkennbar.

3.1.6. Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung von PLB am Thr-17 nach Ucn-2-Gabe**Abb. 3.5. Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten PLB-Phosphorylierung am Threonin-17**

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphoryliertes PLB (obere Bande, pPLB Thr-17), Gesamt-PLB (mittlere Bande, PLB) und Gesamt-GAPDH (untere Bande). (B) Zeitabhängigkeit der Ucn-2-induzierten PLB-Phosphorylierung am Threonin-17 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten ($MW \pm SEM$, $n=8$). * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle. ** $p \leq 0,01$ (C) Zeitabhängigkeit der PLB-Expression in Gegenwart von Ucn 2

Abb. 3.5.A zeigt einen Original-Western-Blot. Die obere Bande zeigt das phosphorylierte PLB Thr-17 (pPLB; Phosphorylierungsstelle am Threonin-17). In der mittleren Bande ist das Gesamtprotein (PLB) dargestellt. Diese Gesamtproteinbande war nahezu gleich stark, d.h. dass die PLB-Expression durch Ucn 2 nicht verändert wurde. Ucn 2 bewirkte eine zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung am Threonin-17 über den gesamten Zeitraum mit einem Maximum nach 10-30 Minuten.

Abb. 3.5.B fasst die Daten von 8 verschiedenen Experimenten zusammen. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Es zeigte sich, dass die Ucn-2-Gabe zu einer zeitabhängigen Steigerung der Phosphorylierung des PLB am Thr-17 führte. Die Phosphorylierung stieg auf etwa 250-600% der Kontrolle an. Das Maximum nach

nach 15 bis 30 Minuten auf.

Abb. 3.5.C stellt die entsprechenden Daten der PLB-Expression in Gegenwart von Ucn 2 dar. Die relative Änderung der Expression wurde auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Es ist keine Expressionsänderung erkennbar.

3.2. Western-Blot-Untersuchungen zur FSK-vermittelten Phosphorylierung von Akt, eNOS, p44/42-MAPK und PLB

Für diese Versuchsreihen wurden die Kaninchen-Kardiomyozyten für 30 Minuten mit 10 μ M FSK behandelt, um den cAMP/PKA-Signalweg zu stimulieren.

3.2.1. Phosphorylierung von p44/42-MAPK nach FSK-Gabe

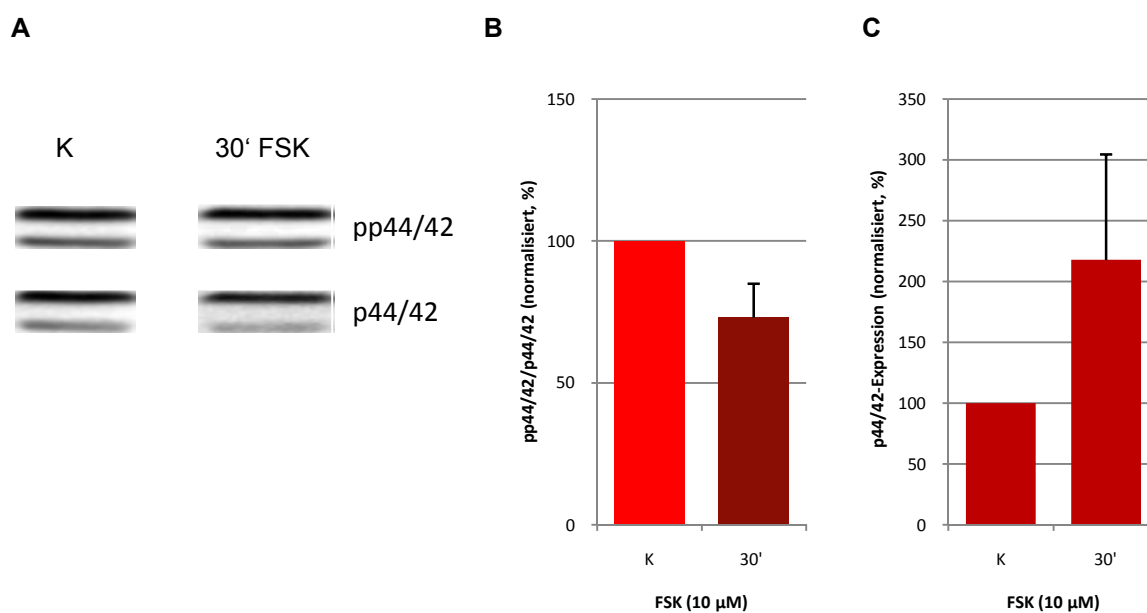


Abb. 3.6. p44/42-MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von FSK-Gabe

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphorylierte p44/42-MAPK (obere Bande, pp44/42-MAPK) und Gesamt-p44/42-MAPK (untere Bande, p44/42-MAPK) (B) p44/42-MAPK-Phosphorylierung von isolierten Kaninchenkardiomyozyten in Gegenwart von FSK ($MW \pm SEM$, $n=8$) (C) p44/42-MAPK-Expression in Gegenwart von FSK.

Abb. 3.6.A zeigt einen Original-Western-Blot. Die oberen Banden zeigen die Färbung mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen p44/42-MAPK (pp44/42). Die Phosphorylierung änderte sich in Gegenwart von FSK nicht. In der unteren Reihe wurde mit einem Antikörper gegen p44/42-MAPK gefärbt, der die Gesamtproteinmenge von p44/42-MAPK detektiert. Die untere Gesamtproteinbande blieb nach FSK-Gabe nahezu gleich stark, d.h. dass die p44/42-MAPK-Expression durch FSK nicht verändert wurde.

In Abb. 3.6.B sind die Daten aus 8 verschiedenen Isolierungen zusammengefasst. Die relativen

Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Die FSK-Gabe führte nach 30 Minuten zu keiner wesentlichen Änderung der Phosphorylierung der p44/42-MAPK.

In Abb. 3.6.C sind die relativen Änderungen der p44/42-MAPK-Expression, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle, dargestellt. Es ist ein Trend zu einem Anstieg erkennbar, der jedoch nicht signifikant ist.

3.2.2. Phosphorylierung von Akt am Ser-473 nach FSK-Gabe

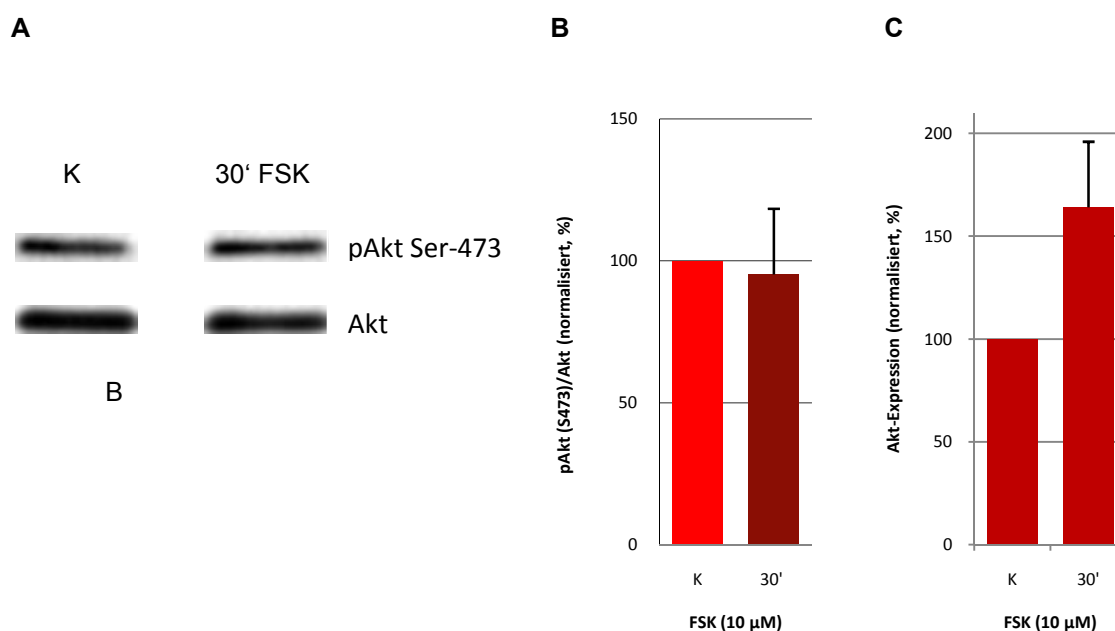
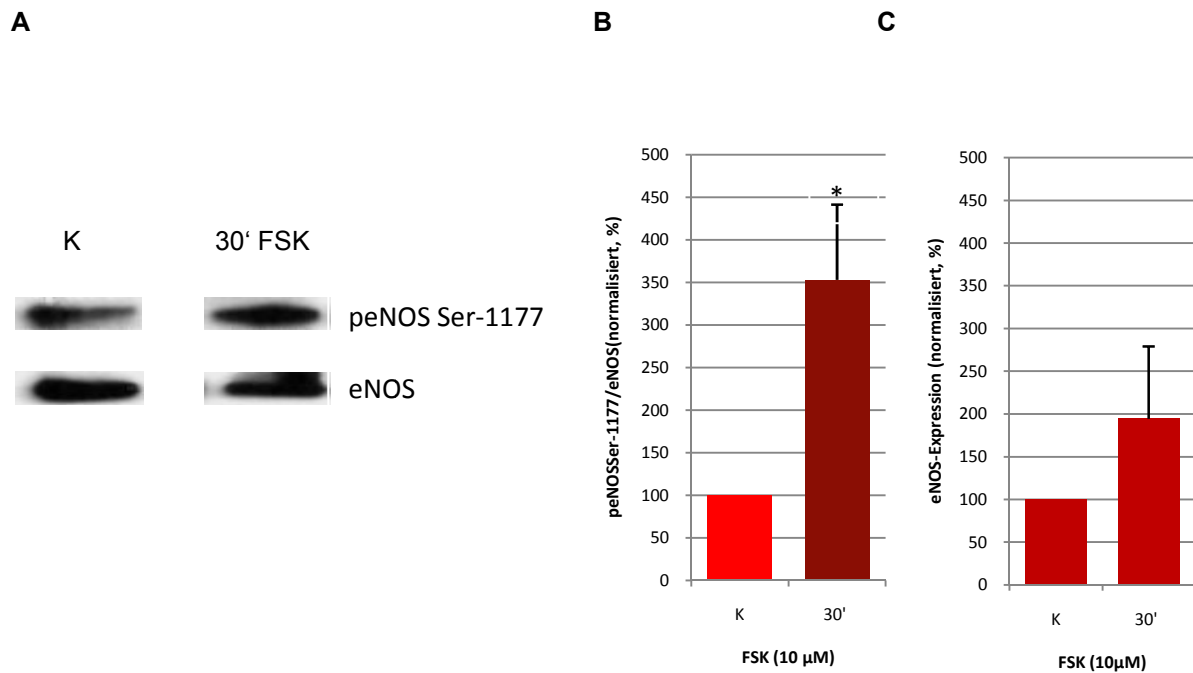


Abb. 3.7. Akt-Phosphorylierung am Serin-473 in Gegenwart von FSK

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Akt (obere Bande, pAkt Ser-473) und Gesamt-Akt (untere Bande, Akt). (B) Akt-Phosphorylierung am Serin-473 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten in Gegenwart von FSK ($MW \pm SEM$, $n=7$). (C) Akt-Expression in Gegenwart von FSK

Abb. 3.7.A zeigt einen Original-Western-Blot. Die obere Bande zeigt die Färbung mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen Akt (pAkt; Phosphorylierungsstelle Serin-473). In der unteren Reihe wurde mit einem Antikörper gegen Akt gefärbt, der die Gesamtproteinmenge von Akt anzeigt. Die untere Gesamtproteinbande war nahezu gleich stark, d.h. dass die Akt-Expression durch FSK nicht verändert wurde. Die Phosphorylierung des Serin-473 variierte kaum. Die Phosphorylierungsstärke war bei Kontrollbedingungen und 30 Minuten nach FSK-Gabe fast gleich. In Abb. 3.7.B sind die Daten aus 7 verschiedenen Isolierungen zusammengefasst. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Die FSK-Gabe führte zu keiner signifikanten Änderungen der Phosphorylierung des Ser-473.

In Abb. 3.7.C sind die relativen Änderungen der Akt-Expression, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle, dargestellt. Es ist keine signifikante Änderung der Expression erkennbar.

3.2.3. Phosphorylierung von eNOS am Ser-1177 nach FSK-Gabe**Abb. 3.8. eNOS-Phosphorylierung am Serin-1177 in Gegenwart von FSK**

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphorylierte eNOS (obere Bande, peNOS Ser-1177) und Gesamt-eNOS (untere Bande, eNOS). (B) eNOS-Phosphorylierung am Serin-1177 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten in Gegenwart von FSK ($MW \pm SEM$, $n=6$). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (C) eNOS-Expression in Gegenwart von FSK.

Abb. 3.8.A zeigt einen Original-Western-Blot. Die obere Bande zeigt die phosphorylierte eNOS (peNOS; Phosphorylierungsstelle am Serin-1177). In der unteren Bande ist das Gesamtprotein (eNOS) dargestellt. FSK führte zu einer erhöhten Phosphorylierung des Serin-1177.

Abb. 3.8.B fasst die Daten von 6 verschiedenen Experimenten zusammen. Die relative Änderung des Phosphorylierungsgrades wurde normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Es zeigte sich, dass die FSK-Gabe zu einer erhöhten Phosphorylierung der eNOS am Ser-1177 führte. Der Anstieg nach 30 Minuten auf einen Wert von $353 \pm 88\%$ ($n=6$, $p \leq 0,05$) war signifikant.

Abb. 3.8.C stellt die entsprechenden Daten der eNOS-Expression in Gegenwart von FSK dar. Die relative Änderung der Expression wurde auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Es ist keine signifikante Änderung der Expression erkennbar.

3.2.4. Phosphorylierung von PLB am Ser-16 nach FSK-Gabe

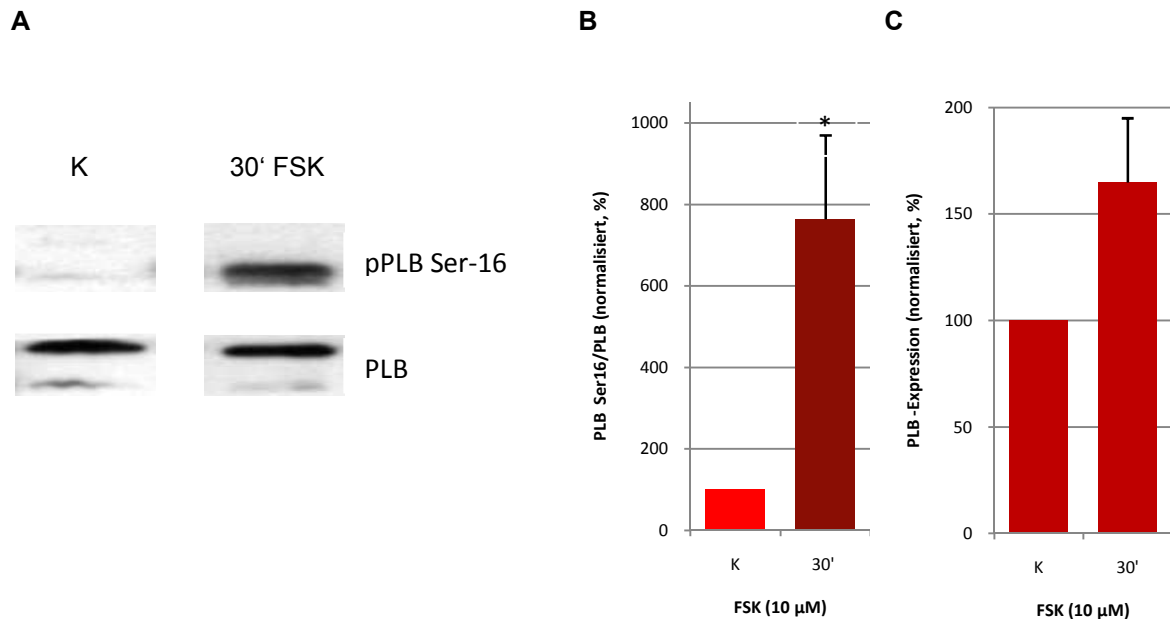


Abb. 3.9. PLB-Phosphorylierung am Serin-16 in Gegenwart von FSK

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphoryliertes PLB (obere Bande, pPLB Ser-16), Gesamt-PLB (untere Bande, PLB)

(B) PLB-Phosphorylierung am Serin-16 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten in Gegenwart von FSK (MW \pm SEM, n=8).

(C) PLB-Expression in Gegenwart von FSK

In der Abb. 3.9.A ist ein Original-Western-Blot von PLB zu sehen. Die obere Bande zeigt das am Ser-16 phosphorylierte PLB (pPLB; Phosphorylierungsstelle am Serin-16). In der unteren Bande ist das Gesamtprotein (PLB) dargestellt. Die untere Gesamtproteinbande blieb nach FSK-Gabe nahezu gleich stark, d.h. dass die PLB-Expression durch FSK nicht verändert wurde. FSK bewirkte jedoch eine starke Zunahme der Phosphorylierung am PLB Ser-16.

Abb. 3.9.B fasst die Daten von 8 verschiedenen Experimenten zusammen. Die relative Änderung des Phosphorylierungsgrades wurde normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Es zeigte sich, dass die FSK-Gabe zu einem starken Anstieg der Phosphorylierung des PLB am Ser-16 nach 30 Minuten führte von 763 \pm 206% (n=8, p \leq 0,05).

Abb. 3.9.C stellt die entsprechenden Daten der PLB-Expression in Gegenwart von FSK dar. Die relative Änderung der Expression wurde auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Es ist keine signifikante Expressionsänderung durch FSK erkennbar.

3.2.5. Phosphorylierung von PLB am Thr-17 nach FSK-Gabe

A

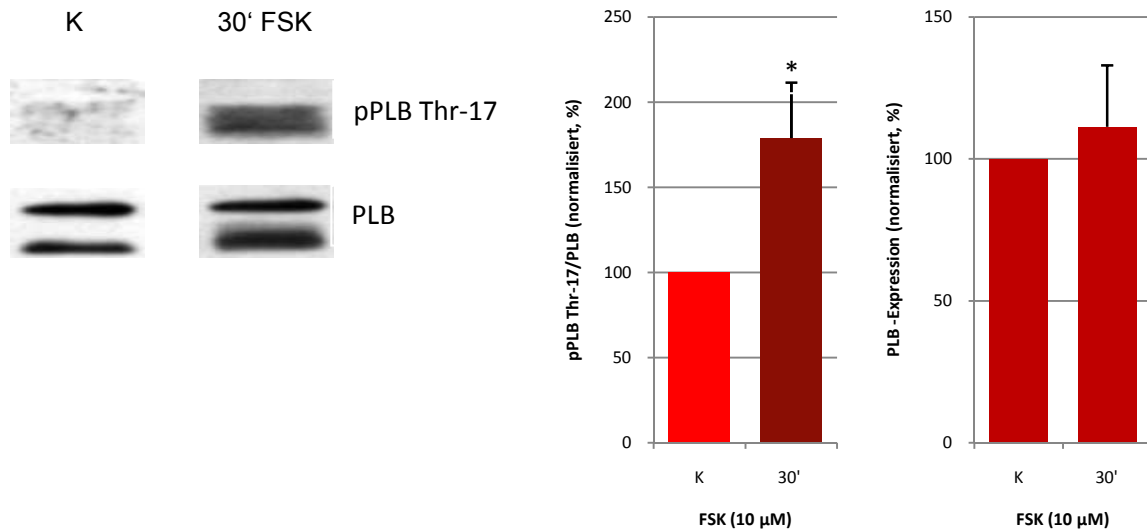


Abb. 3.10. PLB-Phosphorylierung am Threonin-17 in Gegenwart von FSK

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphoryliertes PLB (obere Bande, pPLB Thr-17), Gesamt-PLB (untere Bande, PLB)
 (B) PLB-Phosphorylierung am Threonin-17 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten in Gegenwart von FSK ($MW \pm SEM$, $n=7$).
 * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle. (C) PLB-Expression in Gegenwart von FSK.

In der Abb. 3.10.A ist ein Original-Western-Blot von PLB zu sehen. Die obere Bande zeigt das am Thr-17 phosphorylierte PLB (pPLB; Phosphorylierungsstelle am Threonin-17). In der unteren Bande ist das Gesamtprotein (PLB) dargestellt. Die untere Gesamtproteinbande war zu allen Zeitpunkten nach FSK-Gabe nahezu gleich stark, d.h. dass die PLB-Expression durch FSK nicht verändert wurde. FSK bewirkte eine Phosphorylierungszunahme am Thr-17 nach 30 Minuten.

Abb. 3.10.B fasst die Daten von 7 verschiedenen Experimenten zusammen. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Es zeigte sich, dass die FSK-Gabe zu einem starken Anstieg der Phosphorylierung des PLB am Thr-17 führte auf etwa 180% der Kontrolle.

Abb. 3.10.C stellt die entsprechenden Daten der PLB-Expression in Gegenwart von FSK dar. Es ist keine Änderung der Expression durch FSK erkennbar.

3.3. Western-Blot-Untersuchungen zur Änderung der Ucn-2-vermittelten Phosphorylierung von PLB nach OA- und CsA-Gabe

Für diese Versuchsreihen wurden die Kaninchen-Kardiomyozyten für 30 Minuten mit einem Protein-Phosphatase-Inhibitor, Okadasäure (OA, 1 μM) oder Cyclosporin A (CsA, 0,1 μM), behandelt und anschließend für 30 Minuten mit Ucn 2 (100 nM) inkubiert. Außerdem wurde je Versuchsreihe eine Kulturschale mit Myozyten nur mit Ucn 2 behandelt (ohne Phosphatasehemmstoffe) und eine Kulturschale blieb unbehandelt (Kontrolle).

3.3.1. Wirkung von OA und CsA auf die Ucn-2-induzierte PLB-Phosphorylierung am Ser-16

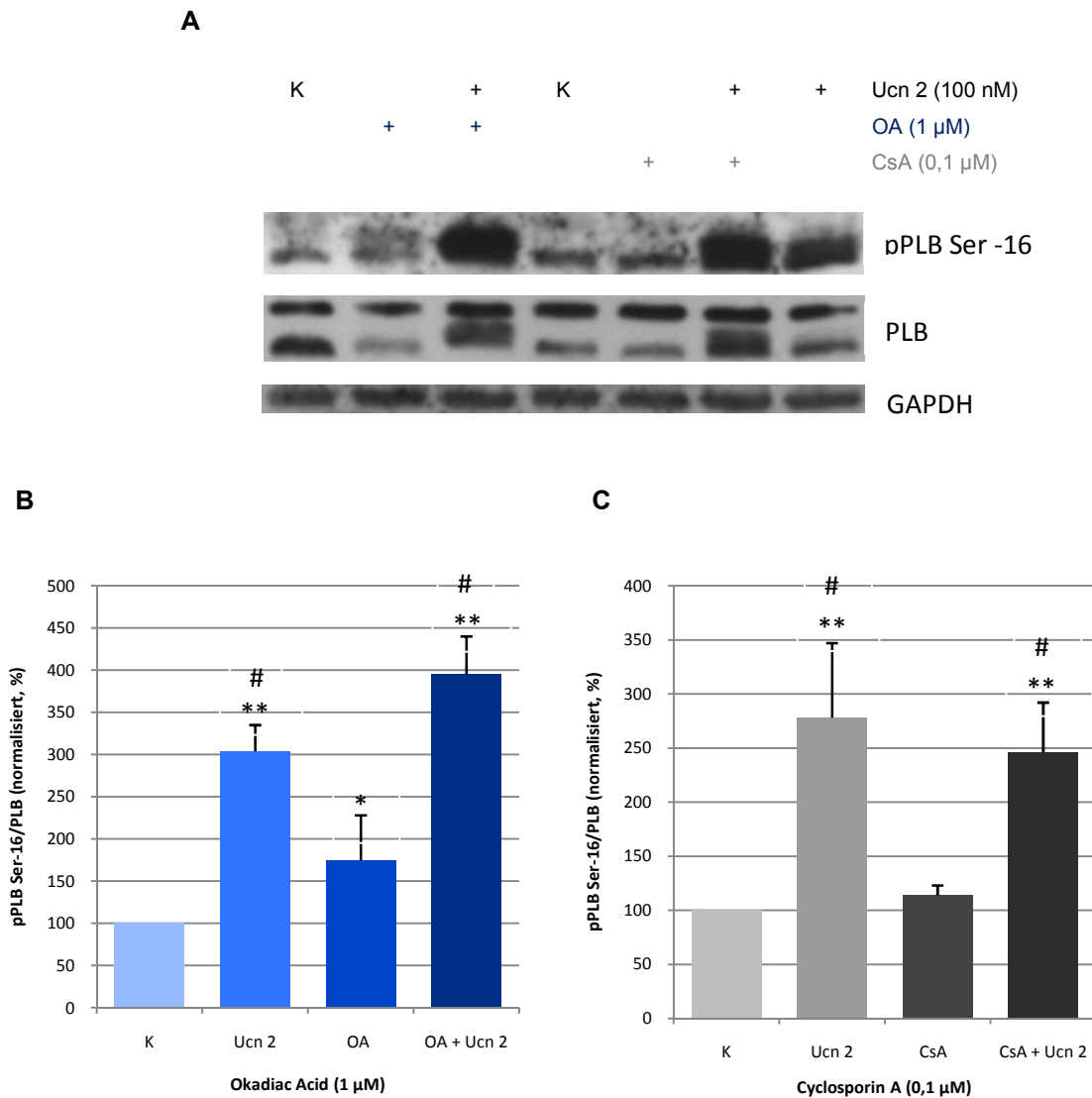
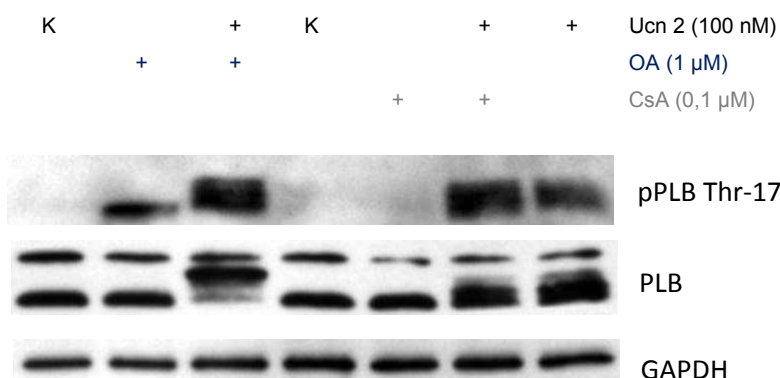


Abb. 3.11. Einfluss von OA und CsA auf die Ucn-2-vermittelte PLB-Phosphorylierung am Ser-16

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphoryliertes PLB (obere Bande, pPLB Serin-16), Gesamt-PLB (mittlere Bande, PLB) und Gesamt-GAPDH (untere Bande) (B) Wirkung von OA auf die Ucn-2-induzierte PLB-Phosphorylierung am Ser-16 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten ($MW \pm SEM$, $n=12$) (C) Wirkung von CsA auf die Ucn-2-induzierte PLB-Phosphorylierung am Ser-16 ($MW \pm SEM$, $n=16$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ OA bzw. CsA.

Abb. 3.11.A zeigt einen Original-Western-Blot von PLB. Die obere Bande zeigt das am Ser-16 phosphorylierte PLB (pPLB; Phosphorylierungsstelle am Serin-16). In der mittleren Bande ist das Gesamtprotein (PLB) dargestellt. Dieses war in allen Proben nahezu gleichstark. Dies spricht dafür, dass die PLB-Expression weder durch Ucn 2 noch durch die Phosphataseinhibitoren verändert wurde. Ucn 2 bewirkte eine Zunahme der Phosphorylierung von PLB am Ser-16 in An- und Abwesenheit der Blocker. OA allein erhöhte die Phosphorylierung im Gegensatz zu CsA. Eine weitere Phosphorylierungszunahme bei gleichzeitiger Gabe von OA und Ucn 2 und bei CsA und Ucn 2 ist erkennbar.

Abb. 3.11.B fasst die Daten von 12 verschiedenen Experimenten zusammen. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Es zeigte sich, dass die alleinige Ucn-2-Gabe zu einem Phosphorylierungsanstieg des PLB am Ser-16 führte (vgl. 3.1.5.). OA alleine erhöhte die PLB-Phosphorylierung am Ser-16 signifikant. In Gegenwart von OA erhöhte Ucn 2 die PLB-Phosphorylierung am Ser-16 signifikant stärker als OA allein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PLB-Phosphorylierung am Ser-16 sowohl durch den cAMP/PKA-Signalweg als auch durch eine OA-sensitive Phosphatase reguliert wird. In Abb. 3.11.C sind die Daten von 16 verschiedenen Experimenten mit CsA zusammengefasst. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Die alleinige Ucn-2-Gabe führte zu einem Phosphorylierungsanstieg auf $278 \pm 69\%$ ($p=0,01$). CsA alleine erhöht die Phosphorylierung nicht. In Gegenwart von CsA hatte Ucn 2 keinen zusätzlichen Effekt. Dies spricht gegen eine Beteiligung von CsA-sensitiven Phosphatasen an der Regulierung der PLB-Phosphorylierung am Ser-16.

3.3.2. Wirkung von OA und CsA auf die Ucn-2-induzierte PLB-Phosphorylierung am Thr-17**A**

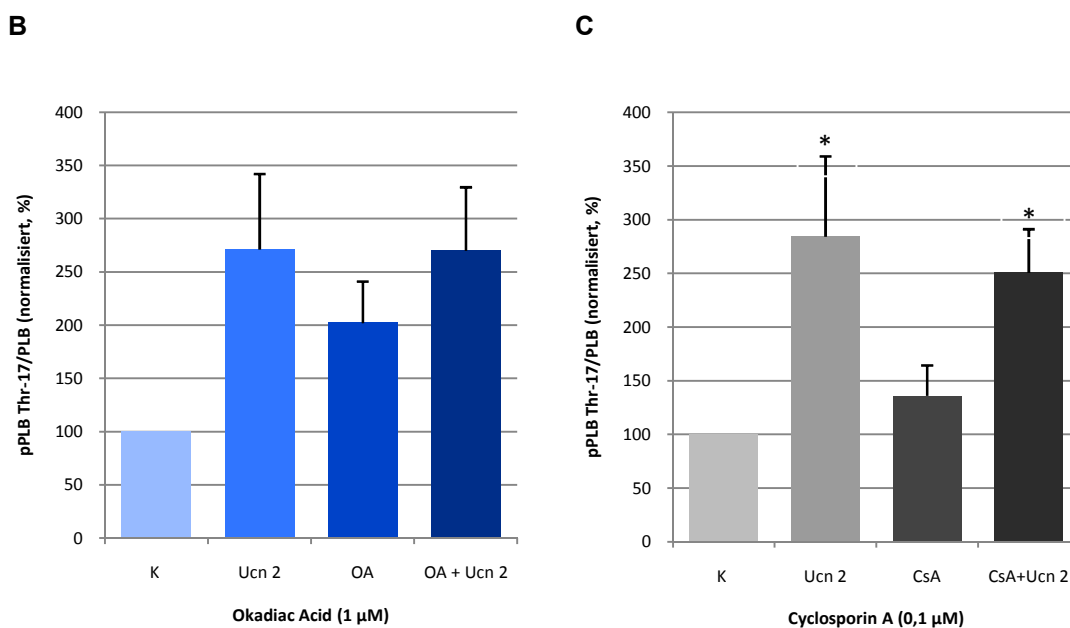


Abb. 3.12. Einfluss von OA und CsA auf die Ucn-2-vermittelte PLB-Phosphorylierung am Thr-17

(A) Western-Blots mit Antikörpern gegen phosphoryliertes PLB (obere Bande, pPLB Threonin), Gesamt-PLB (mittlere Bande, PLB) und Gesamt-GAPDH (untere Bande) (B) Wirkung von OA auf die Ucn-2-induzierte PLB-Phosphorylierung am Thr-17 von isolierten Kaninchenkardiomyozyten ($MW \pm SEM$, $n=6$). (C) Wirkung von CsA auf die Ucn-2-induzierte PLB-Phosphorylierung am Thr-17 ($MW \pm SEM$, $n=8$). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

In der Abb. 3.12.A ist ein Original-Western-Blot von PLB zu sehen. Die obere Bande zeigt das am Thr-17 phosphorylierte PLB (pPLB; Phosphorylierungsstelle am Threonin-17). In der mittleren Bande ist das Gesamtprotein (PLB) dargestellt. Die Banden waren nahezu gleich stark. Dies spricht dafür, dass die PLB-Expression weder durch Ucn 2 noch durch die Phosphataseinhibitoren verändert wurde. Ucn 2 bewirkt eine Phosphorylierungszunahme in An- und Abwesenheit der Blocker. OA allein erhöhte die Phosphorylierung am PLB Thr-17, CsA nicht. Eine weitere Zunahme der Phosphorylierung bei gleichzeitiger Gabe von OA und Ucn 2 sowie CsA und Ucn 2 ist erkennbar.

Abb. 3.12.B fasst die Daten von 6 verschiedenen Experimenten zusammen. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Es zeigte sich, dass die alleinige Ucn-2-Gabe zu einem Phosphorylierungsanstieg des PLB am Thr-17 führte. Auch OA alleine erhöhte die PLB-Phosphorylierung am Thr-17. In Gegenwart von OA führte Ucn 2 nochmals zu einer verstärkten PLB-Phosphorylierung am Thr-17. Die Varianzanalyse zeigte jedoch, dass die Werte nicht statistisch signifikant waren ($p=0,07$).

In Abb. 3.12.C sind die Daten von 8 Experimenten zusammengefasst. Die relativen Änderungen des Phosphorylierungsgrades wurden normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. CsA alleine hatte keinen nennenswerten Effekt. Bei zusätzlicher Gabe von Ucn 2 kam es zu einem Anstieg der PLB-Phosphorylierung am Thr-17, der genauso groß war wie bei alleiniger Gabe von Ucn 2. Somit hatte CsA keine Wirkung auf die PLB-Phosphorylierung am Thr-17.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PLB-Phosphorylierung am Thr-17 im Wesentlichen durch den Ucn 2/cAMP/PKA-Signalweg reguliert wird.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente mit isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten durchgeführt, da diese den Vorteil bieten, unter kontrollierten Versuchsbedingungen arbeiten zu können. Direkte Effekte auf Kardiomyozyten sind somit erkennbar. In Homogenaten aus Herzmuskelgewebe können andere Zellen, die im Herzen angesiedelt sind, wie z.B. Endothelzellen und Fibroblasten, die zu untersuchenden Homogenate verunreinigen. Daher ist es nicht ausgeschlossen, dass in Homogenaten aus Herzmuskelgewebe Expressions- und Phosphorylierungsänderungen von Proteinen durch Änderungen in diesen Zelltypen verursacht werden und nicht durch Änderungen in den Kardiomyozyten.

Die Urocortine werden für einen möglichen Einsatz in der Therapie der Herzinsuffizienz zunehmend interessanter, seitdem Davis et al. am herzinsuffizienten Patienten positive Wirkungen mit Urocortininfusionen erzielen konnten. Hierbei zeigte sich ein Anstieg des Herzminutenvolumens, eine Abnahme des arteriellen Blutdruckes, des systemischen Gefäßwiderstandes und somit auch der kardialen Arbeit (Davis et al. 2007b). Urocortin 2 entfaltet seine Wirkungen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mehrere Signalwege aktivieren können, darunter den cAMP/PKA-, den PKC-, den MEK1/2-p44/42-MAPK-, den PI3K/Akt- und den CaMKII-Signalweg (Brar et al. 2000, Brar et al. 2002, Calderon-Sanchez et al. 2009, Yang et al. 2006).

Welche Signalwege von Urocortinen in Kardiomyozyten aktiviert werden und wie diese Signalwege interagieren, ist bisher nur unzureichend erforscht. Dies war Gegenstand dieser Arbeit.

Alle Versuche wurden an isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten mit einer Ucn-2-Konzentration von 100 nM durchgeführt, da hierfür bereits zuvor eine maximale Wirkung nachgewiesen werden konnte (Yang et al. 2006, Ikeda et al. 2005).

4.1. Signalwege

4.1.1. Der PI3K/Akt/eNOS-Signalweg

In unsere Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Ucn 2 zu einer Phosphorylierung von Akt am Ser-473 und Thr-308 führt und in der Folge Akt die eNOS am Ser-1177 phosphoryliert (Walther 2009).

Der zeitliche Verlauf und weitere Untersuchungen mit PI3K-Inhibitoren ließen vermuten, dass die beiden Proteine zu einem Signalweg gehören.

Dimmeler et al. erkannte als erster in Endothelzellen, dass die eNOS durch Akt direkt phosphoryliert und aktiviert wird und dass dies zu einer vermehrten NO-Produktion führt (Dimmeler et al. 1999). Bei Untersuchung des zugrundeliegenden protektiven Mechanismus von Ischämie und Reperfusionverletzungen im Herzen wurde gezeigt, dass auch die Akt-Aktivierung eine Rolle spielt, indem sie zu einer Phosphorylierung von eNOS am Ser-1177 führt (Bell und Yellon 2003).

Aufgrund dieser Studienergebnisse wurde in dieser Arbeit getestet, ob Ucn 2 zu einer Akt-Phosphorylierung am Thr-308 und zu einer eNOS-Phosphorylierung am Ser-1177 führt und ob diese Proteine zum gleichen Signalweg gehören.

Es konnte eine zeitabhängige Ucn-2-vermittelte Phosphorylierung der Akt am Thr-308 und der eNOS am Serin-1177 festgestellt werden mit einem Maximum nach 10 bis 15 Minuten.

4.1.1.1. Hemmstoffe des PI3K/Akt/eNOS-Signalweges

Funktionellen Daten zeigten die Erhöhung der zellulären NO-Produktion nach Ucn-2-Gabe mit einem ähnlichen Zeitverlauf, wie sie in dieser Arbeit für die Phosphorylierung von Akt und eNOS beschrieben wurde (Walther 2009).

Inhibierte man die PI3K, welche zur Phosphorylierung von Akt am Thr-308 und am Ser-473 führt (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000), durch Ly294002 oder Wortmannin, führte dies zu einer Reduktion der Ucn-2-vermittelten Phosphorylierung von Akt am Ser-473 und Thr-308 sowie eNOS am Ser-1177. Dies zeigt, dass der PI3K/Akt-Signalweg Ucn-2-induziert die eNOS in Kaninchen-Ventrikeldomyozyten phosphoryliert (Walther 2009). Der Ucn-2-vermittelte zeitliche Verlauf der Akt- und eNOS-Phosphorylierung in dieser Arbeit deckt sich mit diesen Ergebnissen. So wurde eine maximale Akt- und eNOS-Phosphorylierung nach etwa 10 bis 30 Minuten beobachtet (diese Arbeit). Funktionelle Daten zur vermehrten eNOS-vermittelten NO-Produktion zeigten ein Maximum nach 20 bis 30 Minuten (Walther 2009).

4.1.1.2. Vergleich von Substanzen, die den PI3K/Akt/eNOS-Signalweg aktivieren

Für Pitavastatin konnte ebenfalls eine Phosphorylierung der Akt am Ser-473 und der eNOS am Ser-1177 in Endothelzellen gezeigt werden. Der Anstieg der Phosphorylierung begann nach 15 bis 30 Minuten und erreichte ein Maximum nach 30 Minuten (Wang J et al. 2005). In dieser Arbeit hingegen zeigte sich bereits nach 5 Minuten eine Ucn-2-induzierte Phosphorylierungserhöhung beider Proteine mit einem Maximum nach 10-15 Minuten.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass Ucn 2 schneller wirkt als Pitavastatin.

Pitavastatin induzierte zusätzlich eine Steigerung der eNOS-Expression (Tokoro et al. 2004), was in dieser Arbeit weder für Ucn 2 noch für FSK nachgewiesen werden konnte.

Es konnte schon in vorhergehenden Studien in kleinen Koronargefäßen gezeigt werden, dass FSK, ein direkter Aktivator der Adenylat-Zyklase, zu einer Steigerung der eNOS-Phosphorylierung am Ser-1177 führt. Dies war verbunden mit einer Akt-Phosphorylierung am Ser-473 und Thr-308 mit einem Maximum nach 2 Minuten und einem signifikanten Abfall der Phosphorylierung bereits nach 5 Minuten. Die eNOS-Phosphorylierung erreichte ihr Maximum 5 Minuten nach FSK-Gabe (Zhang XP und Hintze 2006). In dieser Arbeit wurde bei der Messung nach 30 Minuten keine signifikante

Änderung der Phosphorylierung der Akt am Ser-473 nach FSK-Gabe beobachtet. Die eNOS-Phosphorylierung am Ser-1177 war nach 30 Minuten jedoch signifikant erhöht.

Es könnte daher Unterschiede in der cAMP-abhängigen Regulation der Akt- und eNOS-Phosphorylierung zwischen Koronargefäßen und Herzmuskelzellen geben. Während in Koronargefäßen cAMP zu einer vermehrten Akt-Phosphorylierung und nachfolgend zu einer eNOS-Phosphorylierung führt, kommt es in Herzmuskelzellen zu keiner cAMP-abhängigen Akt-Phosphorylierung. Hier kommt es vielmehr zu einer direkten cAMP-abhängigen Phosphorylierung der eNOS (s.u.).

4.1.2. Der cAMP/PKA-Signalweg

In einigen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass Urocortine im Zusammenhang mit einer Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges stehen (Nishikimi et al. 2000, Ikeda et al. 2005, Yang et al. 2006).

Die Beteiligung des cAMP/PKA-Signalweges konnte für den Ucn 1-Effekt auf die ANP- und BNP-Sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten gezeigt werden (Ikeda et al. 1998). Weiterhin führte Ucn 2 zu einer cAMP-Produktion in Rattenkardiomyozyten im Gegensatz zu Nicht-Myozyten (Ikeda et al. 2005). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte einen Zusammenhang zwischen dem cAMP/PKA-Signalweg und Ucn 2 finden. Nach Ucn-2-Gabe konnte ein cAMP/PKA-abhängiger positiv-inotroper und positiv-lusitroper Effekt in Kaninchenventrikelmuskelzellen festgestellt werden, der nach PKA-Inhibition kaum noch nachweisbar war (Yang et al. 2006).

Als Maß für eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges wurde in dieser Arbeit die PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB am Serin-16 ermittelt (Laraia und Morkin 1974). Von Forskolin ist bekannt, dass es ein Aktivator der Adenylatzyklase ist, der eine rezeptorunabhängige, selektive cAMP-Konzentrationserhöhung bewirkt, die anschließend die PKA stimuliert.

Ob dies auch für Ucn 2 zutrifft, wurde in dieser Arbeit überprüft.

Ucn 2 und Forskolin führten zu einem starken Phosphorylierungsanstieg von PLB am Ser-16 (etwa 8-10-fach) über den gesamten Inkubationszeitraum mit einem Maximum nach 5 Minuten für Ucn 2.

Eine wesentliche Veränderung der Expression von PLB zeigte sich weder für die Ucn-2- noch für die FSK-Inkubation.

Ucn 2 und FSK zeigten in dieser Arbeit beide einen starken Phosphorylierungsanstieg von PLB am Ser-16. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Ucn 2 und FSK den gleichen Signalweg, d.h. den cAMP/PKA-Signalweg, stimulieren.

Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus den vorbeschriebenen Studien.

4.1.3. Der Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII-Signalweg

Schon 2004 konnte in Zellen der Amygdala gezeigt werden, dass durch Ucn 1 die CaMKII aktiviert wird (Rainnie et al. 2004). Auch Grossini et al. konnten in Endothelzellen zeigen, dass die CaMKII durch Ucn 2 aktiviert wird (Grossini et al. 2009). Diese Studien sprechen dafür, dass Urocortine den Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII-Signalweg aktivieren.

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob Urocortine auch in Herzmuskelzellen zu einer Aktivierung des Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII-Signalweges führen. Hierfür wurde die Phosphorylierung von PLB am Threonin-17, der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle, gemessen (Le Peuch et al. 1979).

Ucn 2 und FSK führten zu einer starken Phosphorylierung von PLB am Threonin-17 (etwa 2.5- bis 5-fach).

Die Ergebnisse zeigen, dass einer der in die Ucn-2-Wirkung involvierten Signalwege der Ca²⁺/Calmodulin-CaMKII-Signalweg ist, was auch in weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden konnte (Yang et al. 2011). Da sowohl Ucn 2 als auch FSK diesen Signalweg aktivieren, deutet dies darauf hin, dass es über eine cAMP/PKA-abhängige Erhöhung der [Ca²⁺]_i-Transienten (Yang et al. 2006) zur Aktivierung des Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII-Signalweges kommt. Zudem wird die cAMP/PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB am Ser-16 als Voraussetzung für eine Phosphorylierung von PLB am Thr-17 diskutiert (Luo et al. 1998). Die Tatsache, dass Ucn 2 zu einer tendenziell höheren Phosphorylierung am Thr-17 führt als FSK, könnte daraufhin deuten, dass Ucn 2 zusätzlich PKA-unabhängig zu einer Aktivierung des Ca²⁺/Calmodulin-CaMKII-Signalweges führt.

4.1.4. Der MEK1/2-p44/42-MAPK-Signalweg

Es konnte in vorhergehenden Untersuchungen gezeigt werden, dass Ucn 1 zu einer schnellen Phosphorylierung von p44/42-MAPK in neonatalen Rattenkardiomyozyten führt. Nach 10 Minuten zeigte sich eine Phosphorylierungserhöhung, die bis zu 6 Stunden nach Ucn-1-Gabe anhielt und nach 24 Stunden auf Ausgangswerte abfiel (Brar et al. 2000).

Um zu untersuchen, ob auch Ucn 2 in adulten Kardiomyozyten den MEK1/2-p44/42-MAPK-Signalweg aktiviert, wurde in dieser Arbeit die Phosphorylierung der p44/42-MAPK am Thr-202/Tyr-204 untersucht.

Es konnte ein deutlicher Phosphorylierungsanstieg nach Ucn-2-Gabe für die p44/42-MAPK mit einem Maximum nach 5 bis 15 Minuten und einen Abfall auf Kontrollwerte nach 180 Minuten verzeichnet werden.

Die Ergebnisse beweisen, dass auch Ucn 2 den MEK1/2-p44/42-MAPK-Signalweg in Gang setzt, ähnlich wie Ucn 1. Die Untersuchungsergebnisse unterscheiden sich jedoch stark in Bezug auf den Zeitverlauf und den Rückgang der Phosphorylierung. Der Phosphorylierungsabfall auf Ausgangswerte nach 180 Minuten könnte durch eine Desensitivierung erklärt werden (Siehe 4.2.1). Gründe für die schnellere Aktivierung von p44/42-MAPK nach Ucn-2-Gabe könnten die Verwendung von Ucn 2 statt Ucn 1, die Durchführung der Experimente mit adulten Kaninchenkardiomyozyten statt neonatalen

Rattenkardiomyozyten und der Entzug von Nährmedien der Rattenkardiomyozyten vor Ucn-1-Inkubation sein.

4.2. Interaktionen der Signalwege

4.2.1. Der cAMP/PKA- und der Akt/eNOS-Signalweg

Frühere Studien in Endothelzellen zeigten bereits, dass die Ucn-2-induzierte eNOS-Phosphorylierung am Ser-1177 mit einer cAMP/PKA-, CaMKII-, p44/42-MAPK- und Akt-Aktivierung in Verbindung gebracht werden konnte (Grossini et al. 2009).

Für die koronare Mikrozirkulation des Hundes konnte eine PKA-abhängige Akt-Phosphorylierung nachgewiesen werden, die wiederum zu einer Akt-vermittelten eNOS-Phosphorylierung führte (Zhang XP und Hintze 2006).

Andere Arbeitsgruppen konnten eine PKA-abhängige aber Akt-unabhängige Phosphorylierung von eNOS am Ser-1179 im Rind (Äquivalent zum Ser-1177 im Menschen und Kaninchen) beobachten (Bae et al. 2003, Boo et al. 2002).

Schließlich konnte in adulten Kaninchen-Kardiomyozyten gezeigt werden, dass eine PKA-Hemmung durch H-89 mit der Ucn-2-vermittelten Phosphorylierungsreduktion von eNOS am Ser-1177 einherging. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die PKA direkt in die eNOS-Phosphorylierung involviert ist (Walther 2009).

Die Phosphorylierung von Akt wurde durch H-89 jedoch nicht beeinflusst. Somit wurde geschlussfolgert, dass die Akt die eNOS PKA-unabhängig aktiviert. Eine Blockade der PKA mit H-89 und der PI3K mit LY29004 führte zu einer deutlichen Reduktion der NO-Produktion. Dies legt nahe, dass sowohl der PI3K/Akt- als auch der cAMP/PKA-Signalweg die eNOS am Ser-1177 phosphorylieren und damit stimulieren kann, was anschließend zu einer vermehrten NO-Produktion führt (Walther 2009).

In dieser Arbeit konnte eine Ucn-2-induzierte PI3K/Akt-Signalweg-Aktivierung beginnend nach 10 Minuten mit einem durchschnittlichen Maximum nach 10 bis 30 Minuten und eine Ucn-2-vermittelte schnelle cAMP/PKA-Signalweg-Aktivierung beginnend nach 5 Minuten mit einem starken Anstieg über den gesamten Inkubationszeitraum beobachtet werden. Anschließend zeigte sich eine eNOS-Phosphorylierung mit einem späteren Maximum nach 10 bis 30 Minuten, was aufgrund des zeitlichen Verlaufes mit einer Aktivierung sowohl des Akt- also auch des PKA-Signalweges erklärt werden kann. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass sich in dieser Arbeit der Zeitverlauf der Phosphorylierung sowohl von Akt am Thr-308 als auch von eNOS am Ser-1177 als relativ variabel zeigte, da die Maxima der Phosphorylierung der Einzelversuche zwischen 5 und 30 Minuten nach Ucn-2-Gabe beobachtet wurden. Die Daten dieser Arbeit decken sich mit Voruntersuchungen, die eine Phosphorylierung von eNOS am Ser-1177 sowohl durch den cAMP/PKA- als auch durch den PI3K/Akt-Signalweg erkannten (Walther 2009). Eine PKA-abhängige und Akt-unabhängige Phosphorylierung von eNOS konnte Ucn-2-vermittelt wie in früheren Studien nicht nachgewiesen werden (Bae et al. 2003, Boo et al. 2002). Ein Grund hierfür könnte sein, dass unterschiedliche Zelltypen verwendet wurden. In dieser Arbeit wurden

Kaninchenkardiomyozyten verwendet, die Arbeitsgruppen um Bae und Boo arbeiteten jedoch mit Endothelzellen. Eine andere Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Verwendung von Bradykinin, VEGF und 8-Br-cAMP statt Ucn 2 sein.

Um zu untersuchen, ob die PKA allein in der Lage ist, die eNOS zu aktivieren, wurde der Adenylatzyklase-Agonist FSK eingesetzt.

In dieser Arbeit führte FSK zu einer PKA-abhängigen und Akt-unabhängigen Phosphorylierung von eNOS am Ser-1177. FSK hat somit eine ähnliche Wirkungsweise wie Bradykinin, VEGF und 8-Br-cAMP (Bae et al. 2003, Boo et al. 2002). Weiterhin zeigt dies, dass die PKA direkt die eNOS phosphorylieren kann und somit Akt nicht als vorgeschaltetes Enzym benötigt.

In Kombination mit den Ergebnissen nach Ucn-2-Gabe lässt sich daraus schlussfolgern, dass Ucn 2 durch zwei unabhängige Signalwege die eNOS phosphorylieren kann: durch den PI3K/Akt- und den cAMP/PKA-Signalweg.

Dies deckt sich mit früheren Befunden in adulten Kaninchen-Kardiomyozyten (Walther 2009).

4.2.2. Der MEK 1/2-p44/42-MAPK- und der Akt/eNOS-Signalweg

Ein Hinweis darauf, dass außer Akt noch andere Proteine die eNOS am Ser-1177 phosphorylieren können, ist darin zu sehen, dass bei einer Akt-Inhibierung die eNOS am Ser-1177 immer noch phosphoryliert wird. Diese Proteine könnten die p44/42-MAPK und/oder die PKA sein, denn bei einer Aktivierung der Src-Tyrosinkinase wird über die p44/42-MAPK und die PKA eine eNOS-Phosphorylierung vermittelt (Xu Z et al. 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass die p44/42-MAPK die Akt-Phosphorylierung am Ser-473 und am Thr-308 fördert und daher auch die eNOS-Phosphorylierung (Merla et al. 2007). Eine Inhibition der p44/42-MAPK-Phosphorylierung mit U0126 in Mäusen verringerte die Akt-Phosphorylierung am Thr-308 und Ser-473 sowie die eNOS-Phosphorylierung nach der Vorbehandlung mit Statinen. Dies legt nahe, dass die p44/42-MAPK der Akt und der eNOS vorgeschaltet ist. Die Arbeitsgruppe um Mineo et al. fand hingegen Hinweise für eine parallele Aktivierung von Akt und p44/42-MAPK durch die Src-Tyrosinkinase in Endothelzellen des Schafes, was letztendlich zu einer eNOS-Phosphorylierung am Ser-1179 führte (Mineo et al. 2003).

Ob die Ucn-2-induzierte Phosphorylierung der p44/42-MAPK an der eNOS-Phosphorylierung am Ser-1177 in adulten Kardiomyozyten beteiligt ist, darauf liefern die Ergebnisse dieser Arbeit erste Hinweise.

Ucn 2 führte zu einer schnellen Phosphorylierung der p44/42-MAPK mit einem Maximum nach 5 bis 15 Minuten. Ähnlich schnell folgte die Akt-Phosphorylierung bereits nach 5 Minuten mit einem variablen Maximum nach 10 bis 30 Minuten. Die p44/42-MAPK-Phosphorylierung fiel nach 180 Minuten wieder auf Kontrollwerte ab, ebenso wie die Akt-Phosphorylierung am Thr-308. Die eNOS-Phosphorylierung wies ein variables Maximum nach 10 bis 30 Minuten auf mit einem leichten Abfall nach 180 Minuten. Diesem Zeitverlauf der Phosphorylierung der einzelnen Proteine zu urteilen, könnte es also sehr wohl so sein, dass Ucn 2 zunächst zur Phosphorylierung der p44/42-MAPK führt und dass diese anschließend die Akt phosphoryliert, welche wiederum die eNOS phosphoryliert.

Andererseits kann aufgrund des variablen Zeitverlaufes der Akt- und eNOS-Phosphorylierung nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer parallelen Phosphorylierung von p44/42-MAPK und Akt kommt.

Die Ergebnisse in adulten Kardiomyozyten sind damit sowohl mit den Daten von Merla et al. (2007) in Mäusen als auch mit denen von Mineo et al. (2003) in Endothelzellen vereinbar. In zukünftigen Studien sollte geklärt werden, ob die p44/42-MAPK-Phosphorylierung der Akt-Phosphorylierung vorgeschaltet ist oder ob es zu einer parallelen Phosphorylierung durch Ucn-2-Gabe kommt.

4.2.3. Der MEK1/2-p44/42-MAPK- und der cAMP/PKA-Signalweg

Ob es Interaktionen zwischen dem MEK1/2-p44/42-MAPK-Signalweg und dem cAMP/PKA-Signalweg gibt ist unklar, da widersprüchliche Studienergebnisse vorliegen. Es konnte sowohl eine Ucn-2-vermittelte cAMP-unabhängige (Brar et al. 2004) als auch cAMP-abhängige (Grossini et al. 2009) p44/42-MAPK-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Brar et al. 2004). Dies war Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit.

Der Einsatz von Forskolin, welches selektiv den cAMP/PKA-Signalweg stimuliert, führte zu keiner p44/42-MAPK-Phosphorylierung.

Die Daten dieser Arbeit zeigen daher keinen direkten Zusammenhang zwischen dem p44/42-MAPK- und dem cAMP/PKA-Signalweg in adulten Kaninchen-Kardiomyozyten. Da Ucn 2 beide Signalwege aktiviert, ist von einer parallelen Aktivierung auszugehen. Dies deckt sich mit den Daten von Brar et al. (2004).

4.2.4. Der cAMP/PKA- und der Ca²⁺/Calmodulin-CaMKII-Signalweg

Luo et al. sah Hinweise dafür, dass eine PLB-Phosphorylierung am Ser-16 eine Voraussetzung für eine Phosphorylierung am Thr-17 darstellt (Luo et al. 1998). Somit würde die PKA indirekt zu einem PLB-Phosphorylierungsanstieg am Thr-17 führen, indem sie eine Phosphorylierung des Thr-17 durch die CaMKII erst ermöglicht.

Nach Ucn-2-Gabe konnte in dieser Arbeit eine starke Phosphorylierung des PLB am Ser-16 und Thr-17 gezeigt werden. Der unterschiedliche Zeitverlauf mit einem frühen Maximum der Phosphorylierung am Ser-16 und einem späteren Maximum am Thr-17 nach 15 Minuten deckt sich mit den Befunden von Luo et al. (1998). Dies deutet darauf hin, dass es nach Ucn-2-Gabe in Kaninchen-Kardiomyozyten zunächst zu einer PKA-abhängigen Phosphorylierung am Ser-16 kommt und erst im Anschluss daran, vermutlich durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, zu einer CaMKII-abhängigen Phosphorylierung am Thr-17.

Auch FSK führte zu einer ähnlich starken Phosphorylierung von PLB am Ser-16 und Thr-17.

Aufgrund der FSK-Ergebnisse, ist davon auszugehen, dass der Ca²⁺/Calmodulin-CaMKII-Signalweg als Folge der cAMP/PKA-Signalweges aktiviert wird, da FSK zu einer selektiven Erhöhung der cAMP-

Konzentration führt. Da die PKA viele Ca^{2+} -regulierende Proteine reguliert bzw. stimuliert und dadurch die Ca^{2+} -Homöostase beeinflusst, deuten die Ergebnisse daraufhin, dass es sekundär auch zu einer Ca^{2+} -abhängigen Stimulierung des Ca^{2+} -Calmodulin/CaMKII-Signalweges kommt. Demnach ist der Ca^{2+} -Calmodulin/CaMKII-Signalweg dem cAMP/PKA-Signalweg in Kardiomyozyten nachgeschaltet.

4.2.5. Der PI3K/Akt- und der Ca^{2+} /Calmodulin/CaMKII-Signalweg

Es ist bekannt, dass die CaMKII PLB am Thr-17 phosphoryliert (Rainnie et al. 2004).

Catalucci et al. fand heraus, dass auch die Akt PLB am Thr-17 phosphorylieren kann. Hierzu wurden transgene Mäuse mit einer Überexpression von aktiviertem Akt im sarkoplasmatischen Retikulum untersucht. Es zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung von PLB am Thr-17. In PI3K-Knockout-Mäusen konnte man hingegen eine Reduktion der PLB-Phosphorylierung am Thr-17 erkennen (Catalucci et al. 2009). Im Gegensatz dazu fand die Arbeitsgruppe um Gao keinen direkten Zusammenhang zwischen der Akt und einer Phosphorylierung von PLB am Thr-17. Es wurde hierbei keine streng auf das SR-bezogene Akt-Aktivierung durchgeführt (Gao et al. 2008).

In dieser Arbeit sah man nach Ucn-2-Gabe eine Phosphorylierungserhöhung von Akt am Thr-308 beginnend nach 5 Minuten mit einem Maximum nach 10 bis 30 Minuten. Für die Phosphorylierung von PLB am Thr-17 zeigte sich Ucn-2-induziert ein starker Anstieg mit einem ähnlichen Zeitverlauf. FSK-vermittelt konnte keine Phosphorylierungserhöhung von Akt am Ser-473 beobachtet werden, aber eine starke Phosphorylierungserhöhung von PLB am Thr-17.

Dies zeigt, dass eine Ucn-2-Gabe zu einer Phosphorylierung von Akt am Thr-308 und von PLB am Thr-17 führt. Ob hierbei Akt PLB direkt phosphoryliert ist anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig zu klären.

4.3. Die Signalweginaktivierung

Genau wie die Signalwegaktivierung folgt auch die Inaktivierung der Signalwege einem unterschiedlichen zeitlichen Verlauf je nach untersuchtem Protein. Während das PLB am Ser-16 und Thr-17 auch noch nach 180 Minuten einen sehr hohen Phosphorylierungsgrad aufwies, nahm die Phosphorylierung der anderen untersuchten Proteine nach 30 bis 180 Minuten wieder ab. Die p44/42-MAPK zeigte einen Phosphorylierungsrückgang bereits nach 30 Minuten und fiel nach 180 Minuten auf Kontrollwerte ab. Einen ähnlichen Zeitverlauf zeigte die Akt-Phosphorylierung am Thr-308. Bei der eNOS ließ sich ebenfalls ein Maximum zwischen 10 bis 30 Minuten erkennen ohne einen deutlichen Abfall der Phosphorylierung nach 180 Minuten. Aus diesen Resultaten lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung von Ucn-2-vermittelten Signalwegen in kardialen Myozyten einem komplexen zeitlichen Ablauf unterliegt. Ein kompliziertes Zusammenspiel zwischen CRF_2 -Rezeptoraktivierung und -desensitivierung als auch die zeitabhängige Phosphorylierung und

Dephosphorylierung der Signalproteine durch Kinasen und Phosphatasen könnten Gründe hierfür sein.

4.3.1. Mögliche Mechanismen für den zeitabhängigen Rückgang der Ucn-2-vermittelten p44/42-MAPK-Phosphorylierung

180 Minuten nach Ucn-2-Gabe ließ sich ein Phosphorylierungsrückgang der p44/42-MAPK erkennen, welcher eventuell auf einer Desensitivierung der Ucn-2-vermittelten Signaltransduktionswege beruhen könnte. Unter einer Desensitivierung versteht man das Abschalten eines Signalweges mit Hilfe von spezifischen zellulären Mechanismen, welche z.B. bei einer Rezeptordaueraktivierung angekurbelt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Desensitivierung des β -Adrenorezeptors (β -AR) bei Herzinsuffizienz. Als Kompensation wird bei Herzinsuffizienz das sympathische Nervensystem aktiviert, welches mit Hilfe von Katecholaminen die Herzfrequenz und die Kontraktilität erhöht und letztendlich zu einer besseren Pumpleistung führt. Hält dieser Zustand jedoch an, so kommt es zur β -AR-Desensitivierung (Böhm 1998, Pieske 1998). Somit wäre einer der spezifischen zellulären Mechanismen der Desensitivierung eine Rezeptorinaktivierung. Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie z.B. dem β -AR, wird durch Rezeptorphosphorylierung mittels G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinasen (GRKs) und zusätzlicher Bindung eines Adapterproteins (z.B. β -Arrestin) der Rezeptor abgeschaltet. Arrestin bewirkt eine Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein und ermöglicht die Endozytose des Arrestin-Rezeptor-Komplexes (Luttrell und Lefkowitz 2002). Anschließend können die Rezeptoren entweder wieder in die Zellmembran eingebaut oder abgebaut werden (McDonald und Lefkowitz 2001). Der β_1 -AR wird infolge von chronischer Noradrenalin-Ausschüttung abgebaut. Die daraus resultierende verminderte Rezeptorexpression bewirkt eine verringerte Ansprechbarkeit des Herzens auf Noradrenalin, was die Kontraktilität und die Herzfrequenz herabsetzt (Böhm 1998, Pieske 1998).

Die CRF-Rezeptoren gehören ebenfalls zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Perrin und Vale 1999). Für den CRF₁-R konnte in HEK293-Zellen und humanen Retinoblastom-Y79-Zellen, ausgelöst durch einen CRF₁-R-Agonisten, mit und ohne Phosphorylierung des Rezeptors durch GRKs ein vermehrtes Vorhandensein von β -Arrestin 2 festgestellt werden. Dies führte zu einer Endozytose der CRF₁-R. Die Bindung des Arrestin-Rezeptor-Komplexes ist hierbei transient und ermöglicht ein schnelles Rezeptorrecycling und eine Resensitivierung (Oakley et al. 1999). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass CRF₁-R bei verlängerter Gabe eines Rezeptoragonisten über den p44/42-MAPK-Signalweg β -Arrestin 2 rekrutiert (Oakley et al. 2007). Dies deckt sich mit unseren Resultaten. Durch die CRF₂-R-Aktivierung mittels Ucn 2 könnte der p44/42-MAPK-Signalweg gefördert werden, der zu Selbstlimitierung β -Arrestin 2 rekrutiert und somit zur CRF₂-R-Desensitivierung führen könnte. Dies würde den Phosphorylierungsabfall der p44/42-MAPK nach 180 Minuten erklären.

4.4. Phosphatasen

Während die Beteiligung von Proteinkinasen an der Urocortin-induzierten Phosphorylierung von Signalproteinen im Herzen schon in mehreren Studien charakterisiert wurde, war die Bedeutung von Proteinphosphatasen für die Regulation der Proteinphosphorylierung bisher nicht Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand zweier Inhibitoren – Okadasäure und Cyclosporin A – erstmals die Rolle von Serin/Threonin-Proteinphosphatasen für die Ucn-2-induzierte Phosphorylierung von PLB in Kardiomyozyten untersucht. Okadasäure ist ein Hemmstoff der PP1 und der PP2A (Hescheler et al. 1988), Cyclosporin A ein Hemmstoff der PP2B (Calcineurin) (Liu J et al. 1992).

4.4.1. Okadasäure-sensitive Phosphatasen dephosphorylieren PLB

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt eine Inhibierung von PP1 und PP2A durch Okadasäure auf die PLB-Phosphorylierung hat und inwiefern eine additive oder synergistische Wirkung auftritt, wenn zusätzlich Ucn 2 verabreicht wird, von dem bekannt ist, dass es die Phosphorylierung von PLB am Ser-16 und Thr-17 stark erhöht. Die Ergebnisse zeigen, dass die alleinige Gabe von OA zu einem Phosphorylierungsanstieg des PLB am Ser-16 und Thr-17 führte, der für die PLB-Phosphorylierung am Ser-16 statistisch signifikant war. Auch Huang et al. konnten eine PLB-Phosphorylierungserhöhung nach OA-Gabe nachweisen (Huang et al. 1999). Eine zusätzliche Gabe von Ucn 2 führte in beiden Fällen zu einer Phosphorylierungssteigerung des PLB am Ser-16 und Thr-17, die höher war als bei alleiniger Gabe von OA oder Ucn 2. Der additive Effekt von OA und Ucn 2 auf die PLB-Phosphorylierung am Ser-16 und Thr-17 deutet daraufhin, dass die PLB-Phosphorylierung Ucn-2-induziert über den cAMP/PKA- und den Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII-Signalweg und durch OA-sensitive Phosphatasen reguliert wird.

4.4.2. Eine cAMP-Erhöhung erhöht die PP2A-Aktivität

Forskolin induziert eine PKA-unabhängige Erhöhung der PP2A-Aktivität durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Feschenko et al. 2002). In dieser Arbeit konnte sowohl für FSK als auch für Ucn 2 eine Erhöhung der Phosphorylierung von PLB am Ser-16 gezeigt werden. Die Ser-16-Phosphorylierung wurde hierbei als Marker für eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges verwendet, da eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration zur PKA-Aktivierung führt und PKA wiederum PLB am Ser-16 phosphoryliert (Laraia und Morkin 1974). Daher ist anzunehmen, dass auch Ucn 2 den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht und somit auch die PP2A-Aktivität steigert. Dies entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit, da eine Gabe von Ucn 2 in Kombination mit Okadasäure, einem PP2A-Inhibitor, zu einer zusätzlichen Steigerung der Phosphorylierung von PLB am Ser-16 führte. Dies legt den Schluss nahe, dass die PP2A an der Regulation der Ucn-2-induzierten PLB-Phosphorylierung beteiligt ist.

4.4.3. Cyclosporin-A-sensitive Phosphatasen haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von PLB

Cyclosporin A bewirkt im Komplex mit Cyclophilin eine Hemmung von Calcineurin (PP2B) (Liu J et al. 1992). Calcineurin, welches Ca^{2+} -Calmodulin-abhängig ist, spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung einer kardialen maladaptiven Hypertrophie (Molkentin et al. 1998). Seine pharmakologische Hemmung resultiert in einer Verhinderung einer linksventrikulären Hypertrophie und einer Regression einer bestehenden Hypertrophie (Lim et al. 2000).

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt eine Inhibierung von PP2B durch Cyclosporin A auf die Phosphorylierung von PLB hat und inwiefern eine additive oder synergistische Wirkung auftritt, wenn zusätzlich Ucn 2 verabreicht wird. CsA alleine erhöhte die Phosphorylierung von PLB am Ser-16 und Thr-17 nicht. In Gegenwart von CsA hatte Ucn 2 keinen zusätzlichen Effekt auf die Phosphorylierung von PLB am Ser-16 und Thr-17. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Ucn-2-induzierte Phosphorylierung von PLB nicht durch eine CsA-sensitive Phosphatase reguliert wird.

4.5. Physiologische Bedeutung von Ucn 2

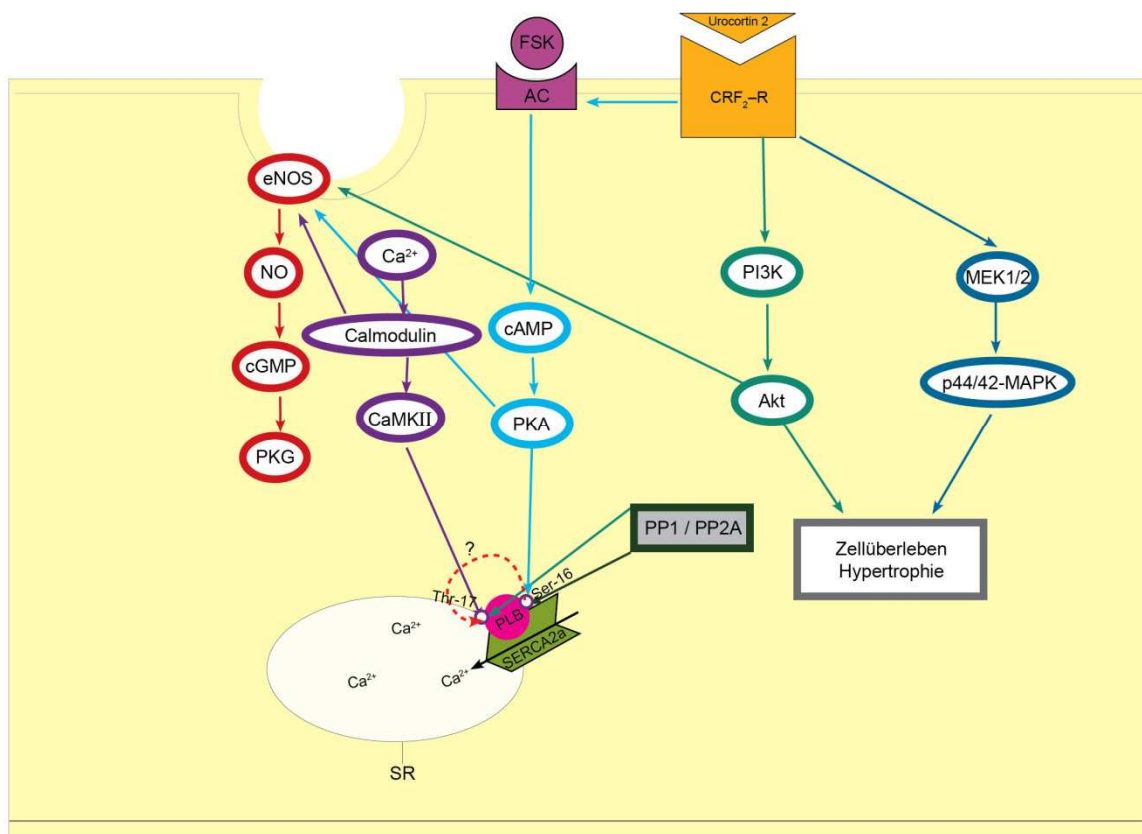


Abb. 4.1. Schematische Darstellung der Ucn-2-induzierten Signalkaskaden im Kardiomyozyten

Abkürzungen: AC: Adenylatzyklase, Akt: Proteinkinase B, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, CaMKII: Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, CRF₂R: Corticotropin-Releasing-Faktor-Rezeptor Typ 2, eNOS: endotheliale NO-Synthase, FSK: Forskolin, MEK1/2: MAPK-Kinase der p44/42-MAPK, NO: Stickstoffmonoxid, OA: Okadasäure, PI3K: Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase, PKA: Proteinkinase A, p44/42-MAPK: p44/42-Mitogen-aktivierte Proteinkinase, PLB: Phospholamban, PP1/PP2A: Proteinphosphatase 1 und 2A, SERCA 2a: Ca²⁺-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums, SR: Sarkoplasmatisches Retikulum, sGC: lösliche Guanylatzyklase, Ucn 2: Urocortin 2

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ucn 2 in adulten Kaninchenkardiomyozyten über verschiedene Signalwege seine Wirkung entfaltet. Hierzu gehören der cAMP/PKA-, der MEK1/2-p44/42-MAPK-, der PI3K/Akt/eNOS - und der Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII-Signalweg. Weiterhin konnte der zeitliche Verlauf und das Zusammenspiel dieser Signaltransduktionswege genauer evaluiert werden.

Der cAMP/PKA- und der Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII-Signalweg führen zu einer Phosphorylierung von PLB am Serin-16 oder Threonin-17. Beides bewirkt eine Aufhebung der hemmenden Wirkung von PLB auf die SERCA2a-Aktivität, wodurch der Ca²⁺-Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums erhöht wird. Der hierdurch gesteigerte [Ca²⁺]-Transient bewirkt eine Zunahme der Kontraktilität der Kardiomyozyten (Hagemann und Xiao 2002, Yang et al. 2006). Dieser positiv inotrope Effekt stellt einen wichtigen Anpassungsmechanismus des Herzens dar. Als Nebenwirkung tritt jedoch ein cAMP/PKA- und Ca²⁺/Calmodulin/CaMKII-vermittelter proarrhythmogener Effekt auf. Dieser lässt sich durch eine vermehrte spontane diastolische Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR durch eine PKA- und CaMKII-induzierte SR-Ca²⁺-Überladung erklären (Yang et al. 2011). Eine erhöhte eNOS-vermittelte NO-Produktion in Kardiomyozyten wird als kardioprotektiv angesehen. Die Ucn-2-vermittelte erhöhte eNOS-Phosphorylierung am Ser-1177, die zu einer Steigerung der NO-Produktion führt, wird durch die Aktivierung mehrerer Signalwege sichergestellt. Hierzu gehören der cAMP/PKA- und der PI3K/Akt-Signalweg. Da bei Herzinsuffizienz die Aktivierung und Wirkung des cAMP/PKA-Signalweges stark eingeschränkt ist, stellt die redundante Ucn-2-vermittelte eNOS-Phosphorylierung durch den PI3K/Akt-Signalweg sicher, dass es unter diesen Bedingungen trotzdem zu vermehrter NO-Produktion kommt. Dies könnte in Verbindung mit den anderen Signalwegen erklären, warum Ucn 2 bei Herzinsuffizienz günstige Wirkungen entfaltet. Die eNOS führt durch eine NO-Freisetzung über die Aktivierung des sGC/cGMP/PKG-Signalweges und über Transnitrosylierung zu einer Modulation der elektromechanischen Kopplung im Kardiomyozyten (siehe 1.4.6.3.1.). NO selbst hat einen antiapoptotischen Effekt (Brunner et al. 1997, Izhar et al. 1998). Myokardiale Umbauprozesse, wie z.B. Hypertrophie, die zu einer kardialen Dysfunktion führen, werden durch den anti-adrenergen Effekt der eNOS begrenzt (Ziolo et al. 2008, Janssens et al. 2004, Buys et al. 2007).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ucn 2 den MEK1/2-p44/42-MAPK-Signalweg aktiviert. In vorhergehenden Studien wirkten Urocortine kardioprotektiv über Aktivierung des MEK1/2-p44/42-MAPK-Signalweges bei Ischämie- und Reperfusionverletzungen in Rattenkardiomyozyten und humanen Kardiomyozyten. Es zeigte sich außerdem ein antiapoptotischer Effekt durch die Aktivierung der p44/42-MAPK (Brar et al. 1999, Nishikimi et al. 2000, Brar et al. 2004). Weiterhin konnte durch die Aktivierung der p44/42-MAPK eine positiv-inotrope und positiv-lusitrope Wirkung nachgewiesen

werden (Calderon-Sanchez et al. 2009). Hypertroph wirksam ist p44/42-MAPK nicht (Chanalaris et al. 2005).

Für die Limitierung der Ucn-2-induzierten Phosphorylierung der Signalproteine spielen Okadasäure-sensitive (PP1, PP2A) – nicht aber Cyclosporin-A-sensitive (PP2B) – Phosphatasen eine Rolle. Die Okadasäure-sensitiven Phosphatasen bewirken eine Dephosphorylierung von PLB, möglicherweise auch von weiteren Proteinen. Die Dephosphorylierung von PLB am Ser-16 und Thr-17 limitiert die SERCA-vermittelte Erhöhung des SR-Ca²⁺-Gehaltes und damit den positiv-inotropen und positiv-lusitropen Effekt von Ucn 2, aber auch den proarrhythmogenen Effekt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse lassen die Daten dieser Arbeit den Schluss zu, dass Ucn 2 in adulten Kardiomyozyten die elektromechanische Kopplung positiv beeinflusst und kardioprotektiv wirksam ist, über die Aktivierung des cAMP/PKA-, des Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII-, des MEK1/2-p44/42-MAPK- und des PI3K/Akt-Signalweges. Wichtige Mediatoren dieser Signalwege sind PLB und die eNOS. Die erhöhte PLB-Phosphorylierung am Ser-16 und Thr-17 führt zu einem erhöhten SR-Ca²⁺-Gehalt, zu erhöhten [Ca²⁺]_i-Transienten und damit zu verstärkter Kontraktion. Die erhöhte eNOS-Phosphorylierung am Ser-1177 führt zu einer erhöhten NO-Produktion, die über verschiedene Mechanismen kardioprotektiv wirksam ist. Okadasäure-sensitive Phosphatasen (PP1, PP2A) spielen eine Rolle für die Inaktivierung der Ucn-2-aktivierten Signalwege und Effekte, indem sie zur Dephosphorylierung von PLB beitragen.

5. Zusammenfassung

Urocortin 2 (Ucn 2) gehört zur Familie der Corticotropin-Releasing-Faktoren (CRF), die über den CRF₂-Rezeptor kardioprotektiv wirksam sind. Es wirkt auf das Herz positiv inotrop und positiv lusitrop. Die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen, über die Ucn 2 seine kardialen Wirkungen entfaltet, sind jedoch nur unzureichend erforscht. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Stimulierung verschiedener Signalkaskaden (PI3K/Akt/eNOS, MEK1/2-p44/42-MAPK, cAMP/PKA, Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII) durch Ucn 2 sowie deren mögliche Interaktionen in isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten untersucht. Außerdem wurde die Bedeutung von Proteinphosphatasen für die Regulation der Proteinphosphorylierung überprüft.

Hierzu wurden isolierte Kaninchen-Kardiomyozyten mit Ucn 2, dem Adenylatzyklasestimulator Forskolin oder den Phosphatasehemmstoffen Okadasäure und Cyclosporin A behandelt. Okadasäure hemmt die Proteinphosphatase 1 (PP1) und 2A (PP2A) und Cyclosporin A die Proteinphosphatase 2B (PP2B, Calcineurin). Anschließend wurde mit Hilfe der Western-Blot-Technik und mit phosphospezifischen Antikörpern die Phosphorylierung von Akt am Ser-473 und Thr-308, von eNOS am Ser-1177, von Phospholamban (PLB) am Ser-16 (Substrat der PKA) und Thr-17 (Substrat der CaMKII) und von p44/42-MAPK am Thr-202/Tyr-204 bestimmt.

Ucn 2 (100 nM) führte zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der untersuchten Proteine. Eine maximale Phosphorylierung wurde nach 5-30 Minuten beobachtet, wobei der Ucn-2-induzierte Anstieg der Phosphorylierung für Akt am Thr-308 75% nach 10 Minuten, für eNOS am Ser-1177 100% nach 15 Minuten, für p44/42-MAPK 270% nach 10 Minuten, für PLB am Ser-16 1000% nach 5 Minuten und für PLB am Thr-17 600% nach 15 Minuten betrug. Bei der 30-minütigen Inkubation mit Forskolin (10 µM) konnte eine Phosphorylierung von eNOS am Ser-1177 auf etwa 350% der Kontrolle, von PLB am Ser-16 auf etwa 750% der Kontrolle und von PLB am Thr-17 auf etwa 180% der Kontrolle beobachtet werden, jedoch nicht von Akt am Ser-473 oder p44/42-MAPK am Thr-202/Tyr-204. Die Inkubation mit Okadasäure (1 µM) alleine zeigte für PLB am Ser-16 und Thr-17 eine Phosphorylierungserhöhung um 80-130%, wohingegen für die Inkubation von Okadasäure mit Ucn 2 ein Phosphorylierungsanstieg von PLB am Ser-16 und Thr-17 von 260-280% beobachtet werden konnte. Inkubierte man die Zellen mit Cyclosporin A (0,1 µM) alleine, führte dies zu keinem Phosphorylierungsanstieg von PLB. Auch Cyclosporin A mit Ucn 2 zeigte keinen zusätzlichen Phosphorylierungsanstieg im Vergleich mit Ucn 2 alleine.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Ucn 2 in Kaninchen-Kardiomyozyten mehrere Signalwege (PI3K/Akt/eNOS, MEK1/2-p44/42-MAPK, cAMP/PKA, Ca²⁺-Calmodulin/CaMKII) stimuliert mit einem z.T. erheblich unterschiedlichen Zeitverlauf. Aufgrund des zeitlichen Verlaufes, der Spezifität der phosphorylierten Reste für bestimmte Kinasen und des Einsatzes von Forskolin konnte auf Interaktionen zwischen den Signalwegen geschlossen werden. Ucn 2 phosphorylierte die eNOS am Ser-1177 sowohl über den cAMP/PKA- als auch über den PI3K/Akt-Signalweg. Die PLB-Phosphorylierung nach Ucn-2-Gabe beruht auf der Stimulierung des cAMP/PKA (Ser-16) und des Ca²⁺/Calmodulin/CaMKII-Weges (Thr-17). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Okadasäure-sensitive Phosphatasen (PP1 und PP2A) an der Regulation der Phosphorylierung von PLB beteiligt

sind. Cyclosporin-A-sensitive Phosphatasen (Calcineurin) scheinen hingegen für die Ucn-2-induzierte Phosphorylierung von PLB keine Rolle zu spielen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Ucn 2 in adulten Kardiomyozyten über die Aktivierung des cAMP/PKA-, des Ca^{2+} -Calmodulin/CaMKII-, des MEK1/2-p44/42-MAPK- und des PI3K/Akt-Signalweges kardioprotektiv, positiv inotrop und positiv lusitrop wirkt. Ein erhöhter SR- Ca^{2+} -Gehalt, ein erhöhter $[\text{Ca}^{2+}]$ -Transient und damit eine verstärkte Kontraktilität wird durch die gesteigerte PLB-Phosphorylierung am Ser-16 und Thr-17 erzielt. Kardioprotektive Mechanismen werden durch eine erhöhte eNOS-Phosphorylierung am Ser-1177, die zu einer erhöhten NO-Produktion führt, in Gang gesetzt. Okadasäure-sensitive Phosphatasen (PP1, PP2A) spielen eine Rolle für die Inaktivierung der Ucn-2-aktivierten Signalwege und Effekte, indem sie zur Dephosphorylierung von PLB beitragen.

6. Literaturverzeichnis

Adams DG, Coffee RL Jr, Zhang H, Pelech S, Strack S, Wadzinski BE (2005): Positive regulation of Raf 1-MEK1/2-ERK1/2 signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A holoenzymes. *J Biol Chem* 280(50), 42644-42554

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996): Mechanism of activation of proteinkinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15(23), 6541-51

Bae SW, Kim HS, Cha YN, Park YS, Jo SA, Jo I (2003): Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 306(4), 981-987

Baines CP (2007): The mitochondrial permeability transition pore as a target of cardioprotective signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(2), H903-4

Bale TL, Hoshijima M, Gu Y, Dalton N, Anderson KR, Lee KF, Rivier J, Chien KR, Vale WW, Peterson KL (2004): The cardiovascular physiologic actions of urocortin II: acute effects in murine heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(10), 3697-702

Barouch LA, Cappola TP, Harrison RW, Crone JK, Rodriguez ER, Burnett AL, Hare JM (2003): Combined loss of neuronal and endothelial nitric oxide synthase causes premature mortality and age-related hypertrophic cardiac remodeling in mice. *J Mol Cell Cardiol* 35(6), 637-44

Beckmann JS, Koppenol WH (1996): Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, 1424-37

Bell RM, Yellon DM (2003): Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Cell Cardiol* 41(3), 508-15

Bers DM (2002a): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415(6868), 198-205

Bers DM (2002b): Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ Res* 90, 14-7

Böhm M (1998): Catecholamine refractoriness and their mechanisms in cardiocirculatory shock and chronic heart failure. *Thorac Cardiovasc Surg* 46, 270-75

Boknik P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Schmitz W, Schröder F, Neumann J (2000): Protein phosphatase activity is increased in rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362(3), 222-31

- Boknik P**, Heinroth-Hoffmann I, Kirchhefer U, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller T, Schmitz W, Brodde O, Neumann J (2001): Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy. *Cardiovasc Res* 51(4), 717-28
- Boo YC**, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H (2002): Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 277, 3388-96
- Brar BK**, Jonassen AK, Stephanou A, Santilli G, Railson J, Knight RA, Yellon DM, Latchman DS (2000): Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 275(12), 8508-14
- Brar BK**, Stephanou A, Knight R, Latchman DS (2002): Activation of protein kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death. *J Mol Cell Cardiol* 34(4), 483-92
- Brar BK**, Jonassen AK, Egorina EM, Chen A, Negro A, Perrin MH, Mjos OD, Latchman DS, Lee KF, Vale W (2004): Urocortin-II and urocortin-III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury: an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart. *Endocrinology* 145(1), 24-35
- Bredt DS**, Snyder SH (1990): Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 682-5
- Brixius K**, Wollmer A, Böck B, Mehlhorn U, Schwinger RH (2003): Ser16-, but not Thr17-phosphorylation of phospholamban influences frequency-dependent force generation in human myocardium. *Pflugers Arch* 447(2), 150-7
- Brunner F**, Leonard B, Kukovetz WR, Mayer B (1997): Role of endothelin, nitric oxide and L-arginine release in ischaemia/reperfusion injury of rat heart. *Cardiovasc Res* 36, 60-6
- Bueno OF**, van Rooij E, Molkentin JD, Doevendans PA, De Windt LJ (2002): Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res* 53(4), 806-21
- Buys ES**, Raheer MJ, Blake SL, Neilan TG, Graveline AR, Passeri JJ, Llano M, Perez-Sanz TM, Ichinose F, Janssens S, Zapol WM, Picard MH, Block KD, Scherrer-Crosbie M (2007): Cardiomyocyte-restricted restoration of nitric oxide synthase 3 attenuates left ventricular remodeling after chronic pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1), H620-7
- Calderon-Sanchez E**, Delgado C, Ruiz-Hurtado G, Dominquez-Rodriguez A, Cachofeiro V, Rodriguez-Moyano M, Gomez AM, Ordonez A, Smani T (2009): Urocortin induces positive inotropic effect in rat heart. *Cardiovasc Res* 83(4), 717-25
- Campbell DL**, Stamler JS, Strauss HC (1996): Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol* 108(4), 277-93

- Catalucci D**, Latronico MV, Ceci M, Rusconi F, Young HS, Gallo P, Santonastasi M, Bellacosa A, Brown JH, Condorelli C (2009): Akt increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr17. *J Biol Chem* 284(41), 28180-7
- Chanalaris A**, Lawrence KM, Townsend PA, Davidson S, Jamshidi Y, Stephanou A, Knight RD, Hsu SY, Hsueh AJ, Latchman DS (2005): Hypertrophic effects of urocortin homologous peptides are mediated via activation of the Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 328(2), 442-8
- Channick R**, Badesch DB, Tapson VF, Simonneau G, Robins I, Frost A, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ (2001): Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a placebo-controlled study. *J Heart Lung Transplant* 20(2), 262-3
- Chen ZP**, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriquez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE (1999): AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 443(3), 285-9
- Coffer PJ**, Jin J, Woodgett JR (1998): Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 335, 1-13
- Cohen P**, Cohen PT (1989): Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264(36), 21435-8
- Cohn JN**, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T (1984): Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311(13), 819-23
- Currie S**, Smith GL (1999): Enhanced phosphorylation of phospholamban and downregulation of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase type 2 (SERCA 2) in cardiac sarcoplasmic reticulum from rabbits with heart failure. *Cardiovasc Res* 41(1), 135-46
- Davidson SM**, Rybka AE, Townsend PA (2009): The powerful cardioprotective effects of urocortin and the corticotropin releasing hormone (CRH) family. *Biochem Pharmacol* 77(2), 141-50
- Davis ME**, Pemberton CJ, Yandle TG, Fisher SF, Lainchbury JG, Frampton CM, Rademaker MT, Richards AM (2007a): Urocortin 2 infusion in healthy humans: hemodynamic, neurohormonal, and renal responses. *J Am Coll Cardiol* 49(4), 461-71
- Davis ME**, Pemberton CJ, Yandle TG, Fisher SF, Lainchbury JG, Frampton CM, Rademaker MT, Richards M (2007b): Urocortin 2 infusion in human heart failure. *Eur Heart J* 28(21), 2589-97
- de Groot-Krusemann HA**, Baan CC, Mol WM, Niesters HG, Maat AP, Balk AH, Weimar W (2001): Cyclosporine A downregulates intragraft platelet-derived growth factor- α mRNA expression after clinical heart transplantation. *Transplant Proc* 33, 2241-3
- Dimmeler S**, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999): Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399(6736), 601-5

- Dolmetsch RE**, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI (1997): Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺-response amplitude and duration. *Nature* 386(6627), 855-8
- EI-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(1), 87-93
- EI-Mowafy AM**, White RE (1999): Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Lett* 451(1), 63-7
- Fekete EM**, Zorrilla EP (2007): Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Front Neuroendocrinol* 28(1), 1-27
- Feldman AM**, Cates AE, Veazey WB, Hershberger RE, Bristow MR, Baughman KL, Baumgartner WA, Van Dop C (1988): Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 82(1), 189-97
- Feng J**, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA (2004): Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 279(39), 41189-96
- Feron O**, Saldana F, Michel JB, Michel T (1998): The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 273(6), 3125-8
- Feschenko MS**, Stevenson E, Nairn AC, Sweadner KJ (2002): A novel cAMP-stimulated pathway in protein phosphatase 2A activation. *J Pharmacol Exp Ther* 302(1), 111-8
- Fiedler B**, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Moltenkin JD, Drexler H, Wollert KC (2002): Inhibition of calcineurin –NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(17), 11363-8
- Fischmeister R**, Mery PF (1996): Regulation of cardiac calcium current by cGMP/NO route. *C R Seances Soc Biol Fil* 190(2-3), 181-206
- Fleming I**, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R (2001): Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/Calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88(11), 68-75
- Flesch M**, Maack C, Cremers B, Bäumer AT, Südkamp M, Böhm M (1999): Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation* 100(4), 346-53
- Francis GS**, Benedict C, Johnstone DE, Kirlin PC, Nicklas J, Liang CS, Kubo SH, Rudin-Toretzky E, Yusuf S (1990): Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* 82(5), 1724-9

- Francis GS**, Cohn JN, Johnson G, Rector TS, Goldman S, Simon A (1993): Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure. Relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 87, (6 Suppl), VI40-48
- Frank K**, Tilgmann C, Shannon TR, Bers DM, Kranias EG (2000): Regulatory role of phospholamban in the efficiency of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport. *Biochemistry* 39(46), 14176-82
- Fujii J**, Ueno A, Kitano K, Kadoma M, Tada M (1987): Complete complementary DNA-derived amino acid sequence of canine cardiac phospholamban. *J Clin Invest* 79(1), 301-4
- Fujii J**, Maruyama K, Tada M, MacLennan DH (1990): Co-expression of slow-twitch/cardiac muscle Ca²⁺(+)-ATPase (SERCA2A) and phospholamban. *FEBS Lett* 273(1-2), 232-4
- Fulton D**, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos, Sessa WC (1999): Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399(6736), 597-601
- Galie N**, Hinderliter AL, Torbicki A, Fourme T, Simonneau G, Pulido T, Espinola-Zavaleta N, Rocchi G, Manes A, Frantz R, Kurzyna M, Nagueh SF, Barst R, Channick R, Dujardin K, Kronenberg A, Leconte I, Rainisio M, Rubin L (2003): Effects of the oral endothelin-receptor antagonist bosentan on echocardiographic and doppler measures in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 41(8), 1380-6
- Gao MH**, Tang T, Guo T, Miyahara A, Yajima T, Pestonjamas K, Feramisco JR, Hammond HK (2008): Adenylyl Cyclase Type VI increases Akt activity and phospholamban phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 283(48), 33527-35
- Giaid A**, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duquid WP, Stewart DJ (1993): Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328(24), 1732-9
- 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, 2123-32
- Granger DL**, Hibbs JB Jr (1996): High-output nitric oxide: weapon against infection? *Trends Microbiol* 4(2), 46-47
- Granger CB**, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Östergren J, Pfeffer MA, Swedberg K (2003): Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet* 362(9386), 772-6

- Grossini E**, Molinari C, Mary DA, Uberti F, Ribichini F, Caimmi PP, Vacca G (2009): Urocortin II induces nitric oxide production through cAMP and Ca²⁺ related pathways in endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 23(1-3), 87-96
- Hagemann D**, Xiao RP (2002): Dual Site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 12(2), 51-56
- Han X**, Shimoni Y, Giles WR (1994): An obligatory role for nitric oxide in autonomic control of mammalian heart rate. *J Physiol* 476, 309-14
- Hare JM** (2003): Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 35(7), 719-29
- Hare JM**, Lofthouse RA, Juang GJ, Colman L, Ricker KM, Kim B, Senzaki H, Cao S, Tunin RS, Kass DA (2000): Contribution of caveolin protein abundance to augmented nitric oxide signaling in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 86(10), 1085-92
- Herzig S**, Neuman J (2000): Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80(1), 173-210
- Hescheler J**, Miesckes G, Rüegg JC, Takai A, Trautwein W (1988): Effects of a protein phosphatase inhibitor, okadaic acid, on membrane of isolated guinea-pig cardiac myocytes. *Pflugers Arch* 412(3), 248-52
- Hobai IA**, O'Rourke B (2000): Enhanced Ca²⁺-activated Na⁺-Ca²⁺ exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ Res* 87(8), 690-8
- Hobai IA**, O'Rourke B (2001): Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation* 103(11), 1577-84
- Hoppe UC**, Erdmann E (2001): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Herausgegeben vom Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung. *Z Kardiol* 90, 218-237
- Hsu SY**, Hsueh AJ (2001): Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 7(5), 605-11
- 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(9), 848-53
- Hülsmann M**, Stanek B, Frey B, Sturm B, Putz D, Kos T, Berger R, Woloszczuk W, Maurer G, Pacher R (1998): Value of cardiopulmonary exercise testing and big endothelin plasma levels to predict short-term prognosis of patients with chronic heart failure. *J Am Cell Cardiol* 32(6), 1695-700
- Ichiki T**, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T (1995): Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377(6551), 748-50

- Ikeda K**, Tojo K, Sato S, Ebisawa T, Tokudome G, Hosoya T, Harada M, Nakagawa O, Nakao K (1998): Urocortin, a newly identified corticotripin-releasing factor-related mammalian peptide, stimulates atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide secretions from neonatal rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 250(2), 298-304
- Ikeda K**, Tojo K, Otsubo C, Udagawa T, Hosoya T, Tajima N, Nakao K, Kawamura M (2005): Effects of urocortin II on neonatal rat cardiac myocytes and non-myocytes. *Peptides* 26(12), 2473-81
- Ingebritsen TS**, Stewart AA, Cohen P (1983): The protein phosphatases involved in cellular regulation.6.Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues, an assessment of their physiological roles. *J Eur Biochem* 132(2), 297-307
- Izhar U**, Schwalb H, Borman JB, Merin G (1998): Cardioprotective effect of L-arginine in myocardial ischemia and reperfusion in an isolated working rat heart model. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 39(3), 321-9
- Jackson WA**, Colyer J (1996): Translation of Ser16 und Thr17 phosphorylation of phospholamban into Ca²⁺-pump of stimulation. *Biochem J* 316, 201-7
- Janssens S**, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szelid Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD (2004): Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res* 94(9), 1256-62
- Juntilla MR**, Li SP, Westermarck J (2008): Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* 22(4), 954-65
- Karczewski P**, Bartel S, Krause EG (1990): Differential sensivity to isoprenaline of troponin I and phospholamban phosphorylation in isolated rat hearts. *Biochem J* 266(1), 115-22
- Khan SA**, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, Fradley M, Shoukas AA, Berkowitz DE, Hare JM (2003): Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res* 92(12), 1322-9
- Kimura Y**, Takahachi K, Totsune K, Maramatsu Y, Kaneko C, Darnel AD, Suzuki T, EbinaM, Nukiwa T, Sasano H (2002): Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab* 87(1), 340-346
- Kiss E**, Jakab G, Kraniias EG, Edes I (1994): Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression.Regulatory effects of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport and myocardial relaxation. *Circ Res* 75(2), 245-51
- Kleinert H**, Schwarz PM, Förstermann U (2003): Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384(10-11), 1343-1364

Knight RA, Chen-Scarabelli C, Yuan Z, McCauley RB, Di Rezze J, Scarabelli GM, Townsend PA, Latchman D, Saravolatz L, Faggian G, Mazzucco A, Chowdrey HS, Stephanou A, Scarabelli TM (2008): Cardiac release of urocortin precedes the occurrence of irreversible myocardial damage in the rat heart exposed to ischemia/reperfusion injury. *FEBS Lett* 582(6), 984-90

Koertge J, Al-Khalili F, Ahnve S, Janszky I, Svane B, Schenck-Gustafsson K (2002): Cortisol and vital exhaustion in relation to significant coronary artery stenosis in middle-aged women with acute coronary syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 27(8), 893-906

Koob GF, Heinrichs SC (1999): A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* 848(1-2), 141-52

Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL (1998): Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol* 12(8), 1077-85

Kranias EG, Gupta RC, Jakab G, Kim HW, Steenaart NA, Rapundalo ST (1988): The role of protein kinases and protein phosphatases in the regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum function. *Mol Cell Biochem* 82(1-2), 37-44

Laraia PJ, Morkin E (1974): Adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent membrane phosphorylation: A possible mechanism for the control of microsomal calcium transport in heart muscle. *Circ Res* 35, 298-306

Latini R, Masson S, Anand I, Judd D, Maggioni AP, Chiang YT, Bevilacqua M, Salio M, Cardano P, Dunselman PH, Holwerda NJ, Tognoni G, Cohn JN (2002): Effects of valsartan on circulating brain natriuretic peptide and norepinephrine in symptomatic chronic heart failure: the Valsartan Heart Failure Trail (Val-HeFT). *Circulation* 106(19), 2454-8

Lawrence KM, Latchman DS (2006): The Urocortins: mechanisms of cardioprotection and therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem* 6(10), 1119-26

Lawrence KM, Chanalaris A, Scarabelli T, Hubank M, Pasini E, Townsend PA, Comini L, Ferrari R, Tinker A, Stephanou A, Knight RA, Latchman DS (2002): K(ATP) channel gene expression is induced by urocortin and mediates its cardioprotective effect. *Circulation* 106(12), 1556-62

Layland J, Li JM, Shah AM (2002): Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 540, 457-67

Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG (1979): Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry* 18(23), 5150-7

Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW (2001): Identification of urocortin III, an

additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(13), 7570-5

Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkentin JD (2000): Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 101(20), 2431-7

Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM (1983): Beta-adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca²⁺-ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 258(1), 464-71

Liu CN, Yang C, Liu XY, Li S (2005): In vivo protective effects of urocortin on ischemia-reperfusion injury in rat heart via free radical mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol* 83(6), 459-65

Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, Cohen P, MacKintosh C, Klee CB, Schreiber SL (1992): Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* 31(16), 3896-901

Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D (2002): Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Study. *Circulation* 106(24), 3068-72

Lu C, Kumar R, Akita T, Joyner RW (1994): Developmental changes in the actions of phosphatase inhibitors on calcium current of rabbit heart cells. *Pflugers Arch* 427(5-6), 389-98

Luo W, Chu G, Sato Y, Zhou Z, Kadambi VJ, Kranias EG (1998): Transgenic approaches to define the functional role of dual site phospholamban phosphorylation. *J Biol Chem* 273(8), 4734-9

Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002): The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-65

Maack T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides (2006): *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50(2), 198-207

MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991): Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylates phospholamban. *Eur J Biochem* 196(3), 725-34

Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA (2002): The Breathing not Properly Multinational Study I. Rapid measurement of B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 347(3), 161-7

Maisson PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL (2003): Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 93, 388-98

- McCabe TJ**, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC (2000): Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 275(9), 6123-28
- McDonald PH**, Lefkowitz RJ (2001): Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal* 13(10), 683-9
- McMurray JJ**, Pfeffer MA (2005): Heart failure. *Lancet*, 365(9474), 1877-89
- MERIT-HF Study Group** (1999): Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in-Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*, 353(9169), 2001-7
- Merla R**, Daher IN, Ye Y, Uretsky BF, Birnbaum Y (2007): Pretreatment with statins may reduce cardiovascular morbidity and mortality after elective surgery and percutaneous coronary intervention: clinical evidence and possible underlying mechanisms. *Am Heart J* 154(2), 392-402
- Mery PF**, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister (1993): Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 268(35), 26286-95
- Michel CM**, Li Y, Heusch G (2001): Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363, 245-66
- Michel T**, Feron O (1997): Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100(9), 2146-52
- Michell BJ**, Chen ZP, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE (2001): Coordinated control of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276(21), 17625-8
- Mills GD**, Kubo H, Harris DM, Berretta RM, Piacentino V 3rd, Houser SR (2006): Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 reduces cardiac adrenergic contractile responsiveness in chronic pressure overload-induced hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1), H61-H70
- Mineo C**, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW (2003): High density lipoprotein-induced endothelial nitric oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP-kinases. *J Biol Chem* 278(11), 9142-9
- Molkentin JD** (2004): Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 63(3), 467-75
- Molkentin JD**, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Garnt SR, Olson EN (1998): A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93(2), 215-28
- Moncada S**, Higgs A (1993): The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329(27), 2002-12

- Monoitte S**, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL (2001): Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 103(12), 1649-55
- Mount PF**, Kemp BE, Power DA (2007): Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 42(2), 271-9
- Nappi RE**, Rivest (1995): Stress-induced genetic expression of a selective corticotropin-releasing factor-receptor subtype within the rat ovaries: an effect dependent on the ovulatory cycle. *Biol Reproduct* 53(6), 1417-28
- Neumann J**, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC, Watanebe 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(1), 265-72
- Ng LL**, Loke IW, O'Brien RJ, Squire IB, Davies JE (2004): Plasma urocortin in human systolic heart failure. *Clin Sci (Lond)* 106(4), 383-8
- Nishikimi T**, Miyata A, Horio T, Yoshihara F, Nagaya N, Takishita S, Yutani C, Matsuo H, Matsuoka J, Kangawa K (2000): Urocortin, a member of the corticotropin-releasing factor family, in normal and diseased heart. *Am J Physiol Circ Physiol* 279(6), H3031-9
- Oakley RH**, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (1999): Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274(45), 32248-57
- Oakley RH**, Olivares-Reyes JA, Hudson CC, Flores-Vega F, Dautzenberg FM, Hauger RL (2007): Carboxyl-terminal and intracellular loop sites for CRF1 receptor phosphorylation and beta-arrestin-2 recruitment: a mechanism regulating stress and anxiety responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(1), 209-22
- Obansanjo-Blackshire K**, Mesquita R, Jabr RI, Mokentin JD, Hart SL, Marber MS, Xia Y, Heads RJ (2006): Calcineurin regulates NFAT-dependent iNOS expression and protection of cardiomyocytes: co-operation with Src tyrosine kinase. *Cardiovasc Res* 71(4), 672-83
- Okosi A**, Brar BK, Chan M, D'Souza L, Smith E, Stephanou A, Latchman DS, Chowdrey HS, Knight RA (1998): Expression and protective effects of urocortin in cardiac myocytes. *Neuropeptides* 32(2), 167-71
- Palchaudhuri MR**, Wille S, Mevenkamp G, Spiess J, Fuchs E, Dautzenberg FM (1998): Corticotropin-releasing factor receptor type 1 from *Tupaia belangeri*: cloning, functional expression and tissue distribution. *Eur J Biochem* 258(1), 78-84

- Parkes DG**, May CN (2000): Urocortin: A novel player in cardiac control. *New Physiol Sci* 15, 264-8
- Parkes DG**, Vaughan J, Rivier J, Vale W, May CN (1997): Cardiac inotropic actions of urocortin in conscious sheep. *Am J Physiol* 272, H2115-22
- Passier R**, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN (2000): CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest* 105(10), 1395-1406
- Periasamy M**, Bhupathy P, Babu GJ (2008): Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res* 77(2), 265-73
- Perrin MH**, Vale WW (1999): Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann NY Acad Sci* 885, 312-28
- Pieske B** (1998): New aspects of the pathophysiology of heart failure. *Wien Med Wochenschr* 148(5), 108-20
- Pinsky DJ**, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T (1997): Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res* 81(3), 372-9
- Pollock JS**, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F (1991): Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(23), 10480-4
- Pousset F**, Isnard R, Lechat P, Kalotka H, Carayon A, Maistre G, Escolano S, Thomas D, Komajda M (1997): Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 18(2), 254-8
- 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(12), 4217-27
- Rademaker MT**, Charles CJ, Espiner EA, Fisher S, Frampton CM, Kirkpatrick CM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Richards AM, Vale WW (2002): Beneficial hemodynamic, endocrine, and renal effects of urocortin in experimental heart failure: comparison with normal sheep. *J Am Coll Cardiol* 40(8), 1495-505
- Rademaker MT**, Cameron VA, Charles CJ, Richards AM (2005): Integrated hemodynamic, hormonal, and renal actions of urocortin 2 in normal and paced sheep: beneficial effects in heart failure. *Circulation* 112(23), 3624-32
- Rademaker MT**, Cameron VA, Charles CJ, Richards AM (2006): Urocortin 3: hemodynamic, hormonal, and renal effects in experimental heart failure. *Eur Heart J* 27(12), 2088-98

- Rainnie DG**, Bergeron R, Sajdyk TJ, Patil M, Gehlert DR, Shekhar A (2004): Corticotrophin releasing factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. *J Neurosci* 24(14), 3471-9
- Reddy LG**, Jones LR, Pace RC, Stokes DL (1996): Purified, reconstituted cardiac Ca²⁺-ATPase is regulated by phospholamban but not by direct phosphorylation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 271(25), 14964-70
- Ritter O**, Hack S, Schuh K, Röthlein K, Perrot A, Osterziel A, Schulte HD, Neyses L (2002): Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 105(19), 2265-9
- Rubin LJ**, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Blach CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G (2002): Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346(12), 896-903
- Sadoshima J**, Xu Y, Slayter HS, Izumo S (1993): Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75(5), 977-84
- Sande JB**, Sjaastad I, Hoen IB, Bokenes J, Tonnessen T, Holt E, Lunde PK, Christensen G (2002): Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res* 53(2), 382-91
- Sato Y**, Kiriazis H, Yatani A, Schmidt AG, Hahn H, Ferguson DG, Sako H, Mitarai S, Honda R, Mesnard-Roullier L, Frank KF, Beyermann B, Wu G, Fujimori K, Dorn GW 2nd, Kranias EG (2001): Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in caldesmon overexpressing myocardium by phospholamban ablation. *J Biol Chem* 276(12), 9392-9
- Schmidt U**, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK (1999): Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca²⁺ ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am J Physiol* 277, H474-80
- Schmitt JP**, Kamisago M, Asahi M, Li GH, Ahmad F, Mende U, Kranias EG, MacLennan DH, Seidman JG, Seidmann CE (2003): Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* 299(56111), 1410-3
- Schwinger RH**, Münch G, Böck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999): Reduced Ca²⁺-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 31(3), 479-91
- Senzaki H**, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, Paolucci N, Tomaselli GF, Hare IM, Kass DA (2001): Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J* 15(10), 1718-26

- Simmerman HK**, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR (1986): Sequence analysis of phospholamban identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem* 261(28), 13333-41
- Spiess J**, Dautzenberg FM, Sydow S, Hauger RL, Rühmann A, Blank T, Radulovic J (1998): Molecular Properties of the CRF Receptor. *Trends Endocrinol Metab* 9(4), 140-5
- Statistisches Bundesamt Deutschland** (2007): Herz-/Kreislaufkrankungen weiterhin häufigste Todesursache. Pressemitteilung Nr. 385 vom 21.9.2007
- Steenart NA**, Ganim JR, Di Salvo J, Kranias EG (1992): The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum in a type 1 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 293(1), 17-24
- Stewart DJ**, Levy RD, Cernacek P, Langleben D (1991): Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 114(6), 464-9
- Stojanovic MO**, Ziolo MT, Wahler GM, Wolska BM (2001): Anti-adrenergic effects of nitric oxide donor SIN-1 in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(1), C342-9
- Sugden PH, Clark A** (1997): Regulation of ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 9(5), 337-51
- Swanson SK**, Born T, Zysowsky LD, Cho H, Chang HY, Walsh CT, Rusnak F (1992): Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3741-5
- Swedberg K**, Eneroth P, Kjeksus J (1987): Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *New Eng J Med* 316, 1429-1435
- Takimoto Y**, Aoyama T, Keyamura R, Shinoda E, Hattori R, Yui Y, Sasayama S (2000): Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int J Cardiol* 76(2-3), 135-45
- Tokoro T**, Wang J, Kitajima I (2004): The novel HMG-CoA reductase inhibitor, Pitavastatin, induces a protective action in vascular endothelial cells through the production of nitric oxide (NO). *Takugaku Zasshi* 124(3), 121-6
- Townsend PA**, Davidson SM, Clarke SJ, Khaliulin I, Carroll CJ, Scarabelli TM, Knight RA, Stephanou A, Latchman DS, Halestrap AP (2007): Urocortin prevents mitochondrial permeability transition in response to reperfusion injury indirectly by reducing oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(2), H928-38
- Traebert M**, Trebeß I, Erenkamp S, Hüser J, Kockskämper J, Glitsch HG, Hartung C, Welzel P (1998): High affinity regulation of cardiac Cl⁻ and Ca²⁺ conductances by (13R)-spiroforskolin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358, 538-46

- Traustadottir T**, Bosch PR, Matt KS (2003): Gender differences in cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychological stress in healthy older adult men and women. *Stress* 6(2), 133-40
- Turnbull AV**, Vaughan J, Rivier JE, Vale WW, Rivier C (1999): Urocortin is not a significant regulator of intermittent electrofootshock-induced adrenocorticotropin secretion in the intact male rat. *Endocrinology* 140(1), 71-8
- Ugi S**, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, Obata T, Ebina Y, Kachiwagi 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(19), 8778-89
- Valdenaire O**, Giller T, Brey V, Gottowik J, Kilpatrick G (1997): A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin-releasing factor. *Biochem Biophys Acta* 1352(2), 129-32
- Vale W**, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981): Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213(4514), 1394-7
- Vanderheyden M**, Bartunek J, Goethals M (2004): Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur J Heart Fail*, 261-8
- Vanhaesenbroeck B**, Alessi DR (2000): The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346, 561-76
- Vila-Petroff MG**, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ (1999): Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 84(9), 1020-31
- Vita N**, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Lelias JM, Kaghad M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1993): Primary structure and functional expression of mouse and human brain corticotropin releasing factor receptors. *FEBS Lett* 335(1), 1-5
- Walther S**: Mechanismen der Urocortin-II-induzierten Stimulation der NO-Produktion in isolierten Kaninchen-Ventrikelmyozyten. *Med. Diss. Göttingen* 2009
- Wang H**, Kohr MJ, Wheeler DG, Ziolo MT (2008a): Endothelial nitric oxide synthase decreases beta-adrenergic responsiveness via inhibition of L-type Ca²⁺ current. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(3), H1473-80
- Wang H**, Kohr MJ, Traynham CJ, Wheeler DG, Janssen PM, Ziolo MT (2008b): Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban. *Am J Physiol Cell Physiol* 294(6), C1566-75
- Wang J**, Tokoro T, Matsui K, Higa S, Kitajima I (2005): Pitavastatin at low dose activates endothelial nitric oxide synthase through PI3K-AKT pathway in endothelial cells. *Life Sci* 76(19), 2257-68 23

- Wegener AD**, Simmerman HKB, Liepnieks J, Jones LR (1986): Proteolytic cleavage of phospholamban purified from canine cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles: generation of a low resolution model of phospholamban structure. *J Biol Chem* 261(11), 5154-9
- Wegener AD**, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR (1989): Phospholamban phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 264(19), 11468-74
- Whitworth JA** (1992): Adrenocorticotrophin and steroid-induced hypertension in humans. *Kidney Int Suppl.* 37, 34-7
- Wiley KE**, Davenport AP (2004): CRF2 receptors are highly expressed in the human cardiovascular system and their cognate ligands urocortin 2 and 3 are potent vasodilators. *Br J Pharmacol* 143(4), 508-14
- Williams MR**, Arthur JS, Balendran A, van der Kaay J, Poli V, Cohen P, Alessi DR (2000): The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol* 10(8), 439-48
- Wright SP**, Doughty RN, Frampton CM, Gamble GD, Yandle TG, Richards M (2009): Plasma Urocortin 1 in human heart failure. *Circ Heart Fail* 2(5), 465-71
- Xu KY**, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC (1999): Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(2), 657-62
- Xu Z**, Prak SS, Mueller RA, Bagnell RC, Patterson C, Boysen PG (2005): Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 65(4), 803-12
- Yang LZ**, Kockskämper J, Heinzl FR, Hauber M, Walther S, Spiess J, Pieske B (2006): Urocortin II enhances contractility in rabbit ventricular myocytes via CRF(2) receptor-mediated stimulation of protein kinase A. *Cardiovasc Res* 69(2), 402-11
- Yang LZ**, Kockskämper J, Khan S, Suarez J, Walther S, Doleschal B, Unterer G, Khafaga M, Mächler H, Heinzl FR, Dillmann WH, Pieske B, Spiess J (2011): cAMP and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases mediate inotropic, lusitropic and arrhythmogenic effects of urocortin 2 in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 162(2), 544-56
- Zhang XP**, Hintze TH (2006): cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(6), 2376-84
- Zhang YH**, Zhang MH, Sears CE, Emanuel K, Redwood C, El-Armouche A, Kranias EG, Casadei B (2008): Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice. *Circ Res* 102(2), 242-9
- Ziolo MT**, Kohr MJ, Wang H (2008): Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* 45(5), 625-32

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Burkert Pieske danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Dank seiner innovativen Vorlesungen weckte er mein Interesse für die Kardiologie.

Besonders herzlich möchte ich Prof. Dr. Jens Kockskämper für die Betreuung meiner Arbeit danken. Er lehrte mich mit viel Geduld wissenschaftlich zu arbeiten und zu denken. Auch über eine weite Entfernung war er für mich immer erreichbar und ich habe mich gut betreut gefühlt.

Ein Dankeschön auch an die medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Brigitte Korff und Frau Esther Messerschmidt, die mit viel Rat und Tat mit mir jedes Problem meisterten.

Für jegliche Art der Unterstützung, auch in technischen Fragen und in meiner Ausdrucksweise, möchte ich meiner Familie und meinen Freunden wirklich danken, ganz besonders Lydia Waldmann und Viktoria Friedl. Danke, dass ich so eine tolle Familie und so tolle Freunde habe, die immer ein aufmunterndes Wort für mich hatten, wenn es mal stagnierte, und mir geholfen haben, wo sie konnten.

Lebenslauf

Am 9. Dezember 1982 wurde ich, Susanne Renz, als Tochter von Brigitte Renz und Rüdiger Renz in Worms geboren.

Nach meiner Einschulung 1989 besuchte ich bis 1993 die Paternus-Grundschule in Worms und wechselte dann auf das Eleonorengymnasium in Worms, wo ich meine Schulausbildung 2002 mit dem Abitur abschloss.

Anschließend studierte ich im Wintersemester 2002/2003 Biomedizinische Chemie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

Im April 2003 begann ich mein Studium der Medizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Nach Bestehen des ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung 2005 entschloss ich mich zu meiner Dissertation in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie am Zentrum Innere Medizin der Georg-August-Universität Göttingen. Den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich im November 2009.

Meine Famulaturen absolvierte ich in den Bereichen Allgemeinmedizin (Praxis Prof. Dr. G. Boelcke, Wendelsheim), Anästhesiologie und Intensivmedizin (Klinikum Worms), Anästhesiologie (Herz- und Diabeteszentrum NRW), Kardiologie und Pneumologie, (Universitätsklinikum Göttingen), Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie (Klinikum Konstanz) und Radiologie und Nuklearmedizin (Praxis Dr. med. S. Schulz, Dr. med. E. Schäfer, Worms).

Seit dem April 2010 arbeite ich als Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe des Katholischen Klinikums Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. Wiest.