

Biologie

Untersuchung von Z-Scheiben Proteinen in
quergestreiften Muskeln mittels
2-D Elektrophorese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Stefanie Klede

aus Bremen

-2011-

Dekan: Prof. Dr. Christian Klämbt

Erster Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang A. Linke

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Eva Liebau

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2011

Tag der Promotion: 21.10.2011

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Sarkomer	1
1.2 Die Z-Scheibe	2
1.2.1 Aufbau der Z-Scheibe	2
1.2.2 Die Z-Scheibe als Knotenpunkt verschiedener Signalkaskaden	3
1.3 Kardiale Hypertrophie und Hypertrophie-assoziierte Erkrankungen	7
1.3.1 Herzinsuffizienz	8
1.3.2 Kardiomyopathien	9
1.4 Hypertrophie-Signalwege im Herzen	10
1.4.1 Die GPCR-abhängige Signalweiterleitung	10
1.4.2 Der CnA/NFAT-Signalweg	11
1.4.3 Der ERK1/2-MAPK-Signalweg	14
1.4.4 Der PKC-Signalweg	16
1.5 Das Muskel LIM Protein	18
1.5.1 MLP und die Entstehung von Herzerkrankungen	21
1.5.2 MLP, ein kardialer Stress-Sensor?	22
2. ZIELSETZUNG	24
3. MATERIAL	25
3.1 Verwendete Herzgewebe	25
3.2 Chemikalien	26
3.3 Lösungen und Reagenzien für die Proteinbiochemie	26
3.3.1 Proteinextraktion aus Herzgewebe	26
3.3.1.1 Subzelluläre Proteomfraktionierung von Herzgewebe	26
3.3.2 Protein-Konzentrationstests	27
3.3.2.1 Aceton-Fällung zur Ankonzentration von Proteinlösungen	27
3.3.2.2 Neuhoff'sche Konzentrationsbestimmung	27
3.3.2.3 Kits zur Bestimmung von Protein-Konzentrationen	27
3.3.3 Material und Lösungen für SDS-PAGE und Titingele	27
3.3.4 <i>Semi-Dry Immunoblotting</i>	28
3.3.5 2-D Gelelektrophorese	29
3.3.5.1 2-D Differenz Gelelektrophorese	30
3.3.6 Gelfärbungen	31
3.3.6.1 Coomassie-Färbung mit <i>Serva-Blue</i>	31
3.3.6.2 Coomassie-Färbung mit <i>Coomassie-Stain G250</i>	31
3.3.6.3 Blau-Silberfärbung nach Candiano <i>et al.</i>	31
3.3.6.4 Silberfärbung	32
3.3.7 Massenspektrometrie	32
3.3.7.1 Entfärbung und Verdau der Proteine	32
3.3.7.2 MALDI TOF/TOF MS/MS	33
3.3.7.3 vMALDI-LTQ	33
3.3.7.4 LC-ESI MS/MS	34

3.3.8 Proteinexpression	34
3.3.8.1 Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen	34
3.3.8.2 Plasmid-Präparation	35
3.3.8.3 Ansetzen eines Glycerin-Stocks	35
3.3.8.4 Ansetzen von Bakterienkulturen zur Proteinexpression	35
3.3.9 Phosphorylierungsstudien	36
3.3.9.1 Dephosphorylierung von Proteinlösungen für die 2-D DIGE	37
3.3.9.2 Autoradiographie	37
3.3.9.3 Interaktionsstudien	38
3.4 Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur	38
3.4.1 Zellkulturmaterial	38
3.4.2 Zellkulturlösungen	39
3.4.3 Zellkulturmedien	39
3.4.4 Material und Lösungen für die Immunhistologie	39
3.5 Antikörper	40
3.5.1 Primärantikörper	40
3.5.1.1 Entwicklung eines phosphorylierungsspezifischen MLP Antikörpers	41
3.5.2 Sekundärantikörper	41
3.6 Geräte	42
3.7 Software und Online-Datenbanken	43
<hr/>	
4. METHODEN	45
<hr/>	
4.1 Proteinbiochemie	45
4.1.1 Proteinextraktion aus Herzgewebe	45
4.1.2 Subzelluläre Proteomfraktionierung von Herzgewebe	45
4.1.3 Ankonzentration von Proteinlösungen durch Aceton-Fällung	46
4.1.4 Konzentrationstests	46
4.1.4.1 Neuhoff'sche Bestimmung von Proteinkonzentrationen	46
4.1.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit kommerziellen Kits	46
4.1.5 SDS-PAGE	46
4.1.5.1 Titingele	47
4.1.6 <i>Semi-Dry Immunblotting</i>	47
4.1.7 2-D Gelelektrophorese	48
4.1.7.1 Probenvorbereitung für die 2-D GE	49
4.1.7.2 Die 1. Dimension: Rehydrierung und IEF von IPG-Strips (pH 4-7)	49
4.1.7.3 Die 1. Dimension: Rehydrierung und IEF von IPG-Strips (pH 6-11)	50
4.1.7.4 Die 2. Dimension: Equilibrierung und SDS-PAGE	52
4.1.7.5 2-D DIGE	53
4.1.8 Gelfärbungen	56
4.1.8.1 Coomassie-Färbung mit <i>Serva Blue</i>	56
4.1.8.2 Coomassie-Färbung mit <i>Coomassie-Stain G250</i>	56
4.1.8.3 Blau-Silberfärbung nach Candiano <i>et al.</i>	56
4.1.8.4 Silberfärbung	56
4.1.9 Massenspektrometrie	57
4.1.9.1 Entfärbung der Gelstücke und Trypsin-Verdau	57
4.1.9.2 Proteinidentifikation mit dem ABI PRISM 4800 MALDI TOF/TOF	58
4.1.9.3 Identifikation von Phosphorylierungsstellen in MLP mit dem vMaldi-LTQ System	59
4.1.9.4 Proteinidentifikation durch LC-Elektrospray-Ionenfallen MS/MS	60

4.1.10 Expression von rekombinatem humanem MLP	61
4.1.10.1 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	61
4.1.10.2 Ansetzen eines Glycerin-Stocks aus einer Vorkultur	61
4.1.10.3 Ansetzen einer Vorkultur aus einem Glycerin-Stock	61
4.1.10.4 Ansetzen einer Hauptkultur und Induktion der Proteinexpression	61
4.1.10.5 Aufschluss der <i>E. coli</i> Zellen	61
4.1.10.6 Bindung der GST-Fusionsproteine an eine Glutathion-Sepharose Matrix	62
4.1.10.7 Entfernung des GST-tags durch Thrombin-Verdau	62
4.1.11 Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Studien	62
4.1.11.1 Dephosphorylierung von Proteinlösungen für die 2-D DIGE	63
4.1.11.2 Autoradiographie	63
4.1.11.3 <i>In vitro</i> Phosphorylierungstests	64
4.1.11.4 <i>In vitro</i> Dephosphorylierungstests	65
4.1.11.5 <i>In vitro</i> Interaktionstest zwischen CFL-2 und MLP bzw. S95 phosphoryliertem MLP	65
4.2 Zellkultur	66
4.2.1 Primärkultur von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten	66
4.2.1.1 Behandlung von NRVM mit ET-1 und dem Raf-1 Inhibitor GW5074	66
4.2.2 Immunfluoreszenzfärbung von NRVM	67
4.3 Statistik	67
<hr/>	
5. ERGEBNISSE	68
<hr/>	
5.1 Bei MLP-Defizienz sind vorrangig Chaperone und Sarkomer-assoziierte Proteine dysreguliert	68
5.1.1 Die 32kDa Isoform von FHL-1 ist in allen Kompartimenten von MLP ^{-/-} Herzzellen nachweisbar	71
5.1.2 Im MLP ^{-/-} ist die Expression von ERK1/2, CnA β und NFAT3 erhöht	72
5.1.3 Die FHL-1 Expression ist auch im MLP/CnA β -DKO erhöht	73
5.1.4 Die Expression von MLP beeinflusst die Titindegradation	74
5.2 In MLP^{W4R/W4R} Herzen sind Tropomyosin-α1- und α-Aktinin-2-Expression erhöht	75
5.3 Identifikation und Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen in MLP	76
5.3.1 Kardiales MLP ist an Serin-95 phosphoryliert	76
5.3.2 Spezifitätsnachweis der P-S95 MLP und MLP Antikörper	77
5.3.3 Die MLP S95 Phosphorylierung ist in verschiedenen Spezies konserviert	78
5.3.4 MLP und S95 phosphoryliertes MLP unterscheiden sich in ihrer Lokalisation in Kardiomyozyten nicht voneinander	79
5.3.5 MLP ist bereits im embryonalen Herzen an S95 phosphoryliert	80
5.3.6 MLP wird <i>in vitro</i> durch ERK2 und PKC ϵ phosphoryliert	80
5.3.7 Die MLP S95 Phosphorylierung wird durch ERK1 und ERK2 vermittelt	81
5.3.8 PKC ϵ phosphoryliert MLP an S46	82
5.3.9 Die MLP Phosphorylierungsstelle an S46 ist in verschiedenen Spezies konserviert	83
5.3.10 Die MLP S95 Phosphorylierung wird durch den MAPK-Signalweg reguliert	83
5.3.11 Die MLP S95 Phosphorylierung erfolgt unabhängig von FHL-1	84
5.3.12 CnA dephosphoryliert MLP an S95	85
5.3.13 Die MLP S95 Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität von MLP zu CFL-2	86
5.3.14 In Hundeherzen mit kompensatorischer Hypertrophie und DHF ist die Phosphorylierung von MLP an S95 CnA β -abhängig vermindert	87

6. DISKUSSION	89
6.1 Die DCM-Entwicklung im MLP ^{-/-} könnte primär durch die Dysregulation von Sarkomer-assoziierten Proteinen und Chaperonen ausgelöst werden	89
6.2 Die Titin-Degradation im MLP ^{-/-} ist möglicherweise aufgrund einer Dysregulation von Chaperonen abgeschwächt	91
6.3 Bewirkt die MLP W4R Mutation die Entstehung von HCM?	92
6.4 Die MLP S95 Phosphorylierung wird über den MAPK- sowie den CnA-Signalweg reguliert und ist Teil des kardialen Hypertrophie-Signalweges	93
7. ZUSAMMENFASSUNG	102
7.1 Abstract	105
8. LITERATURVERZEICHNIS	108
9. ANHANG	128
Anhang 1: Aufreinigung der MLP Antikörper durch Kreuz-Affinitäts- Chromatographie	128
Anhang 2: Generelles Funktionsprinzip der Massenspektrometrie	129
Anhang 2.1: Funktionsprinzip eines MALDI TOF/TOF Massenspektrometers	129
Anhang 2.2: Das vMALDI LTQ Ionenfallen-Massenspektrometer	131
Anhang 2.3: Funktionsprinzip des Easy nLC HPLC-Systems und der HCT Ultra ESI MS/MS	132
Anhang 3: 2-D DIGE und MS/MS Ergebnisse des Vergleichs von MLP ^{-/-} und wt Herzen	133
Anhang 4: Zoom auf einige 2-D DIGE Spots in MLP ^{-/-} und wt Herzen	136
Anhang 5: 2-D DIGE- und MS-Ergebnisse des Vergleichs von MLP ^{W4RW4R} und wt Herzen	137
Anhang 6: MS-Spektren einzelner Peptide, die zur Proteinidentifikation führten	140
Anhang 7: vMaldi Spektren zu den MLP Proben M1, M2, M4 und M5	141
Anhang 8: Immunfluoreszenzfärbungen an NRVM mit MLP- und P-S95 MLP-Antikörpern	142
Anhang 9: Kontrolle zur Expression von MLP-pGEX4T2 in <i>E. coli</i> DH5α	143
10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	144
PUBLIKATIONEN	
VERSICHERUNGEN	
Versicherungen nach § 6 Abs. 3, Nr. 5, 6, 9	
Versicherung nach § 6 Abs. 3 (2)	
MEIN HERZLICHER DANK...	

1. Einleitung

„Leben ist Bewegung und ohne Bewegung findet Leben nicht statt.“

Dieses Zitat von Moshe Feldenkrais beschreibt die Bedeutung der Muskulatur für Menschen und Tiere. Muskulatur ist nicht nur für die Ausführung von bewussten Bewegungen essentiell; sie ist auch Hauptbestandteil der inneren Organe und Gefäße. Selbst das Herz – der Antrieb allen Lebens – ist ein Muskel. Muskulatur dient zur Verrichtung mechanischer Arbeit, die durch Kontraktion von Muskelzellen (Myozyten) geleistet wird. Aufbau und strukturelle Organisation der Myozyten variieren in Abhängigkeit von der spezifischen Muskelfunktion. Generell wird zwischen der glatten Muskulatur der Gefäße und inneren Organe, der quergestreiften Muskulatur des Herzens und der quergestreiften Skelettmuskulatur unterschieden (Fahlke *et al.*, 2008).

1.1 Das Sarkomer

Das Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit der Kardiomyozyte und enthält somit die Motoren des Herzens. Es setzt sich (stark vereinfacht) aus drei Filamentsystemen (Myofilamenten) zusammen: dem dünnen Filament (Aktinfilament), dem dicken Filament (Myosinfilament) und dem Titinfilament. Die spezielle Anordnung der dicken und dünnen Filamente lässt das Sarkomer unter dem Mikroskop als ein Muster aus hellen (I-Band) und dunklen Banden (A-Band) erscheinen (Abb. 1a) (Fahlke *et al.*, 2008). Weitere Banden im Sarkomer sind die M-Linie und die Z-Scheibe. Die M-Linie liegt im Zentrum des A-Bandes und ist von einem schmalen, aktinfreien Bereich umgeben, der auch als H-Zone bezeichnet wird. Im Gegensatz zur zentral gelegenen M-Linie bilden die Z-Scheiben die äußeren Enden des Sarkomers. Zwei der drei Myofilamente, Aktin und Titin, sind an der Z-Scheibe verankert. Die über 1µm langen Titinmoleküle verlaufen von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Fürst *et al.*, 1988). Das Aktinfilament reicht von der Z-Scheibe über das I-Band bis ins A-Band. Zusätzlich sind Troponin- und Tropomyosinmultimere um den Aktin-Doppelstrang gewunden. Das Myosinfilament, in dessen Zentrum die M-Linie liegt, bedingt die optischen Eigenschaften des A-Bands (Abb. 1) (Boateng & Goldspink, 2008).

Im A-Band bilden die Aktin- und Myosinfilamente miteinander Querbrücken aus. Erhöht sich im Herzen die intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]$, so bewirkt dies eine Adenosintriphosphat (ATP) -abhängige Konformationsänderung der Querbrücken (Querbrückenmechanismus). Infolge dessen gleiten die Aktin- und Myosinfilamente gemäß der Gleitfilamenttheorie ineinander, wobei sich die I-Bande und H-Zone verschmälern. Im Gegensatz dazu bleibt die Breite der A-Bande konstant (Abb. 1b und Abb. 1c) (Fahlke *et al.*, 2008). Durch das Ineinandergleiten der Filamente verkürzen sich die Sarkomere und somit die Kardiomyozyten - das Herz kontrahiert (Systole) (Abb. 1c). Bei diesem Vorgang sind die Aktin- und Myosinfilamente für die Entwicklung der aktiven Kontraktionskraft im kardialen Sarkomer verantwortlich. Im Gegensatz dazu ist das Titinfilament - im Zusammenspiel mit Kollagenfasern - die Hauptdeterminante für die passive Federkraft, Steifigkeit und Viscoelastizität des Herzens (Linke, 2008).

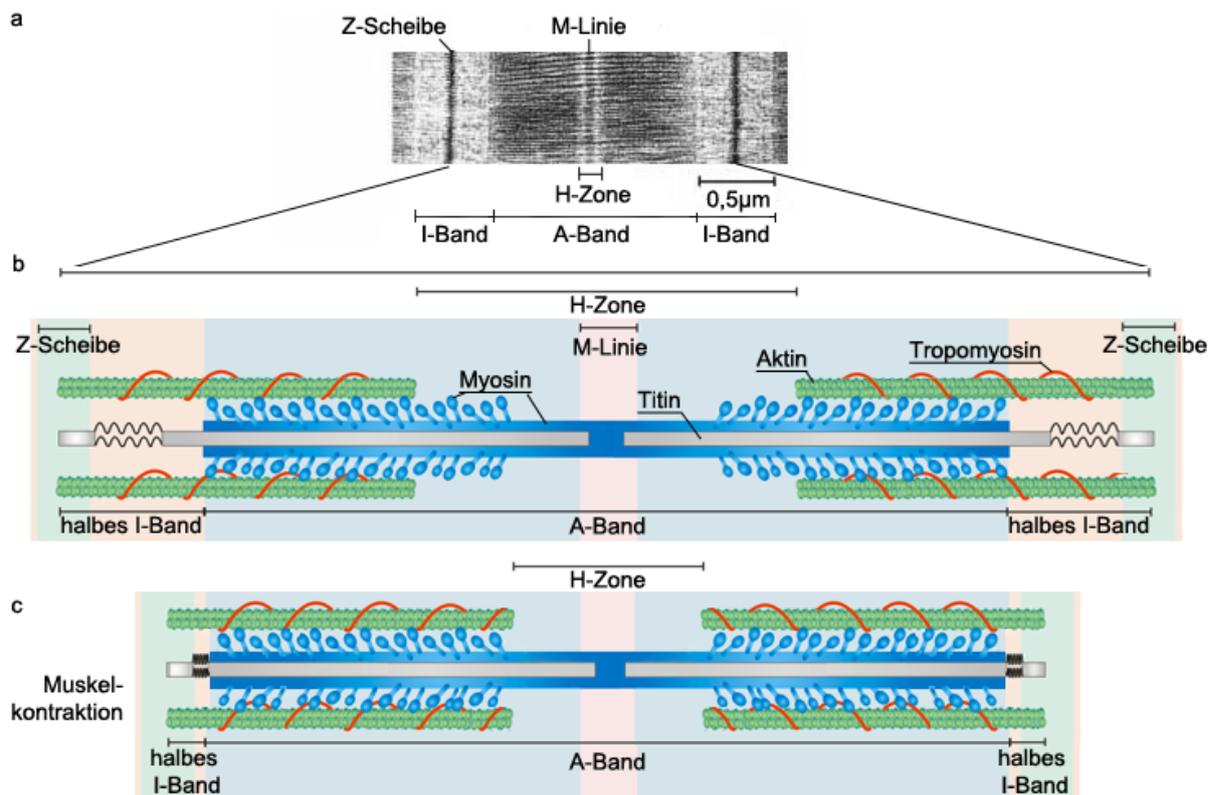


Abb. 1: Aufbau des Sarkomers im quergestreiften Muskel. (a) Mikroskopische Aufnahme der Sarkomerstruktur. Abbildung verändert nach <http://themedicalbiochemistrypage.org/muscle.html>. (b) Schematische Darstellung des relaxierten Sarkomers (c) Verkürztes Sarkomer während der Systole.

Die passiven mechanischen Eigenschaften werden u.a. entscheidend durch die Titinisoformen-Komposition beeinflusst. Im Herzen werden zwei verschiedene Titinisoformen exprimiert: die ca. 3,2 - 3,7 MDa große N2BA-Isoform, die eine relativ geringe passive Federkraft besitzt, und die steifere, ca. 3 MDa große N2B-Isoform (Linke, 2008). Die elastische Federregion des Titinfilaments wird während der Systole zusammengedrückt (Abb. 1b und Abb. 1c) (Fahlke *et al.*, 2008).

In Kardiomyozyten wird die Umwandlung von mechanischen Reizen in biochemische Signale vermutlich an verschiedenen Punkten koordiniert. Es wird angenommen, dass konformationsregulierte Mechanosensoren in den Umwandlungsprozess involviert sind, die an der M-Linie, dem I-Band und an der Z-Scheibe lokalisiert sein sollen (Knöll *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2006; Linke, 2008; Voelkel & Linke, 2011).

1.2 Die Z-Scheibe

1.2.1 Aufbau der Z-Scheibe

Die Z-Scheibe ist eine komplexe Struktur, welche von maßgeblicher Bedeutung für die Funktionalität des Herzens ist (Frank *et al.*, 2006). Im Längsschnitt ähnelt die Z-Scheibe einer gezackten Linie, weil benachbarte Sarkomere versetzt zueinander angeordnet sind (Abb. 2). An der Z-Scheibe wird das Aktinfilament durch das „Capping Protein“ CapZ abgeschlossen. Darüber hinaus werden verschiedene Aktinfilamente durch α -Aktinin-vermittelte Brückenbindungen miteinander vernetzt. Die an den Bindungen

beteiligten Aktinmoleküle und α -Aktinin-Homodimere sind in exakten Winkeln zueinander ausgerichtet. Bei Kontraktion des Sarkomers ändert sich die Ausrichtung der Brückenbindungen (Goldstein *et al.*, 1989; Voelkel & Linke, 2011). Im relaxierten kardialen Sarkomer kann die Z-Scheibe zwei verschiedene Konformationen einnehmen: die quadratische Gitterstruktur (*small-square lattice*) und die engmaschige Korbgeflechtstruktur (*basketweave lattice*) (Goldstein *et al.*, 1989; Voelkel & Linke, 2011). Außerdem wird angenommen, dass auch die Titinisoformen-Komposition die Konformation der Z-Scheibe beeinflusst (Voelkel & Linke, 2011).

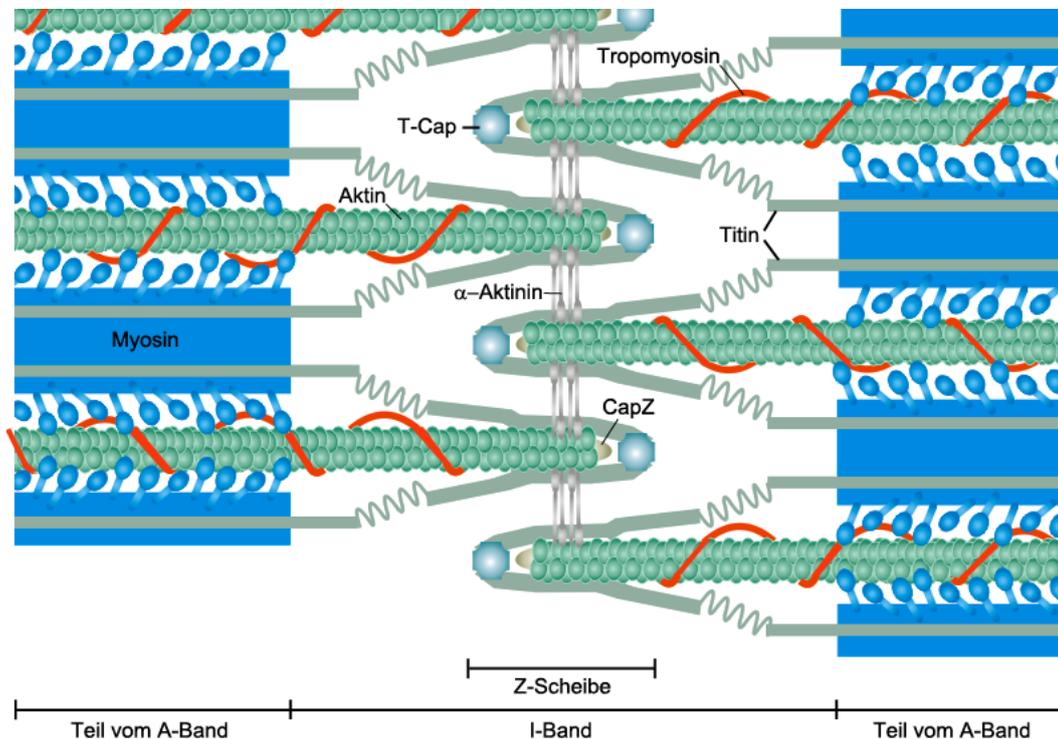


Abb. 2: Die versetzte Anordnung von Aktin-, Titin- und Myosinfilamenten im Längsschnitt durch die Z-Scheibe. Neben der Z-Scheiben Region sind auch Teile der angrenzenden I- und A-Banden abgebildet. Ein T-Cap Molekül verbindet in einer sandwichartigen Struktur je zwei Titinmoleküle an ihren NH₂-Termini. Die Aktinfilamente angrenzender Sarkomere werden durch α -Aktinin-Homodimere miteinander vernetzt.

Je zwei parallel angeordnete Titinmoleküle eines Halbsarkomers werden an der Z-Scheibe durch gemeinsame Bindung an Telethonin/T-Cap vernetzt. Dabei bildet T-Cap mit den Titindomänen Z1 und Z2 eine sandwichartige Struktur (Gregorio *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 2006). Darüber hinaus vermittelt T-Cap indirekte Interaktionen zwischen dem Titin NH₂-Terminus und verschiedenen Z-Scheiben-assoziierten Signalproteinen (Krüger & Linke, 2009).

1.2.2 Die Z-Scheibe als Knotenpunkt verschiedener Signalkaskaden

Die Strukturproteine der Z-Scheibe sind mit einer Vielzahl von Signalproteinen assoziiert, die wiederum an verschiedenen Signalkaskaden beteiligt sind. Daher ist die Z-Scheibe nicht nur ein bloßes Strukturelement des Sarkomers, sondern auch ein Knotenpunkt für verschiedene biochemische Signalkaskaden (Frank *et al.*, 2006). Aufgrund der besonderen funktionalen Dualität der Z-Scheibe wird vermutet, dass sie als Stress-

Sensor fungiert, dem u.a. die Umwandlung von mechanischen in biochemische Signale zugeschrieben wird (Knöll *et al.*, 2002; Pyle & Solaro, 2004; Heineke & Molkentin, 2006; Hoshijima, 2006). Bei diesem Umwandlungsprozess spielt vermutlich das Titinfilament eine besondere Rolle, da es zur Erzeugung der mechanischen Signale beiträgt und sowohl direkt als auch indirekt mit verschiedenen Signalmolekülen interagiert (Krüger & Linke, 2009; Voelkel & Linke, 2011).

Z-Scheiben-assoziierte Signalproteine ändern in Folge spezifischer Stimulation ihre Konformation und translozieren in andere zelluläre Kompartimente, wie z.B. den Nukleus (Voelkel & Linke, 2011). Im Nukleus interagieren Signalproteine u.a. mit Transkriptionsfaktoren, wodurch die Genexpression beeinflusst wird (Hoshijima, 2006; Krüger & Linke, 2009). Defekte in Z-Scheiben-Proteinen führen zur Dysregulation der assoziierten Signalwege, was wiederum die Entstehung verschiedener Formen von Herzmuskerkrankungen zur Folge hat (Frank *et al.*, 2006; Luther, 2009; Claeys *et al.*, 2009; Krüger & Linke, 2009). Zu den Z-Scheiben-assoziierten Signalproteinen, deren Defekt zur Entstehung von Herzerkrankungen beitragen, gehören z.B. Cypher-1, Calsarcin-1, Calcineurin (CnA), Proteinkinase C_{epsilon} (PKC_ε) und das Muskel LIM Protein (MLP) (Abb. 3).

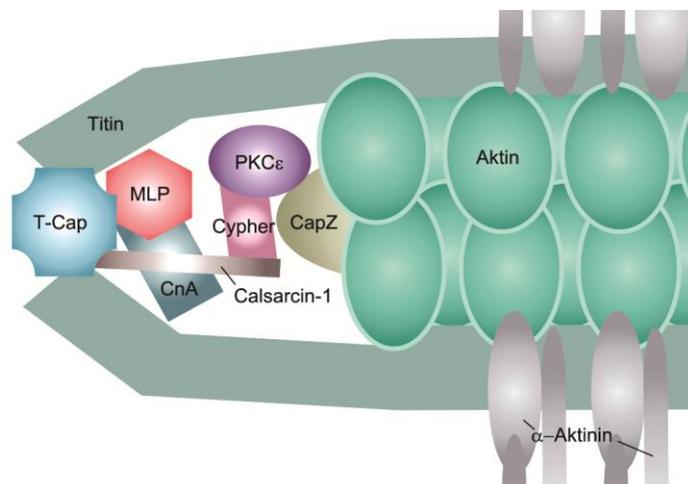


Abb. 3: Schematische Darstellung der Interaktion einiger Struktur- und Signalproteine an der Z-Scheibe von Kardiomyozyten. CnA: Calcineurin; MLP: Muskel LIM Protein; PKC_ε: PKC_{epsilon}.

Cypher-1 trägt zum Erhalt der Z-Scheiben-Struktur während der Kontraktion des Sarkomers bei (Zheng *et al.*, 2009). Außerdem ist Cypher-1 mit dem PKC-Signalweg assoziiert (Zheng *et al.*, 2010). Mutationen in Cypher-1 führen zur Entstehung von dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und Herzinsuffizienz (siehe Kapitel 1.3.1 und Kapitel 1.3.2) (Arimura *et al.*, 2009; Luther, 2009; Sheikh *et al.*, 2007; Vatta *et al.*, 2003). Zu den direkten Bindungspartnern von Cypher-1 zählen u.a. α-Aktinin, Calsarcin-1 und PKC_ε (Luther, 2009; Faulkner *et al.*, 1999; Frey & Olson, 2002; Zhou *et al.*, 1999).

Die Ca²⁺-abhängige Serin-Threonin Phosphatase CnA (auch Protein Phosphatase 2B, PP2B, genannt), setzt sich aus einer 59 - 63kDa großen katalytischen Untereinheit, CnA A, und einer 19kDa großen regulatorischen Untereinheit, CnA B, zusammen. Im Säugerherz werden zwei CnA A Isoformen exprimiert: CnA_{alpha} (CnA_α) und CnA_{beta} (CnA_β) (Heineke & Molkentin, 2006). CnA_β ist die stressresponsive CnA A Isoform. Die Expression von CnA_β wird durch hypertrophe Stimulation gesteigert. Der homozygote

CnAβ *knock-out* (KO) in der Maus bewirkt eine drastische Reduktion der Hypertrophie-Induktionsfähigkeit des Herzens (Bueno *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2001; Jabr *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2005; Taigen *et al.*, 2000). An der Z-Scheibe interagiert CnA u.a. mit MLP, Calmodulin (CaM) und Calsarcin-1 (Frey *et al.*, 2000; Pyle & Solaro, 2004; Frank *et al.*, 2006). In Kardiomyozyten bindet CnA am Sarkolemma an das Ca²⁺- und Integrin-bindende Protein-1 (CIB1) sowie an L-Typ Ca²⁺-Kanäle (Heineke *et al.*, 2010_B; Tandan *et al.*, 2009). CnA reguliert die Aktivität der hypertrophen Transkriptionsfaktoren Nuklearer Faktor von aktivierten T-Zellen (NFAT) (siehe Kapitel 1.3.3.2) sowie Myozyten *Enhancer* Faktor 2C (MEF2C). Durch die Interaktion mit MEF2C beeinflusst CnA auch die MEF2C-abhängige MLP Expression (Aramburu *et al.*, 2000; Clerk *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2009; Stronach *et al.*, 1999).

Calsarcin-1 ist die herzspezifische Isoform des CnA-assoziierten sarkomerischen Proteins (calcineurin-associated sarcomeric protein = Calsarcin) und fungiert u.a. als Inhibitor der CnA-Aktivierung (Frey *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2004; Paulsson *et al.*, 2010). Weitere Bindungspartner von Calsarcin-1 sind α-Aktinin, γ-Filamin, Cypher-1 und T-Cap (Pyle & Solaro, 2004; Hoshijima, 2006; Frank *et al.*, 2006).

Die Serin-Threonin-Kinasen der PKC-Familie regulieren in Kardiomyozyten u.a. die Kontraktion sowie verschiedene physiologische Hypertrophie-Signalwege (siehe Kapitel 1.4.4) (Frank *et al.*, 2006). Die PKC-Isoform PKCε interagiert an der Z-Scheibe z.B. mit MLP, Cypher, CapZ und der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) (Edmondson *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2006; Pyle *et al.*, 2002; Robia *et al.*, 2001). PKCε ist in Kardiomyozyten außerdem am Sarkolemma sowie im Nukleus lokalisiert (Newton & Messing, 2010; Ventura *et al.*, 1995).

MLP gehört sowohl zu den Struktur- als auch zu den Signalproteinen. An der Z-Scheibe interagieren MLP-Multimere u.a. mit T-Cap, α-Aktinin, CnA und PKCε (Arber & Caroni, 1996; Boateng *et al.*, 2007; Heineke *et al.*, 2005; Knöll *et al.*, 2002) (siehe Kapitel 1.5).

An die Z-Scheibe und einen Teil des I-Bandes grenzt eine subsarkolemmale Struktur, die als Costamer bezeichnet wird (Abb. 4) (Samarel, 2005). Costamer-assoziierte Proteine vernetzen im Sarkolemma verankerte Signalmoleküle mit Z-Scheiben-Proteinen und dienen als Krafttransmissionsschaltstelle zwischen benachbarten Kardiomyozyten (Hoshijima, 2006; Samarel, 2005; Srivastava & Yu, 2006). Am Costamer sind u.a. Integrine, Desmin, γ-Filamin und die Proteine des Fokalen Adhäsionskomplexes lokalisiert (Abb. 4) (Samarel, 2005).

Integrine sind Membranproteine, die das Costamer direkt mit der Extrazellulären Matrix (ECM) verbinden. Sie dienen der Übertragung von Signalen zwischen angrenzenden Kardiomyozyten (Tirziu *et al.*, 2010). Das sarkoplasmatische Ende der Integrine interagiert im Fokalen Adhäsionskomplex u.a. mit FAK und der Integrin-Linked-Kinase (ILK) (Frank *et al.*, 2006; Hannigan *et al.*, 2007).

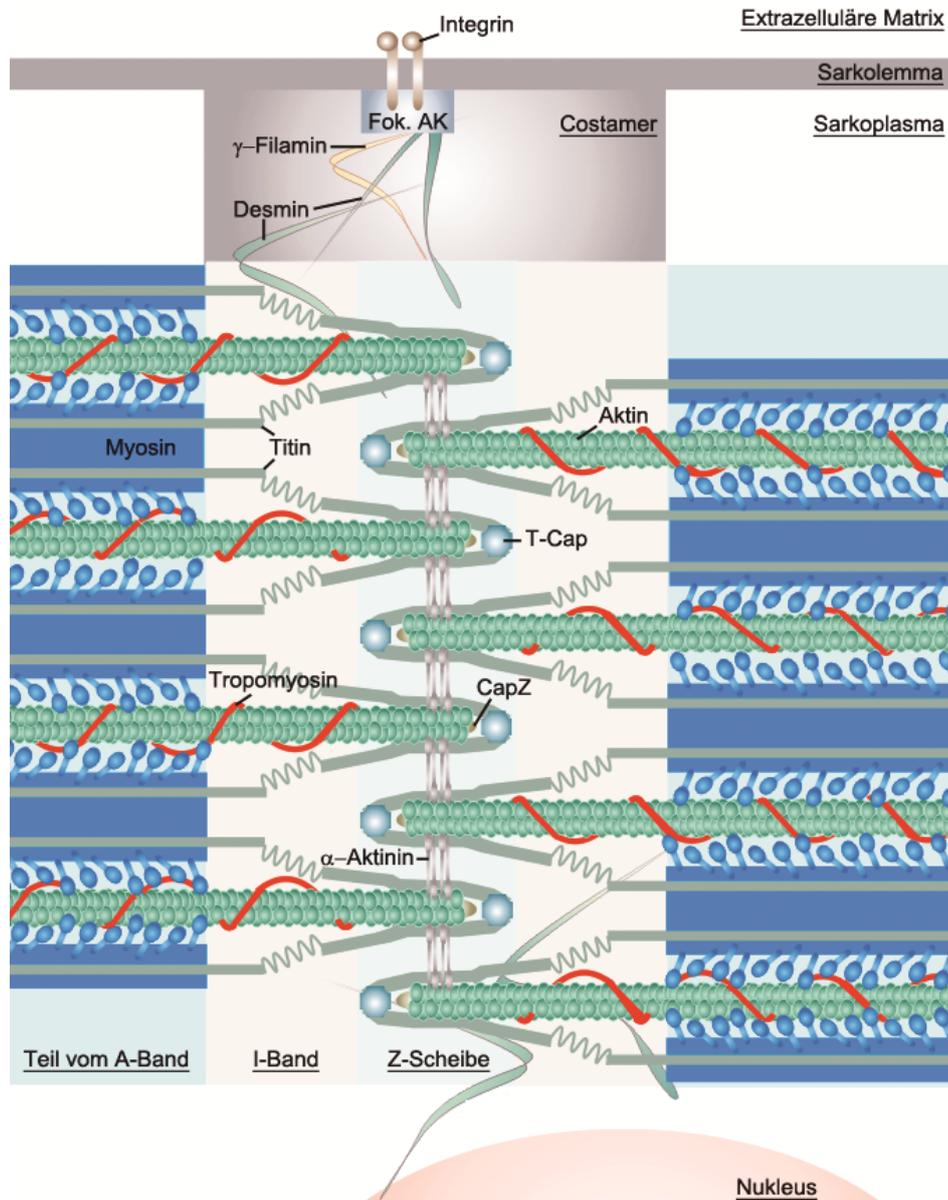


Abb. 4: Schematische Darstellung der Verbindung zwischen Extrazellulärer Matrix, Costamer, Z-Scheibe und Nukleus. Fok. AK: Fokaler Adhäsionskomplex.

Der Fokale Adhäsionskomplex ist ein Multiproteinkomplex, der Integrine mit dem Cytoskelett verbindet. Zum Fokalen Adhäsionskomplex gehören Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen (z.B. FAK), Serin-Threonin Kinasen (z.B. ILK und PKC ϵ), cytoskelettale Strukturproteine (z.B. α -Aktinin) und Signalmediatoren [z.B. das kleine Guanosin triphosphat- (GTP-) bindende Protein Ras] (Hannigan *et al.*, 2007; Hoshijima, 2006; Samarel, 2005; Srivastava & Yu, 2006).

Desmin und γ -Filamin sind intermediäre Filamentproteine, die zur Vernetzung der Aktinfilamente beitragen und die Z-Scheibe mit dem Fokalen Adhäsionskomplex verbinden (Frank *et al.*, 2006). Außerdem verbindet Desmin benachbarte Z-Scheiben und reicht bis hin zur Nukleusmembran (Capetanaki *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2004; Goldfarb & Dalakas, 2009).

1.3 Kardiale Hypertrophie und Hypertrophie-assoziierte Erkrankungen

Als *Muskel-Hypertrophie* bezeichnet man die Zunahme des Muskelfaserdurchmessers aufgrund eines verstärkten Einbaus von Myofilamenten, wobei die Zellzahl unverändert bleibt (Fahlke *et al.*, 2008). Auslöser für die Entstehung einer Hypertrophie können biomechanischer Stress, die Dysregulation von dehnungssensitiven Mechanismen und die Ausschüttung neurohumoraler Botenstoffe sein [z.B. Endothelin-1 (ET-1) und Angiotensin-II (AngII)] (Heineke & Molkentin, 2006). Das Laplace-Gesetz bezogen auf das Herz besagt, dass die transmurale Wandspannung (T) dem Ventrikeldruck (p) und dem inneren Radius des Ventrikels (r) direkt proportional ist, zur Wanddicke (h) aber indirekt proportional:

$$T = \frac{p \cdot r}{2h} \quad (1)$$

Demnach wird eine erhöhte Wandspannung im Herzen, die durch einen verstärkten transmuralen Druck hervorgerufen wurde, durch hypertrophes Ventrikelwachstum reduziert (Paulus *et al.*, 1976). Dementsprechend führt eine Hypertonie-bedingte Erhöhung der kardialen Nachlast zur Entstehung von linksventrikulärer Hypertrophie (Battegay *et al.*, 2005; Frohlich *et al.*, 1992; Norton, 2001).

Je nach Art des Kardiomyozytenwachstums wird zwischen physiologischer und pathologischer Hypertrophie unterschieden (Abb. 5).

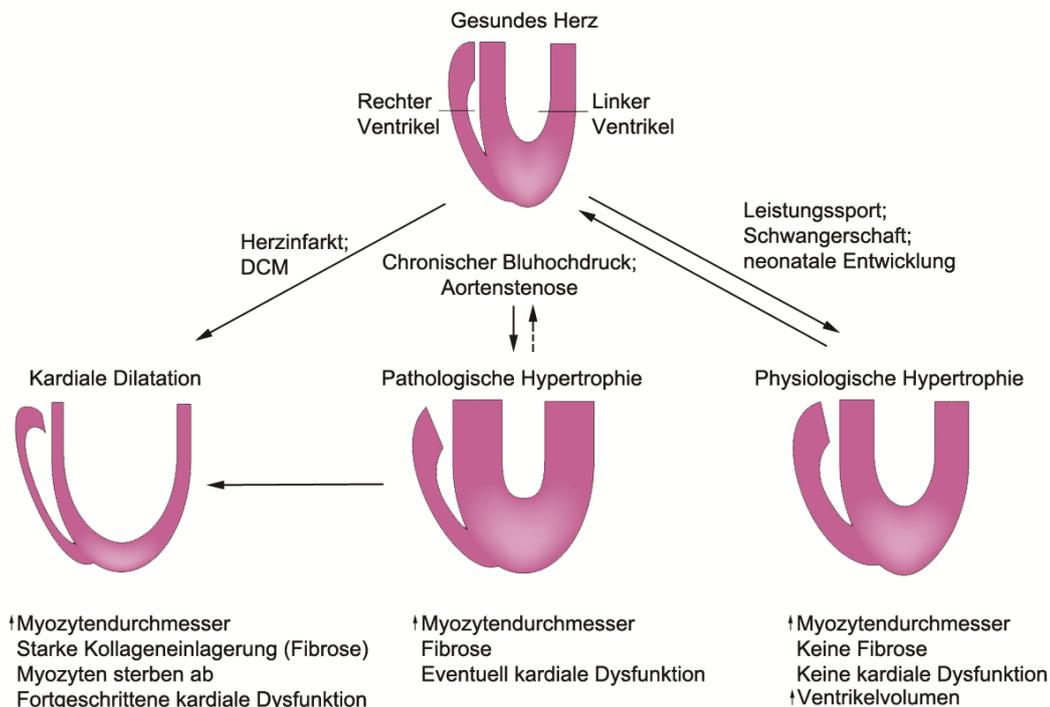


Abb. 5: Schematische Darstellung der Entwicklung von physiologischer und pathologischer Hypertrophie im Herzen. Abbildung verändert nach Heineke & Molkentin (2006).

Herzen mit physiologischer Hypertrophie zeigen ein gleichmäßig dimensioniertes (exzentrisches) Wachstum des Myokards, d.h. es vergrößern sich nicht nur die Ventrikelwände sondern auch die Ventrikelvolumina (Heineke & Molkentin, 2004).

Ist das Herz dauerhaft einem erhöhten biomechanischen Stress ausgesetzt, so normalisiert die Hypertrophie entsprechend des Laplace'schen Gesetzes die ventrikuläre Wandspannung und die Herzfunktion wird aufrecht erhalten (Norton, 2001). Auslöser für die Entstehung einer physiologischen Hypertrophie können z.B. Schwangerschaft oder intensive sportliche Betätigung (z.B. bei Leistungssportlern) sein. Darüber hinaus ist die physiologische Hypertrophie Teil der normalen postnatalen Entwicklung (Porrello *et al.*, 2008).

Herzen mit pathologischer Hypertrophie weisen ein stärkeres Längen- als Breitenwachstum auf (konzentrisches Wachstum). Konzentrisches Zellwachstum bewirkt die Verkleinerung des Ventrikelvolumens und vermindert folglich das kardiale Pumpvolumen. Herzen mit pathologischer Hypertrophie weisen außerdem eine verminderte Elastizität auf (Heineke & Molkentin, 2006). Auslöser für die Entstehung von pathologischer Hypertrophie können Veränderungen des extrinsischen oder intrinsischen biomechanischen Stresses sein. Intrinsischer Stress wird z.B. durch Gendefekte in Sarkomer- (assoziierten) Proteinen ausgelöst. Zu den extrinsischen Stressfaktoren zählen u.a. Herzklappendefekte und arterieller Bluthochdruck (Hypertonie) (Frey & Olson, 2003).

Mit Fortschreiten der pathologischen Hypertrophie entstehen massive myokardiale Fibrosen und es kommt zum vermehrten Absterben von Kardiomyozyten und zur Dilatation des Ventrikels (dilatative Kardiomyopathie) (Abb. 5). Die kardiale Dysfunktion nimmt immer weiter zu, was zum plötzlichen Herztod führen kann (Frey & Olson, 2003; Heineke & Molkentin, 2006; Porrello *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 1996). Man spricht in diesem Zusammenhang von einem *maladaptiven Verlauf* der Hypertrophie.

1.3.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein komplexes klinisches Syndrom, das aufgrund einer kardialen Dysfunktion entsteht. Ein wesentliches Charakteristikum der Herzinsuffizienz ist eine verminderte bzw. unzureichende Funktionsfähigkeit des Herzens (Roger, 2010). In der westlichen Welt gilt Herzinsuffizienz als häufigste Todesursache und etwa 90% aller Herzinsuffizienzpatienten sterben innerhalb von zehn Jahren (Regitz-Zagrosek *et al.*, 2010; Roger, 2010). Herzinsuffizienz entsteht zumeist infolge einer Vorerkrankung, wie z.B. Hypertonie, Herzmuskelentzündung (Myokarditis), Herzklappeninsuffizienz oder Kardiomyopathie (siehe Kapitel 1.3.2).

Beim Übergang von kompensatorischer Hypertrophie zu Herzinsuffizienz sind verschiedene Strukturen und Prozesse betroffen, die zusammengenommen die systolische und/oder diastolische Ventrikelfunktion vermindern. Dazu zählen (Heineke & Molkentin, 2006; Oka & Komuro, 2008):

- Entstehung einer Hypertrophie,
- Veränderungen in der Expression sowie Funktion von kontraktionsregulierenden Proteinen,
- Absterben von Kardiomyozyten durch verstärkte Nekrose- bzw. Apoptose-Induktion,

- Fortschreiten einer Fibrose und
- Änderung der Signalweiterleitung zwischen benachbarten Kardiomyozyten.

Eine Herzinsuffizienz, die mit einem verminderten ventrikulären Blutausswurfvolumen einhergeht, wird als *systolische Herzinsuffizienz* (SHF) bezeichnet. Ist hingegen das Blutausswurfvolumen unverändert, jedoch die Befüllbarkeit der Ventrikel herabgesetzt, so spricht man von einer *diastolischen Herzinsuffizienz* (DHF) (Oka & Komuro, 2008; Paulus *et al.*, 2007; Roger, 2010). Sowohl DHF als auch SHF führen zu einer fortschreitenden Verschlechterung der kardialen Pumpleistung (Oka & Komuro, 2008). Die DHF tritt insbesondere bei älteren Patienten mit chronischer Hypertonie auf. Insgesamt ist ungefähr die Hälfte aller diagnostizierten Herzinsuffizienz-Fälle diastolischen Ursprungs (Munagala *et al.*, 2005; Paulus, 2010).

1.3.2 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind Herzerkrankungen, die mit einer mechanischen und/oder elektrischen kardialen Dysfunktion einhergehen. Es gibt verschiedene Formen von Kardiomyopathien, wie z.B. die hypertrophe (HCM), die dilatative (DCM) und die ischämische (ICM) (Maron *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 1996).

HCM Herzen zeigen eine konzentrische, häufig asymmetrische, nicht-dilatative kardiale Hypertrophie. Die systolische Funktion des linken Ventrikels (LV) ist dabei unverändert oder leicht erhöht, die diastolische Funktion kann gestört sein. Weitere pathologische Charakteristika der HCM sind interstitielle Fibrosen und eine gestörte Myofibrillen-Organisation. Die HCM tritt mit einer Häufigkeit von mindestens 1:500 auf, wobei ungefähr die Hälfte aller HCM-Erkrankungen familiär bedingt ist. In diesem Zusammenhang spricht man von familiärer hypertrophischer Kardiomyopathie (FHC). Die FHC gilt als häufigste genetisch bedingte Herzerkrankung (Marian, 2010; Olivotto *et al.*, 2009). Folgen einer HCM können kardiale Arrhythmien sowie das plötzliche Eintreten des Todes sein (Richardson *et al.*, 1996).

Im Unterschied zur HCM geht die DCM mit einer Ventrikeldilatation sowie einer systolischen Dysfunktion im LV einher. In selteneren Fällen kann auch der rechte Ventrikel (RV) betroffen sein (Elliott *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 1996). Die DCM tritt mit einer Häufigkeit von 1:2.500 auf und gilt als dritthäufigste Ursache für die Entstehung von Herzinsuffizienz und als häufigster Grund von Herztransplantationen (Maron *et al.*, 2006). Genau wie die HCM kann auch die DCM zum plötzlichen Eintritt des Todes führen (Elliott *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 1996).

Bei der ICM wird die kontraktile Dysfunktion durch eine Sauerstoffunterversorgung des Herzens ausgelöst. Ursachen für die Entstehung einer ICM können z.B. Erkrankungen der Koronararterien oder eine DCM-Vorerkrankung sein (Candell-Riera *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 1996).

1.4 Hypertrophie-Signalwege im Herzen

Hypertrophe Stimulation aktiviert verschiedene Transmembranproteine im Sarkolemma von Kardiomyozyten. Zu diesen Transmembranproteinen gehören z.B. die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) (Heineke & Molkentin, 2006). GPCRs, die mit hypertrophen Signalkaskaden assoziiert sind, aktivieren die Expression hypertropher Gene. Dadurch wird die Proteinsynthese erhöht und der Myofibrilleneinbau verstärkt. Zu den hypertrophen Signalkaskaden gehören u.a. der Proteinkinase A- (PKA-), der CnA/NFAT-, der PKC- und der Mitogen-aktivierte Proteinkinase- (MAPK-) Signalweg (Bassel-Duby & Olson, 2003; Frey & Olson, 2003; Molkentin & Dorn, 2001).

1.4.1 Die GPCR-abhängige Signalweiterleitung

Die kardiale Funktion und ihre Adaption an hämodynamische Veränderungen werden maßgeblich durch GPCRs reguliert (Akhter *et al.*, 1998; Frey & Olson, 2003). Eine GPCR-Überexpression kann zur Entstehung von Herzerkrankungen führen (Lemire *et al.*, 2001). GPCRs werden durch Bindung von sympathischen (adrenerge GPCRs) oder parasymphatischen Neurotransmittern (muskarinerge GPCRs) aktiviert, wobei sich auch die Konformation der GPCR-assoziierten G-Proteine verändert. Jedes G-Protein setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen: G_{α} (G_{α}), G_{β} (G_{β}) und G_{γ} (G_{γ}). Durch die GPCR-abhängige Konformationsänderung im G-Protein können $G_{\beta/\gamma}$ und G_{α} dissoziieren. Daraufhin aktivieren bzw. inhibieren $G_{\beta/\gamma}$ und G_{α} verschiedene Signalmoleküle (Abb. 6) (Molkentin & Dorn, 2001).

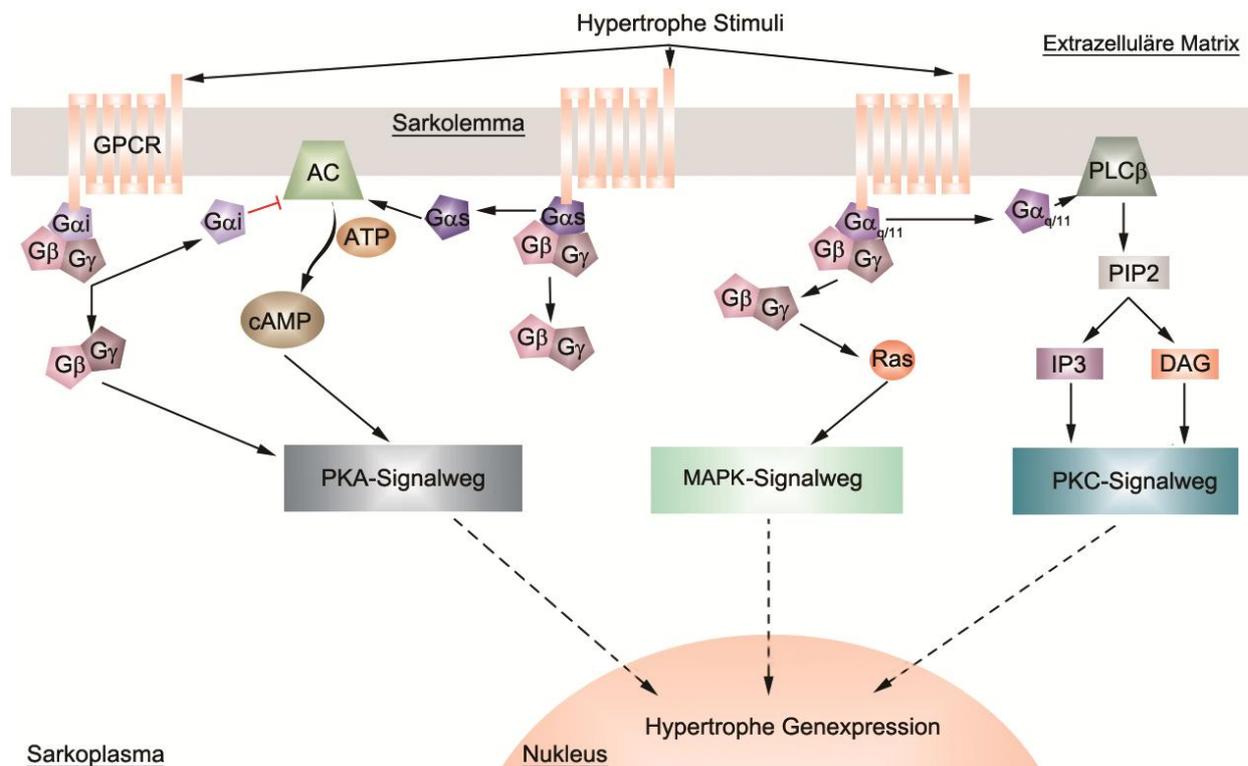


Abb. 6: Schematische Darstellung der hypertrophen Signalweiterleitung über GPCRs. AC: Adenylatzyklase; ATP: Adenosinriphosphat, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; DAG: Diacylglycerin; $G_{\alpha s}$: stimulatorisches G-Protein; $G_{\alpha i}$: inhibitorisches G-Protein; $G_{\alpha q/11}$: $G_{\alpha q/11}$ -Protein; GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor; IP3: Inositol-1,4,5-trisphosphat; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C; PLC β : Phospholipase C β .

Je nachdem welche spezifische Wirkung G-Proteine auf Signalmoleküle haben, werden die G-Proteine in Gruppen (z.B. G_{α_s} , G_{α_i} und $G_{\alpha_q/11}$) eingeteilt (Frey & Olson, 2003).

Zur Gruppe der G_{α_s} -Proteine gehören stimulatorische G_{α} -Proteine, welche die Aktivierung von Adenylatzyklase vermitteln. Adenylatzyklase wiederum katalysiert den Umsatz von ATP zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), dem Aktivator von PKA (Abb. 6). Zu den G_{α_s} -gekoppelten GPCRs gehören die β -adrenergen Rezeptoren (Frey & Olson, 2003; Fahlke *et al.*, 2008; Michal, 1999).

G_{α_i} -Proteine sind inhibitorische G_{α} -Proteine, die hemmend auf die Aktivität der Adenylatzyklase wirken. Die Aktivierung von G_{α_i} -gekoppelten GPCRs, zu denen die muskarinergen Rezeptoren M2 und M4 sowie α_2 -adrenerge Rezeptoren gehören, vermindert demnach die cAMP-Bildung (Abb. 6) (Frey & Olson, 2003; Michal, 1999).

$G_{\alpha_q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren, zu denen beispielsweise α -adrenerge und muskarinerge GPCRs gehören, regulieren die $G_{\alpha_q/11}$ -Protein-vermittelte Phospholipase C β (PLC β) Aktivierung. Aktive PLC β katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in die Signalmoleküle Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) (Abb. 6) (Frey & Olson, 2003; Michal, 1999). Die Aktivierung von $G_{\alpha_q/11}$ -Proteinen ist fester Bestandteil der kardialen Hypertrophie-Antwort (Akhter *et al.*, 1998; Molkentin & Dorn, 2001)

Neben den G_{α_s} , G_{α_i} und $G_{\alpha_q/11}$ Proteinen gibt es eine vierte Gruppe der G_{α} -Proteine: die kleinen G-Proteine, deren Bezeichnung sich auf ihr relativ geringes Molekulargewicht (MW) von ca. 21kDa bezieht. Zu den kleinen G-Proteinen gehören u.a. Ras, Rac und Rho (Michal, 1999; Molkentin & Dorn, 2001). Die Aktivierung von Ras wird durch $G_{\alpha_q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren (Abb. 6) sowie membrangebundene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) vermittelt. Durch Stimulation der Rezeptoren wird der Austausch von Ras-gebundenem Guanosindiphosphat (GDP) gegen GTP initiiert. In diesen Austausch sind insbesondere die GDP/GTP-Austauschfaktoren $G_{\beta/\gamma}$ und die RTK-gebundenen Faktoren Grb2 und Sos1 involviert (Michal, 1999; Molkentin & Dorn, 2001; Proud, 2004).

1.4.2 Der CnA/NFAT-Signalweg

Der CnA/NFAT-Signalweg ist Bestandteil der pathologischen und eventuell auch der physiologischen Hypertrophie-Antwort (Frey & Olson, 2003; Kolwicz *et al.*, 2009; Luedde *et al.*, 2006; Wilkins & Molkentin, 2004). Patienten mit kompensatorischer Hypertrophie zeigen eine stark erhöhte Aktivierung des CnA/NFAT-Signalwegs. Gleiches gilt für Herzinsuffizienz-Patienten, obschon der Effekt hier im Vergleich zur kompensatorischen Hypertrophie schwächer ausfällt (Diedrichs *et al.*, 2007; Haq *et al.*, 2001). Wird der CnA/NFAT-Signalweg blockiert, so wird auch die kardiale Hypertrophie-Induktion gehemmt (Bueno *et al.*, 2002; Bueno *et al.*, 2004; Heineke *et al.*, 2010_B). Hypertrophe Stimuli bewirken einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Das ins Sarkoplasma strömende Ca^{2+} bindet an verschiedene Ca^{2+} -abhängige Proteine, wie z.B. die CnA-Aktivatoren CaM und μ -Calpain (Abb. 7) (Houser & Molkentin, 2008; Wu *et al.*, 2007).

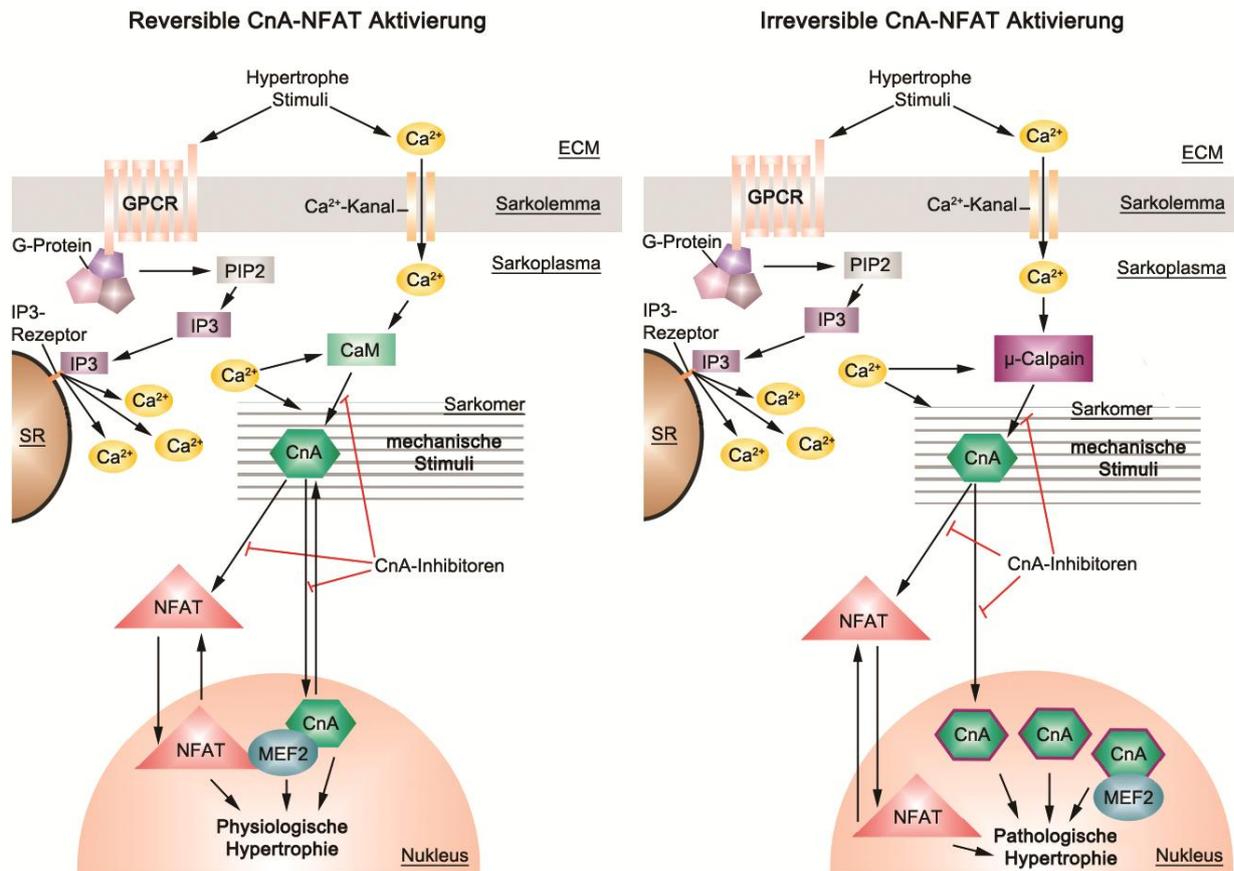


Abb. 7: Gegenüberstellung der reversiblen und irreversiblen CnA/NFAT-Hypertrophie-Signalwege. CaM: Calmodulin; CnA: Calcineurin; ECM: Extrazelluläre Matrix; GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor; IP3: Inositol-1,4,5-trisphosphat; MEF2: Myozyten Enhancer Faktor 2; NFAT: Nuklearer Faktor von aktivierten T-Zellen; PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum.

CaM ist ein Adapterprotein mit vier Ca²⁺-Bindungsstellen. Durch Bindung von Ca²⁺ ändert sich die Konformation von CaM, wodurch die CaM-Adapterfunktion aktiviert wird (Michal, 1999; Heineke & Molkentin, 2006). Das Ca²⁺-gebundene CaM wandert an die Z-Scheibe und bindet an die regulatorische CnA-Untereinheit CnA B. Die Interaktion von CnA B mit CaM bewirkt die Freilegung der katalytischen CnA Untereinheit CnA A. Aktives CnA wandert zu seinen verschiedenen Substraten, um diese zu dephosphorylieren. Zu den CnA-Substraten gehören u.a. vier Isoformen des Transkriptionsfaktors NFAT (NFATc1 - NFATc4) (Jain *et al.*, 1993). Durch die CnA-vermittelte Dephosphorylierung wird die Konformation in NFAT verändert, wodurch ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) freigelegt wird (Aramburu *et al.*, 2004; Im & Rao, 2004; Okamura *et al.*, 2000; Shibasaki *et al.*, 1996). Daraufhin wandern CnA und NFAT in den Nukleus. Im Nukleus dephosphoryliert CnA den hypertrophen Transkriptionsfaktor Myozyten Enhancer Faktor 2 (MEF2) und steigert dadurch die Aktivität von MEF2 (Baines & Molkentin, 2005; Wilkins & Molkentin, 2004). NFAT hingegen wirkt, in Abhängigkeit von seinen nukleären Interaktionspartnern, entweder stimulierend oder hemmend auf die Expression seiner assoziierten Gene (Im & Rao, 2004). So induziert NFAT z.B. im Zusammenspiel mit Aktivator-Protein-1 (AP-1), MEF2, GATA-Sequenz-bindenden Transkriptionsfaktoren (z.B. GATA4) und Histon-Deacetylasen (HDACs) die Expression verschiedener hypertropher Gene (Bassel-Duby & Olson, 2003; Frey & Olson, 2003; Heineke & Molkentin, 2006; Im & Rao, 2004; Macián *et al.*, 2001). Sobald die sarkoplasmatische Ca²⁺-Konzentration sinkt, löst sich CaM von CnA wodurch CnA inaktiviert wird. Inaktives CnA

verlässt den Nukleus und kehrt an die Z-Scheibe zurück. NFAT wird erneut phosphoryliert und verlässt den Nukleus ebenfalls. Die CaM-vermittelte Aktivierung des CnA/NFAT-Signalwegs ist somit reversibel und vermutlich an der Entstehung der physiologischen Hypertrophie beteiligt (Wu *et al.*, 2007).

Im Gegensatz dazu ist die μ -Calpain-vermittelte CnA-Aktivierung irreversibel und mit der Entstehung von pathologischer Hypertrophie assoziiert (Abb. 7). Die Cystein-Protease μ -Calpain wird durch den Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert (Burkard *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007). Ca^{2+} -gebundenes μ -Calpain vermittelt die proteolytische Abspaltung der autoinhibitorischen Domäne CnA B. Infolge des CnA B Verlustes kann CnA nicht mehr inaktiviert werden. Aktives CnA dephosphoryliert NFAT und transloziert in den Nukleus, wo es die hypertrophe Genexpression initiiert (Baines & Molkentin, 2005). Da die μ -Calpain-vermittelte Aktivierung irreversibel ist, kann CnA den Kern nicht mehr verlassen. Aktives CnA akkumuliert im Nukleus, weshalb die CnA-abhängige hypertrophe Genexpression auch nach Ende der hypertrophen Stimulation fortgesetzt wird (Wu *et al.*, 2007).

Insgesamt kann gesagt werden, dass ein kardialer Hypertrophie-Signalweg durch die CnA-vermittelte Dephosphorylierung von NFAT reguliert wird. Die CnA-Aktivierung ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig:

1. von der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration bzw. der Aktivierung von μ -Calpain und CaM (Burkard *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 2003; Heineke *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007);
2. von der CnA-Lokalisation. CnA kann nur dann an der Z-Scheibe aktiviert werden, wenn es von MLP gebunden wird, bzw. wenn es am Sarkolemma mit Ca^{2+} -Kanälen oder dem Ca^{2+} und Integrin-bindenden Protein-1 (CIB-1) interagiert (Heineke *et al.*, 2005, Heineke *et al.*, 2010_B; Tandan *et al.*, 2009). An der Z-Scheibe konkurriert der PKC-interagierende Cousin von Thioredoxin (PICOT) mit CnA um die Bindung an MLP. Die Überexpression von PICOT vermindert die Z-Scheiben Lokalisation von CnA und inhibiert dadurch die Aktivierung des CnA/NFAT-Signalweges (Cha *et al.*, 2008; Dorn, 2006; Jeong *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2008);
3. von der Expression endogener CnA-Inhibitoren. Zu den CnA-Inhibitoren zählen z.B. PICOT, der Regulator von CnA 1 (RCAN-1), Atrogin-1, die CaM-Kinase II (CaMKII) und Calsarcin (Crabtree & Olson, 2002; Davies *et al.*, 2007; Frey & Olson, 2003; Heineke *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2004; MacDonnell *et al.*, 2009; Olson *et al.*, 2003; Rothermel *et al.*, 2001; Vega *et al.*, 2001).

Die meisten CnA/NFAT-regulierenden Mechanismen werden durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert. Unklar ist, wie die Aktivierung der verschiedenen Regulationsmechanismen koordiniert wird (Houser & Molkentin, 2008). Entscheidende Faktoren könnten die Lokalisation von CnA sowie Wechselwirkungen des CnA/NFAT-Signalwegs mit anderen Hypertrophie-assoziierten Signalkaskaden sein. Der CnA/NFAT-Signalweg ist beispielsweise mit dem PKC- und dem ERK-Signalweg assoziiert (Molkentin, 2004).

1.4.3 Der ERK1/2-MAPK-Signalweg

MAPK-Signalwege sind Kaskaden von Kinase-vermittelten Phosphorylierungsübertragungen zwischen Zellmembran und Nukleus (Kehat & Molkentin, 2010). Eine Aktivierung der MAPK-Signalwege führt über verschiedene Zwischenschritte zur zweifachen Phosphorylierung und somit Aktivierung von terminalen Effektorkinasen, nämlich p38, extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK) und/oder c-Jun N-terminale Kinase (JNK). Die Phosphorylierung der Effektorkinasen wird durch MAPKs mit dualer Spezifität vermittelt, d.h. diese MAPKs phosphorylieren ihre Substrate gleichzeitig an zwei konservierten Tyrosin- (Tyr) und Threonin-Resten (Thr), die innerhalb eines Tyr-X-Thr-Aktivierungsmotivs liegen (Baines & Molkentin, 2005). Je nachdem, welche Effektorkinase am Ende der Signalkaskade steht, wird zwischen dem p38-, dem JNK- und dem ERK-MAPK-Signalweg unterschieden (Kehat & Molkentin, 2010; Kuida & Boucher, 2004). Die p38- und JNK-MAPK-Signalwege regulieren die zelluläre Antwort auf Stress und Verletzungen, wohingegen der ERK-MAPK-Signalweg die Zellproliferation und Myogenese stimuliert (Kehat & Molkentin, 2010; Kuida & Boucher, 2004).

Es sind fünf verschiedene ERK Isoformen, ERK1 - ERK5, bekannt. Die am stärksten exprimierten und am intensivsten erforschten ERK Isoformen sind ERK1 und ERK2 (Baines & Molkentin, 2005). Obwohl bereits viele verschiedene an der ERK1/2-Signalkaskade beteiligte Faktoren identifiziert wurden, sind die exakten Regulationsmechanismen dieses Signalwegs nach wie vor unbekannt. Klar ist, dass der ERK1/2-Signalweg durch einige intrazelluläre und nahezu alle bekannten extrazellulären Stress- und Agonisten-vermittelten hypertrophen Stimuli aktiviert wird, wie z.B. Dehnung, Zytokine, GPCR- und RTK-Aktivierung (Kehat & Molkentin, 2010; Mebratu & Tesfaigzi, 2009).

Die Stimulation von GPCRs aktiviert zunächst das kleine G-Protein Ras, das daraufhin die MAPK-Kinase-Kinase Raf1 ans Sarkolemma rekrutiert (Abb. 8). Ras-gebundenes Raf1 wird durch PKC-vermittelte Phosphorylierung aktiviert und transloziert zu den MAPK-Kinasen mit dualer Spezifität MEK1 und MEK2, um diese zu phosphorylieren (Baines & Molkentin, 2005; Muslin, 2005). Daraufhin vermitteln MEK1/2 ihrerseits die duale Phosphorylierung der ERK1/2-Aktivierungsmotive. Damit ERK1/2 aktiviert werden können, müssen Raf1, MEK1/2 und ERK1/2 miteinander komplexieren, was über einen Rekrutierungsfaktor, wie z.B. FHL-1, möglich ist (Sheikh *et al.*, 2008). Nach ihrer Aktivierung wandern ERK1/2 zu ihren Bindungspartnern und Substraten, darunter cytoskelettale Proteine, Proteinkinasen, pro-apoptotische Faktoren, Transkriptions- und Translationsfaktoren (Lorenz *et al.*, 2009).

Damit ERK1/2 mit Transkriptionsfaktoren interagieren können, müssen sie zuvor in den Nukleus gelangen. Die Translokation von ERK1/2 in den Nukleus setzt jedoch eine zusätzliche Autophosphorylierung von ERK1/2 voraus, die durch eine Bindung von $G_{\beta\gamma}$ an den Raf1-MEK1/2-ERK1/2-Komplex induziert wird (Abb. 8) (Lorenz *et al.*, 2009).

Im Nukleus stimulieren ERK1/2 die Aktivität der Transkriptionsfaktoren von myogenen und proliferatorischen Genen wie z.B. NFATc1 oder GATA4, und tragen so zur Entstehung von kardialer Hypertrophie bei (Aplin *et al.*, 2001; Frey & Olson, 2003;

Heineke & Molkenkin, 2006; Hsu *et al.*, 2004; Kehat & Molkenkin, 2010; Li & Johnson, 2006; Molkenkin, 2004; Muslin, 2005; Oka *et al.*, 2007).

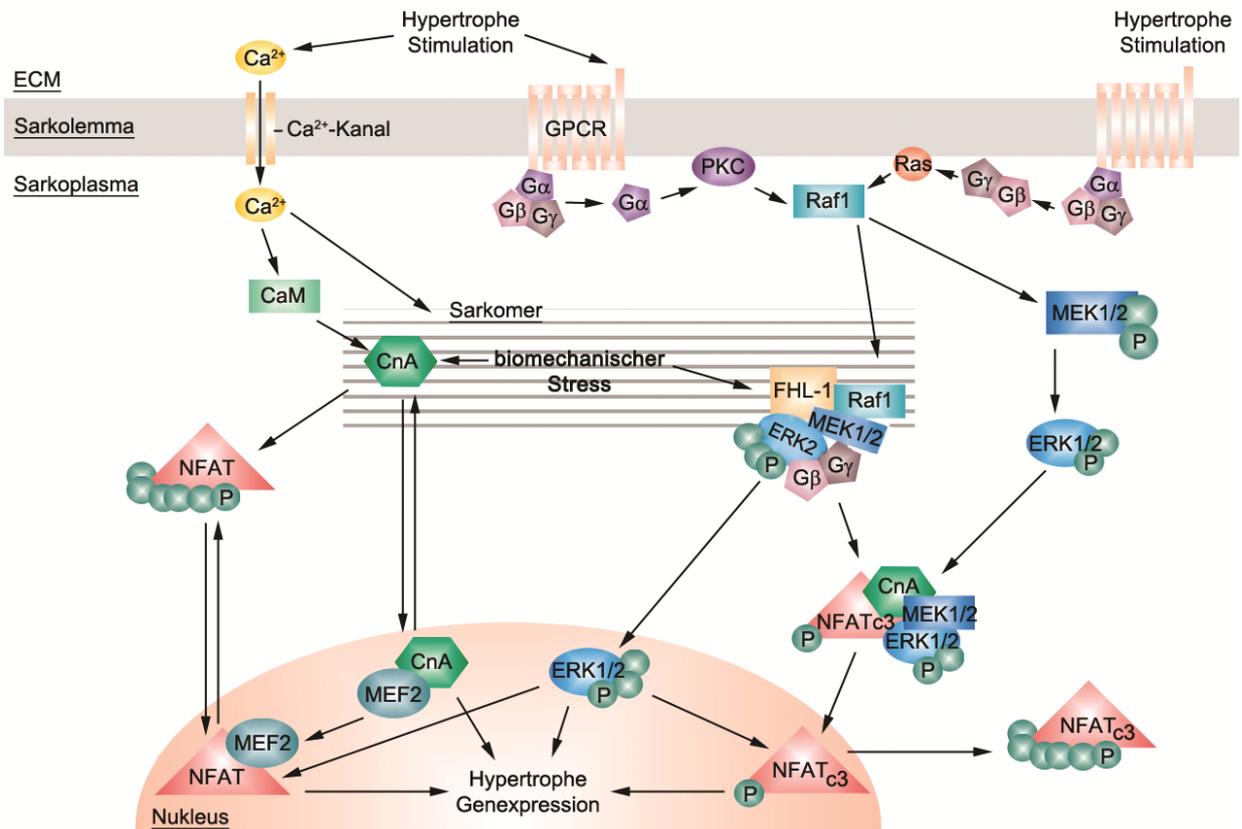


Abb. 8: Schematische Darstellung der CnA/NFAT- und ERK1/2-Hypertrophie-Signalwege. CaM: Calmodulin; CnA: Calcineurin; ECM: Extrazelluläre Matrix; ERK: Extrazelluläre signalregulierte Kinase; FHL-1: Viereinhalb LIM Domänen Protein-1; GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor; MEF2: Myozyten Enhancer Faktor 2; NFAT: Nuklearer Faktor von aktivierten T-Zellen; NFATc3: Nuklearer Faktor von aktivierten T-Zellen c3; P: Phosphorylierung.

In Überexpressionsstudien und *knock-out* (KO) Mausmodellen für MEK1/2 bzw. ERK1/2 wurde eine Verbindung zwischen der MEK-ERK1/2-Aktivierung und der Entstehung von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz nachgewiesen (Bueno *et al.*, 2000; Purcell *et al.*, 2007). Da einige der veröffentlichten Studien zum Teil gegensätzliche Resultate erbrachten, ist die Entstehung von Hypertrophie vermutlich nicht zwangsläufig mit einer Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade verknüpft (Kehat & Molkenkin, 2010; Kuida & Boucher, 2004). In Kardiomyozytenkulturen wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ERK1/2 und der Entwicklung von Hypertrophie nachgewiesen. *In vivo* Ergebnisse deuten darauf hin, dass Änderungen der ERK1/2-Aktivität häufiger mit der Entstehung von Herzinsuffizienz einhergehen als mit der von Hypertrophie. Die Aktivität von ERK1/2 ist z.B. in Herzen mit kompensatorischer Hypertrophie nicht verändert, wohingegen sie bei Hypertrophie-bedingter Herzinsuffizienz eindeutig gesteigert ist (Haq *et al.*, 2001): Mäuse mit blockierter ERK1/2-Aktivität entwickeln nach hypertropher Stimulation grundsätzlich eine Herzinsuffizienz und Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz zeigen eine erhöhte ERK1/2-Aktivität (Haq *et al.*, 2001; Kehat & Molkenkin, 2010). Interessanterweise führt der homozygote ERK2-KO im Mausmodell schon während der embryonalen Entwicklung zum Tode. (Kuida & Boucher, 2004; Baines & Molkenkin, 2005).

Die Regulationsmechanismen des ERK1/2-Signalwegs sind bislang weitestgehend unverstanden, es wird jedoch angenommen, dass die Interaktion von ERK1/2 mit verschiedenen Ankerproteinen an der Regulation beteiligt sein könnte (Kehat & Molkentin, 2010). Der ERK1/2-Interaktionspartner FHL-1 rekrutiert z.B. den Raf1-MEK1/2-ERK2-Komplex an die Titin N2B *unique sequence* Domäne ($N2B_{us}$) im I-Band. Ist kein FHL-1 verfügbar, so kann der Komplex nicht an die $N2B_{us}$ binden und MEK1/2 und ERK2 werden nicht aktiviert. Die Kardiomyozyte kann in diesem Fall nur mit einer verminderten Hypertrophie-Induktion auf biomechanischen Stress reagieren (Sheikh *et al.*, 2008).

In die spezifische Regulation des ERK1/2-Signalwegs könnten außerdem Wechselwirkungen mit anderen Signalkaskaden involviert sein (Kehat & Molkentin, 2010). Der ERK1/2-Signalweg ist z.B. mit dem CnA/NFAT- und dem PKC-Hypertrophie-Signalweg assoziiert (Frey & Olson, 2003; Heineke & Molkentin, 2006; Molkentin, 2004; Sabri & Steinberg, 2003; Sanna *et al.*, 2005). Die Assoziation mit dem CnA/NFAT-Signalweg erfolgt auf mehreren Ebenen:

1. MEK1-ERK1/2 bilden einen Komplex mit CnA und der NFAT Isoform NFATc3, wodurch NFATc3 phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung erhöht die Desoxyribonukleinsäure- (DNS-) Bindungsaffinität von NFATc3 und somit die hypertrophe Genexpression (Abb. 8);
2. ERK1/2 reguliert die Expression des NFAT-Interaktionspartners AP-1. Daher resultiert aus der ERK1/2-Aktivierung auch eine transkriptionelle Aktivierung von NFAT (Molkentin, 2004; Sanna *et al.*, 2005).

1.4.4 Der PKC-Signalweg

PKC ist eine Serin-Threonin Kinase und bildet zusammen mit Proteinkinase A und B die Superfamilie der ABC-Proteinkinasen (ABC-Kinasen). Alle ABC-Kinasen besitzen eine N-terminale regulatorische Domäne und eine carboxyterminale (C-terminale) Kinasedomäne. Über die Kinasedomäne werden die Substrate gebunden und Phosphatgruppen aufgenommen bzw. abgegeben. Die regulatorische Domäne dient einerseits der Interaktion mit anderen Proteinen und andererseits der konformatorischen Blockade der Kinasedomäne. Wird beispielsweise die regulatorische Domäne von PKC phosphoryliert, so bewirkt dies eine Freilegung der PKC Kinasedomäne und damit die Aktivierung der Kinase (Barnett *et al.*, 2008).

Es gibt verschiedene PKC Isoformen, die entsprechend ihrer spezifischen Aktivierungsmechanismen in drei Gruppen eingeteilt werden (Michal, 1999; Newton & Messing, 2010):

1. konventionelle Isoformen: PKC α , PKC β_1 , PKC β_2 und PKC γ ;
2. neue Isoformen: PKC δ , PKC ϵ , PKC η und PKC θ ;
3. atypische Isoformen: PKC ζ und PKC ι/λ .

Die Aktivierung der konventionellen PKC Isoformen erfolgt Ca^{2+} -abhängig, die der neuen und atypischen PKC Isoformen hingegen nicht. Konventionelle und neue PKCs benötigen membrangebundene Phospholipide wie DAG, Phosphatidylserin oder Arachidonsäure als Aktivatoren (Kochs *et al.*, 1993; Newton & Messing, 2010). Atypische PKC Isoformen sind unabhängig von der cytoplasmatischen DAG- und Ca^{2+} -Konzentration. Ihre Aktivierung ist von anderen Lipiden sowie von ihrem eigenen Phosphorylierungsstatus abhängig (Newton & Messing, 2010).

Generell wird die PKC-Aktivierung durch $\text{G}\alpha_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren reguliert (Abb. 9). $\text{G}\alpha_{q/11}$ aktiviert $\text{PLC}\beta$, woraufhin $\text{PLC}\beta$ die Hydrolyse von PIP_2 zu DAG und IP_3 vermittelt. DAG aktiviert am Sarkolemma unterschiedliche PKC Isoformen, die daraufhin in verschiedene subzelluläre Kompartimente translozieren (Barnett *et al.*, 2008).

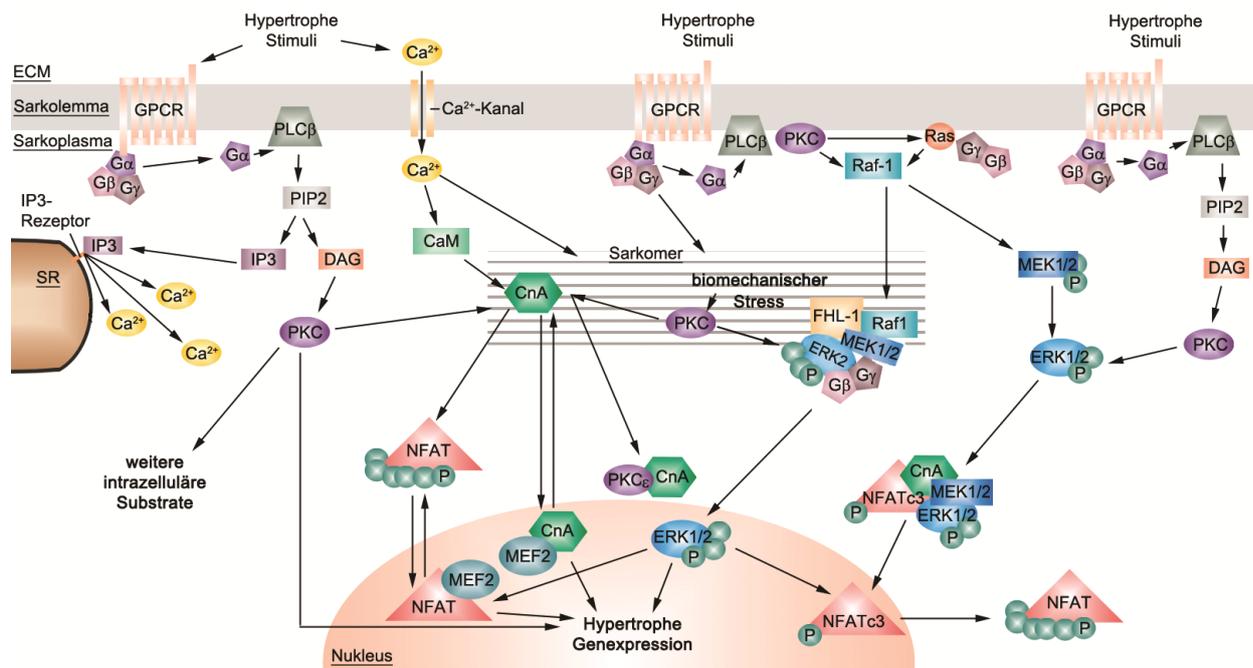


Abb. 9: Schematische Darstellung der Verknüpfung zwischen den PKC-, CnA/NFAT- und ERK1/2-Hypertrophie-Signalwegen. CaM: Calmodulin; CnA: Calcineurin; DAG: Diacylglycerin; ECM: Extrazelluläre Matrix; ERK1/2: Extrazelluläre signalregulierte Kinase 1 und 2; FHL-1: Viereinhalb LIM Domänen Protein-1; GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor; IP_3 : Inositol-1,4,5-trisphosphat; MEF2: Myozyten Enhancer Faktor 2; NFAT: Nuklearer Faktor von aktivierten T-Zellen; NFAT_{c3}: Nuklearer Faktor von aktivierten T-Zellen c3; P: Phosphorylierung. PIP_2 : Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat; PKC: Proteinkinase C; $\text{PLC}\beta$: Phospholipase Cβ; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum.

PKCε wandert nach seiner Aktivierung z.B. an die Z-Scheibe und bindet an Rezeptoren für aktivierte C-Kinasen (RACKs), die in Substratnähe lokalisiert sind (Robia *et al.*, 2001; Huang & Walker, 2004; Newton & Messing, 2010). IP_3 bindet an Ca^{2+} -Kanal-Rezeptoren in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (IP_3 -Rezeptoren). Dadurch öffnen sich die Ca^{2+} -Kanäle und Ca^{2+} strömt über den Kanal ins Sarkoplasma. Die Aktivität von PKC steigert die Bildung von IP_3 und somit auch die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration. Ein Anstieg der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration erhöht nicht nur die Aktivität der konventionellen PKC Isoformen, sondern verstärkt auch die Kontraktion der Kardiomyozyte, wodurch wiederum der CnA/NFAT- sowie verschiedene MAPK-Hypertrophie-Signalwege aktiviert werden (Heidkamp *et al.*, 2001; Heineke & Molkentin, 2006).

Im Herzen werden die PKC Isoformen PKC α , PKC β , PKC δ , PKC ϵ und die atypischen PKC Isoformen exprimiert (Simonis *et al.*, 2007). PKC ϵ ist in Schutzmechanismen gegen kardialen Durchblutungsmangel (Ischämie) und in die Entstehung von kardialer Hypertrophie involviert (Akita *et al.*, 2008; Braz *et al.*, 2004; Churchill & Mochly-Rosen, 2007; Frey & Olson, 2003; Gray *et al.*, 1997; Heineke & Molkentin, 2006; Murphy & Frishman, 2005; Sabri & Steinberg, 2003; Simonis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2001). Weil PKC ϵ Ras und ERK1/2 direkt aktiviert, stimuliert es den ERK1/2-Hypertrophie-Signalweg (Murphy & Frishman, 2005). PKC ϵ bildet an der perinuklearen Membran einen dehnungsabhängigen Komplex mit CnA, wodurch es auch in den CnA/NFAT-Signalweg involviert ist (Sabri & Steinberg, 2003; Vincent *et al.*, 2006). Am Cytoskelett interagiert PKC ϵ mit Aktin, dem Myosin-bindenden Protein C (MyBPC), den myristoylierten und Alanin-reichen PKC Substraten (MARCKs), CapZ, Cypher, FAK und MLP (Akita *et al.*, 2008; Edmondson *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2006; Newton & Messing, 2010; Ping *et al.*, 2001; Pyle *et al.*, 2002).

1.5 Das Muskel LIM Protein

Das Muskel LIM Protein (MLP) gehört zur Familie der Cystein-reichen LIM-Domänen Proteine (CRPs) und wird ausschließlich im Herzen und in quergestreifter Skelettmuskulatur exprimiert (Arber *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1999). Die Bezeichnung *LIM* geht auf die drei ersten entdeckten LIM-Proteine Lin-11, Mec-3 und Isl-1 zurück (Freyd *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992). Eine LIM-Domäne besteht aus einer Konsensussequenz [CX₂CX₁₇₋₁₉HX₂CX₂CX₂CX₁₆₋₂₀CX₂ (C/H/D)], die in der dreidimensionalen Proteinstruktur ein tandemartiges zinkbindendes Motiv bildet (Abb. 10). LIM-Domänen dienen primär der Vermittlung von Protein-Interaktionen, wobei diese sowohl strukturelle als auch signalweiterleitende Funktionen erfüllen können. So wandern z.B. viele LIM-Proteine als Antwort auf spezifische Reize in den Nukleus, wo sie zur Regulation der Genexpression beitragen (Arber & Caroni, 1996; Kadrmas & Beckerle, 2004; Zheng & Zhao, 2007).

MLP besteht aus 194 Aminosäuren und hat ein MW von ca. 21kDa. Seine Struktur wird von zwei LIM-Domänen dominiert, die jeweils von Glycin-reichen Sequenzabschnitten umgeben sind (Abb. 10). Daher wird MLP auch als Cystein- und Glycin-reiches Protein-3 (CSRP3) bezeichnet (Arber *et al.*, 1994). MLP kann zwischen verschiedenen subzellulären Kompartimenten hin und her wandern. Seine Struktur enthält außerdem ein NLS, wodurch es in den Nukleus translozieren kann. Im Nukleus fungiert MLP als Positivregulator der Zelldifferenzierung und Myogenese, weshalb es insbesondere während der embryonalen Entwicklung im Nukleus von Myotuben akkumuliert (Arber *et al.*, 1994; Boateng *et al.*, 2007; Boateng *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 1997; Schallus *et al.*, 2009).

Zink-Finger Konsensus-Sequenz

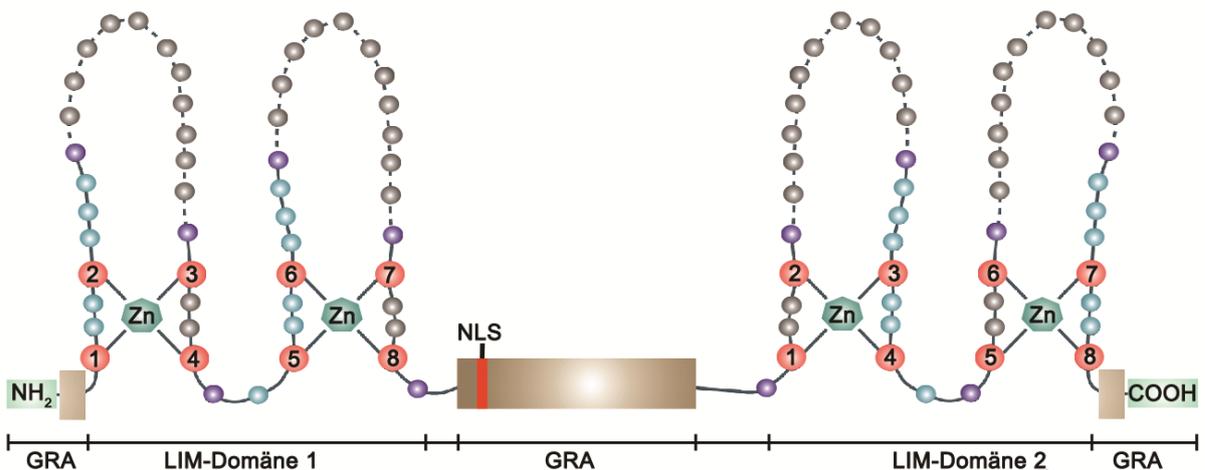


Abb. 10: Schematische Darstellung der Zink-Finger Konsensus-Sequenz sowie der gesamten MLP-Struktur. GRA: Glycin-reicher Abschnitt; NLS: nukleares Lokalisationssignal; NH₂: N-Terminus; COOH: C-Terminus. Abbildung verändert nach Kadmas & Beckerle, 2004.

Im späteren Entwicklungsverlauf und in adulten Herzen ist MLP auch in vielen anderen subzellulären Kompartimenten detektierbar. Im Nucleus liegt MLP immer in Form von Monomeren vor, wohingegen es an der Membran und am Cytoskelett Multimere bildet (Abb. 11). Die homotypische Interaktion in den Multimeren wird über die MLP C-Termini vermittelt (Boateng *et al.*, 2007). Im neonatalen und adulten Herzen führen zyklische Dehnung und hypertrophe Stimulation zur verstärkten Translokation von MLP Monomeren in den Nucleus und somit zur Reinitialisierung der MLP-assoziierten Genexpression (Abb. 11) (Boateng *et al.*, 2007; Boateng *et al.*, 2009; Ecartot-Laubriet *et al.*, 2000; Knöll *et al.*, 2010). Kann MLP nicht in den Nucleus translozieren, so führt hypertrophe und biomechanische Stimulation zur Desorganisation der Sarkomerstruktur (Boateng *et al.*, 2009).

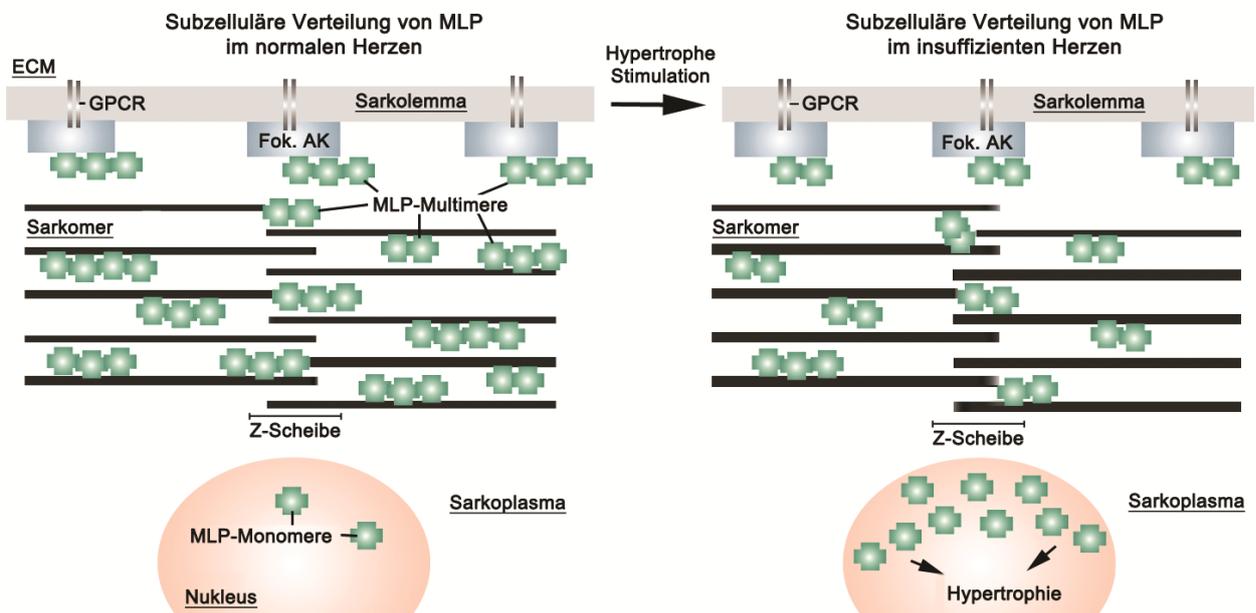


Abb. 11: Subzelluläre Verteilung von MLP im gesunden und insuffizienten Herzen.

Die Verwendung verschiedener Antikörper hat insbesondere in den letzten Jahren zu Diskussionen über die Lokalisation von MLP geführt (Gehmlich *et al.*, 2008; Gehmlich *et al.*, 2010; Geier *et al.*, 2008; Gunkel *et al.*, 2010). Auslöser dafür war, dass ein monoklonaler Antikörper MLP vorrangig im Sarkoplasma detektierte (Geier *et al.*, 2008). Die Autoren nahmen an, dass nur ihr monoklonaler Antikörper MLP spezifisch nachweisen könne und demnach die Lokalisationsnachweise aus Studien, in denen polyklonale Antikörper verwendet worden waren, falsch seien (Geier *et al.*, 2008). Da MLP jedoch in vielen anderen Publikationen nicht nur im Sarkoplasma, sondern auch an der Z-Scheibe, dem I-Band, der M-Linie, an Stressfasern oder der Zellmembran (insbesondere am Costamer und an der Glanzstreifenregion) detektiert wurde (Arber *et al.*, 1994; Arber & Caroni, 1996; Arber *et al.*, 1997; Flick & Konieczny, 2000; Geier *et al.*, 2008; Henderson *et al.*, 2003; Knöll *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 1997), ist davon auszugehen, dass die Annahme von Geier *et al.* falsch ist und MLP in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert ist.

Im Nukleus bindet MLP an die Transkriptionsfaktoren MyoD, Muskel-regulatorischer Faktor-4 (MRF-4) sowie Myogenin und steigert damit ihre Aktivität (Arber *et al.*, 1994; Kong *et al.*, 1997). Da Myogenin u.a. ein Positivregulator der MLP Expression ist, führt seine Aktivierung ebenfalls zu deren Steigerung (Ji *et al.*, 2009).

An der Z-Scheibe interagiert MLP u.a. mit T-Cap, CnA und PICOT (Knöll *et al.*, 2002; Heineke *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2008). Die MLP/T-Cap-Interaktion scheint eine strukturelle Bedeutung zu haben (Knöll *et al.*, 2002; Voelkel & Linke, 2011). Im Gegensatz dazu hat die Interaktion von MLP und CnA auch Einfluss auf die zelluläre Signaltransduktion, da sie für die Aktivierung des CnA/NFAT-Signalwegs essentiell ist (Heineke *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2008). PICOT konkurriert mit CnA um die Bindung zu MLP, weshalb die Interaktion von MLP und PICOT der Negativregulation des CnA/NFAT-Signalwegs dient (Jeong *et al.*, 2008). Generell unterstützen Glutaredoxine, zu denen PICOT gehört, Proteinfaltungsprozesse sowie die Regulation zellulärer Stressantworten während Differenzierung, Transkription und Apoptose (Berndt *et al.*, 2008). Die Expression von PICOT wird durch hypertrophe Stimulation gesteigert (Jeong *et al.*, 2006).

Weitere Sarkomer-assoziierte Bindungspartner von MLP sind PKC ϵ und der Aktin-depolymerisierende Faktor Cofilin-2 (CFL-2) (Edmondson *et al.*, 2002; Papalouka *et al.*, 2009). Die MLP/CFL-2-Interaktion wird über die Aminosäuren 94 - 105 in MLP und 1 - 105 in CFL-2 vermittelt. Dabei beeinflusst das stöchiometrische Bindungsverhältnis von MLP zu CFL-2 die Depolymerisationsgeschwindigkeit von Aktin direkt (Papalouka *et al.*, 2009). Die Interaktion von MLP und PKC ϵ wurde bislang noch nicht funktional charakterisiert (Edmondson *et al.*, 2002).

An der Z-Scheibe und am Costamer interagiert MLP mit α -Aktinin, Zyxin und N-RAP, die den Aufbau der Sarkomerstruktur unterstützen (Arber & Caroni, 1996; Ehler *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2003; Louis *et al.*, 1997). Zyxin kann zudem in den Nukleus translozieren, wo es anti-apoptotisch wirkt (Benmerah *et al.*, 2003; Ehler *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2005). α -Aktinin, Zyxin, MLP und N-Rap können außerdem miteinander komplexieren (Gehmlich *et al.*, 2004; Li & Trueb, 2001).

Weitere am Costamer lokalisierte Bindungspartner von MLP sind ILK und β 1-Spektrin, die beide Teil des Fokalen Adhäsionskomplexes sind. Die Interaktion mit β 1-Spektrin erfolgt über die LIM-2-Domäne in MLP und hat vermutlich eine strukturelle Funktion. Es wird vermutet, dass die MLP/ILK-Interaktion in Signaltransduktionsmechanismen involviert sein könnte (Flick & Konieczny, 2000; Postel *et al.*, 2008).

1.5.1 MLP und die Entstehung von Herzerkrankungen

Veränderungen in der MLP Expression sind an der Entstehung von chronischen Herzerkrankungen beteiligt (Frank *et al.*, 2006). Hypertrophe Stimulation steigert die Expression von MLP in Kardiomyozyten (da Costa *et al.*, 2007; Kostek *et al.*, 2007). In murinen und humanen Herzen mit chronischer Insuffizienz ist die Expression von MLP gesteigert (Boateng *et al.*, 2007; Grzeskowiak *et al.*, 2003). Es gibt allerdings auch gegensätzliche Berichte, wonach die MLP Protein-Level bei fortgeschrittener kardialer Insuffizienz verringert sind (Ecarnot-Laubriet *et al.*, 2000; Zolk *et al.*, 2000). Da die Expression von MLP im gesunden Herzen starken Schwankungen unterliegt, kann es nicht als diagnostischer Biomarker verwendet werden (Zolk *et al.*, 2000).

Nicht nur Änderungen der MLP Expression werden mit der Entstehung von chronischen Herzerkrankungen in Verbindung gebracht, sondern auch Mutationen in MLP (Tab. 1) (Bos *et al.*, 2006; Knöll *et al.*, 2002; Knöll *et al.*, 2010; Hershberger *et al.*, 2008; Geier *et al.*, 2003; Mohapatra *et al.*, 2003; van Rijsingen *et al.*, 2009). Homozygote MLP W4R *knock-in* Mäuse entwickeln im Alter von einem Jahr eine HCM (Knöll *et al.*, 2010). In Bezug auf andere MLP-Mutationen ist jedoch unklar, ob es sich bei ihnen um Polymorphismen handelt, die keinen Einfluss auf die Proteinfunktion haben, oder um krankheitsauslösende Veränderungen.

Tab. 1: Bekannte Kardiomyopathie-assoziierte Mutationen in MLP.

MLP Mutation	Phänotyp	Referenz
Trp4Arg (W4R)	DCM/HCM	Bos <i>et al.</i> , 2006; Knöll <i>et al.</i> , 2002; Knöll <i>et al.</i> , 2010; Newman <i>et al.</i> , 2005
Leu44Pro (L44P)	HCM	Geier <i>et al.</i> , 2003; Bos <i>et al.</i> , 2006
Ser46Arg (S46R)	HCM	Geier <i>et al.</i> , 2008
Ser54Arg/Glu55Gly (S54R/E55G)	HCM	Geier <i>et al.</i> , 2003
Cys58Gly (C58G)	HCM	Geier <i>et al.</i> , 2003
Arg64Cys (R64C)	HCM	Bos <i>et al.</i> , 2006
Tyr66Cys (Y66C)	HCM	Bos <i>et al.</i> , 2006
Lys69Arg (L69R)	DCM	Mohapatra <i>et al.</i> , 2003
Gly72Arg (G72R)	IDCM	Hershberger <i>et al.</i> , 2008
Gln91Leu (Q91L)	HCM	Bos <i>et al.</i> , 2006

IDCM: idiopathische dilatative Kardiomyopathie.

Die Analyse eines MLP-KO Mausmodells lieferte einen Einblick in MLP-assoziierte Mechanismen, die zur DCM-Entstehung beitragen. Heterozygote MLP-KO ($MLP^{+/-}$) Mäuse entwickeln eine linksventrikuläre Dilatation sowie eine systolische Dysfunktion. Verglichen mit dem Wildtyp (wt) sind in $MLP^{+/-}$ Herzen die CnA/NFAT-Aktivierung stark vermindert und die ERK1/2-Expression gesteigert (Heineke *et al.*, 2005).

Beim homozygoten MLP-KO (MLP^{-/-}) zeigen ungefähr 50 - 70% der Tiere im Alter von fünf bis zehn Tagen Ermüdungserscheinungen und sterben 20 - 30 Stunden später (früher Phänotyp). Die übrigen MLP^{-/-} Mäuse entwickeln zwei bis vier Wochen nach der Geburt eine DCM mit Hypertrophie und Herzinsuffizienz (adulter Phänotyp) (Arber *et al.*, 1997; Knöll *et al.*, 2002). Die Herzfunktion von MLP^{-/-} Mäusen mit adultem Phänotyp ist bei der Geburt zunächst normal. Verglichen mit dem wt ist das Herzgewebe im MLP^{-/-} jedoch insgesamt weicher und zeigt eine stark verminderte Muskelspannung (Knöll *et al.*, 2002). Die Glanzstreifen und Z-Scheiben erscheinen im MLP^{-/-} desorganisiert und verbreitert (Arber *et al.*, 1997; Ehler *et al.*, 2001; Esposito *et al.*, 2000; Knöll *et al.*, 2002). Eine ähnliche Strukturveränderung tritt auch bei humaner Herzinsuffizienz auf (Arber *et al.*, 1997; Ehler *et al.*, 2001; Esposito *et al.*, 2000; Knöll *et al.*, 2002; Leu *et al.*, 2001; Lorenzen-Schmidt *et al.*, 2005; Omens *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2001; van den Bosch *et al.*, 2005; Wilding *et al.*, 2006; Zolk *et al.*, 2000). In Kardiomyozyten aus neonatalen MLP^{-/-} Mäusen scheint die mechanische Induktionsfähigkeit zweier Hypertrophie-Marker, dem B-Typ Natriuretischen Peptid (brain natriuretic peptide: BNP) und dem Atrialen Natriuretischen Faktor (ANF), gestört zu sein (Knöll *et al.*, 2002; Raskin *et al.*, 2009). Insbesondere diese Beobachtung bot Anlass für erste Spekulationen darüber, ob MLP Teil eines Mechanosensor-Komplexes sein könnte (Knöll *et al.*, 2002).

Um herauszufinden, welche Mechanismen zur Entstehung der MLP-Defizienz-abhängigen DCM beitragen, wurden verschiedene Doppel-*knock-out* (DKO) Mausmodelle entwickelt. Der DKO von MLP und Phospholamban (PLB), einem Inhibitor der Ca²⁺-ATPase 2A des Sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA 2A), erhöhte beispielsweise die kardiale Kontraktilität und schwächte dadurch den MLP^{-/-} Phänotypen ab (Minamisawa *et al.*, 1999). Da die Aktivierung von β 1-adrenergen GPCRs bei der Entstehung der MLP^{-/-}-bedingten DCM eine Rolle spielt, wurde anhand eines weiteren DKO überprüft, ob dies auch auf den G_{q/11}-gekoppelten GPCR Angiotensin-II Typ 1a (AT1a) zutrifft. Der MLP/AT1a DKO verbesserte im Vergleich zum MLP KO die murine Herzfunktion (Esposito *et al.*, 2000; Rockman *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu erhöhte der DKO von MLP und CnA β (MLP/CnA β -DKO) im Vergleich zum MLP^{-/-} die allgemeine Sterblichkeitsrate der Mäuse und verstärkte die kardiale Dysfunktion, die Kardiomyozytensterblichkeit und die kardiale Fibrose. Umgekehrt reduzierte eine geringfügige Überexpression von CnA β in MLP^{-/-} Mäusen die Fibrose und verbesserte die kardiale Funktion (Heineke *et al.*, 2010_A).

1.5.2 MLP, ein kardialer Stress-Sensor?

Seit langem wird darüber diskutiert, ob MLP Teil eines zellulären Stress- oder Dehnungs-Sensors ist (Knöll *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2006; Heineke & Molkentin, 2006; Gehmlich *et al.*, 2008; Gehmlich *et al.*, 2010; Geier *et al.*, 2008; Gunkel *et al.*, 2010; Voelkel & Linke, 2011). Für diese Annahme sprechen die Lokalisation von MLP an verschiedenen Knotenpunkten der zellulären Signalweiterleitung, seine große Mobilität und seine offensichtliche Involvierung in die Entstehung chronischer Herzerkrankungen. Dagegen spricht jedoch, dass unklar ist, ob mechanischer Stress überhaupt bis zum MLP weitergeleitet wird. So interagiert MLP beispielsweise nicht direkt mit Titin,

von dem angenommen wird, dass es im zellulären Stress- bzw. Dehnungs-Sensor eine zentrale Funktion hat (Voelkel & Linke, 2011). Wahrscheinlich ist, dass MLP kein direkter Teil des Stress- bzw. Dehnungssensor ist, womöglich aber eine wichtige Rolle spielt bei der Weiterleitung der durch den Sensor detektierten und umgewandelten Signale (Voelkel & Linke, 2011).

Vermutet wird, dass die MLP-abhängige Signaltransduktion durch posttranslationale Modifikationen moduliert werden kann. Bislang wurde im kardialen MLP nur eine solche Modifikation beschrieben: die reversible Acetylierung von Sarkomer-assoziiertem MLP an Lysin-69 (Gupta *et al.*, 2008). Diese Acetylierung wird durch Lysin-Acetyltransferase 2B (PCAF) vermittelt und durch Histon-Deacetylase-4 (HDAC4) entfernt. Inhibiert man HDAC4 in Kardiomyozyten, so erhöht sich die myofibrilläre Ca^{2+} -Sensitivität, weshalb vermutet wird, dass die Acetylierung von MLP eine kontraktionsregulierende Funktion haben könnte (Gupta *et al.*, 2008). In humaner Skelettmuskulatur wurde außerdem eine bislang uncharakterisierte Phosphorylierung von MLP an Serin-95 (S95) mittels Massenspektrometrie entdeckt (Højlund *et al.*, 2009). Die Identifikation und funktionelle Charakterisierung posttranslatonaler Modifikationen in MLP sind ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Aufklärung molekularer Signalmechanismen von MLP.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, durch zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D GE) die Rolle von MLP bei der kardialen Signaltransduktion zu untersuchen. Dafür wurden zwei verschiedene Herangehensweisen gewählt.

1. Die Analyse von zwei verschiedenen MLP-Mausmodellen bezüglich Veränderungen in ihrem kardialen Proteom

Obwohl das MLP-KO Mausmodell intensiv untersucht wurde, ist nach wie vor unbekannt, welche molekularen Mechanismen primär zur Entstehung der MLP^{-/-}-abhängigen DCM führen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Veränderungen des kardialen Proteoms in verschiedenen Entwicklungsstadien der MLP^{-/-}-bedingten DCM detektiert werden. Dafür sollte das Proteom von ein, vier und 12 Wochen alten MLP^{-/-} Herzen sowie der korrespondierenden wt Herzen untersucht werden. Die Proteomanalyse sollte dabei durch eine 2-D GE-Variante, die zweidimensionale Differenz Gelelektrophorese (2-D DIGE), erfolgen. Durch diesen Versuchsansatz sollte die Unterscheidung zwischen frühen und späten Ereignissen in der DCM-Entwicklung ermöglicht werden. Darüber hinaus sollte überprüft werden, welche Auswirkungen die MLP-Defizienz auf Sarkomer-, bzw. Z-Scheiben-assoziierte Proteine hat.

Bei dem zweiten Mausmodell, das durch 2-D DIGE untersucht werden sollte, handelte es sich um den MLP W4R *knock-in* (MLP^{W4R/W4R}). Durch den 2-D DIGE-Vergleich der MLP^{W4R/W4R} und wt Mäuse sollte überprüft werden, ob die W4R Mutation Veränderungen des kardialen Proteoms bewirkt.

2. Die Identifikation und Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen im kardialen MLP

Bislang unbekannte posttranslationale Modifikationen im kardialen MLP sollten identifiziert und charakterisiert werden. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der Frage, wie diese Modifikationen reguliert werden und ob sie mit der Entstehung von Herzerkrankungen assoziiert sein könnten.

3. Material

3.1 Verwendete Herzgewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Herzgewebe gearbeitet. Tieraufzucht sowie experimentelle Arbeiten erfolgten unter Beachtung der lokalen Tierschutzgesetze. Spezies, Pathologie und Ursprung aller verwendeten Herzgewebe sind in Tab. 2 und Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 2: Spezies und Pathologie der verwendeten Herzgewebe.

Spezies	Alter	Pathologie	Quelle
<i>Canis lupus familiaris</i> – „Mongrel“ (Mischling)	8 – 12 Jahre	DHF aufgrund einer bilateralen Nierenummantelung (chronische Hypertonie). Hypertrophie und Fibrose im LV, erhöhte systolische und arterielle Steifigkeit (Munagala <i>et al.</i> , 2005; Shapiro <i>et al.</i> , 2007)	Margret M. Redfield Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
	1 Jahr	gesund (Munagala <i>et al.</i> , 2005; Shapiro <i>et al.</i> , 2007)	
<i>Homo sapiens</i>	45 – 62 Jahre	gesund	Cris dos Remedios Universität Sydney, Sydney, Australien
<i>Mus musculus</i>	siehe Tab. 3		
<i>Rattus norvegicus</i> (Wistar unileva, Auszucht)	embryonale Entwicklungsstufe Tag 18 (E18)	gesund	AG Prof. Linke Tierstall Westfälische Wilhelms-Universität Münster und Ruhr-Universität Bochum, Deutschland
	neonatal: 1 – 2 Tage		
	trächtig: 6 Monate	gesund	

Tab. 3: Verwendete gentechnisch-veränderte Mausmodelle.

Genotyp	Alter	Phänotyp	Quelle
MLP ^{-/-}	1 Woche	gesund	Ralph Knöll Imperial College, London
	4 Wochen	DCM	
	12 Wochen	DCM	
MLP ^{+/+}	1 Woche	gesund	
	4 Wochen	gesund	
	12 Wochen	gesund	
	1 Jahr	gesund	
MLP ^{W4RMV4R}	1 Jahr	HCM	
CnAβ ^{-/-}	2,5 - 6 Monate	verminderte basale Herzgröße und drastische Verminderung der Hypertrophie-Induktionsfähigkeit (Bueno <i>et al.</i> , 2002)	
CnAβ ^{+/+}		gesund	
MLP ^{-/-} /CnAβ ^{-/-} DKO		verglichen mit MLP ^{-/-} : erhöhte Sterblichkeitsrate, fortgeschrittene kardiale Dysfunktion, Dilatation und verstärkte Fibrose (Heineke <i>et al.</i> , 2010_A)	
FHL-1 ^{-/-}	8 Wochen bis 1 Jahr	kein Phänotyp; leichte Verminderung der Hypertrophie-Induktion (Sheikh <i>et al.</i> , 2008)	Farah Sheikh Universität von Californien - San Diego, La Jolla, Californien,
FHL-1 ^{+/+}		gesund (Sheikh <i>et al.</i> , 2008)	

3.2 Chemikalien

Alle verwendeten Standard-Chemikalien hatten - sofern nicht anders angegeben - einen analytischen Reinheitsgrad und wurden über die Firmen Applichem (Darmstadt), Diagonal (Münster), MERCK (Darmstadt), SIGMA-Aldrich (München), Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), und Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.3 Lösungen und Reagenzien für die Proteinbiochemie

3.3.1 Proteinextraktion aus Herzgewebe

Material:

Eisbehälter	VWR International, Langenfeld
Glas-Gewebehomogenisatoren <i>Kimble Kontes Tissue Grinder Comp Dounce (2ml) und SZ20 Dual (1ml)</i>	Omnilab, Bremen
Kryomörser	Omnilab, Bremen
Skalpelle	Braun Aesculap, Tuttlingen
Uhrglasschalen	VWR International, Langenfeld

Lösungen (gelöst in ddH₂O):

Greaser Probenpuffer	0,05M Tris-HCl, pH 6,8 8M Harnstoff 2M Thioharnstoff 3% Natriumdodecylsulfat (<i>SDS</i>) (w/v) 10% Glycerin (v/v) 0,3% <i>Serva-Blue</i> (w/v) 75mM Dithiothreitol (<i>DTT</i>)
2-D-Probenpuffer	8M Harnstoff <i>Plus-One Amberlite IRN 150L</i> [GE Healthcare, Piscataway (USA)] 2M Thioharnstoff 4% 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-Propansulfonat (<i>CHAPS</i>) (w/v) 1% DTT (w/v)

3.3.1.1 Subzelluläre Proteomfraktionierung von Herzgewebe

<i>QProteome Cell Compartment Kit</i>	Qiagen, Hilden
---------------------------------------	----------------

3.3.2 Protein-Konzentrationstests

3.3.2.1 Aceton-Fällung zur Ankonzentration von Proteinlösungen

Aceton J.T. Baker, Deventer (Niederlande)

3.3.2.2 Neuhoff'sche Konzentrationsbestimmung

Material:

Zelluloseacetat Membran (#112078150K) Sartorius AG, Göttingen

Lösungen:

Amidoschwarz-Färbelösung	90% Methanol (MetOH) (v/v) 10% Essigsäure (v/v) 0,5% Amidoschwarz
Entfärbelösung	90% MetOH (v/v) 10% Essigsäure (v/v)

3.3.2.3 Kits zur Bestimmung von Protein-Konzentrationen

Bicinchoninsäure Protein Assay (BCA-Kit) Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)

2-D-Quant Kit GE Healthcare, München

3.3.3 Material und Lösungen für SDS-PAGE und Titingele

Material:

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BA) Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Diagonal, Münster
Protein-Molekulargewichts-Marker	Fermentas/Invitrogen, Karlsruhe
<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i> (#SM1811) ✓ <i>PageRuler™ Unstained Protein Ladder</i> (#SM0661) 	

Lösungen (in ddH₂O gelöst):

1,5% Agarose (w/v)	1,5% Agarose (w/v)
10% APS-Lösung (w/v)	10% Ammoniumpersulfat (APS) (w/v)
Glycerin/ddH ₂ O	50% Glycerin (v/v)
10x Laufpuffer; pH 8,4 (1 Liter)	50mM Tris 384mM Glycerin 50ml 20% SDS-Lösung
1x Laufpuffer	1:10 Verdünnung des 10x Laufpuffers
Sammelgelpuffer; pH 6,8; 250ml	2M Tris-HCl, pH 6,8 10ml 20% SDS-Lösung
20% SDS-Lösung (w/v)	20% SDS (w/v)
Trenngelpuffer; pH 8,8; 250ml	2M Tris-HCl, pH 8,8 5ml 20% SDS-Lösung

3.3.4 Semi-Dry ImmunoblottingMaterial:

Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran	Millipore, Schwalbach
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell/ Diagonal

Lösungen:

Anodenpuffer, pH 8,8 (gelöst in ddH ₂ O)	300mM Tris-HCl 100mM Tricin
Kathodenpuffer, pH 8,7 (gelöst in ddH ₂ O)	30mM Tris 300mM 6-Amino-Capronsäure
5% Bovines Serumalbumin (BSA)	5% BSA (w/v) gelöst in 1x TBST
5% Magermilchpulver-Lösung (MP)	5% Magermilchpulver (w/v) gelöst in 1xTBST
PVDF-Färbelösung	0,075% <i>Serva-Blue</i> (w/v) gelöst in MetOH
PVDF-Entfärbelösung	10% Eisessig (v/v) 40% Ethanol (EtOH) (v/v) 50% ddH ₂ O (v/v)

Fortsetzung Lösungen:

10xTBST (gelöst in ddH ₂ O)	500mM Tris-HCl, pH 8,0 1,5M NaCl 0,5% Tween-20 (v/v)
1x TBST	1:10 Verdünnung des 10x Laufpuffers

Verwendete Kits:

<i>ECL Western Blot Detection Kit</i>	GE Healthcare, München
---------------------------------------	------------------------

3.3.5 2-D GelelektrophoreseMaterial:

30% AA/BA	BioRad, München
EtOH (absolut)	Warner Graham Company, Church Lane Cockeysville, USA
Filterpapier (<i>mini Trans-Blot</i>)	BioRad, München
2-Hydroxyethyl-disulfid	Acros Organics/Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)
Immobilisierte pH Gradienten Gele (IPG-Strips) (linear, pH4-7, pH 6-11, 18cm)	GE Healthcare, München
IPG-Puffer (pH 4-7 und pH 6-11)	BioRad, München
Mineralöl	BioRad, München
TEMED	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)

Lösungen (sofern nicht anders angegeben in ddH₂O gelöst):

10% APS	10% APS (w/v)
1,5M Bis-Tris-Puffer, pH 6,4	50mM Bis-Tris-HCl (pH 6,4)
2% Coomassie G-250 Lösung	2% Coomassie G-250 (w/v)
10mM DTT-Lösung	10mM DTT
Equilibrierungs-Lösung	30% Glycerin (v/v) 2,5% SDS (w/v) gelöst in 1,5M Bis-Tris-Puffer 0,75% <i>Serva-Blue</i>

Fortsetzung Lösungen:

Equilibrierungs-Puffer 1	0,1g DTT gelöst in 10ml Equilibrierungs-Lösung
Equilibrierungs-Puffer 2	0,25g Iodacetamid (<i>IAA</i>) gelöst in 10ml Equilibrierungs-Lösung
10x MES-Laufpuffer	450mM 2-Morpholinoethansulfonsäure monohydrat (MES) 290mM Bis-Tris 10mM EDTA 1% SDS
1x MES Laufpuffer	1:10 Verdünnung des 10xMES Laufpuffers
10% SDS-Lösung (w/v)	10% SDS (w/v)

3.3.5.1 2-D Differenz GelelektrophoreseMaterial:

CyDye DIGE Fluors [minimal dyes Cy2, Cy3, Cy5] für *Ettan DIGE* GE Healthcare, Piscataway (USA)

Lösungen:

Cy2	Cy2 gelöst in 99% H ₂ O-freiem N,N-Dimethylformamid (<i>DMF</i>)
Cy3	Cy3 gelöst in 99% <i>DMF</i>
Cy5	Cy5 gelöst in 99% <i>DMF</i>
DIGE-Puffer	25mM Bis-Tris-HCl (pH 8,5) 8mM Harnstoff 2M Thioharnstoff 4% CHAPS gelöst in ddH ₂ O
Lysin-Lösung	10mM Lysin gelöst in ddH ₂ O

Verwendete Kits:

2-D Clean-up Kit GE Healthcare, München

3.3.6 Gelfärbungen

3.3.6.1 Coomassie-Färbung mit Serva-Blue

Lösungen:

Coomassie-Entfärber 1	50% EtOH (absolut) (v/v) 7% Essigsäure (v/v) 43% ddH ₂ O
Coomassie-Entfärber 2	5% EtOH (absolut) (v/v) 7% Essigsäure (v/v) 88% ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	40% MetOH (v/v) 10% Essigsäure (v/v) 50% ddH ₂ O 0,25% Serva-Blue

3.3.6.2 Coomassie-Färbung mit Coomassie-Stain G250

Material:

G250 Coomassie-Stain (# 101-0787) BioRad, München

Lösungen:

Fixierlösung 1	45% MetOH (v/v) 5% Eisessig (v/v) 50% ddH ₂ O
Fixierlösung 2	50% MetOH (v/v) 50% ddH ₂ O

3.3.6.3 Blau-Silberfärbung nach Candiano et al.

Lösungen:

Blau-Silber-Färbelösung	10% H ₃ PO ₄ (v/v) 10% (NH ₄) ₂ SO ₄ (v/v) 0,12% Coomassie G-250 (w/v) mit ddH ₂ O bis zum Endvolumen auffüllen und im Dunkeln lagern; kurz vor der Verwendung unter ständigem Rühren MetOH bis zu einer Endkonzentration von 20% (v/v) hinzufügen
Fixierlösung 1 und 2	siehe Kapitel 3.2.6.2

3.3.6.4 SilberfärbungLösungen:

Entwickler	20g Natriumcarbonat unter ständigem Rühren in 1L eiskaltem ddH ₂ O gelöst; direkt vor Gebrauch 500µl Formaldehyd hinzugeben
Fixierlösung 1 und Fixierlösung 2	siehe Kapitel 3.2.6.2
Sensitivier-Lösung	0,2g Natriumthiosulfat in 1L ddH ₂ O gelöst
Silber-Lösung	0,5g Silbernitrat in 500ml eiskaltem ddH ₂ O gelöst
Stop-Lösung	5% Essigsäure (v/v) 95% ddH ₂ O (v/v)

3.3.7 Massenspektrometrie**3.3.7.1 Entfärbung und Verdau der Proteine**Material:

99% Acetonitril (ACN) (Reinheit >99,8%)	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Sequenzier-Grad gereinigtes porcines Trypsin (#V5111)	Promega, Madison (USA)

Lösungen:

5% Ameisensäure	5% Ameisensäure (v/v) gelöst in ddH ₂ O
DTT/NH ₄ HCO ₃ -Lösung	10mM DTT gelöst in 25mM Ammoniumbicarbonat (NH ₄ HCO ₃)
Blutlaugensalz-Lösung	30mM roten Blutlaugensalzes gelöst in ddH ₂ O
IAA/NH ₄ HCO ₃ -Lösung	55mM IAA gelöst in 25mM NH ₄ HCO ₃
Lösung A	50% Blutlaugensalz-Lösung (v/v) 50% Natriumthiosulfat-Lösung (v/v)
Natriumthiosulfat-Lösung	100mM Natriumthiosulfat gelöst in ddH ₂ O
100mM NH ₄ HCO ₃ -Lösung	100mM NH ₄ HCO ₃ gelöst in ddH ₂ O
50mM NH ₄ HCO ₃ -Lösung	50mM NH ₄ HCO ₃ gelöst in ddH ₂ O

Fortsetzung Lösungen:

25mM NH ₄ HCO ₃ -Lösung	25mM NH ₄ HCO ₃ gelöst in ddH ₂ O
Trypsin-Lösung [1U/μl]	2.000 Einheiten (U) Trypsin gelöst in 2ml 50mM NH ₄ HCO ₃ -Lösung

3.3.7.2 MALDI TOF/TOF MS/MSMaterial:

Trifluoressigsäure (TFA), Reinheitsgrad für Proteinsequenzierung	Applichem, Darmstadt
Zip-Tip Pipettenspitzen	Millipore, Schwalbach

Lösungen:

Elutions-Lösung	70% ACN (v/v) 29,9% ddH ₂ O (v/v) 0,1% TFA (v/v)
Entsalzungs-Lösung	0,1% TFA in ACN (v/v)
Equilibrierungs-Lösung	50% ACN (v/v) 49,9% ddH ₂ O 0,1% TFA (v/v)
Matrix	50% ACN (v/v) 49,9% ddH ₂ O 0,1% TFA (v/v) α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure bis zur Sättigung hinzugeben

3.3.7.3 vMALDI-LTQLösungen:

ACN/TFA-Lösung	55% ACN (v/v) 0,2% TFA (v/v) 44,8% ddH ₂ O(v/v)
----------------	--

Verwendete Kits:

TiO ₂ Protea Tip Probe-Kit (# SPI244)	Protea Biosciences, Morgantown (USA)
--	--------------------------------------

3.3.7.4 LC-ESI MS/MSMaterial:

Flüssigchromatographie (LC) Säule 1 Bruker Daltonics, Bremen
 (analytische Säule): 3µm Biosphere C18
 (Länge:10cm, innerer Durchmesser: 75µm,
 äußerer Durchmesser:360µm)
 (#NS-AC-10-dp3)

LC Säule 2 (*Trapping Säule*): Bruker Daltonics, Bremen
 5µm Biosphere C18 (Länge:2 cm,
 innerer Durchmesser: 100µm, äußerer
 Durchmesser: 360µm) (#NS-MP-10)

Lösungen:

Lösung A 0,1% Ameisensäure in ddH₂O (v/v)
 Lösung B 0,1% Ameisensäure in ACN (v/v)
 0,1% TFA 0,1% TFA in ddH₂O (v/v)

3.3.8 ProteinexpressionAntibiotika:

Ampicillin (AMP) Roth, Karlsruhe

Lösungen:

Luria-Bertani (LB-) Medium 10g Bacto-Trypton/Pepton, pH 7,4
 (1 Liter, in ddH₂O gelöst) 5g Hefeextrakt
 5g NaCl
 1ml 1M NaOH

LB-AMP-Medium 100µg Ampicillin-Lösung / ml LB-Medium

3.3.8.1 Transformation von kompetenten *Escherichia coli* Zellen

Alle benutzten Vektoren mit Insert wurden von Sebastian Kötter (AG Prof. Linke) hergestellt. Details zur verwendeten prokaryotischen *Escherichia coli* (*E. coli*) Zelllinie sind in Tab. 4 aufgeführt

Tab. 2: Verwendete *E. coli* Zelllinie.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ , ø80d/lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1	Hanahan, 1983

Vektoren mit Insert:

pGEX4T2 mit MLP-Glutathion-S-Transferase-Markierung (GST-tag, kurz: GST)

pGEX4T2 mit MLP^{S46N}-GST

pGEX4T2 mit MLP^{S95A}-GST

pGEX4T2 mit MLP^{Q94R}-GST

3.3.8.2 Plasmid-Präparation

High Pure Affinity Isolation Kit
(#11754777001)

Roche Diagnostic, Mannheim

3.3.8.3 Ansetzen eines Glycerin-StocksMaterial:

Flüssiger Stickstoff

Airliquide, Düsseldorf

Lösungen:

40% Glycerin, autoklaviert

40% Glycerin (v/v)

60% ddH₂O (v/v)

3.3.8.4 Ansetzen von Bakterienkulturen zur ProteinexpressionMaterial:

4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-
Hydrochlorid (AEBSF) (#A1421)

Applichem, Darmstadt

Aprotinin (#A2132)

Applichem, Darmstadt

Glutathion-Sepharose-Matrix

GE Healthcare, München

Leupeptin (#4041-100)

Peptanova, Sandhausen

Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranosid
(IPTG)

Applichem, Darmstadt

Lysozym (#A3711)

Applichem, Darmstadt

Para-Amino-Benzamidin-Beads
(Para-Beads)

GE Healthcare, München

Thrombin [1U/ μ l] (#T4648)

SIGMA-Aldrich, München

Lösungen (gelöst in ddH₂O):

AEBSF (1ml)	100mg AEBSF
Aprotinin (1ml)	10mg Aprotinin
Hochsalz-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 8,0 300mM NaCl 2,5mM CaCl ₂ 5mM MgCl ₂ 1mM DTT
IPTG	0,5M IPTG
Leupeptin (1ml)	40mg Leupeptin
Lyse-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 7,6 0,5mM EGTA 1mM DTT
Lysozym (1ml)	50mg Lysozym
Thrombin-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 8,0 150mM NaCl 2,5mM CaCl ₂ 5mM MgCl ₂ 1mM DTT

3.3.9 PhosphorylierungsstudienMaterial:

Aktives ERK1 (Aktivität: 33,5 U/μl) Konzentration: 0,1μg/μl	SIGMA-Aldrich, München
Aktives ERK2 (Aktivität: 100 U/μl) Konzentration: 0,1μg/μl	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) [1mM]	SIGMA-Aldrich, München
Phosphatase Inhibitor Cocktail #P2850	SIGMA-Aldrich, München
Phosphatidylserin [2,5μg/ml] (#P6641)	SIGMA-Aldrich, München
<i>PKC Isozyme Sampler Set</i> [0,01U/μl]	Calbiochem/Merck, Darmstadt

Lösungen:

ATP	50mM ATP gelöst in ddH ₂ O
0,5mM CaCl ₂	0,5mM CaCl ₂ gelöst in ddH ₂ O
2M Kaliumpropionat (KPr)	11,22g KOH gelöst in 100ml 2M Propionsäure
0,1M Magnesiumpropionat (MgPr)	200ml 0,3M Propionsäure 1,01g MgO mit ddH ₂ O auf 250ml auffüllen
pCa8, pH 7,0	20mM Creatinphosphat 20mM Imidazol 4mM EGTA 12mM MgPr 97,6mM KPr gelöst in ddH ₂ O

3.3.9.1 Dephosphorylierung von Proteinlösungen für die 2-D DIGEMaterial:

Alkalische Phosphatase (AP) [100U/μl] und NEBuffer 3	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
CnA (#C1907)	SIGMA-Aldrich, München
CaM (#P2277)	SIGMA-Aldrich, München
Protease-Inhibitor Cocktail (#P8340)	SIGMA-Aldrich, München

Lösungen (gelöst in ddH₂O):

Dephosphorylierungs-Puffer	50mM Tris, pH 8,5 1% SDS
----------------------------	-----------------------------

3.3.9.2 AutoradiographieMaterial:

BAS Kasette 2325	FujiFilm, Straubenstadt
[γ ³² P]-ATP (9,25 MBq, 250μCi)	Hartmann Analytic, Braunschweig
FAK [0,0015U/μl]	Biaffin, Kassel
Phosphoimaging Plate BAS-IPMS 2325	Raytest/ FujiFilm, Straubenstadt

3.3.9.3 Interaktionsstudien

Material:

Rekombinantes humanes wt CFL-2-GST Millipore, Schwalbach
(GST-Fusions-Protein exprimiert in *E. coli*)
MW: 45kDa (#12-454)

3.4 Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur

Alle verwendeten Lösungen und Materialien wurden vor Gebrauch steril filtriert bzw. im Autoklaven sterilisiert.

3.4.1 Zellkulturmaterial

Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-Aldrich, München
ET-1 (#E7764) Stock: [4µM] in DMSO gelöst	SIGMA-Aldrich, München
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Gelatine	Applichem, Darmstad Zellkulturschalen Greiner, Frickenhausen
GW 5074 (#EI-307) Stock: [20mM] in DMSO	Enzo Life Sciences, Lörrach
Ham's F-12 Medium (#FG0815) mit Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Low-Glucose DMEM (DMEM) (#FG0415)	Biochrom AG, Berlin
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PBS-Instamed (Dulbecco) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (# L182-50)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) [1.000U/10.000µg/ml]	Biochrom AG, Berlin
15ml und 50ml Reaktionsröhrchen	Greiner, Frickenhausen
6-Well Platten	Greiner, Frickenhausen
Skalpelle	Braun Aesculap, Tuttlingen
Steril-Filter	Millipore, Schwalbach
Zellschaber, 25cm (#83.1830)	Sarstedt, Newton (USA)

3.4.2 Zellkulturlösungen

70% EtOH	70% EtOH (v/v) 30% ddH ₂ O
1% Gelatine gelöst in ddH ₂ O	1% Gelatine (w/v)
Pancreatin-Lösung (1 Liter)	8g NaCl 2g D-Glucose 200mg KCl 57,5mg NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O 20mg Phenolrot 1g Natriumbicarbonat gelöst in ddH ₂ O Am Tag der Präparation: 20mg Pancreatin und 150U Collagenase pro 100ml Pancreatin-Lösung zugeben
PBS (1 Liter) gelöst in ddH ₂ O	9,55g/L PBS-Instamed (w/v)

3.4.3 Zellkulturmedien

DMEM-Kulturmedium	10% FCS (v/v) 1% Pen/Strep (v/v) 89% DMEM (v/v)
Ham's F-12 Preplating-Medium (1 Liter)	250mg Fetuin 20mg Ascorbinsäure 10g BSA 10ml Pen/Strep gelöst in Ham's F-12 Medium

3.4.4 Material und Lösungen für die ImmunhistologieMaterial:

Entelan®	Merck, Darmstadt
Deckgläschen (12 und 18mm)	Thermo Fisher/ VWR International, Langenfeld
Hoechst 33342	SIGMA, München
SuperFrost Ultra Plus® Objektträger	Thermo Fisher/ VWR International, Langenfeld

Lösungen:

2,5% BSA	2,5% BSA in PBS gelöst (v/v)
2,5% Kaninchen Normalserum	2,5% Kaninchen Normalserum gelöst in PBS (v/v)
3% Paraformaldehyd (PFA)	3% PFA gelöst in ddH ₂ O (w/v) und steril filtrieren
0,5% Triton-X 100	0,5% Triton-X 100 in PBS (v/v)

3.5 Antikörper**3.5.1 Primärantikörper**

Es wurden ausschließlich Immunglobulin G (*IgG*)-spezifische Antikörper verwendet. In Tab. 5 und 6 sind alle verwendeten poly- (*pAK*) und monoklonalen (*mAK*) Primärantikörper aufgelistet. Die Antikörper wurden über Cell Signaling (Beverly, USA), Biozol (Eching), SIGMA-Aldrich (München), BD Biosciences (Franklin Lakes, USA), Millipore (Schwalbach), Abcam (Cambridge, GB), Abnova (Heidelberg) und Biaffin (Kassel) bezogen.

Tab. 3: Für Western Blots verwendete Primärantikörper.

Antikörper	pAK/mAK	Verdünnung	Hersteller	Bestell #
Kaninchen-Anti- α -Aktinin	pAK	1:1.000 in 5% BSA	CS	3134
Kaninchen-Anti- α B-Crystallin	pAK	1:1.000 in 4% MP	Biozol	SR-B223
Maus-Anti- β -Actin HRP konjugiert	mAK	1:25.000 in 5% BSA	SIGMA	A3854
Maus-Anti-Calsarcin-1	pAK	1:1.000 in 5% MP	BD	612578
Maus-Anti-CnA alle Isoformen (CnA-PAN)	pAK	1:250 in 5% BSA	BD	610259
Kaninchen-Anti-CnA α	pAK	1:1.000 in 5% MP	Biozol	LS-C81636/17177
Kaninchen-Anti-CnA β	pAK	1:1.000 in 5% BSA	Millipore	07-1493
Kaninchen-Anti-CnA β	pAK		Millipore	07-068
Maus-Anti-Cypher-1	pAK	1:2.500 in 4% MP	BD	611850
Kaninchen-Anti-ERK1/2	pAK	1:1.000 in 5% BSA	Abcam	ab17942
Kaninchen-Anti-ERK1/2	mAK		CS	137F5
Kaninchen-Anti-P-ERK1/2 T202/Y204 und T185/Y187	pAK		Abnova	PAB12748
Maus-Anti-P-ERK1/2 T202/Y204 und T185/Y187	mAK		Biaffin	Anti-ERK1/2
Kaninchen-Anti-FHL-1	pAK	1:1.000 in 5% MP	Abcam	ab49241
Maus-Anti-GAPDH HRP konjugiert	pAK	1:10.000 in 5% BSA	Abcam	ab9482
Kaninchen-Anti-GAPDH	mAK	1:1.000 in 5% BSA	CS	2118
Maus-Anti-Lamin A/C	mAK		BD	612162
Kaninchen-Anti-P-S95 MLP	pAK		Eurogentec	-
Kaninchen-Anti-MLP	pAK			-
Maus-Anti-NFAT2 (NFAT _{c1})	mAK	Abcam	ab2796	
Kaninchen-Anti-NFAT3 (NFAT _{c4})	mAK	CS	2183	

CS: Cell Signaling; SIGMA: SIGMA-Aldrich; BD: BD Biosciences

Tab. 4: Für Immunfluoreszenzmarkierungen verwendete Primärantikörper bzw. Farbstoffe.

Antikörper/Farbstoff	Verdünnung	Hersteller	Bestell #
Maus-Anti- α -Aktinin (mAk)	1:300	SIGMA-Aldrich	A7811
Kaninchen-Anti-FHL-1	1:50	Abcam	ab49241
Kaninchen-Anti-P-S95 MLP (pAk)	1:50	AG Linke/Eurogentec (siehe Kapitel 3.4.1.1)	-
Kaninchen-Anti-MLP (pAk)	1:50		-
Bisbenzimid Hoechst 33342 (Hoechst 33342)	1:3.000	SIGMA-Aldrich	B2261

3.5.1.1 Entwicklung eines phosphorylierungsspezifischen MLP Antikörpers

Für die Charakterisierung der MLP S95 Phosphorylierung wurde die Entwicklung und Synthese eines phosphorylierungsspezifischen MLP S95 Antikörpers (P-S95 MLP), sowie eines Kontrollantikörpers gegen MLP bei der Firma Eurogentec in Auftrag gegeben. Beide Antikörper sind polyklonale IgG-Antikörper und wurden im Kaninchen erzeugt.

Sequenzen der zur Immunisierung verwendeten Peptide:

P-S95 MLP: $\text{H}_2\text{N} - \text{CGL QFQ QS}(\text{PO}_3\text{H}_2)\text{P KPA R} - \text{CONH}_2$

MLP Kontrollantikörper: $\text{H}_2\text{N} - \text{CGL QFQ QSP KPA R} - \text{CONH}_2$

Beide Antikörper wurden von Eurogentec durch Kreuz-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt und der Reinheitsgrad anschließend mit einem ELISA-Test überprüft (Anhang 1).

3.5.2 Sekundärantikörper

Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte Sekundärantikörper:

Ziege–**Anti-Maus** HRP
IgG (H+L) (#115-035-146) Jackson Immuno Research / Dianova,
Hamburg

Ziege-**Anti-Kaninchen** HRP
IgG (H+L) (#R1364HRP) Acris Antibodies GmbH, Herford

In **Tab. 7** sind die für Immunfluoreszenzmarkierung verwendeten Sekundärantikörper aufgelistet.

Tab. 5: Für Immunfluoreszenz-Markierung (IF) verwendete Fluorochrom-konjugierte Sekundär-Antikörper.

Spezifität	Fluorochrom	Anregung [nm]	Emission [nm]	Hersteller
Ziege- Anti-Maus (IgG, H&L) (#F9006)	FITC	492	520	SIGMA-Aldrich, München
Ziege- Anti-Kaninchen (IgG, H&L) (#81-6115)	Cy3	550	570	Zymed/Invitrogen, Karlsruhe

3.6 Geräte

Gerät	Hersteller/Distributor
✓ Brucheisautomat ZBE-100	Ziegra/ Omnilab, Bremen
✓ <u>Elektrophorese-Kammern:</u>	
✓ Minigel Twin	Biometra, Göttingen
✓ Protean II XL Cell	BioRad, München
✓ Gewebehomogenisator Ultra Turax T25	Thermo Fisher/ VWR International, Langenfeld
✓ <u>Inkubatoren:</u>	
✓ Inkubator Heracell 150 ICU	Thermo Fisher/ VWR International, Langenfeld
✓ Inkubator Isotemp Incubator	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)
✓ Schüttelinkubator MU 2525	Multitron/ VWR International, Langenfeld
✓ IPG-Strip Reswelling Tray (7-24cm)	GE Healthcare, München
✓ LAS 4000 Luminescent Image Analyzer	FujiFilm, Straubenstadt
✓ <u>Massenspektrometer:</u>	
✓ ABI 4800 TOF/TOF Analyzer	Applied Biosystems, Foster City (USA)
16900 Opti-TOF LC/MALDI Insert (123x81 mm)	Applied Biosystems, Foster City (USA)
✓ HCTultra Elektrospray Ionenfallen Massenspektrometer Easy nLC System vMALDI LTQ	Bruker Daltonics, Bremen Thermo Electron, Rockford (USA)
✓ Mikrotom Kryostat CM 3000	(Reichert-Jung) Leica, Wetzlar
✓ Konfokales Mikroskop Nikon ECLIPSE Ti MEA 53100 Argon Ionen Laser LGA-PA Zwischentubus	Nikon, Düsseldorf LG Laser Technologies, Kleinostheim Olympus, Hamburg
✓ Phosphoimager BAS-1800 II Eraser für BAS	FujiFilm, Straubenstadt FujiFilm, Straubenstadt
✓ <u>Power-Supplies:</u>	
✓ Standard Power Pack P25/P25T	Biometra, Göttingen
✓ Power PAC 1000	BioRad, München
✓ Präzisionswaage TE 64	Sartorius/Omnilab, Bremen
✓ Protean IEF Cup Loading Tray	BioRad, München
✓ Protean IEF Cell 2-D Fokussierer und 18cm Fokussier-Schlitten	BioRad, München
✓ Rollermixer SRT6	Stuart/VWR International, Langenfeld
✓ Rotationsrad Rotator SB3	Stuart/VWR International, Langenfeld
✓ Rundschüttelmaschine SM 30A´	Bühler/Omnilab, Bremen
✓ <u>Scanner:</u>	
✓ Expression 10.000XL	Epson
✓ CanonScan 9900F	Canon
✓ Typhoon 9400	GE Healthcare, Piscataway (USA)

Gerät	Hersteller/Distributor
✓ Semi-Dry Blotting Apparatur Fastblot B33/B34	Biometra, Göttingen
✓ Sicherheitswerkbank Herasafe KS 12	Thermo Fisher/ VWR International, Langenfeld
✓ <u>Spektrophotometer:</u>	
✓ AD340	Beckman Coulter Inc., Brea (USA)
✓ Ultrospec 5300pro Gold UV/Visible Spectrophotometer	Amersham Bioscience/GE Healthcare, München
✓ Thermomixer Comfort 5355R	Eppendorf, Hamburg
✓ Thermo Savant SC110A SpeedVac Plus	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)
✓ Ultraschall-Desintegrator Sonoplus HD 2070	Bandelin/ Omnilab, Bremen
✓ <u>Vortex-Schüttler:</u>	
✓ Vortex Genie 2 LabDancer	Bender & Hobein, Zürich (Schweiz) VWR, Langenfeld
✓ Wasser-Aufbereitungsanlage Lab Tower 15 EDI	Thermo Fisher/ VWR International, Langenfeld
✓ <u>Wasserbäder:</u>	
✓ Schüttelwasserbad SW-22	Julabo, Seelbach
Waterbath Sonicator FS60H	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)
✓ <u>Zentrifugen:</u>	
✓ Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
✓ Kühlzentrifuge 1-15K mit Rotor 12124	SIGMA-Aldrich, St. Louis (USA)
✓ Tischzentrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg
✓ Sorvall RC6+ Centrifuge	Thermo Electron LED, Langenselbold
- <u>Rotoren:</u>	Thermo Electron LED, Langenselbold
FiberLite F10S6x500y	
FiberLite F21-8x50y	
✓ Ultrazentrifuge (UZ) Sorvall Discovery ME 20 SE	Thermo Fisher/ VWR International, Langenfeld
Rotor Hitachi S110AT-0021	Hitachi, Tokio (Japan)

3.7 Software und Online-Datenbanken

Software	Hersteller/ Händler
✓ AD-LD Analysis Version 1.2	Beckman Coulter Inc., Brea (USA)
✓ Bioworks	Thermo Fisher, Rockford (USA)
✓ Compass 1.3 Software inklusive HyStar 3.2 SR2; Esquire ctrl 6.2 und Data Analysis 4.0 SR1	Bruker Daltonics, Bremen
✓ DeCyder	GE Healthcare, München

Software	Hersteller/ Händler
✓ EXCEL	Microsoft
✓ GPS V2.1	CUCKOO Workgroup USTC
✓ Mascot	Matrixscience
✓ Multi Gauge V3.2	FujiFilm, Straubenstadt
✓ NIS-Elements AR 3.1	Nikon
✓ Proteinpilot	Applied Biosystems, Foster City (USA)
✓ ProteinScape 2	Bruker Daltonics, Bremen
✓ Redfin	Ludesi (Schweden)
✓ Sigma Plot 11	Systat Software Inc.
✓ Silver Fast Launcher Version 2.0.7	LaserSoft
✓ SWIFT II-06	Biochrom
✓ Xcalibur 2.0 SR2 vMALDI LTQ 2.2	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)

Datenbank	www-Adresse
✓ CLUSTALW	http://align.genome.jp/
✓ IPI Maus	http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPImouse.html
✓ Masco	http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS
✓ NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
✓ NCBI Protein-Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins
✓ NetPhosK1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/
✓ Swissprot	http://expasy.org/sprot/
✓ Swissprot Protein-Blast	http://expasy.org/tools/blast/
✓ pI/MW prediction tool	http://expasy.org/tools/pi_tool.html
✓ UbPred	http://www.ubpred.org/
✓ Uniprot	http://www.uniprot.org/

4. Methoden

4.1 Proteinbiochemie

4.1.1 Proteinextraktion aus Herzgewebe

Alle verwendeten Herzgewebe wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Zur Proteinextraktion wurden Gewebestückchen mit Greaser-Probenpuffer versetzt und auf Eis mit Skalpell zerkleinert. Die Proben wurden in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt, zehn bis 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Thermomixer für drei Minuten bei 96°C denaturiert. Nach weiteren zehn Minuten auf Eis wurden die verbliebenen Gewebetrümmer bei 4°C und $14.000\times g$ ab zentrifugiert. Bis zum Konzentrationstest bzw. zur weiteren Verwendung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) wurden die extrahierten Proteine bei -20°C gelagert.

4.1.2 Subzelluläre Proteomfraktionierung von Herzgewebe

Zur Bestimmung der Lokalisation von Proteinen in Kardiomyozyten wurden verschiedene Herzgewebe subzellulär fraktioniert:

- 12 Wochen alte MLP^{-/-}- und wt Herzen wurden daraufhin untersucht, ob sie sich bezüglich der Lokalisation von FHL-1 unterscheiden;
- 12 Wochen alte, gesunde Mauser Herzen wurden zur Bestimmung der subzellulären Verteilung von MLP und P-S95 MLP verwendet;
- gesunde und DHF Hundeherzen wurden fraktioniert, um zu überprüfen ob sie sich hinsichtlich der Lokalisation von P-S95 MLP bzw. MLP unterscheiden.

Für die Fraktionierung wurde das *QProteome Cell Compartment Kit* (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben verwendet.

Das Proteom von je 20mg Herzgewebe wurde in cytosolische, membranäre, nukleäre und cytoskelettale Fraktion aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinfractionen durch Aceton-Fällung (siehe Kapitel 4.1.3) an konzentriert, in Greaser-Probenpuffer resuspendiert und die Proteinkonzentration mit der Neuhoff'schen Methode bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4.1) (Neuhoff *et al.*, 1979). Pro Fraktion wurden $15\mu\text{g}$ Protein in die SDS-PAGE eingesetzt und geblottet (siehe Kapitel 4.1.5 und Kapitel 4.1.6). Die Western Blots wurden mit Primärantikörpern gegen FHL-1, Lamin A/C und β -Tubulin III, bzw. P-S95 MLP, MLP und GAPDH sowie mit den korrespondierenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert. Nach Behandlung der Blots mit dem *ECL-Detection Kit* wurden die Antikörpersignale im LAS 4000 Luminescent Image Analyzer (FujiFilm, Straubing) detektiert und mit *Multi Gauge*, *SIGMA Plot 11* sowie *EXCEL* quantifiziert.

4.1.3 Ankonzentration von Proteinlösungen durch Aceton-Fällung

Zur Ankonzentration sowie Reinigung der subzellulären Proteinfractionen und rekombinant exprimierter Proteine wurde die Aceton-Fällung angewandt. Die Proteinlösungen wurden dafür mit dem Vierfachen ihres Eigenvolumens mit eiskaltem Aceton gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei ausgefallene Proteine wurden ab zentrifugiert (zehn Minuten bei 12.000xg/ 4°C) und der Überstand verworfen. Das Protein-Pellet wurde in einem für den weiteren Versuchsablauf geeigneten Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Rekombinante Proteine wurden zur Verwendung in Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungs-Tests in pCa8-Lösung resuspendiert, subzelluläre Proteinfractionen hingegen in Greaser-Probenpuffer.

4.1.4 Konzentrationstests

4.1.4.1 *Neuhoff'sche Bestimmung von Proteinkonzentrationen*

Die Konzentration von Proteinen, die in Greaser-Probenpuffer gelöst worden waren, wurde durch eine von Neuhoff *et al.* beschriebene Methode bestimmt (Neuhoff *et al.*, 1979). Je 5µl Probe bzw. reiner Greaser-Probenpuffer (als Referenz) wurden auf eine Zelluloseacetat-Membran pipettiert und getrocknet. Die trockene Membran wurde für fünf Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung angefärbt und anschließend für ca. 15 Minuten auf einem Rundschüttler entfärbt. Der Entfärber wurde verworfen und die aufgetragenen Proben mit einer Schere aus der Membran ausgeschnitten. Die Membran-Stücke wurden in je 1ml DMSO aufgelöst und die optische Dichte (OD) der DMSO-Protein-Lösung bei 630nm gemessen (Spektrophotometer; Amersham Bioscience). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben-ODs mit einer BSA-Standardkurve abgeglichen. Der Nachweisbereich der Neuhoff'schen Konzentrationsbestimmung liegt bei ca. 0,01-10mg Protein/ml (Neuhoff *et al.*, 1979).

4.1.4.2 *Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit kommerziellen Kits*

Für die Bestimmung der Protein-Konzentration von rekombinanten Proteinen und von Proben für die 2-D GE wurde entweder das *2-D Quant-Kit* (GE Healthcare) oder das *BCA-Kit* (Pierce) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die OD rekombinant exprimierter Proteine wurde mit einem Spektrophotometer von Amersham Bioscience detektiert und die der 2-D DIGE Proben mit einem von Beckman Coulter.

4.1.5 SDS-PAGE

Für die Auftrennung von denaturierten Proteingemischen gemäß ihres MW wurde die SDS-PAGE in einem Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem angewandt (Laemmli, 1970; Ornstein, 1964). Die dafür verwendeten SDS-Gele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Der AA/BA-Gehalt der Trenngele variierte in Abhängigkeit vom MW der zu untersuchenden Proteine (Tab. 8, Tab. 9 und Tab. 10).

Durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 20 - 30mA pro Gel sowie einer maximalen Spannung von 220V wurden die Proteine innerhalb von anderthalb Stunden aufgetrennt (1x Laufpuffer; Elektrophoresekammer: Biometra).

Tab. 6: Abhängigkeit des AA/BA-Anteils [%] im Trenngel vom MW der auf zu trennenden Proteine.

AA/BA [%]	MW [kDa] der Proteine
15-20	10-40
12,5	40-75
10,0	75-100
7,5	100-150
5-7,5	100-300

Tab. 7: Zusammensetzung eines Trenngels mit 7,5%, 10%, 12,5% sowie 15% AA/BA-Anteil.

AA/BA-Anteil	7,5%	10%	12,5%	15%
AA/BA (30/0,8) (v/v) [ml]	1,83	2,45	3,05	3,65
Trenngel-Puffer [ml]	1,88			
Glycerin/Bidest (1:1) [ml]	0,38			
ddH ₂ O [ml]	3,38	2,78	2,15	1,59
10% APS [μl]	37,50			
TEMED [μl]	3,75			

Tab. 8: Zusammensetzung eines 4%igen Sammelgels.

AA/BA-Anteil	4%
AA/BA (30/0,8) (v/v) [μl]	300
Sammelgel-Puffer [μl]	310
ddH ₂ O [ml]	1,84
10% APS [μl]	25
TEMED [μl]	7,5

4.1.5.1 Titingele

Proteine mit einem MW >800kDa können nicht in normalen Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden, da die Porengröße der Gele zu gering ist (Lottspeich & Zorbas, 1998). Um eine ausreichende Porengröße der Gele zu erreichen werden niederprozentige Polyacrylamidgele durch Zugabe von Agarose stabilisiert (Tatsumi & Hattori, 1995). So ist es möglich 2%ige Polyacrylamidgele herzustellen, in denen sogar das größte bekannte Protein, Titin, das ein MW von bis zu vier Megadalton (MDa) besitzt, elektrophoretisch aufzutrennen. Diese agaroseverstärkten Polyacrylamidgele werden daher auch als *Titingele* bezeichnet.

Für die Herstellung von zwei Titingelen wurden 1,33ml AA/BA, 5ml Trenngelpuffer, 100μl 20% SDS-Lösung, 5,9ml ddH₂O und 11,5μl TEMED gemischt, im Wasserbad auf 47°C erhitzt und mit 150μl 10% APS sowie 6,65ml 1,5%iger Agarose versetzt. Die Polymerisation der Gele erfolgte für ca. fünf Stunden bei 4°C und die elektrophoretische Auftrennung der Proteine über Nacht bei einer konstanten Stromstärke von 2mA pro Gel und einer maximalen Spannung von 220V. Nach der Auftrennung wurden die Gele wie in Kapitel 4.1.8.1 beschrieben angefärbt.

4.1.6 Semi-Dry Immunblotting

Direkt im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine durch *Semi-Dry Immunblotting* elektrophoretisch auf PVDF-Membranen transferiert. Eine schematische Darstellung des Blotting-Transfer-Sandwiches zeigt Abb. 12. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte bei 4°C für 45 - 60 Minuten bei einer

konstanten Stromstärke von 250mA pro Gel (maximale Spannung: 220V). Anschließend wurde die Transfereffizienz durch eine PVDF-Färbung (Färbung: ca. eine Minute; Entfärbung: ca. zehn Minuten) überprüft und mit dem *LAS 4000 Lumineszenz Imaging System* (FujiFilm, Straubing) dokumentiert.

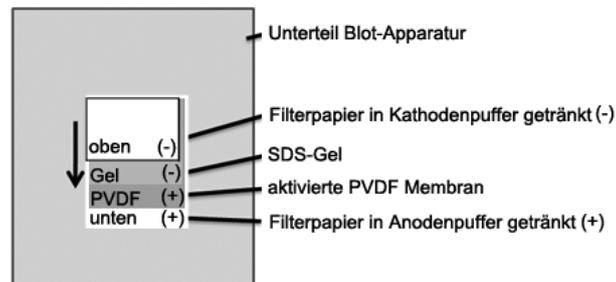


Abb. 12: Schematische Darstellung eines Semi-Dry Western Blot Transfer-Sandwiches. Je drei *Whatman*-Filterpapiere wurden in Anoden- (+) bzw. Kathodenpuffer (-) getaucht. Die Anodenpuffer-getränkten Filterpapiere wurden auf den Boden der Blotting-Apparatur gelegt und die zuvor in absolutem MetOH aktivierte PVDF-Membran darauf platziert. Auf die Membran wurde das SDS-Gel gelegt und mit den drei Kathodenpuffer-getränkten Filterpapieren bedeckt.

Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% BSA bzw. 5% MP blockiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (Tab. 5) inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde mit 1xTBST fortgewaschen. Für die Detektion des Primärantikörpers wurde die Membran für eine Stunde mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert (Tab. 6). Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 1xTBST entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem *ECL-Western Blot Detection Kit* behandelt und die chemilumineszenten Signale wurden mit dem *LAS 4000 Lumineszenz Imaging System* (FujiFilm; Straubing) visualisiert. Alle Western Blot Signale wurden mit der *Multi Gauge* Software quantifiziert und die dabei ermittelten Daten mit *Sigma Plot 11* und *EXCEL* analysiert.

Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten – sofern nicht anders angegeben – bei Raumtemperatur auf einer Rundschüttelmaschine.

4.1.7 2-D Gelelektrophorese

Das Prinzip der 2-D GE basiert auf der zweistufigen elektrophoretischen Auftrennung von komplexen Proteingemischen nach zwei unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der Proteine. Im ersten Schritt (erste Dimension), der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden die Proteine ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entsprechend in einem pH-Gradienten Gel aufgetrennt. Während des zweiten Schrittes (zweite Dimension) werden die Proteine in einer SDS-PAGE gemäß ihrem MW aufgetrennt. Prinzipiell ermöglicht die 2-D GE die Analyse von mehreren Tausend Proteinen gleichzeitig. Die Reproduzierbarkeit von 2-D Gelen, und somit die verlässliche Anwendung für die Proteomanalyse, wurde durch die Einführung von denaturierenden Bedingungen und die Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten Gelen (*IPG-Strips*) möglich (Bjellqvist *et al.*, 1982; O'Farrell, 1975). Neben der quantitativen Bestimmung von Expressionsunterschieden zwischen verschiedenen Proben wird die 2-D GE auch zur

Identifikation von Protein-Isoformen und posttranslationalen Modifikationen eingesetzt (Mann & Jensen, 2003).

Die große Sensitivität der 2-D GE, sowie die in der Regel darauf folgende massenspektrometrische Analyse der 2-D Proteinspots, erfordern eine große Sorgfalt in Bezug auf kontaminationsfreie Arbeit. Alle verwendeten Lösungen wurden vor dem Gebrauch filtriert. Außerdem wurde bei allen Arbeitsschritten darauf geachtet Kontaminationen mit Keratin zu vermeiden, um die Proteinidentifikation zu erleichtern.

4.1.7.1 Probenvorbereitung für die 2-D GE

Für die 2-D GE wurde gefrorenes Herzgewebe von MLP^{-/-}, MLP^{W4R/W4R} und korrespondierenden wt Mäusen verwendet (Tab. 2). Zunächst wurde das Herzgewebe unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Kryomörser pulverisiert und in einen Glashomogenisator (*Kimbel Kontes, dual*) überführt. Pro 100µg Gewebepulver wurden je 100µl 2-D-Probenpuffer zugesetzt. Im ersten Homogenisationsschritt wurde die Probe 40x mit dem Pistel bearbeitet, dann in einen feineren Glashomogenisator (*Kimbel Kontes, dounce*) überführt und weitere 25x mit dem Pistel bearbeitet. Wenn die Lösung schließlich frei von Gewebestücken war, wurde sie in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und im letzten Homogenisationsschritt für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einem Wasserbad (*Waterbath Sonicator, Thermo Fisher Scientific*) sonifiziert. Durch die Sonifizierung wurden die in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren zerstört, die bei der Auftrennung stören würden. Anschließend wurden verbliebene Zelltrümmer ab zentrifugiert (20 Minuten bei 12.000xg und 4°C; Kühlzentrifuge, SIGMA-Aldrich) und Aliquots der Proteinlösung bis zur ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

4.1.7.2 Die 1. Dimension: Rehydrierung und IEF von IPG-Strips (pH 4-7)

Für präparative 2-D Gele, die zur massenspektrometrischen Identifikation von Proteinspots verwendet werden sollten, wurden pro Gel (20x20cm) 750µg (Silberfärbung) bzw. 1mg (Coomassie-Färbung) Proteinlösung verwendet. Das eingesetzte Probenvolumen pro IPG-Strip betrug 340µl. Um die Fokussierung der Proteine im pH-Gradienten zu unterstützen, wurden alle Proben mit 1% (v/v) IPG-Puffer (pH 4-7), 1% (v/v) 2-Hydroxyethylsulfid und 2µl einer 2%igen Coomassie G250-Lösung versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben in den Fokussierschlitten pipettiert und die pH 4-7 IPG-Strips mit der Gel-Matrix voran darauf platziert (Abb. 13).

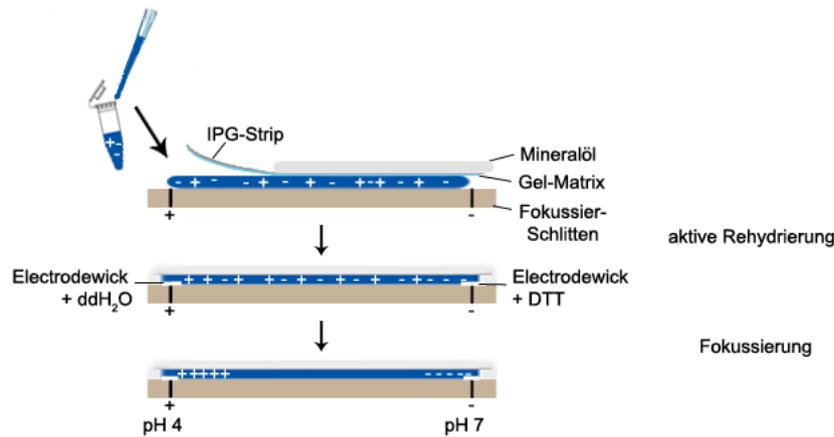


Abb. 13: Schematische Darstellung der aktiven Rehydrierung und IEF von IPG-Strips (pH 4-7).

Der IPG-Strip wurde dann mit Mineralöl überschichtet und die IEF in der *Protean IEF Cell* im „rapid ramp“ Modus bei einer konstanten Temperatur von 20°C gestartet (Tab. 11).

Tab. 9: Fokussier-Bedingungen für die IEF von pH 4-7 IPG-Strips.

IEF-Schritt	Spannung [V]	Dauer (Std)
1. aktive Rehydrierung	50	11
2. Fokussierung	150	1
3. Fokussierung	300	1
4. Fokussierung	600	1
5. Fokussierung	1.000	1
6. Fokussierung	2.000	1
7. Fokussierung	4.000	1
8. Fokussierung	8.000	2
9. Fokussierung	10.000	max. 10

Std: Stunden

Im Anschluss an den ersten Schritt, die aktive Rehydrierung, wurden zwischen die Gel-Matrix und die Elektroden Filterpapiere (Electrodewicks) platziert, die mit 6µl 10mM DTT (Anode), bzw. 6µl ddH₂O (Kathode) versetzt worden waren (Abb. 13). Die Fokussierung wurde beendet, sobald eine konstante Spannung von 10.000V erreicht und die Stromstärke auf weniger als 45mA gesunken war – spätestens jedoch nach zehn Stunden bei 10.000V. Nach der IEF wurden die IPG-Strips entweder direkt für die SDS PAGE equilibriert oder bei -80°C gelagert.

4.1.7.3 Die 1. Dimension: Rehydrierung und IEF von IPG-Strips (pH 6-11)

Proteine mit basischem pI tendieren dazu auf Plastikoberflächen zu präzipitieren und sind darüber hinaus auch schwerer fokussieren zu lassen als solche mit einem sauren pI (López, 2007). Die Rehydrierung von pH 6-11 IPG-Strips erfolgte deshalb über die so genannte Papierbrücken-Ladung (*paperbridge load*) in einem *Cuploading*-Fokussierschlitten (Kane *et al.*, 2006; Sabounchi-Schütt *et al.*, 2000; Sabounchi-Schütt *et al.*, 2001). Dabei wird die Proteinlösung nicht direkt in den Plastik-Fokussierschlitten pipetiert, sondern auf ein Stück Filterpapier (Papierbrücke) (BioRad) sowie in einen trichterförmigen Aufsatz (*Cuploading-Aufsatz*), der auf dem sauren Ende der Gel-Matrix

positioniert ist. Von dort aus wandern die Proteine nach Anlegung eines elektrischen Feldes langsam in den vorab passiv rehydrierten IPG-Strip ein.

Zur passiven Rehydrierung wurden die pH 6-11 IPG-Strips in einen *Rehydration-Tray* mit 340µl 2-D-Probenpuffer gelegt. Der verwendete Probenpuffer war mit 1% (v/v) IPG-Puffer (pH 6-11), 1% (v/v) 2-Hydroxyethylsulfid und 2µl 2%iger Coomassie G250-Lösung versetzt worden. Die pH 6-11 IPG-Strips wurden mit der Gel-Matrix voran auf der Lösung platziert, mit Mineralöl überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (Abb. 14).

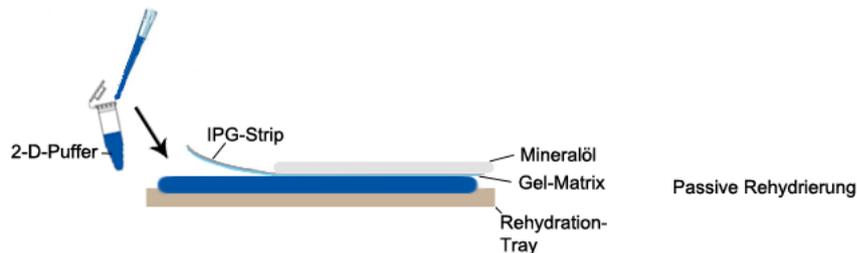


Abb. 14: Schematische Darstellung der passiven Rehydrierung von IPG-Strips (pH 6-11).

Vor der Probenapplikation wurde die Proteinlösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und für eine Stunde mit 1% IPG-Puffer (pH 6-11), 1% 2-Hydroxyethylsulfid und 2µl der 2%igen Coomassie G250-Lösung inkubiert. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen waren identisch mit denen für pH 4-7 IPG-Strips, das Probenvolumen betrug jedoch nur 200µl.

Der rehydrierte IPG-Strip wurde mit der Gel-Matrix nach oben in einen *Cuploading-Fokussierschlitten* gelegt. Eine ca. 5cm lange Papierbrücke wurde so im Schlitten positioniert, dass sie ca. 0,5cm weit auf dem sauren Ende der IPG-Strip Gel-Matrix auflag (Abb. 15). Auf der Überlagerungsfläche von Papierbrücke und IPG-Strip wurde der *Cuploading-Aufsatz* aufgesteckt und die Probe in den *Cuploading-Aufsatz* sowie auf die Papierbrücke appliziert. Anschließend wurden am alkalischen Ende der Gel-Matrix sowie am äußeren Ende der Papierbrücke Electrode-wicks und mobile Elektroden platziert. Nachdem alles mit Mineralöl überschichtet worden war, wurde die Papierbrückenladung in der *Protean IEF Cell* im *rapid ramp* Modus gestartet (Tab. 12).

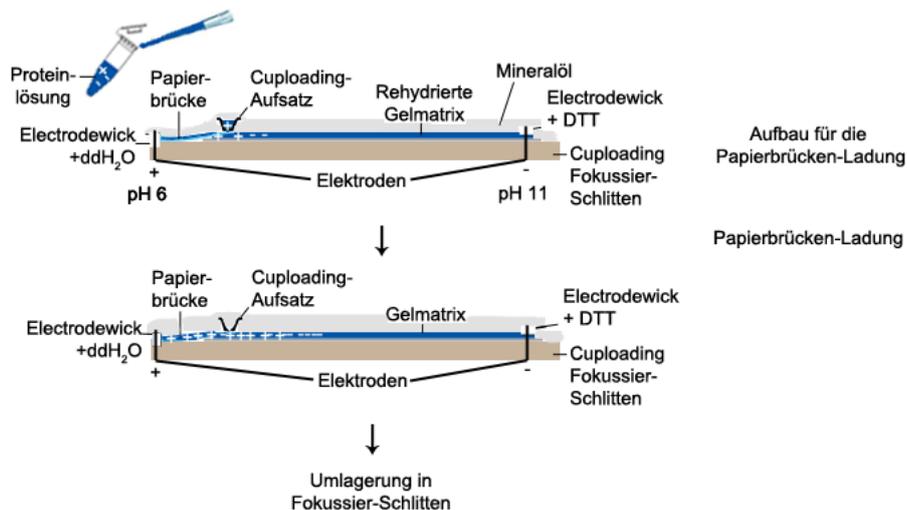


Abb. 15: Schematische Darstellung der Papierbrückenladung.

Tab. 10: Fokussier-Bedingungen während der Papierbrückenladung von pH 6-11 IPG-Strips.

Schritt	Spannung [V]	Dauer (Std)
1	200	12
2	300	10-12

Std: Stunden

Nach der Papierbrückenladung wurde der IPG-Strip für die IEF in einen normalen Fokussierschlitten überführt und die Electrodelecks wurden an seinen Enden platziert. Der IPG-Strip wurde mit Mineralöl überschichtet und die Fokussierung gestartet (Tab. 13). Die Proteine waren vollständig fokussiert sobald eine Spannung von 10.000V und eine Stromstärke von weniger als 45mA erreicht worden waren – spätestens jedoch nach zehn Stunden bei 10.000V.

Tab. 11: Fokussier-Bedingungen für die IEF von pH 6-11 IPG-Strips.

Fokussier-Schritt	Spannung [V]	Dauer (Std)
1	600	1
2	1.000	1
3	2.000	1
4	4.000	1
5	8.000	2
6	10.000	max. 10

Std: Stunden

Im Anschluss an die Fokussierung wurden die IPG-Strips entweder direkt für die nachfolgende SDS-PAGE equilibriert oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.1.7.4 Die 2. Dimension: Equilibrierung und SDS-PAGE

Der 2-D-Probenpuffer enthielt kein SDS, da dieses die Fokussierung der Proteine stört. Für die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE müssen die Proben jedoch mit SDS behandelt worden sein. Aus diesem Grund mussten die IPG-Strips nach der IEF in zwei SDS-haltigen Equilibrierungs-Puffern inkubiert werden (je 15 Minuten bei Raumtemperatur; Schüttelinkubator). Der erste Equilibrierungs-Puffer enthielt DTT und sollte zusätzlich Disulfid-Bindungen zerstören, die sich im Verlauf der IEF hätten bilden können. Im zweiten Equilibrierungs-Puffer war Iodacetamid (IAA) enthalten, um die in den Proben vorkommenden Cysteine zu alkylieren. Alkylierungen verhindern unspezifische Modifikationen der Proteine durch Acrylamid, was die Schlierenbildung im 2-D Gel vermindert.

Die equilibrierten IPG-Strips wurden auf das Sammelgel eines vorbereiteten 20x20cm großen 10%igen Bis-Tris Gels (BioRad Protean XL Gelsystem) gelegt und mit einer zweiten Schicht Sammelgel fixiert.

Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tab. 14 bzw. Tab. 15 aufgeführt. Das Trenngel wurde bis ca. 6cm unterhalb der oberen Kante der Glasplatten gegossen und musste für ca. 30 - 60 Minuten bei Raumtemperatur aushärten. Die fertige Sammelgel-Lösung (Tab. 15) wurde auf zwei 15ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Eines

der Aliquots wurde mit 40µl einer 10%igen APS-Lösung sowie 4µl TEMED versetzt, gemischt und bis ca. 3cm unterhalb der oberen Kante der Gel-Glasplatten gegossen. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, konnte der equilibrierte IPG-Strip mit der Gelmatrix in Richtung Glasplatte darauf gelegt werden. Das zweite Sammelgel-Aliquot wurde mit APS-Lösung und TEMED vermischt und zur Fixierung über den IPG-Strips gegossen. Nachdem das Gel vollständig polymerisiert war, wurde es in eine mit 1xMES-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer (Protean XL Cell; BioRad) eingespannt und die Proteine wurden über Nacht bei konstanten 88V (BioRad Power PAC 1000) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mit *G250 Coomassie-Stain* (BioRad), Blau-Silber-Coomassie-Färbung oder Silberfärbung angefärbt und mit der *Silver Fast Launcher Software* gescannt (Epson) (siehe Kapitel 4.1.8).

Tab. 12: Zusammensetzung eines 10%igen Trenngels für die 2-D GE.

Lösung	Volumen
30% AA/BA (BioRad) [ml]	13,30
1,5M Bis-Tris Puffer (pH 6.4) [ml]	10,00
10% SDS-Lösung [ml]	1,20
ddH ₂ O [ml]	15,50
10% APS-Lösung [µl]	400
TEMED [µl]	40

Tab. 13: Zusammensetzung eines Sammelgels für die 2-D GE.

Lösung	Volumen
30% AA/BA (BioRad) [ml]	1,34
1,5M Bis-Tris Puffer (pH 6.4) [ml]	0,84
10% SDS-Lösung [ml]	0,10
ddH ₂ O [ml]	7,50
Coomassie G250-Lösung [2%] [µl]	5

4.1.7.5 2-D DIGE

Die Kombination zweier verschiedener Auftrennungsmethoden in der 2-D GE ermöglicht es komplexe Proteingemische zu separieren und mehrere Tausend Proteine parallel zu analysieren. Durch die vielen dafür notwendigen Arbeitsschritte erhöht sich jedoch auch die Anzahl der Variablen, durch welche die Position einzelner Proteine im Gel maßgeblich beeinflusst wird. Die Varianz in der Spot-Verteilung zwischen verschiedenen 2-D Gelen ist daher relativ groß, was zu Schwierigkeiten bei der Vergleichbarkeit der Gele untereinander führt. Dieses Problem wurde durch die Entwicklung der 2-D DIGE minimiert (Ünlü *et al.*, 1997).

Die 2-D DIGE unterscheidet sich von der normalen 2-D GE dadurch, dass in ihr bis zu drei verschiedene Proben mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen – den sogenannten *CyDyes* – markiert, miteinander vermischt und dann zusammen im gleichen 2-D Gel aufgetrennt werden können. *CyDyes* sind N-Hydroxysuccinimidylesterderivate der Fluoreszenzfarbstoffe Cy2, Cy3 und Cy5, die über ihre reaktive NHS-Ester-Gruppe eine kovalente Bindung mit dem ε-Lysin-Rest eines Proteins eingehen (Marouga *et al.*, 2005). Laut Herstellerangaben wirkt dabei die für die Fluoreszenzmarkierung eingesetzte Farbstoffkonzentration als Reaktions-limitierender Faktor, so dass durchschnittlich nur ein Lysin-Rest pro Protein markiert wird. Das Verhältnis von Proteinmolekülen zu *CyDyes* beträgt dabei in etwa 5:1, weswegen die Fluoreszenzfarbstoffe auch als „*CyDyes für minimale Markierung*“ bezeichnet werden (van Eyk & Dunn, 2003). Da die Bindung von *CyDyes* die isoelektrischen Eigenschaften der Proteine gar nicht und das

MW der Proteine nur minimal (~500Da) verändert, wird durch die Fluoreszenzmarkierung die Position der Proteine im Gel nicht beeinflusst (Marouga *et al.*, 2005).

Im Vergleich zur konventionellen 2-D GE erfordert die 2-D DIGE Technik einen erheblichen finanziellen Mehraufwand, bietet jedoch entscheidende Vorteile:

- CyDyes sind wesentlich sensitiver als Coomassie- und Silberfärbung: pro 20x20cm großem 2-D DIGE Gel werden nur 50µg von jeder eingesetzten Probe benötigt (Herstellerangaben; GE Healthcare).
- Unterschiede in der Spot-Position aufgrund von versuchsbedingten Varianzen entfallen für Proben, die im gleichen 2-D Gel aufgetrennt werden (Minden *et al.*, 2009; Marouga *et al.*, 2005).
- Beim direkten Vergleich von nur zwei Proben, kann ein Gemisch aus beiden Proben mit einem dritten CyDye markiert und als interner Standard verwendet werden. Dadurch wird die Quantifizierung der Spot-Intensitäten erheblich verbessert (Minden *et al.*, 2009; Marouga *et al.*, 2005).
- Die Anzahl der für eine 2-D DIGE-Studie benötigten Gele ist im Vergleich zur konventionellen 2-D GE mehr als halbiert: einerseits werden in jedem Gel mindestens zwei Proben aufgetrennt und andererseits ist die Varianz in der Spot-Verteilung stark vermindert, was schneller zu signifikanten Ergebnissen führt (Minden *et al.*, 2009; Marouga *et al.*, 2005).

Die verschiedenen CyDyes besitzen gleiche Masse- und Ladungs-Eigenschaften, unterscheiden sich jedoch bezüglich ihrer Anregungs- und Emissionspektren (van Eyk & Dunn, 2003). CyDye-markierte Proteine werden mit einem speziellen Laserscanner (Typhoon; GE Healthcare) visualisiert, der die verschiedenen Farbstoffe nacheinander detektiert. Dadurch kann die Spotverteilung jeder einzelnen Probe separat betrachtet und ausgewertet werden (Abb. 16).

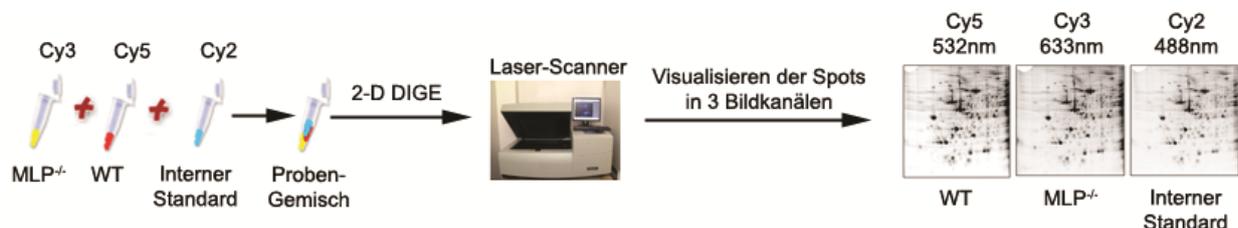


Abb. 16: Mit CyDyes markierte Proteine werden im 2-D Gel durch einen speziellen Laserscanner (Typhoon 9400; GE Healthcare) visualisiert. Dabei werden zunächst alle drei CyDyes nacheinander bei ihren spezifischen Extinktionswellenlänge (Cy5: 532nm; Cy3: 633nm; Cy2: 488nm) visualisiert. Es entsteht für jede Probe ein eigener Bildkanal.

Den verschiedenen Bildkanälen bzw. CyDyes werden in der Scanner-Software (DeCyder, GE Healthcare) Pseudo-Farben zugewiesen, so dass neben den Graustufen auch farbige Gel-Abbildungen betrachtet werden können. In einem Overlay der drei gescannten Bildkanäle können so auf einen Blick Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben anhand von Varianzen der Farbabstufung erkannt werden (Abb. 17). Die Auswertung der 2-D Gele erfolgt anhand der Graustufen-Abbildungen.

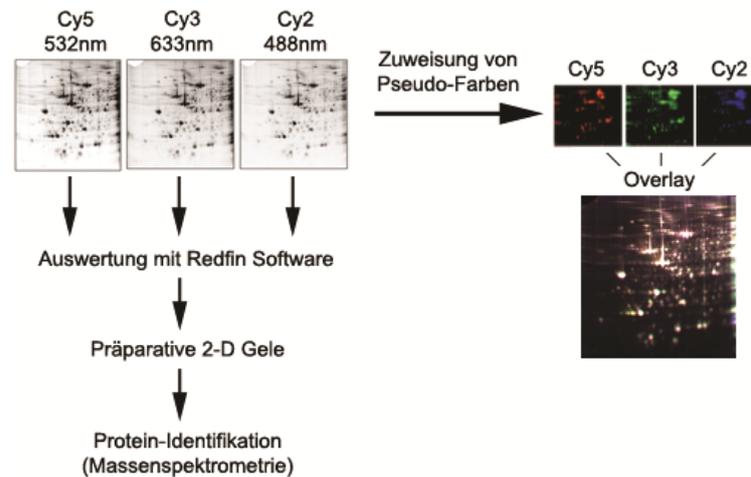


Abb. 17: Auswertung der 2-D DIGE Gele. Den drei CyDye-Bildkanälen werden Pseudo-Farben zugewiesen. In einem Overlay der drei gescannten Bildkanäle sind Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben anhand von Varianzen in den Farbabstufungen ersichtlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 2-D DIGE Technik angewandt, um das Proteom von ein, vier und 12 Wochen alten $MLP^{-/-}$ Herzen sowie von ein Jahr alten $MLP^{W4R/W4R}$ Herzen mit dem der korrespondierenden wt Herzen der Maus zu vergleichen. Die Probenvorbereitung und die Proteinkonzentrationstests wurden in den Kapiteln 4.1.7.1 und 4.1.7.2 beschrieben. Proben, IPG-Strips und 2-D Gele, die Fluoreszenzfarbstoffe enthielten, wurden während des gesamten Versuchsablaufs durch Abdeckung vor Licht geschützt, um ein Ausbleichen der CyDyes zu verhindern.

Jeweils 100µg Probe wurden mit dem *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt und in 60µl DIGE-Puffer resuspendiert. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden je 800pmol Cy3 und 800pmol Cy5 mit je 40µl der zu vergleichenden Proben gemischt (z.B. Cy3 mit vier Wochen altem $MLP^{-/-}$ und Cy5 mit vier Wochen altem wt). Die restlichen 20µl Probe wurden miteinander gemischt und zur Verwendung als interner Standard mit dem dritten Fluoreszenzfarbstoff, Cy2, markiert. Alle Ansätze wurden gevortext (Scientific Industries), kurz zentrifugiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 2µl 10mM Lysin-Lösung wurde die Markierungsreaktion während einer zehnmütigen Inkubation auf Eis gestoppt und anschließend wurden die drei Proben miteinander vermischt. Die eine Hälfte der Probe wurde in einem 2-D Gel mit einem pH-Gradienten von 4-7 und die andere in einem mit einem pH-Gradienten von 6-11 aufgetrennt. Zuvor wurde das Probenvolumen durch Zugabe von 2-D Probenpuffer auf 200µl (pH 6-11 IPG-Strip) bzw. 340µl (pH 4-7 IPG-Strip) erhöht. Alle darauf folgenden 2-D DIGE-Versuchsschritte waren identisch mit den in Kapitel 4.1.7.2, 4.1.7.3 und 4.1.7.4 beschriebenen. Direkt im Anschluss an die SDS-PAGE wurden alle 2-D DIGE Gele zweimal für je 15 Minuten in ddH_2O gewaschen und die Proteine mit dem *Typhoon 9400* Laserscanner und der *DeCyder Software* visualisiert.

Die quantitative Analyse und die statistische Auswertung (ANOVA-Test) der 2-D DIGE Gele wurden anhand der Graustufen Gel-Abbildungen durch die Firma Ludesi mit der *Redfin Software* durchgeführt. Um als signifikant verändert eingestuft zu werden, musste sich die Intensität eines Gel-Spots zwischen den verglichenen Proben

mindestens um das 1,5-fache unterscheiden und der ANOVA-Test für dieses Ergebnis einen p-Wert $<0,05$ ergeben.

4.1.8 Gelfärbungen

Alle Inkubationsschritte für die Gelfärbungen und die Entfärbe-Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einer Rundschüttelmaschine durchgeführt.

4.1.8.1 Coomassie-Färbung mit Serva Blue

SDS-Gele, die nicht geblottet wurden, sowie Titingele wurden direkt nach der elektrophoretischen Auftrennung über Nacht in *Serva-Blue* Coomassie-Färbelösung angefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte in zwei Inkubations-Schritten: für zehn Minuten in Coomassie-Entfärber 1 gefolgt von mehreren Stunden in Coomassie-Entfärber 2 (siehe Kapitel 3.2.6.1). Die Gelfärbungen wurden mit einem Scanner (Canon Scan 9900F; Canon) dokumentiert, mit *Multi Gauge* quantifiziert und mit *EXCEL* bzw. *Sigma Plot 11* statistisch ausgewertet.

4.1.8.2 Coomassie-Färbung mit Coomassie-Stain G250

Die Färbung mit *Coomassie-Stain G250* wurde verwendet, um stark konzentrierte Proteine in 2D Gelen anzufärben. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele dafür zunächst je eine Stunde in Fixierlösung 1 und Fixierlösung 2 inkubiert (siehe Kapitel 3.2.6.2), dann dreimal 15 Minuten mit ddH₂O gewaschen und für eine Stunde in *Biosafe Coomassie G250* angefärbt. Im Anschluss wurden die Gele erneut in ddH₂O gewaschen und eingescannt (*Expression 10.000 XL Scanner*, Epson).

4.1.8.3 Blau-Silberfärbung nach Candiano et al.

Die Blau-Silberfärbung wurde verwendet, um Proteine mit mittlerer bis geringer Konzentration in 2-D Gelen anzufärben (siehe Kapitel 3.2.6.3) (Candiano *et al.*, 2004). Dafür wurden die Gele zunächst je eine Stunde in Fixierlösung 1 bzw. Fixierlösung 2 inkubiert, dreimal mit ddH₂O gewaschen und für ein bis zwei Stunden angefärbt. Ungebundene Farbstoffreste wurden durch mehrmaliges Waschen mit lauwarmem ddH₂O entfernt. Zu Dokumentationszwecken wurden die 2-D Gele gescannt (*Expression 10.000 XL Scanner*, Epson).

4.1.8.4 Silberfärbung

Zur Detektion von gering konzentrierten Proteinen wurden die 2-D Gele mit einer Silberfärbung behandelt (siehe Kapitel 3.2.6.4). Hierfür wurden die Gele zunächst fixiert und gewaschen (siehe Kapitel 4.1.8.3). Im ersten Schritt der Silberfärbung wurden die Gele eine Minute lang in Sensitivierungs-Lösung inkubiert und dann zweimal für je 45 Sekunden in ddH₂O gewaschen. Es folgte eine 15 minütige Inkubation in

Silberlösung gefolgt von zweimaligem Waschen in ddH₂O (je 45 Sekunden). Danach inkubierte das Gel für 30 Sekunden in ca. 200ml eiskaltem Entwickler. Der Entwickler wurde ausgetauscht und, sobald die gewünschte Färbeintensität des Gels erreicht war, verworfen. Die Zugabe von Stop-Lösung beendete die Färbung. Nach einer 45-minütigen Inkubation wurde das Gel zweimal für je zehn Minuten mit ddH₂O gewaschen und die Färbung mit einem Scanner (Epson) dokumentiert.

4.1.9 Massenspektrometrie

Die Identifikation der in den 2-D Gelspots enthaltenen Proteine sowie der Phosphorylierungsstellen in MLP erfolgte durch Massenspektrometrie (MS) (Anhang 2).

2-D Gelspots, die gemäß den Ergebnissen der *Redfin*-Auswertung signifikante Unterschiede in den MLP^{-/-} sowie MLP^{W4R/W4R} 2-D DIGE Gelen aufwiesen im Vergleich zu den wt Geweben, wurden aus den 2-D Gelen ausgeschnitten und mittels MS analysiert. Für die Identifikation von posttranslationalen Modifikationen wurden jene 2-D Gelspots verwendet, die zuvor als MLP identifiziert worden waren.

4.1.9.1 Entfärbung der Gelstücke und Trypsin-Verdau

Vor der MS wurden die Gelstücke zunächst entfärbt und die darin enthaltenen Proteine mit Trypsin verdaut. Das dafür verwendete Protokoll stammt ursprünglich von Shevchenko *et al.*, 1996, wurde jedoch leicht modifiziert. Alle im Folgenden beschriebenen Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Da die 2-D Gele für das Ausschneiden der Proteinspots angefärbt werden mussten, Farbstoffe jedoch bei der MS stören, wurden die Gelstücke zunächst entfärbt. Silbergefärbte Gelstücke wurden für 15 Minuten mit 150 - 300µl Lösung A versetzt. Das Volumen von Lösung A war dabei abhängig von der Größe des Gelstücks. Der Überstand wurde verworfen, die Proben für fünf bis zehn Minuten mit 400 - 500µl ddH₂O gewaschen. Nach 15 minütiger Inkubation in 150µl einer 100mM NH₄HCO₃-Lösung wurden zur Dehydrierung der Gelstücke 150µl ACN hinzugefügt. Nach 15 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Gelstück in der SpeedVac getrocknet.

Vormals Silber-gefärbte sowie unbehandelte Coomassie-gefärbte Gelstücke wurden für 15 Minuten mit 150µl 100mM NH₄HCO₃-Lösung versetzt und durch Zugabe von 150µl ACN 15 Minuten lang dehydriert. Der Überstand wurde verworfen und die beiden letzten Schritte wurden so oft wiederholt, bis die Gelstücke vollständig entfärbt waren. Die entfärbten Gelstücke wurden anschließend in der SpeedVac getrocknet.

Nach der Entfärbung wurden die Proteine im Gelstück mit DTT reduziert und durch IAA alkyliert. Dafür wurden sie zunächst mit 125 - 150µl DTT/NH₄HCO₃-Lösung rehydriert und für eine Stunde bei 55 - 56°C inkubiert (Inkubator, Fisher Scientific). Die Lösung wurde gegen 150µl IAA/NH₄HCO₃-Lösung ausgetauscht und aufgrund der Lichtsensitivität des IAA für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke

fünf Minuten lang mit 150µl ddH₂O gewaschen, für je 15 Minuten mit 50 - 100µl 100mM NH₄HCO₃ und 150µl ACN dehydriert, die Lösung verworfen und die Gelstücke in der SpeedVac getrocknet.

Die Proteine in den Gelstücken wurden durch Zugabe von Trypsin-Lösung verdaut (*In-Gel Verdau*). Dafür wurden die Reaktionsgefäße mit den Gelstücken auf Eis gestellt und mit Trypsin-Lösung überschichtet. Während einer einstündigen Inkubation auf Eis sogen die Gelstücke die Trypsin-Lösung vollständig auf. Nach Zugabe von 50µl 50mM NH₄HCO₃ wurden die Proteine über Nacht bei 37°C verdaut.

4.1.9.2 Proteinidentifikation mit dem ABI PRISM 4800 MALDI TOF/TOF

Für die Identifikation von Proteinen, die im 2-D DIGE Vergleich von MLP^{-/-} und wt Herzen signifikante Unterschiede aufwiesen, wurde das ABI PRISM 4800 MALDI TOF/TOF Massenspektrometer (Applied Biosystems) verwendet. Das Funktionsprinzip des ABI PRISM 4800 MALDI TOF/TOF Massenspektrometers und der damit durchgeführten Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) wird in Anhang 2 sowie Anhang 2.1 erläutert. Alle im Folgenden beschriebenen Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Die Vorbehandlung und der Trypsin-Verdau der Proteine wurden bereits in Kapitel 4.1.9.1 beschrieben. Zur Elution der Peptide wurden die Gelstücke für je 15 Minuten mit 60µl einer 25mM NH₄HCO₃-Lösung und 60-90µl ACN inkubiert bzw. dehydriert. Die peptidhaltigen Überstände wurde in *low-retention* Reaktionsgefäßen gesammelt. Zur weiteren Peptidextraktion wurden die Gelstücke für 15 Minuten mit 50µl 5% Ameisensäure inkubiert und anschließend durch Zugabe von 50µl ACN 15 Minuten lang dehydriert. Die Lösungen wurden mit den bereits gesammelten Überständen gemischt und die Ameisensäure-Extraktion zweimal wiederholt. Anschließend wurden die peptidhaltigen Überstände in der SpeedVac getrocknet.

Die Peptide wurden in 13µl ddH₂O resuspendiert und mit Zip-Tip Pipettenspitzen (Millipore) entsalzt sowie ankonzentriert. Dafür wurden die Spitzen einmal mit Equilibrierungs-Lösung und vier- bis fünfmal mit Entsalzungs-Lösung gespült. Die Peptide wurden durch 15-20-faches Auf- und Abpipettieren an die Chromatographiematrix in den Pipettenspitzen gebunden. Danach wurden die Peptide beim vier- bis fünfmaligen Spülen der Spitze mit Entsalzungs-Lösung gewaschen und mit 4µl Elutionslösung eluiert.

Für die MS-Analyse wurden je 0,7µl Peptid-Lösung auf eine Proben-Applikationsplatte (Applied Biosystems) des Massenspektrometers pipettiert und mit 0,7µl DHB-Matrix gemischt. Nachdem die Proben getrocknet waren, wurde die Platte in das Massenspektrometer gelegt und das Gerät gestartet. Das Massenspektrometer wurde von Steven T. Elliot bedient (Arbeitsgruppe von Jennifer E. van Eyk; Johns Hopkins University, Baltimore, USA).

Anhand der entstandenen Massenspektren wurden die in den Gelstücken enthaltenen Proteine identifiziert. Für die Datenanalyse wurden die *ProteinPilot* Software (Applied Biosystems) und das Online-Programm *Mascot* (Matrixscience) verwendet.

Beide Programme griffen für die Identifikation der Proteine auf die Online-Datenbanken *NCBI* und *SwissProt* zu. ProteinPilot konnte zusätzlich die Datenbank *IPI_Mouse* für die Identifikation der Proteine nutzen. Die vorgeschlagenen Zuordnungen der Massenspektren zu einzelnen Proteinen wurden nur dann als korrekt eingestuft, wenn die Einzelspektren einen minimalen Score von 40 aufwiesen. Bei der Identifikation der Spektren wurde für den Peptidmassenfingerringdruck (PMF-Spektrum) standardmäßig eine Abweichung von weniger als 0,1Da toleriert und bei den MS/MS-Spektren von weniger als 0,6Da. Generell wurde die Auslassung von maximal einer theoretischen Trypsinschnittstelle pro Protein akzeptiert. Aufgrund der Behandlung der Peptide mit DTT und IAA wurden bei der Datenbanksuche zusätzlich Modifikationen der Peptide durch Carbamidomethylierung und Oxidationen erwartet. Die Proteinspezifität der detektierten Peptide wurde mit dem Online-Programm *Blastp* über die *NCBI*- sowie *Swissprot-Datenbanken* überprüft (Johnson *et al.*, 2005).

4.1.9.3 Identifikation von Phosphorylierungsstellen in MLP mit dem vMaldi-LTQ System

Für die Identifikation von Phosphorylierungsstellen in MLP wurden je fünf 2-D Gelspots aus Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten, die zuvor als MLP identifiziert worden waren. Alle Gelstücke wurden entfärbt, die enthaltenen Proteine alkyliert, reduziert und mit Trypsin verdaut (siehe Kapitel 4.1.9.1). Alle im Folgenden beschriebenen Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Zunächst wurden die Peptide für 20 Minuten mit 50µl einer ACN/TFA-Lösung extrahiert und in *low-retention* Reaktionsgefäßen gesammelt. Nach zweimaliger Wiederholung der Extraktion wurden die gesammelten Peptid-Lösungen in der SpeedVac getrocknet. Zur Anreicherung von Phosphopeptiden wurden die getrockneten Peptide gemäß der Herstellerangaben mit dem *TiO₂ ProteaTip Kit* (Protea) behandelt und in 3µl Kit-spezifischer Elutions-Lösung eluiert. Die Identifikation der Phosphorylierungsstellen wurde durch Tatiana Boronino in der Arbeitsgruppe von Robert C. Cole durchgeführt (Massenspektrometrie-Zentrum der Johns Hopkins Universität, Baltimore, USA). Hierbei verwendete sie das Ionenfallen Massenspektrometer vMALDI-LTQ System (Fisher Scientific) (siehe Anhang 2.2). Die resultierenden Massenspektren wurden mit *Xcalibur 2.0 SR2 vMALDI LTQ 2.2* Software, *Mascot* und *Bioworks* analysiert. Alle verwendeten Einstellungen bzw. Suchkriterien für *Mascot* und *Bioworks* sind in Tab. 16 aufgeführt.

Tab. 14: Einstellungen bzw. Suchkriterien von *Mascot* und *Bioworks* bei der Identifikation von Phosphorylierungsstellen in MLP mit dem vMALDI-LTQ System.

Suchkriterium	Mascot	Bioworks
Datenbank	NCBI nr 156	Fasta nr
Spezies	Mammalia/Nagetiere	Nagetiere
Peptid-Toleranz	2Da	2Da
Ionen-Toleranz	1Da	1Da
Ionen-Art	TOF-TOF Ionen	YBA Ionen
Variable Modifikationen	Oxidation (Met)	Oxidation (Met), Carbamidomethylierung (Cys), Phosphorylierung (S,T,Y)

4.1.9.4 Proteinidentifikation durch LC-Elektrospray-Ionenfallen MS/MS

Proteine, die im 2-D DIGE (pH 4-7) Vergleich von MLP^{W4R/W4R} und wt Herzen signifikante Unterschiede aufwiesen, wurden mit einer Kombination aus Easy nLC HPLC-System und der HCT Ultra Elektrospray-Ionenfalle (ESI) identifiziert (beide Bruker Daltonics). Methodisch wurde dabei eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einer Elektrospray MS/MS kombiniert (Anhang 2.3). Die Geräte wurden durch Marina Behrens im Bremer Firmensitz von Bruker Daltonics bedient.

Die Entfärbung, Reduktion, Alkylierung und der Trypsin-Verdau der Proteine wurden in Kapitel 4.1.9.1 beschrieben. Alle im Folgenden beschriebenen Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Die getrockneten Peptide wurden in jeweils 20µl 0,1% TFA resuspendiert und durch HPLC aufgetrennt. Das Injektionsvolumen betrug 5µl und die Fließgeschwindigkeit der HPLC-Pumpe 300nl/Minute bei einem konstanten Druck von 300bar. Die Einstellungen für die Zugabe und das jeweilige Mischungsverhältnis des Laufmittels sind in Tab. 17 aufgeführt.

Tab. 15: Einstellungen für Zugabe und Mischungsverhältnis des Laufmittels in der HPLC.

Schritt	Dauer [Min]	Lösungsmittel A [%]	Lösungsmittel B [%]
1	30	95	5
2	2	65	35
3	8	0	100

Min: Minuten

Für die anschließende MS/MS wurde der zu detektierende Bereich des Verhältnisses von Ionenmasse zu -ladung (m/z) auf 400 - 1.400Da begrenzt. Die ermittelten Daten wurden mit der *Compass 1.3* sowie der *Proteinscape 2* Software ausgewertet (beide Bruker Daltonics), die zur Proteinidentifikation auf *Mascot* bzw. die *Mus musculus* Datenbank von *SwissProt* zugegriffen (Tab. 18).

Tab. 16: Einstellungen der Mascot-Parameter für die Proteinidentifikation durch LC-Elektrospray-Ionenfallen MS/MS.

Mascot-Parameter	Einstellung
Anzahl Auslassungen theoretischer Trypsin-Schnittstellen	1
Peptid-Toleranz	0,35Da
MS/MS-Toleranz	0,8Da
Anzahl C ¹³ Atome	2
Peptid-Ladung	1+,2+,3+
Variable Modifikationen	Carbamidomethylierung (Cys)
Minimaler Score für Akzeptanz der Identifikation	80

4.1.10 Expression von rekombinantem humanem MLP

4.1.10.1 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Zunächst wurden hitzekompetente *E. coli* DH5 α -Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 μ g Vektor (inklusive *Insert*) versetzt, gemischt und fünf bis zehn Minuten auf Eis inkubiert (siehe Kapitel 3.2.8.1). Die Vektoren wurden durch Hitzeschock (90 Sekunden bei 42°C; Wasserbad, Julabo) in die Bakterien eingeschleust. Nachdem die Zellen für zwei Minuten auf Eis abgekühlt worden waren, wurden sie mit 800 μ l Antibiotika-freiem LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Aus den transformierten Zellen wurde eine Vorkultur angeimpft. Dafür wurden die Zellen in sterilen 25ml Glaskolben mit 20ml LB-AMP-Medium gemischt und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert.

4.1.10.2 Ansetzen eines Glycerin-Stocks aus einer Vorkultur

Zur Lagerung der transformierten Zellen wurden Glycerin-Stocks angelegt. Dafür wurden je 500 μ l Vorkultur mit 500 μ l sterilem 40%igem Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.10.3 Ansetzen einer Vorkultur aus einem Glycerin-Stock

Zum Ansetzen einer Vorkultur aus einem Glycerin-Stock wurden zunächst 20ml LB-AMP-Medium in einen sterilen 25ml Glaskolben gefüllt und angeimpft. Die Bakterienkulturen wuchsen über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator.

4.1.10.4 Ansetzen einer Hauptkultur und Induktion der Proteinexpression

Hauptkulturen wurden im Verhältnis 1:20 aus Vorkultur und LB-AMP-Medium angesetzt. Die Bakterienkulturen wurden für einige Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert und der Fortschritt des Wachstums mit einem Spektrophotometer (GE Healthcare) durch Messung der Lösungs-OD bei 600nm überwacht. Sobald die Zellen eine OD von 0,4 - 0,6 erreicht hatten, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 40 μ l IPTG induziert. Die Expression erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler.

4.1.10.5 Aufschluss der *E. coli* Zellen

Nach der Proteinexpression wurden die Bakterienkulturen in einer Sorvall-Zentrifuge pelletiert (30 Minuten / 5.000xg / 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet auf Eis in 2 - 4ml Lyse-Puffer resuspendiert. Zum Schutz gegen Proteolyse wurden alle Proben mit 100 μ l Lysozym, 10 μ l Leupeptin, 3 μ l AEBSF und 3 μ l Aprotinin versetzt und anschließend 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch dreimalige Beschallung mit einem Ultraschall-Desintegrator (je eine Minute; alles auf Eis) zerstört. Dabei entstandene Zelltrümmer wurden ab zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge:

30 Minuten / 15.000xg / 4°C) und der proteinhaltige Überstand in neue Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde der Überstand mit einer Ultrazentrifuge (UZ) für 60 Minuten bei 45.000xg und 4°C ab zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in 15ml Reaktionsgefäße überführt.

4.1.10.6 Bindung der GST-Fusionsproteine an eine Glutathion-Sepharose Matrix

Rekombinant exprimiertes MLP bzw. MLP-Mutanten enthielten ein GST-tag, damit sie gezielt von den bakteriellen Proteinen isoliert und aufgereinigt werden konnten. GST-tags können spezifisch an eine Glutathion-Sepharose-Matrix gebunden werden. Glutathion-Sepharose-Matrix wurde zunächst dreimal mit 3ml Lyse-Puffer equilibriert und anschließend mit dem UZ-Überstand versetzt. Nach Zugabe des UZ-Überstands wurden die Proben für 90 Minuten bei 4°C auf einem Rotationsrad inkubiert. Danach wurden ungebundene bakterielle Proteine durch dreimaliges Waschen mit je 3ml Hochsalzpuffer aus den Proben entfernt.

Nach allen beschriebenen Waschschritten wurde die Matrix für je eine Minute bei 500xg und 4°C ab zentrifugiert und die Überstände verworfen.

4.1.10.7 Entfernung des GST-tags durch Thrombin-Verdau

Die Glutathion-Sepharose-Matrix wurde vor dem Thrombin-Verdau dreimal mit Thrombin-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Matrix in 1ml Thrombin-Puffer aufgenommen und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt.

Die rekombinant exprimierten Proteine wurden durch Zugabe von 10U Thrombin von ihren GST-tags geschnitten (über Nacht / 4°C / Rotationsrad). Nach dem Verdau wurde die Matrix ab zentrifugiert (eine Minute / 500xg / 4°C) und der proteinhaltige Überstand in einem 2ml Reaktionsgefäß gesammelt. Im nächsten Schritt wurde das Thrombin aus dem Überstand entfernt. Dafür wurden zunächst 100µl gut durchmischter Para-Beads dreimal mit Thrombin-Puffer gewaschen, bevor der proteinhaltige Überstand auf die Para-Beads gegeben wurde. Nach 60 - 90 Minuten bei 4°C auf dem Rotationsrad war das Thrombin an die Para-Beads gebunden, die nun ab zentrifugiert wurden (eine Minute / 500xg / 4°C). Der Überstand enthielt das aufgereinigte Protein und wurde in ein neues 2ml Reaktionsgefäß überführt.

4.1.11 Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Studien

Für alle Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Tests wurden rekombinantes MLP bzw. rekombinante MLP-Mutanten verwendet (siehe Kapitel 3.2.8.1). Vor Versuchsbeginn wurden die Proteinlösungen zur Ankonzentration mit Aceton ausgefällt und in pCa8-Lösung resuspendiert (siehe Kapitel 4.1.3). Die Proteinkonzentrationen wurden mit einer Methode nach Neuhoff bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4.1). Dafür wurden jeweils 8µl vom resuspendierten rekombinanten Protein mit 2µl Greaser-Probenpuffer versetzt.

4.1.11.1 Dephosphorylierung von Proteinlösungen für die 2-D DIGE

Um zu überprüfen, ob MLP im Herzen phosphoryliert ist, wurden Proteinextrakte aus adulten 12 Wochen alten Mäusen dephosphoryliert und in 2-D DIGE Gelen mit unbehandelten Kontrollproben verglichen (Raggiaschi *et al.*, 2006).

Je 100µg Probe wurden mit dem *2-D Clean-up Kit* aufgereinigt und in 20µl Dephosphorylierungs-Puffer resuspendiert. Um Proteindegradationen vorzubeugen, wurde die Probe mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt (SIGMA). Die Verwendung des Protease-Inhibitor-Cocktails erfolgte gemäß der Herstellerangaben (SIGMA). Anschließend wurde die Probe auf zwei Ansätze verteilt: ein Ansatz wurde mit alkalischer Phosphatase (AP) dephosphoryliert und der andere als Negativkontrolle verwendet (Tab. 19). Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgte über Nacht bei 37°C. Danach wurden beide Proben erneut mit dem *2-D Clean-up Kit* aufgereinigt und in 2-D DIGE Gelen mit einem pH-Bereich von 6 – 11 aufgetrennt (siehe Kapitel 4.1.7.5).

Tab. 17: Pipettierschema für die Dephosphorylierung von Proteinen mit alkalischer Phosphatase (AP).

Zusatz	Kontrolle	AP-behandelt
Probe (50µg)	10µl	10µl
10x NEBuffer 3	2,5µl	2,5µl
AP [100U/µl]	-	2µl
ddH ₂ O	12,5µl	10,5µl
Gesamt-Volumen	25µl	25µl

4.1.11.2 Autoradiographie

Kinasen, durch die MLP theoretisch phosphoryliert werden kann, wurden durch Sequenzanalysen mit *NetPhosK* und dem Kinase-spezifischen Phosphorylierungsstellen-Vorhersageprogramm *GPS 2.1* identifiziert (Blom *et al.*, 1999; Blom *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2008). Basierend auf den Ergebnissen der Vorhersagen wurde der Effekt verschiedener Kinasen auf die Phosphorylierung von rekombinantem humanem wt MLP sowie auf verschiedene MLP-Mutanten in Autoradiogrammen getestet.

MLP wurde in Anwesenheit von [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP mit verschiedenen PKC Isoformen, ERK2 und FAK behandelt. Zur Identifikation der PKC ϵ -Phosphorylierungsstelle in MLP wurden zusätzlich die MLP Mutanten S46N, S95A und S117A getestet. Die ERK2-vermittelte Phosphorylierung von MLP wurde in der MLP Mutante S95A überprüft. Die Pipettierschemata für die verschiedenen Phosphorylierungsansätze sind in den Tab. 20 bis 22 aufgeführt.

Die mit PKC und FAK behandelten Ansätze inkubierten für 20 Minuten und die mit ERK2 für 30 Minuten bei 30°C. Nach der Kinase-Behandlung wurden alle Proben mit 5µl Greaser-Probenpuffer versetzt, drei Minuten bei 96°C denaturiert und in 15%igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt, gescannt (Canon Scan 9900F, Canon), getrocknet und danach zur Übertragung der $\gamma^{32}\text{P}$ ATP-Signale auf Autoradiographiefilme gelegt. Nach ca. 16 – 24 Stunden wurden die [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP-Signale im Phosphoimager BAS-1800 II (FujiFilm, Straubing) detektiert.

Tab. 18: Pipettierschema zur Phosphorylierung von rekombinantem MLP sowie MLP-Mutanten mit verschiedenen PKC Isoformen für die Autoradiographie.

Zusatz	Kontrolle PKC _{konv}	PKC _{konv.} Ansatz	Kontrolle PKC _{neu}	PKC _{neu} Ansatz	Kontrolle PKC _{atyp.}	PKC _{atyp.} Ansatz
Probe: MLP; S46N; S95A; S117A	8µg	8µg	8µg	8µg	8µg	8µg
OAG [30µM]	1µl	1µl	1µl	1µl	-	-
CaCl ₂ [0,5mM]	0,5µl	0,5µl	-	0,5µl	-	-
Phosphatidylserin	-	-	-	-	1µl	1µl
PKC _{konv.} : α, β1, β2 oder γ [0,005U]	-	0,5µl	1µl	0,5µl	-	0,5µl
PKC _{neu.} : δ, ε, η oder θ [0,005U]	-	-	-	-	-	-
PKC _{atyp.} : ζ oder ι [0,005U]	-	-	-	-	-	-
pCa8	0,5µl	-	1µCi	1µCi	1µl	0,5µl
[γ- ³² P] ATP	1µCi	1µCi	-	-	1µCi	1µCi

PKC_{konv.}: konventionelle PKC Isoformen; PKC_{neu.}: neue PKC Isoformen; PKC_{atyp.}: atypische PKC Isoformen.

Tab. 19: Pipettierschema zur FAK-Behandlung von rekombinantem MLP für die Autoradiographie.

Zusatz	Kontrolle	FAK-Ansatz
Probe: MLP	8µg	8µg
FAK [0,0015U/µl]	-	1µl
pCa8	1µl	-
[γ- ³² P] ATP	1µCi	1µCi

Tab. 20: Pipettierschema zur ERK2-Behandlung von rekombinantem MLP für die Autoradiographie.

Zusatz	Kontrolle	ERK2-Ansatz
Probe: MLP, S95A	8µg	8µg
P42 MAPK Puffer	1µl	1µl
ERK2	-	0,2µl
pCa8	0,2µl	-
[γ- ³² P] ATP	1µCi	1µCi

4.1.11.3 In vitro Phosphorylierungstests

In Western Blots mit Phospho-spezifischen Antikörpern wurden die Autoradiographie-Ergebnisse überprüft. Zusätzlich wurde überprüft, ob MLP auch durch ERK1 an S95 phosphorylierbar ist. Die Zusammensetzung der verschiedenen Versuchsansätze ist in Tab. 23 aufgeführt. Die Kinase-Behandlungen erfolgten für 30 Minuten bei 30°C. Alle Ansätze wurden anschließend mit Greaser-Probenpuffer versetzt, für drei Minuten bei 96°C aufgekocht, in 15%igen SDS-Gelen aufgetrennt und geblottet. Nach dem Proteintransfer wurden die PVDF-Membranen mit P-S95 MLP bzw. MLP Antikörpern inkubiert, die Signale mit dem *LAS 4000 Lumineszenz Imaging System* (FujiFilm) detektiert und mit *Multi Gauge*, *EXCEL* sowie *Sigma Plot 11* ausgewertet.

Tab. 21: Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze zur PKCε-, ERK1- bzw. ERK2-vermittelten *in vitro* Phosphorylierung von MLP und MLP-Mutante S95A.

Zusatz	Kontrolle PKCε	PKCε- Ansatz	Kontrolle ERK1	ERK1- Ansatz	Kontrolle ERK2	ERK2- Ansatz
Proben: MLP oder S95A	8µg	8µg	8µg	8µg	8µg	8µg
OAG [30µM]	1µl	1µl	-	-	-	-
PKC ε	-	0,5µl	-	-	-	-
P42 MAPK Puffer	-	-	1µl	1µl	1µl	1µl
ERK2	-	-	-	-	-	0,2µl
ERK1	-	-	-	0,5µl	-	-
ATP [2,5mM]	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
pCa8	0,5µl	-	0,5µl	-	0,2µl	-

4.1.11.4 *In vitro* Dephosphorylierungstests

Der Effekt von aktivem CnA auf die S95 Phosphorylierung von rekombinantem MLP wurde durch *in vitro* Dephosphorylierungstests in Western Blots überprüft. Dafür wurde rekombinantes MLP zunächst mit ERK2 phosphoryliert (siehe Kapitel 4.1.11.3). Kurzes Aufkochen bei 96°C deaktiviert die Kinase-Aktivität von ERK2. Die Ansätze wurden auf Eis abgekühlt, mit CaM und CnA bzw. pCa8 gemischt (Tab. 24) und über Nacht bei 30°C dephosphoryliert.

Tab. 22: Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze für die CnA-vermittelte *in vitro* Dephosphorylierung von rekombinantem MLP.

Zusatz	Kontrolle	CnA-Ansatz
ERK2-phosphoryliertes MLP	8µg	8µg
CaM (Endkonzentration: 2U)	0,16µl	0,16µl
CnA (Endkonzentration: 1U)	-	2µl
pCa8	2µl	-

Durch Zugabe von 2µl Greaser-Probenpuffer und anschließende dreiminütige Denaturierung der Proteine bei 96°C wurde die Dephosphorylierungsreaktion gestoppt. Die Proteine wurden in 15%igen SDS-Gelen aufgetrennt, geblottet und mit P-S95 MLP sowie dem MLP Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die die Western Blot Signale mit dem *LAS 4000 Lumineszenz Imaging System* (FujiFilm, Straubing) detektiert und mit *Multi Gauge, EXCEL* und *Sigma Plot 11* quantifiziert.

4.1.11.5 *In vitro* Interaktionstest zwischen CFL-2 und MLP bzw. S95 phosphoryliertem MLP

Zur Überprüfung des Einflusses der MLP S95 Phosphorylierung auf die Interaktion zwischen CFL-2 und MLP wurde ein *Pulldown*-Versuch durchgeführt. Dafür wurde zunächst rekombinantes humanes GST-CFL-2 (10µg) an 100µl Gluthation-Sepharose-Beads gekoppelt. Die Kopplung erfolgte für 90 Minuten bei 4°C auf dem Rotationsrad. Das an die Gluthation-Sepharose-Beads gebundene CFL-2 wurde abzentrifugiert (500xg / 1 Minute / 4°C) und ungebundenes Protein durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml Thrombinpuffer entfernt. Anschließend wurden die Gluthation-Sepharose-Beads in 250µl Thrombinpuffer aufgenommen und mit 80µl MLP versetzt. Dabei war das eingesetzte MLP zuvor entweder durch eine Vorbehandlung mit ERK2 an S95 phosphoryliert worden oder aber unphosphoryliert (Kinase-freie Kontrolle) (siehe Kapitel 4.1.11.3). Die Bindung von MLP an CFL-2 erfolgte während einer 90 minütigen Inkubation auf dem Rotationsrad (4°C). Anschließend wurden die Gluthation-Sepharose-Beads mit dem daran gebundenen CFL-2-MLP-Komplex abzentrifugiert (500xg / 1 Minute / 4°C) und der Überstand (Input = ungebundenes Protein) gesammelt. Die Gluthation-Sepharose-Beads wurden noch viermal mit Thrombinpuffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Um zu dokumentieren, ob mehr MLP an CFL-2 gebunden hat als ausgewaschen worden ist, wurde nach jedem Waschschrift der Überstand gesammelt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Gluthation-Sepharose-Beads mit dem gebundenen MLP-CFL-2 Komplex in Greaser-Probenpuffer aufgenommen. Auch der Input und die Wasch-Überstände wurden mit dem

Greaser-Probenpuffer versetzt, wobei das Mischungsverhältnis 1:4 (Überstand:Probenpuffer) betrug. Anschließend wurden alle Proben zur Denaturierung der Proteinkomplexe für 3 Minuten bei 96°C aufgeköcht, durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet (siehe Kapitel 4.1.5 und Kapitel 4.1.6) und mit einem gegen MLP gerichteten Primärantikörper sowie einem passenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion der Western Blot Signale erfolgte mit dem *LAS 4000 Lumineszenz Imaging System* (FujiFilm, Straubing) und die Quantifizierung mit *Multi Gauge, EXCEL* und *Sigma Plot 11*.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Primärkultur von neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten

Ein bis zwei Tage alte neonatale Wistar Unileva Ratten wurden gemäß der gesetzlichen und universitären Richtlinien betäubt, durch Dekapitation getötet, die Herzen entnommen und in eiskaltem DMEM-Medium gesammelt. Nachdem die Atrien entfernt worden waren, wurden die verbliebenen Ventrikel nochmals mit DMEM-Medium gewaschen, mechanisch in 1-2mm große Stücke zerschnitten und anschließend ca. zehnmal für je 15 Minuten in 10ml Pancreatin-Lösung verdaut. Nach dem ersten Verdau wurde der Überstand verworfen; nach allen folgenden Verdau schritten jedoch in einem sterilen 50ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die gesammelten Zellen wurden nach jedem Verdau schritt ab zentrifugiert (drei Minuten / 37°C / 1.000xg), in 2ml DMEM-Kulturmedium resuspendiert und mit den gesammelten Zellen gemischt. Nach dem letzten Verdau schritt wurden die Zellen erneut ab zentrifugiert (drei Minuten / 37°C / 1.000xg) und in Ham's F-12 Preplating Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in Petrischalen ausgesät und für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach zwei Stunden hatte sich ein Großteil der Fibroblasten am Boden der Schalen abgesetzt. Der Überstand, der hauptsächlich neonatale Rattenkardiomyozyten (NRVM) enthielt, wurde gesammelt, ab zentrifugiert (drei Minuten/ 37°C/ 1.000xg) und in 2ml DMEM-Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je 1.000.000 NRVM pro 2,5ml DMEM-Kulturmedium wurden in jede Kammer einer 6-Well-Zellkultur-Platte ausgesät. Die NRVM wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, wobei das DMEM-Kulturmedium täglich gewechselt wurde.

4.2.1.1 Behandlung von NRVM mit ET-1 und dem Raf-1 Inhibitor GW5074

Etwa 48 Stunden nach der Kultivierung wurden die NRVM entweder mit dem MAPK Aktivator ET-1 oder dem Raf-1 Inhibitor GW5074 behandelt. Für die ET-1-Behandlung wurden die Zellen über Nacht mit 10nM ET-1 inkubiert. Zur Raf-1 Inhibition wurden die Zellen für 30 Minuten bzw. zwei Stunden mit 50µM GW5074 behandelt. Die Kontrollansätze wurden für 30 Minuten, zwei Stunden bzw. über Nacht mit dem ET-1- bzw. GW5074-Lösungsmittel DMSO inkubiert. Nach der Behandlung wurden alle Zellen mit PBS gespült, mit Zellschabern geerntet und die zellulären Proteine in

Greaser-Probenpuffer extrahiert. Die Proben wurden anschließend in SDS-Gelen aufgetrennt und geblottet.

Für die Datengewinnung wurden NRVM aus fünf unabhängigen Zellpräparationen verwendet.

4.2.2 Immunfluoreszenzfärbung von NRVM

Die Lokalisation von MLP und von S95 phosphoryliertem MLP in NRVM wurde u.a. durch Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Hierfür wurden die Zellen nach der Präparation auf gelatinebeschichteten Deckgläschen (1% Gelatine-Lösung) ausgesät. Etwa 48 Stunden nach der Kultivierung wurden die NRVM mit PBS gespült und für drei Minuten mit 0,5% Triton-X 100 behandelt, um die Zellmembran zu perforieren. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, für 20 Minuten mit 3% PFA fixiert und erneut mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 2,5% BSA bei Raumtemperatur blockiert, mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit Primärantikörpern inkubiert. Die Antikörper-Lösung bestand aus einer Kombination von α -Aktinin und MLP bzw. P-S95 MLP Antikörper (Tab. 6). Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen entfernt und die NRVM für eine Stunde mit einer Mischung aus Sekundärantikörpern und Hoechst 33342 Farbstoff (1:3.000) inkubiert (Tab. 6 und Tab. 7). Die Zellen wurden erneut gewaschen und mit Entelan auf Objektträgern eingebettet. Repräsentative Abbildungen der immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden mit einem Konfokalen Mikroskop (Nikon Eclipse) unter Verwendung der *NIS-Elements AR 3.1* Software erstellt.

4.3 Statistik

Für die statistische Auswertung von Gelen und Western Blots wurden die Software-Programme *Redfin* (Ludesi), *Multi Gauge* (FujiFilm), *TotalLab*, *EXCEL* und *Sigma Plot 11* verwendet. Als Beladungskontrolle und zur Indizierung der Western Blot Signale wurden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), β -Tubulin III und β -Aktin verwendet.

Alle Ergebnis-Diagramme zeigen Mittelwerte sowie Standardfehler (SEM) bzw. Standardabweichungen (SDM). Entsprechend dem jeweiligen Stichprobenumfang bzw. der Anzahl zu vergleichender Probengruppen wurde die statistische Signifikanz entweder mit dem Student's t-Test (t-Test) oder dem ONE-Way ANOVA-Test (ANOVA-Test) überprüft. Für den Direktvergleich von nur zwei Proben wurde der t-Test angewandt. Für den Vergleich von mehr als zwei Proben wurde ein ANOVA-Test verwendet gefolgt von einem geeigneten Post-Hoc-Test (Holm-Sidak-, Student-Newman-Keuls- oder Dunn's-Test). Generell wurden nur solche Ergebnisse als statistisch signifikant bewertet, deren p-Wert $<0,05$ war.

5. Ergebnisse

5.1 Bei MLP-Defizienz sind vorrangig Chaperone und Sarkomer-assoziierte Proteine dysreguliert

Der 2-D DIGE Vergleich von ein, vier und 12 Wochen alten MLP^{-/-} Mausherzen mit den korrespondierenden wt Herzen ergab, dass durch die MLP-Defizienz die Signalintensitäten von mehr als 200 Proteinspots verändert worden waren (Abb. 18).

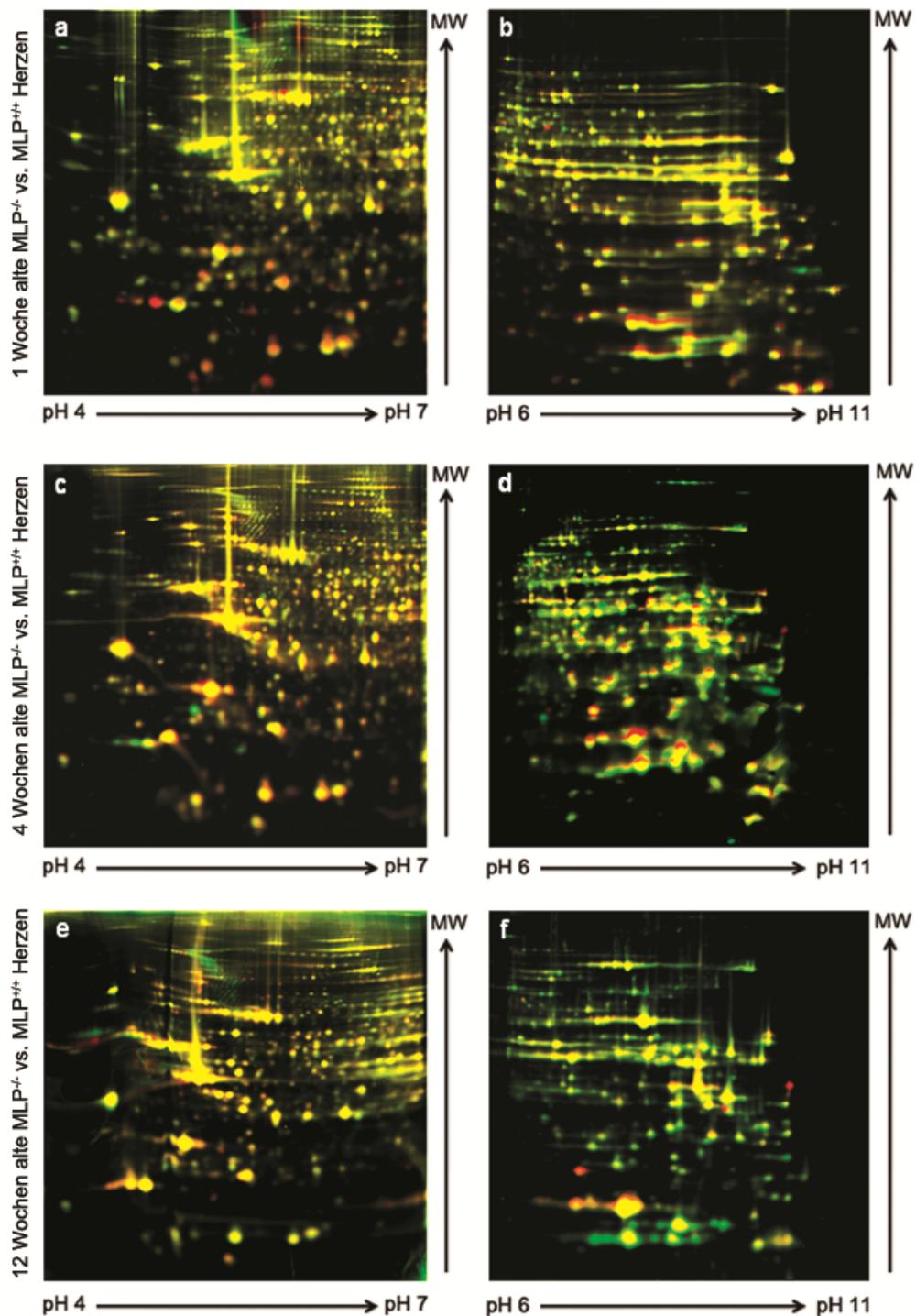


Abb. 18: Vergleich des kardialen Proteoms aus MLP^{-/-}- und MLP^{+/+}-Mäusen in 2-D DIGE Gelen. Gezeigt sind repräsentative pH 4-7 (a, c, e) und pH 6-11 (b, d, f) Gele. Die verglichenen Herzen stammten aus Mäusen im Alter von einer [(a) und (b)], vier [(c) und (d)] und zwölf Wochen [(e) und (f)]. Rot: MLP^{-/-}; grün: MLP^{+/+}.

Von diesen 200 Proteinspots konnten 110 in Coomassie- oder Silber-gefärbten Gelen detektiert werden. Durch eine MS/MS-Analyse wurden 35 Proteinspots 29 verschiedenen Proteinen eindeutig zugeordnet (Abb. 19, Anhang 3a und Anhang 3b). Alle übrigen Spots enthielten mehr als ein Protein, weshalb keine eindeutige Zuordnung der Signalintensitätsänderung möglich war.

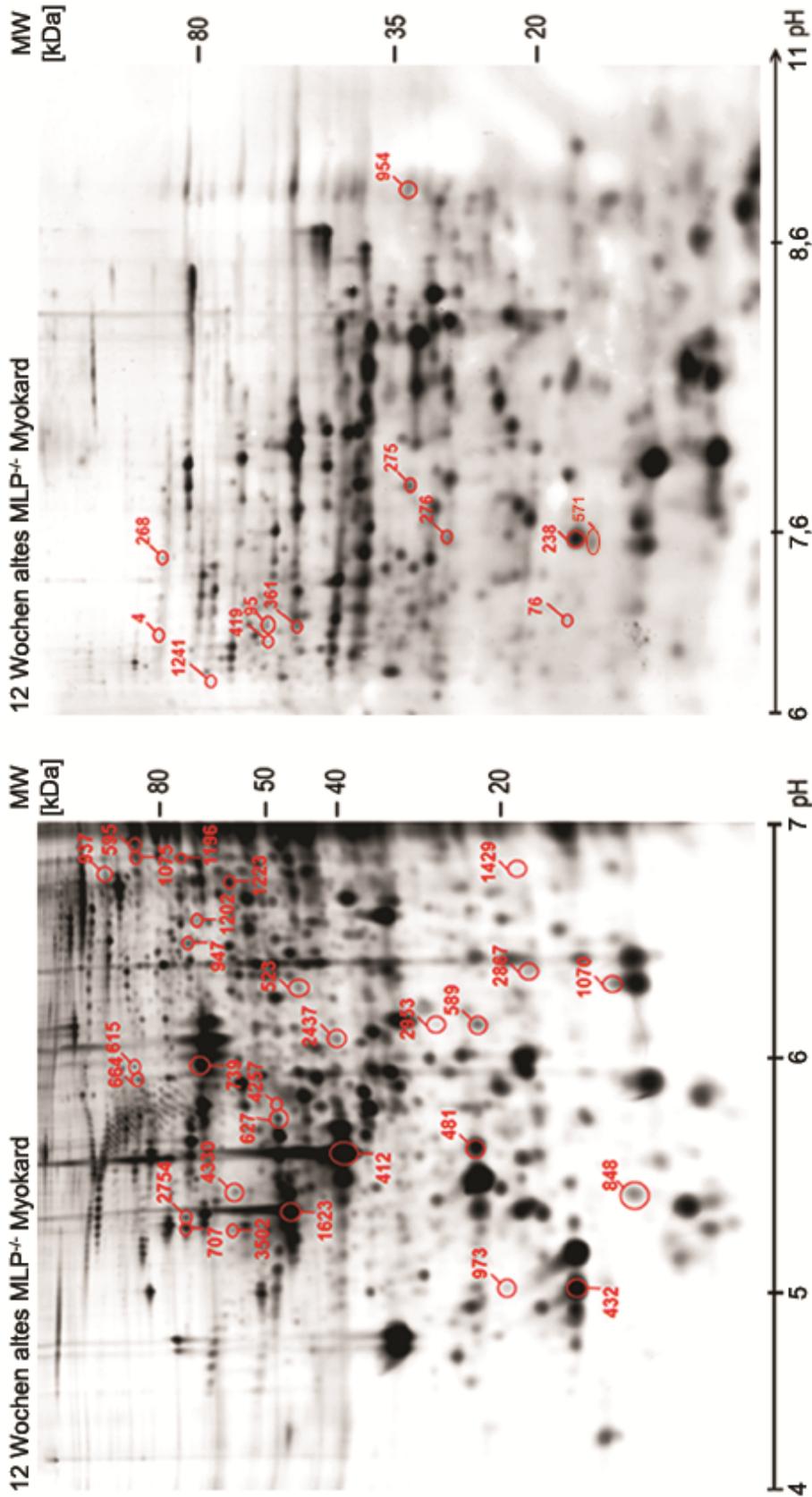


Abb. 19: Lokalisation der in MLP^{-/-} Herzen dysregulierten Protein (rot) im 2-D DIGE Gel. Repräsentative schwarz-weiße Aufnahme von (a) pH 4-7 und (b) pH 6-11 2-D DIGE Gelen von 12 Wochen alten MLP^{-/-} Mäusen. Es wurden ausschließlich die Proteinspots markiert, die durch MS/MS einem einzelnen Protein eindeutig zugeordnet werden konnten. Neben der roten Markierung ist eine Identifikationsnummer (ID) der Proteine angegeben (Tab. Anhang 3a und Anhang 3b).

Viele der im $MLP^{-/-}$ dysregulierten Proteine (34%) sind am Sarkomer lokalisiert (Abb. 20). Zu den Sarkomer-assoziierten Proteinen, deren Expression im $MLP^{-/-}$ gesteigert war, gehörten u.a. Myosin leichte Kette 3 (>1,5-fach), Desmin (>2-fach), CFL-2 (>2-fach), Cypher-1 (>2,2-fach), Calsarcin-1 (>1,8-fach), Sorbin und SH3 Domänenenthaltendes Protein 2 (SRBS2) (>1,7-fach) und die 32kDa Isoform von FHL-1 (~1,5- bis 14-fach). Von allen detektierten Proteinen wies FHL-1 die stärkste Expressionserhöhung auf. Unter den Proteinen, die eine erhöhte Expression aufwiesen, waren auch relativ viele Chaperone (17%), wie z.B. Hitzeschock-Protein 1 β (HSPB1) (>2,3-fach), Hitzeschock-Protein 8 β (HSPB8) (>1,6-fach), T-Komplex Protein 1 γ (TCPG) (>1,8-fach) und α -B-Crystallin (CRYAB) (1,6- bis 6,6-fach) (Abb. 20, Abb. 21, Anhang 3 und Anhang 4).

CRYAB, das Ribonukleoprotein Major Vault Protein (MVP), Desmin und ATP Synthase β Untereinheit (ATPB) wurden in mehreren Spots identifiziert. Dabei waren die MVP-, Desmin- und CRYAB-Spots in verschiedenen pH-Bereichen des 2-D Gels lokalisiert, was darauf hindeutet, dass Änderungen in ihren posttranslationalen Modifikationen vorliegen. Im Gegensatz dazu lagen die ATPB-Spots nicht nur in verschiedenen pH-Bereichen des Gels, sondern auch in unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen, was nicht nur auf Änderungen in verschiedenen posttranslationalen Modifikationen von ATPB hindeutet, sondern auch auf Veränderungen in der ATPB-Isoformen-Komposition oder aber der ATPB-Degradation.

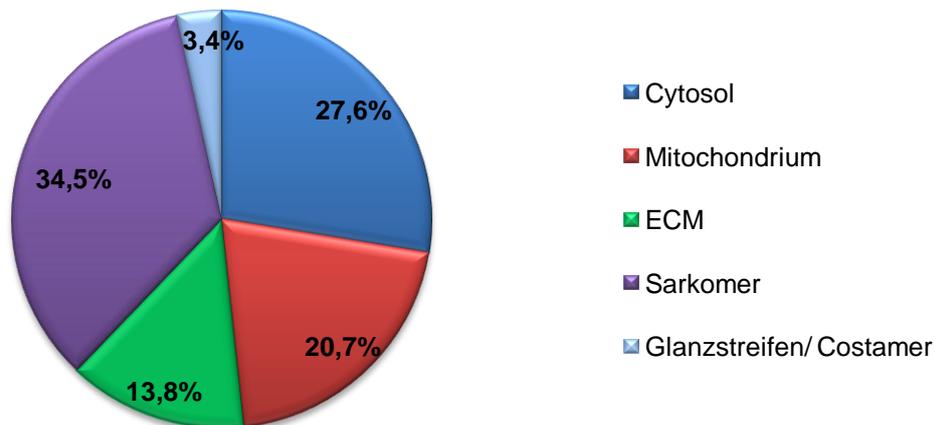


Abb. 20: Theoretische Lokalisation der im $MLP^{-/-}$ Herzen veränderten Proteine in Kardiomyozyten. Proteine, die in mehreren Kompartimenten lokalisiert sind, wurden jeweils nur einem einzigen Ort zugeordnet, wodurch z.B. der Nukleus nicht berücksichtigt wurde, da alle Nukleus-assoziierten Proteine auch in mindestens einem anderen Kompartiment gefunden wurden.

Ein Vergleich der drei untersuchten Altersstufen ergab, dass eine Woche alte $MLP^{-/-}$ Herzen die geringste Anzahl an Veränderungen aufwiesen. Zu den Proteinen, die bereits nach einer Woche dysreguliert waren, gehörten u.a. die Sarkomer-assoziierten Proteine HSPB1, Desmin, CRYAB und FHL-1 (Abb. 20, Anhang 3 und Anhang 4). Verändert waren auch einige Proteine, die nicht am Sarkomer lokalisiert sind, wie z.B. MVP, das Glanzstreifenprotein Phosphoglucomutase-ähnliches Protein 5 (PGM5) und die mitochondrialen bzw. energetischen Proteine 2-Oxovalerat Dehydrogenase Untereinheit α , ATPB, das Stress-70 Protein sowie das Acetyl-Coenzym A Synthetase 2-ähnliche Protein (Abb. 20, Abb. 21, Anhang 3a/ und Anhang 3b).

Bei der stichprobenartigen Überprüfung einiger 2-D DIGE Ergebnisse in Western Blots wurden im MLP^{-/-} gegenüber dem MLP wt Expressionssteigerungen in CRYAB (132%), Cypher-1 (136%) und Calsarcin-1 (184%) detektiert. Die 32kDa Isoform von FHL-1 war in Western Blots von wt Herzen kaum nachweisbar. Die Analyse der Blot-Signale mit *Multi Gauge*, *Excel* und *Sigma Plot 11* ergab, dass die Expression der 32kDa Isoform von FHL-1 in MLP^{-/-} Herzen mindestens 11x größer war als im wt (Abb. 21).

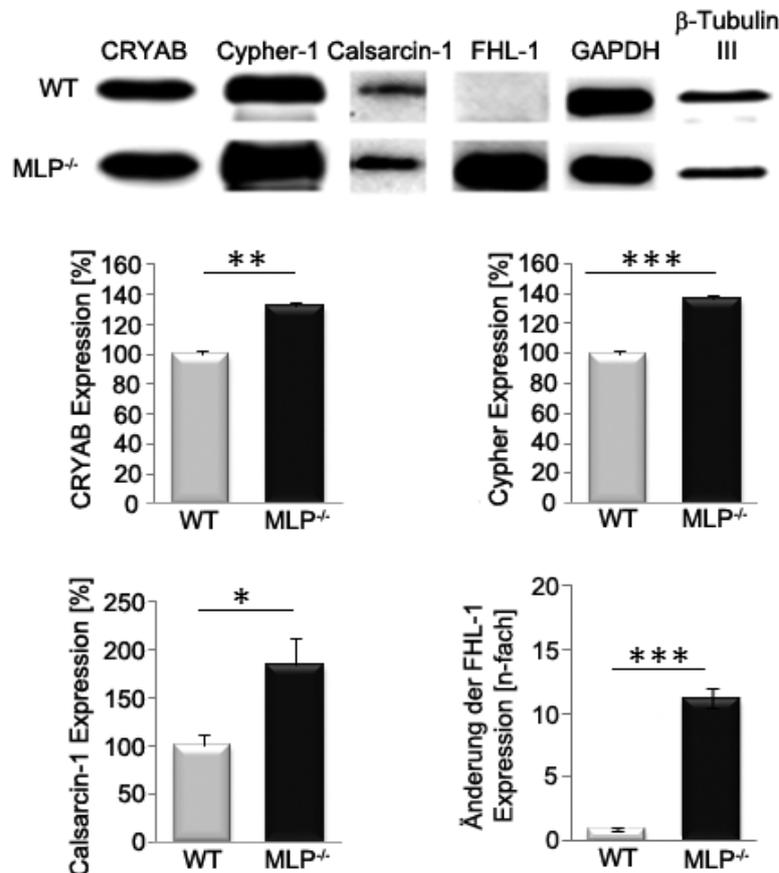


Abb. 21: Stichprobenartige Validierung der 2-D DIGE Ergebnisse in Western Blots von MLP^{-/-} und wt (WT) Herzen. Es wurden Antikörper gegen CRYAB, Cypher-1, Calsarcin-1, FHL-1 (32kDa Isoform), GAPDH und β -Tubulin III verwendet. In den Graphen ist das Ergebnis der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwerte \pm SEM). Die Signifikanz wurde durch einen t-Test ermittelt (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Anzahl der biologischen Replika: $n=6$, bzw. $n=3$ (Cypher).

5.1.1 Die 32kDa Isoform von FHL-1 ist in allen Kompartimenten von MLP^{-/-} Herzzellen nachweisbar

In subzellulären Proteomfraktionen aus 12 Wochen alten MLP^{-/-} und wt Herzen wurde überprüft, wo die 32kDa Isoform von FHL-1 lokalisiert ist. Wie bereits in nicht-fractionierten Proben beobachtet, war die 32kDa Isoform von FHL-1 im wt nicht detektierbar. Im MLP^{-/-} konnte sie hingegen in Cytosol, Membran, Nukleus und Cytoskelett nachgewiesen werden (Abb. 22). Die Expression der 22kDa Isoform von FHL-1 war in wt und MLP^{-/-} gleich exprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation auf das Cytosol beschränkt.

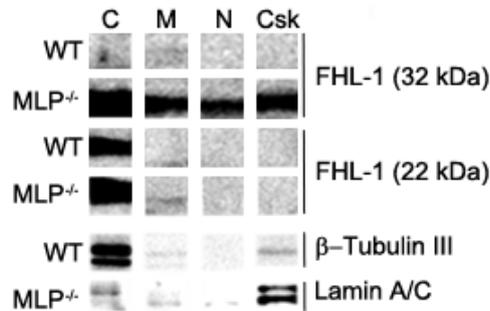


Abb. 22: Lokalisation der 22kDa und 32kDa FHL-1 Isoformen in subzellulären Fraktionen aus MLP^{-/-} und wt (WT) Herzen. Es wurden Antikörper gegen FHL-1 sowie als Kontrolle gegen Lamin A/C und β-Tubulin III verwendet.

Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten von 12 Wochen alten wt Mauserherzen ergaben, dass FHL-1 vorrangig im Cytosol und am Sarkomer lokalisiert ist. In MLP^{-/-} Herzen war FHL-1 hingegen in allen zellulären Kompartimenten lokalisiert. Die Signalintensität von FHL-1 war im MLP^{-/-} verglichen mit dem wt erheblich verstärkt (Abb. 23).

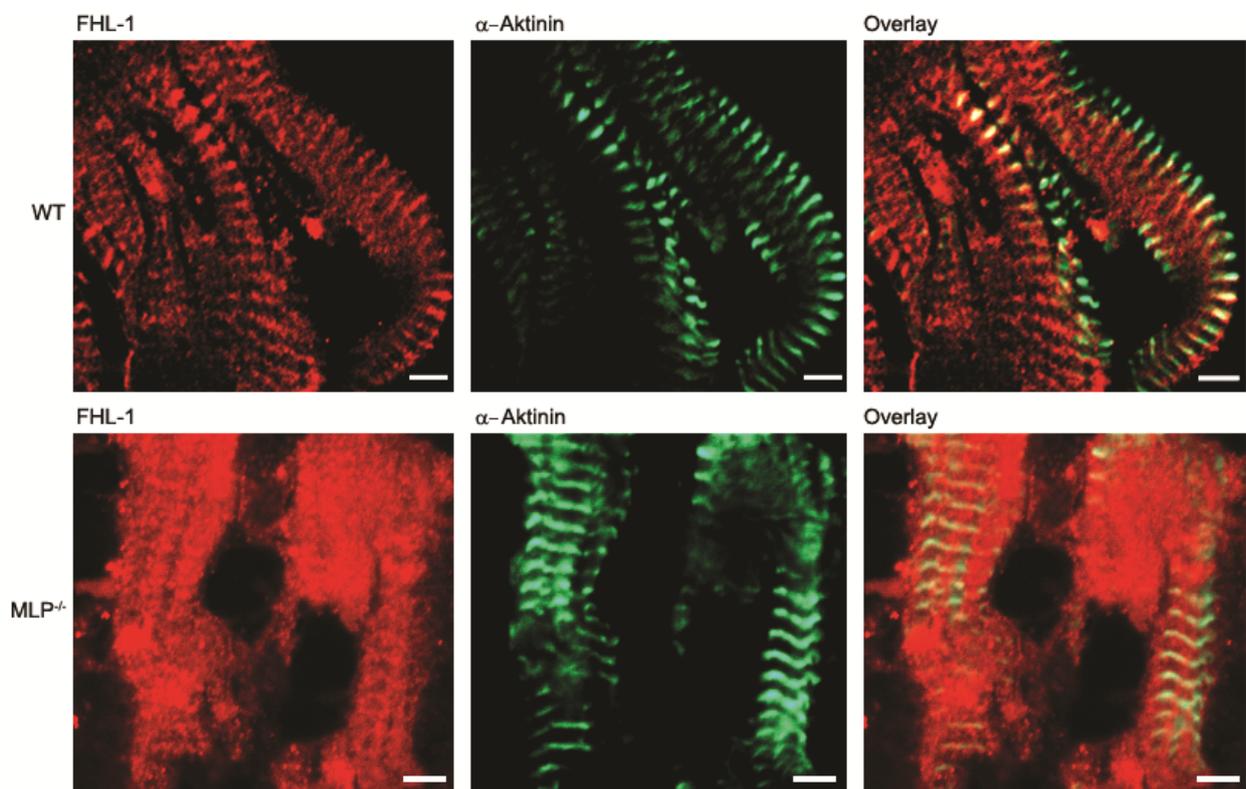


Abb. 23: Lokalisation von FHL-1 in Immunfluoreszenz-gefärbten Kryoschnitten von 12 Wochen alten MLP^{-/-} und wt (WT) Herzen. Rot: Cy3-konjugierter IgG Antikörper, grün: FITC-konjugierter IgG Antikörper. Messskala: 4µm.

5.1.2 Im MLP^{-/-} ist die Expression von ERK1/2, CnAβ und NFAT3 erhöht

Da FHL-1 die Aktivierung des Raf-1/MEK1/2/ERK2-Komplexes beeinflusst, wurde überprüft ob die Expression von ERK1/2 im MLP^{-/-} verändert ist. Im Western Blot Vergleich von 12 Wochen alten MLP^{-/-} und wt Herzen wurde eine MLP-Defizienz-abhängige Expressionserhöhung von ERK1/2 (ERK1: >1,5-fach; ERK2: >2-fach) nachgewiesen (Abb. 24).

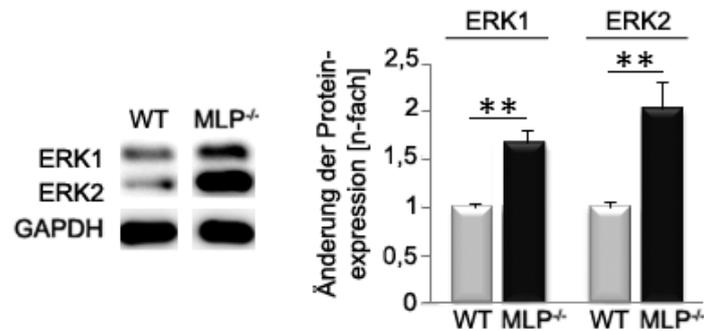


Abb. 24: Vergleich der ERK1/2 Expression in 12 Wochen alten MLP^{-/-} und wt (WT) Herzen. Es wurden Antikörper gegen ERK1/2 und GAPDH verwendet. Im Diagramm sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung abgebildet (Mittelwerte \pm SEM); n=7 (MLP^{-/-}) bzw. n=10 (MLP^{+/+}). Die Signifikanz wurde durch einen t-Test ermittelt (**: p<0,01).

Darüber hinaus wurde auch überprüft, ob die MLP-Defizienz die Expression von CnA beeinflusst, da die Expression des CnA-Inhibitors Calsarcin-1 im MLP^{-/-} gesteigert war. Verglichen mit dem wt war die CnA β Expression im MLP^{-/-} um das neunfache erhöht (Abb. 25). Auch die Expression des CnA-regulierten nuklearen Transkriptionsfaktors NFAT3 war im MLP^{-/-} um das 2,4-fache gesteigert (Abb. 25).

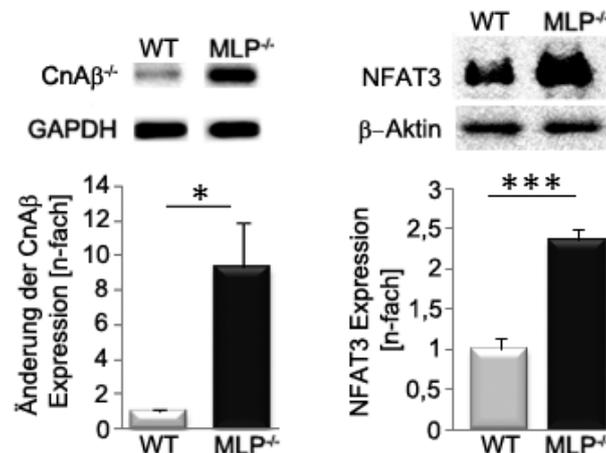


Abb. 25: Vergleich der CnA β sowie NFAT3 Expression in 12 Wochen alten MLP^{-/-} und wt (WT) Herzen. Es wurden Antikörper gegen CnA β , NFAT3, GAPDH und β -Aktin verwendet. Im Diagramm sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwerte \pm SEM). CnA β : n=7 (MLP^{-/-}) und n=6 (MLP^{+/+}); NFAT3: n=4. Die Signifikanz wurde durch einen t-Test ermittelt (*: p<0,05; ***: p<0,001).

5.1.3 Die FHL-1 Expression ist auch im MLP/CnA β -DKO erhöht

Die Expression des Hypertrophie-assoziierten LIM-Proteins FHL-1 war im MLP^{-/-} drastisch gesteigert. Demzufolge musste angenommen werden, dass FHL-1 die Entstehung der MLP-abhängigen DCM maßgeblich beeinflussen könnte. Verglichen mit dem MLP^{-/-} führt der DKO von MLP und CnA β zu einer verstärkten kardialen Dysfunktion und einer gesteigerten Letalität. Umgekehrt vermindert der CnA β ^{-/-} die kardiale Hypertrophie-Induktionsfähigkeit (Heineke *et al.*, 2010_A). Um zu überprüfen, ob die FHL-1 Expression auch in CnA β ^{-/-} oder MLP^{-/-}/CnA β ^{-/-}-DKO Herzen dysreguliert ist, wurden Western Blots von MLP^{-/-}, CnA β ^{-/-}, MLP^{-/-}/CnA β ^{-/-}-DKO und wt Herzen durchgeführt. Dabei wurde in MLP^{-/-} und DKO eine stark erhöhte Expression der 32kDa FHL-1 Isoform detektiert (Abb. 26). Im CnA β ^{-/-} unterschied sich die FHL-1 Expression nicht von der im wt.

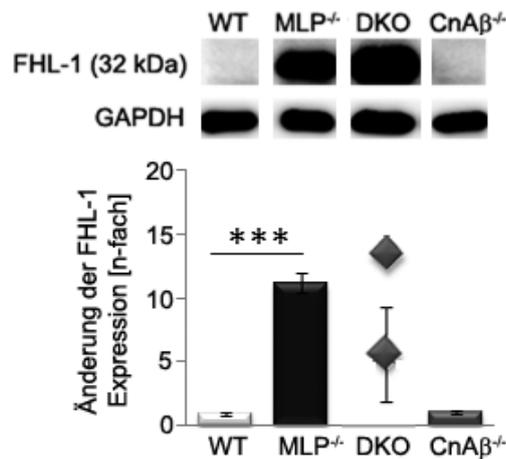


Abb. 26: Vergleich der FHL-1 (32 kDa) Expression in MLP^{-/-}, CnAβ^{-/-}, MLP^{-/-}/CnAβ^{-/-}-DKO und wt (WT) Herzen. Die verwendeten Antikörper detektierten FHL-1 und GAPDH. Im Diagramm sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwerte ± SEM; n=3, bzw. n=2 (DKO; je sechs DKO-Signale pro Probe). Die Signifikanz wurde durch einen t-Test ermittelt (***: p<0,001).

5.1.4 Die Expression von MLP beeinflusst die Titindegredation

Experimente von Philipp Tropberger (AG Linke) hatten ergeben, dass in vier Wochen alten MLP^{-/-} Mauserherzen das größte Titin-Degradationsprodukt, das sogenannte T2-Titin, fehlt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch in 12 Wochen alten MLP^{-/-} Herzen kein T2-Titin nachgewiesen werden (Abb. 27 und Abb. 28). In heterozygoten MLP KO (MLP^{+/-}) Herzen war der T2-Gehalt im Vergleich zum wt um 60% vermindert. Eine Woche alte MLP^{-/-} Herzen zeigten bereits eine 50%ige Reduktion des T2-Gehalts (Abb. 27 und Abb. 28).

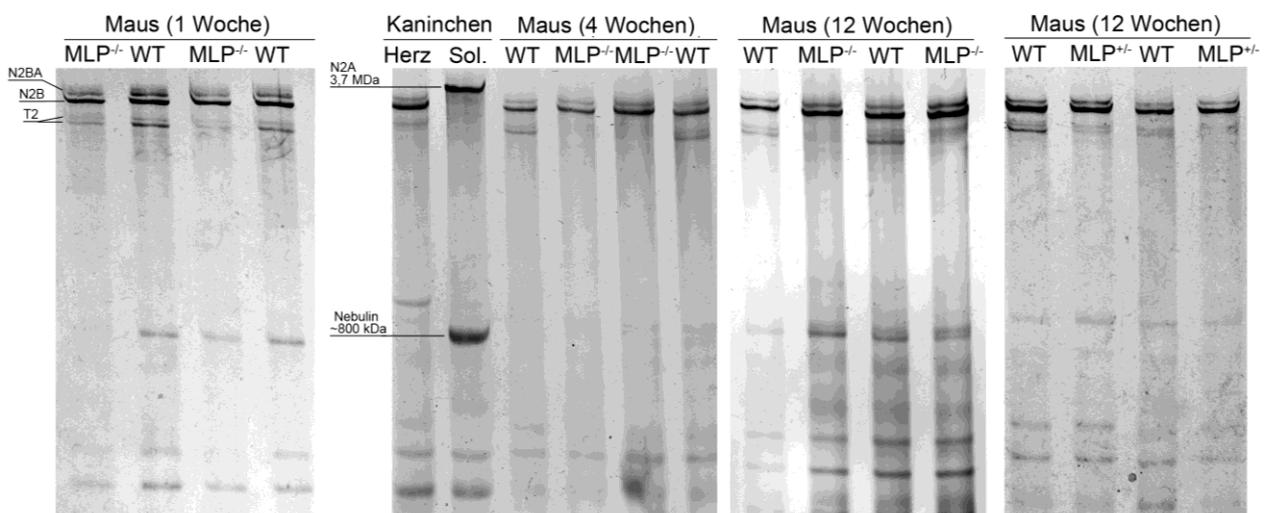


Abb. 27: T2-Titindegredationsbande in ein, vier und 12 Wochen alten MLP^{-/-}, MLP^{+/-} und wt (WT) Mauserherzen. Das Titingel, in dem die Herzen von vier Wochen alten Mäusen sowie die Kaninchenproben aufgetrennt wurden, stammt freundlicherweise von Dr. Irina Makarenko. Anstelle eines Molekulargewichtsmarkers wurde *Musculus soleus* (Sol.) aus dem Kaninchen aufgetragen. Die darin enthaltene Titin N2A-Isoform besitzt ein Molekulargewicht von 3,7 MDa.

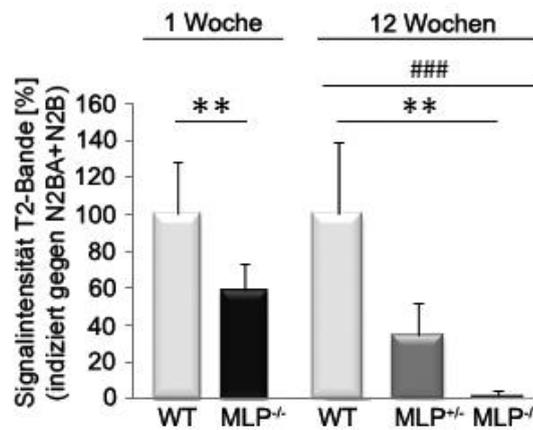


Abb. 28: Ergebnis der statistischen Auswertung der Unterschiede in der T2-Titindegradationsbanden in ein und 12 Wochen alten MLP^{-/-}, MLP^{+/+} und wt (WT) Mäuserherzen. Mittelwerte \pm SEM; n=6 – 8. Die Signifikanz wurde durch einen t-Test (eine Woche; **: p<0,01) bzw. einen ANOVA-Test (###: p<0,001) mit anschließendem Post-Hoc-Test (Dunn's-Test) ermittelt (12 Wochen; **p<0,01).

5.2 In MLP^{W4R/W4R} Herzen sind Tropomyosin- α 1- und α -Aktinin-2-Expression erhöht

Ein Vergleich des kardialen Proteoms von ein Jahr alten MLP^{W4R/W4R} und wt Mäusen durch 2-D DIGE (pH 4-7) ergab signifikante Veränderungen in der Signalintensität von 14 Proteinspots (Abb. 29).

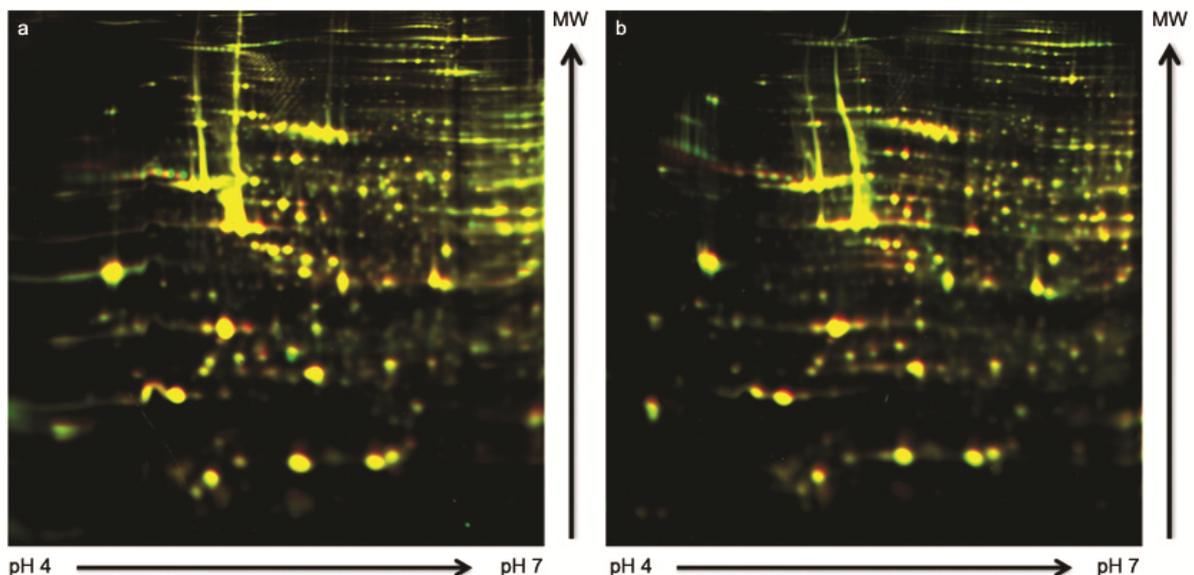


Abb. 29: Vergleich des kardialen Proteoms aus ein Jahr alten MLP^{W4R/W4R} und wt Mäusen durch 2-D DIGE. Gezeigt sind zwei repräsentative 2-D DIGE Gele (pH 4-7). (a) grün: MLP^{W4R/W4R}, rot: wt. (b) grün: wt; rot: MLP^{W4R/W4R}.

Von diesen 14 Spots waren neun in silbergefärbten 2-D Gelen detektierbar und konnten durch ESI MS/MS analysiert werden (Abb. 30). Sieben der neun Spots enthielten mehrere Proteine (Anhang 5 und Anhang 6). Zwei Spots wurden eindeutig als Tropomyosin- α 1 (ID 236) und α -Aktinin-2 (ID 3326) identifiziert. Die Expression von α -Aktinin-2 war im MLP^{W4R/W4R} mehr als 2-fach erhöht und die von Tropomyosin- α 1 mehr als 3-fach.

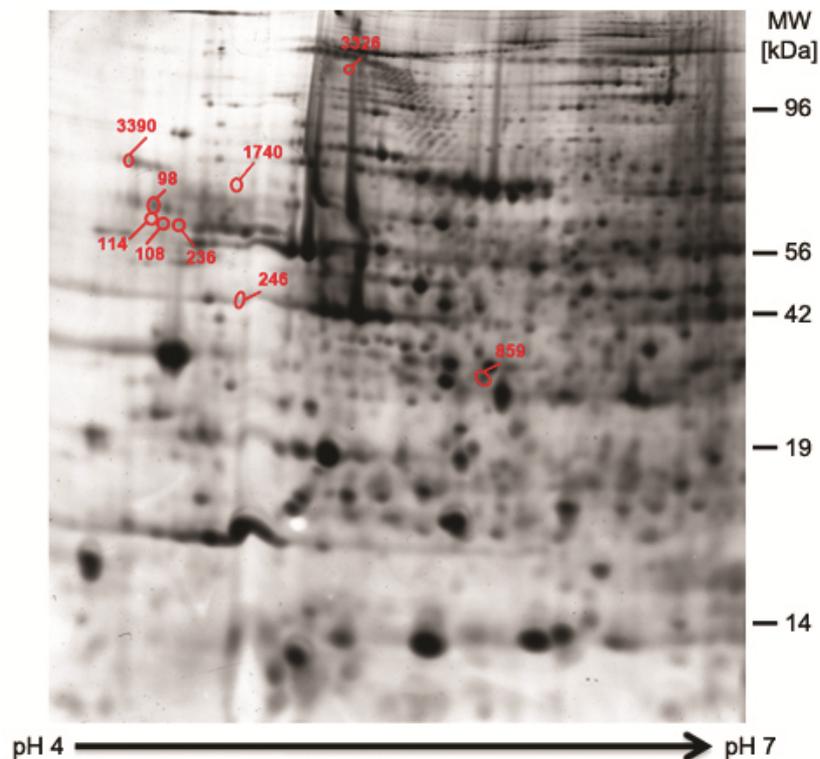


Abb. 30: Proteinspots, die im 2-D DIGE Vergleich von ein Jahr alten MLP^{W4R/W4R} und korrespondierenden wt Mausherzen signifikant verändert waren. Gezeigt ist eine repräsentative schwarz-weiße Aufnahme eines 2-D DIGE Gels. Rot: mittels ESI MS/MS analysierte Spots.

5.3 Identifikation und Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen in MLP

5.3.1 Kardiales MLP ist an Serin-95 phosphoryliert

Eine 2-D DIGE- und MS/MS-Analyse ergab, dass murines MLP in fünf verschiedene Spots separiert wird (Abb. 31a). Die stärksten 2D DIGE Signale wurden in den MLP-Spots M3 (~47%), M4 (~26%) und M2 (~15%) detektiert, die schwächsten in den Spots M5 (~9%) und M1 (~3%) (Abb. 31b). Alle MLP-Spots waren im gleichen Molekulargewichtsbereich des 2-D Gels lokalisiert, unterschieden sich jedoch in ihren isoelektrischen Eigenschaften. Dieses spezifische Spotmuster implizierte, dass mindestens vier bis fünf verschiedene Kombinationen von posttranslationalen Modifikationen in MLP existieren. Um zu überprüfen, ob auch Phosphorylierungen zu diesen Modifikationen zählen, wurde ein Dephosphorylierungs-Test am kardialen Mausproteom durchgeführt. In 2-D DIGE Gelen wurde Phosphatase-behandeltes MLP in deutlich weniger Spots separiert als unbehandeltes (Abb. 31c). Das dephosphorylierte MLP war zudem in einem niedrigeren pH-Bereich des 2-D Gels lokalisiert als das unbehandelte (~pH 8,9). Die vMaldi MS-Analyse ergab, dass vier der fünf MLP-Spots (M2-M5) an Serin-95 (S95) phosphoryliert waren (Abb. 31b, Abb. 31d und Anhang 7). Der Spot M1 mit dem höchsten pI war nicht phosphoryliert. Die statistische Auswertung der Spot-Signalintensitäten ergab, dass in adulten Mäusen ca. 97% des kardialen MLPs an S95 phosphoryliert sind (Abb. 31b).

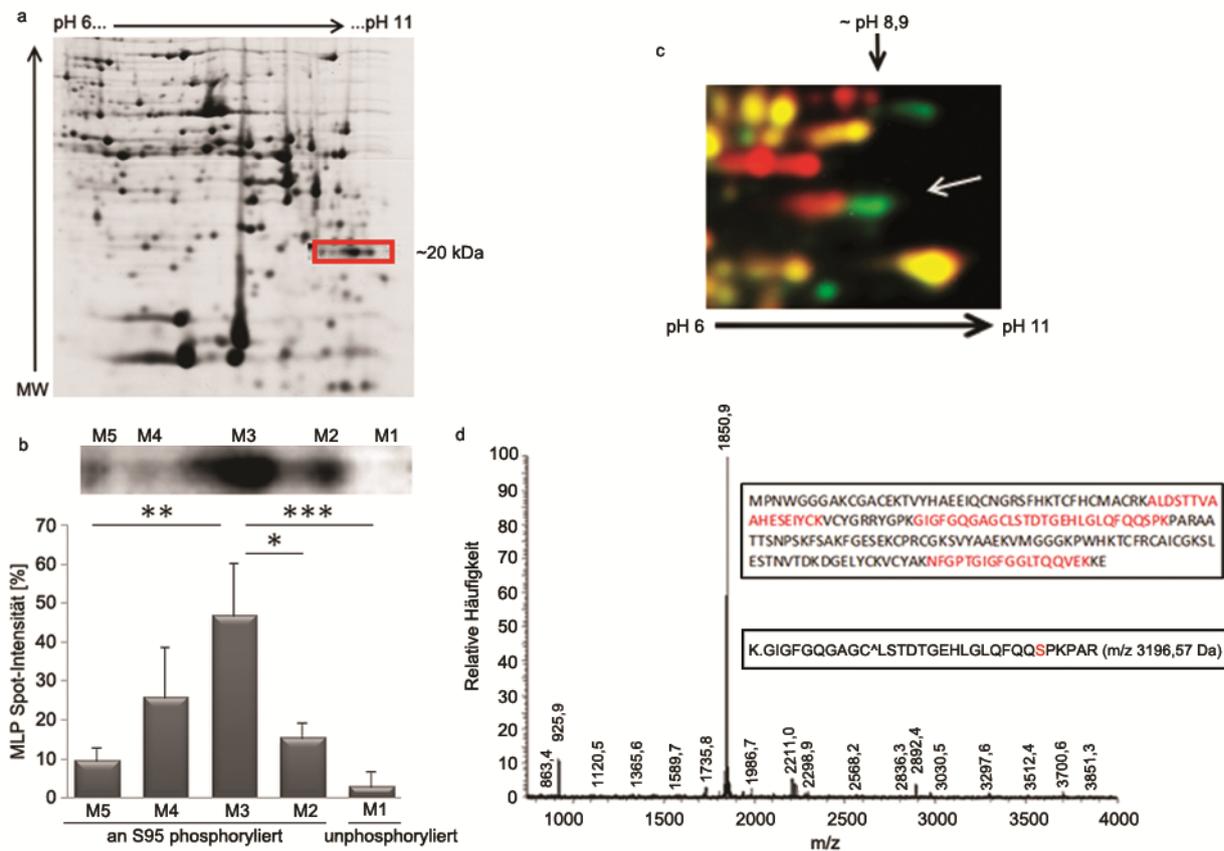


Abb. 31: Identifikation einer Phosphorylierungsstelle in MLP an S95. (a) Repräsentatives 2-D Gel (pH 6-11) des kardialen Proteoms einer 12 Wochen alten Maus. Rot: MLP (b) Vergrößerter Ausschnitt aus (a). Die MLP-Spots M1 bis M5 wurden durch vMALDI MS analysiert. Im Diagramm ist das Ergebnis der statistischen Auswertung der Signalintensitäten der MLP-Spots dargestellt (Mittelwerte \pm SDM; n=3). Die Signifikanz wurde durch einen t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). (c) Ausschnitt aus einem 2-D DIGE Gel, in dem dephosphoryliertes kardiales Mausproteom (grün) mit unbehandelten Kontrollen (rot) verglichen wurde. (d) Massenspektrum von M3. Oberer Kasten: MLP Proteinsequenz. Rot: detektierte Peptide. Unterer Kasten: Peptidsequenz mit Phosphorylierungsstelle S95 (rot).

5.3.2 Spezifitätsnachweis der P-S95 MLP und MLP Antikörper

Für die Charakterisierung der MLP S95 Phosphorylierung wurde bei der Firma Eurogentec die Generierung eines polyklonalen S95-phosphorylierungsspezifischen MLP-(P-S95 MLP) und eines korrespondierenden MLP-Antikörpers in Auftrag gegeben. Beide Antikörper erzeugten in Western Blots von Herzgewebe aus Mensch und Maus eine einzelne Bande mit einem MW von ca. 21kDa (Abb. 32a). Western Blots, die statt mit dem Primärantikörper mit Präimmenserum inkubiert worden waren, wiesen diese Bande nicht auf. Keiner der beiden MLP-Antikörper generierte Signale in Proteinextrakten aus MLP^{-/-} Mausherzen. Unmodifiziertes rekombinantes humanes MLP und dephosphoryliertes murines MLP wurden ausschließlich durch den MLP Antikörper detektiert (Abb. 32a und Abb. 32b).

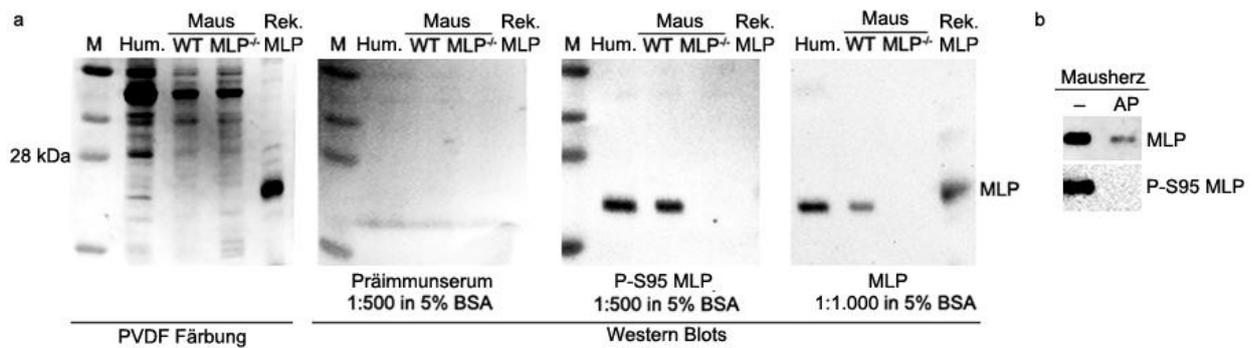


Abb. 32: Spezifitätstest der P-S95 MLP- und MLP-Antikörper in Western Blots. (a) Exemplarische Aufnahmen von PVDF-Färbung sowie Western Blot Signalen nach Inkubation mit Präimmunserum, P-S95 MLP- oder MLP-Antikörper. Verwendete Proben: rekombinantes humanes MLP (rek. MLP) sowie Herzgewebe von Mensch (Hum.) und Maus (wt und MLP^{-/-}). M: MW-Marker. (b) Nachweis der Phosphorylierungsspezifität des P-S95 MLP Antikörpers anhand von dephosphoryliertem Mausherzgewebe. AP: alkalische Phosphatase, -: keine Phosphatase.

5.3.3 Die MLP S95 Phosphorylierung ist in verschiedenen Spezies konserviert

„Alignments“ der MLP-Proteinsequenzen von Maus, Ratte, Mensch, Hund und Rind mit dem Online-Programm *CLUSTAL W 1.81* ergaben, dass S95 und die umliegenden Aminosäuren in allen fünf Spezies konserviert sind (Abb. 33).

```

Aminosäureposition:51                                     S95   100
P50462|CSRP3_Maus:  AHESIYCKVCYGRRYGPKGIGFGQGAGCLSTDTGEHLGLQFQQSPKPAR
P50463|CSRP3_Ratte: AHESIYCKVCYGRKYGPKGIGFGQGAGCLSTDTGEHLGLQFQQSPKPAR
P50461|CSRP3_Human: AHESIYCKVCYGRRYGPKGIGYGQGAGCLSTDTGEHLGLQFQQSPKPAR
E2R9P5_CSRP3_Hund:  AHESIYCKVCYGRRYGPKGIGYGQGAGCLSTDTGEHLGLQFQQSPKPAR
Q4U0T9|CSRP3_Rind:  AHESIYCKVCYGRRYGPKGIGYGQGAGCLSTDTGEHLGLQFQQSPKQAR
*****:*****:*****
Aminosäureposition:101                                    150
P50462|CSRP3_Maus:  AATTSNPSKFSAKFGESEKPCRCGKSVYAAEKVMGGGKPDHKTCFRCAIC
P50463|CSRP3_Ratte: AATTSNPSKFSAKFGESEKPCRCGKSVYAAEKVMGGGKPDHKTCFPCAIC
P50461|CSRP3_Human: SVTTSNPSKFTAKFGESEKPCRCGKSVYAAEKVMGGGKPDHKTCFRCAIC
E2R9P5_CSRP3_Hund:  SATTSNPSKFTAKFGESEKPCRCGKSVYAAEKVMGGGKPDHKTCFRCAIC
Q4U0T9|CSRP3_Rind:  SATTSSNPSKFAKFGESEKPCRCGKSVYAAEKVMGGGKPDHKTCFRCAIC
:..*.. .. *****

```

Abb. 33: Ausschnitt aus dem „Alignment“ der MLP-Aminosäure-Sequenzen von Maus, Ratte, Mensch, Hund und Rind. Rot: Phosphorylierungsstelle an S95; gelb: Aminosäureaustausch; *: konservierte Aminosäuren.

In Western Blots konnte die MLP S95 Phosphorylierung in Herzen aus Mensch, Hund, Ratte und Maus nachgewiesen werden (Abb. 34).

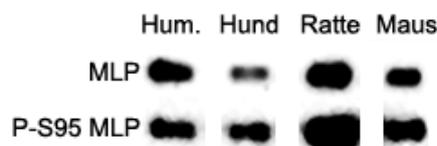


Abb. 34: Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot. Verwendete Primärantikörper: P-S95 MLP und MLP. Hum.: human.

5.3.4 MLP und S95 phosphoryliertes MLP unterscheiden sich in ihrer Lokalisation in Kardiomyozyten nicht voneinander

Immunfluoreszenzfärbungen an NRVM mit dem MLP- und dem P-S95 MLP-Antikörper ergaben ähnliche Färbemuster. MLP und S95 phosphoryliertes MLP waren im Cytoplasma, dem Nukleus, dem Cytoskelett und an der Membran – insbesondere an den Glanzstreifen und den Stressfasern – lokalisiert (Abb. 35 und Anhang 8).

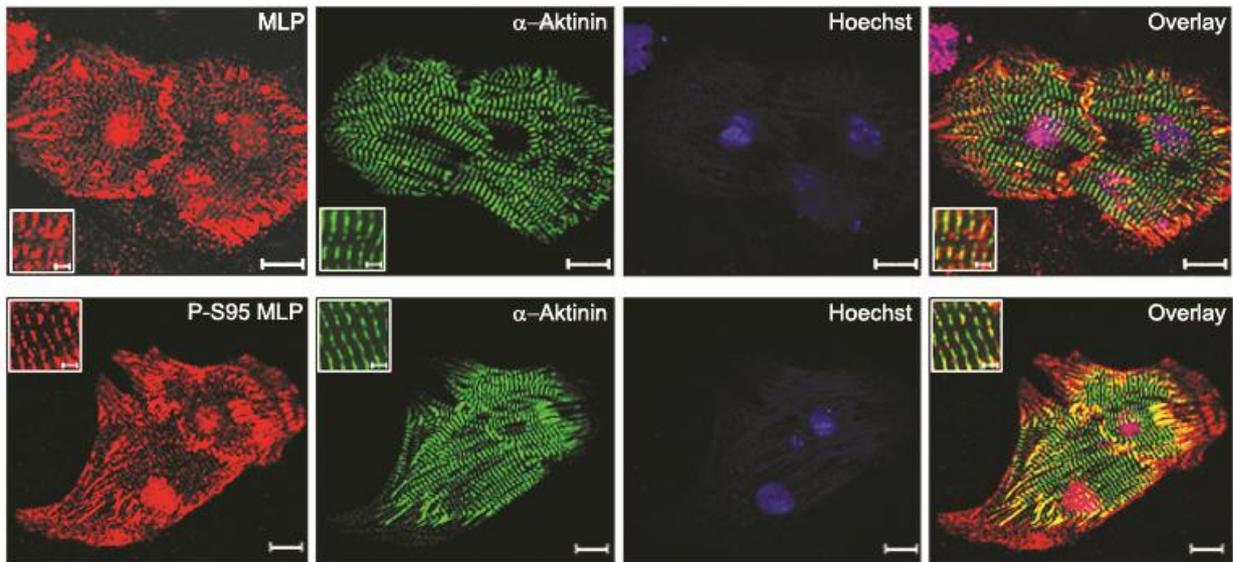


Abb. 35: Lokalisation von P-S95 MLP und MLP in Immunfluoreszenzfärbungen von NRVM. Verwendete Primärantikörper: P-S95 MLP, MLP, α -Aktinin. Die Nuklei wurden mit einem Hoechst-Farbstoff markiert (blau). Messskala: 10 μ m. Einsatzbilder: Querstreifung im Sarkomer; Messskala: 2 μ m.

Auch in Western Blots von subzellulären Fraktionen aus adultem Mausherzgewebe detektierten die MLP- und P-S95 MLP-Antikörper Signale im Cytosol, an der Membran, im Nukleus und am Cytoskelett (Abb. 36). Die stöchiometrische Verteilung von MLP unterschied sich geringfügig von der des P-S95 MLP. Das meiste MLP wurde im Cytosol (66%) detektiert, gefolgt vom Cytoskelett (20%) und der Membran (13%) (Abb. 36). Die nukleäre Fraktion enthielt am wenigsten MLP (1%). Der größte Anteil an P-S95 MLP wurde in der Cytoskelett- (40%) sowie der Cytosol-Fraktion (32%) nachgewiesen. Die Membran-Fraktion enthielt ca. 25% des an S95 phosphorylierten MLPs und die nukleäre Fraktion ca. 3%.

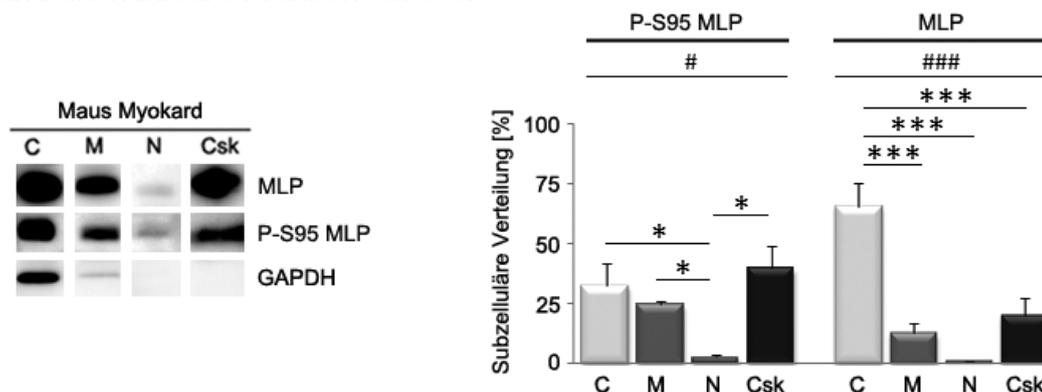


Abb. 36: Verteilung von MLP und P-S95 MLP in subzellulären Fraktionen von 12 Wochen alten Mausherzen. Verwendete Antikörper: GAPDH, P-S95 MLP und MLP. Im Diagramm ist das Ergebnis der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwerte \pm SEM; n=5). Die Signifikanz wurde ermittelt durch einen ANOVA-Test (#: $p < 0,05$; ###: $p < 0,001$) gefolgt vom Holm-Sidak-Test (MLP) bzw. dem Student-Newman-Keuls-Test (P-S95 MLP): *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$. C: Cytosol; M: Membran; N: Nukleus; Csk: Cytoskelett.

5.3.5 MLP ist bereits im embryonalen Herzen an S95 phosphoryliert

Da MLP bereits im embryonalen Herzen exprimiert wird, wurde überprüft, ob auch embryonales (Entwicklungsstadium Tag 18: E18) und neonatales MLP an S95 phosphoryliert wird. In neonatalen und E18 Rattenherzen war die MLP Expression in etwa gleich stark ausgeprägt (Abb. 37). Die beiden Entwicklungsstufen unterschieden sich jedoch eindeutig in ihrer MLP S95 Phosphorylierung. In neonatalen Herzen war der Anteil an S95 phosphoryliertem MLP doppelt so hoch wie in E18 Herzen (Abb. 37).

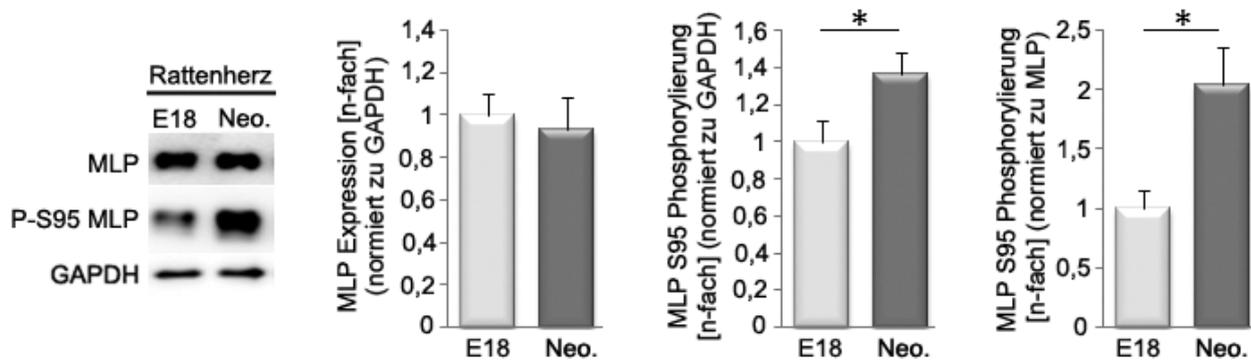


Abb. 37: Entwicklungsabhängige Änderungen der MLP S95 Phosphorylierung im Rattenherz. Verwendete Primärantikörper: GAPDH, MLP und P-S95 MLP. Im Diagramm sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwerte \pm SEM; n=6). Die Signifikanz wurde durch einen t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$). E18: embryonal; Neo.: neonatal.

5.3.6 MLP wird *in vitro* durch ERK2 und PKC ϵ phosphoryliert

Um herauszufinden, welche Kinase die Phosphorylierung von MLP vermittelt, wurde eine Sequenzanalyse mit dem Online-Programm *NetPhosK* und der Software *GPS Phosphosite Prediction Tool* durchgeführt. Beide Programme identifizierten mehrere Serin/Threonin Kinasen, die MLP potentiell phosphorylieren können. Eine praktische Überprüfung der Vorhersagen mittels Autoradiographie ergab, dass rekombinantes humanes MLP sowohl durch PKC ϵ als auch durch ERK2 phosphoryliert werden kann (Abb. 38 und Anhang 9).

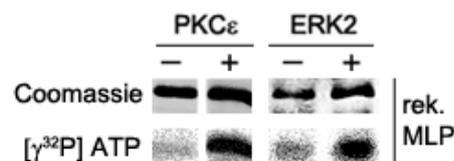


Abb. 38: Nachweis der PKC ϵ - und ERK2-vermittelten Phosphorylierung von rekombinantem (rek.) humanem MLP im Autoradiogramm. Gezeigt sind die Coomassie-gefärbten MLP-Banden (Beladungskontrolle) sowie die [γ³²P] ATP-Signale nach der Inkubation mit den Kinasen. -: keine Kinase.

Andere PKC Isoformen, wie z.B. PKC α , PKC η und PKC γ , konnten MLP ebenfalls phosphorylieren - ihr Effekt war jedoch geringer als der von PKC ϵ (Abb. 39). Zu den getesteten Kinasen, die MLP nicht phosphorylieren konnten, zählten FAK, PKC θ und PKC ι (Abb. 39).

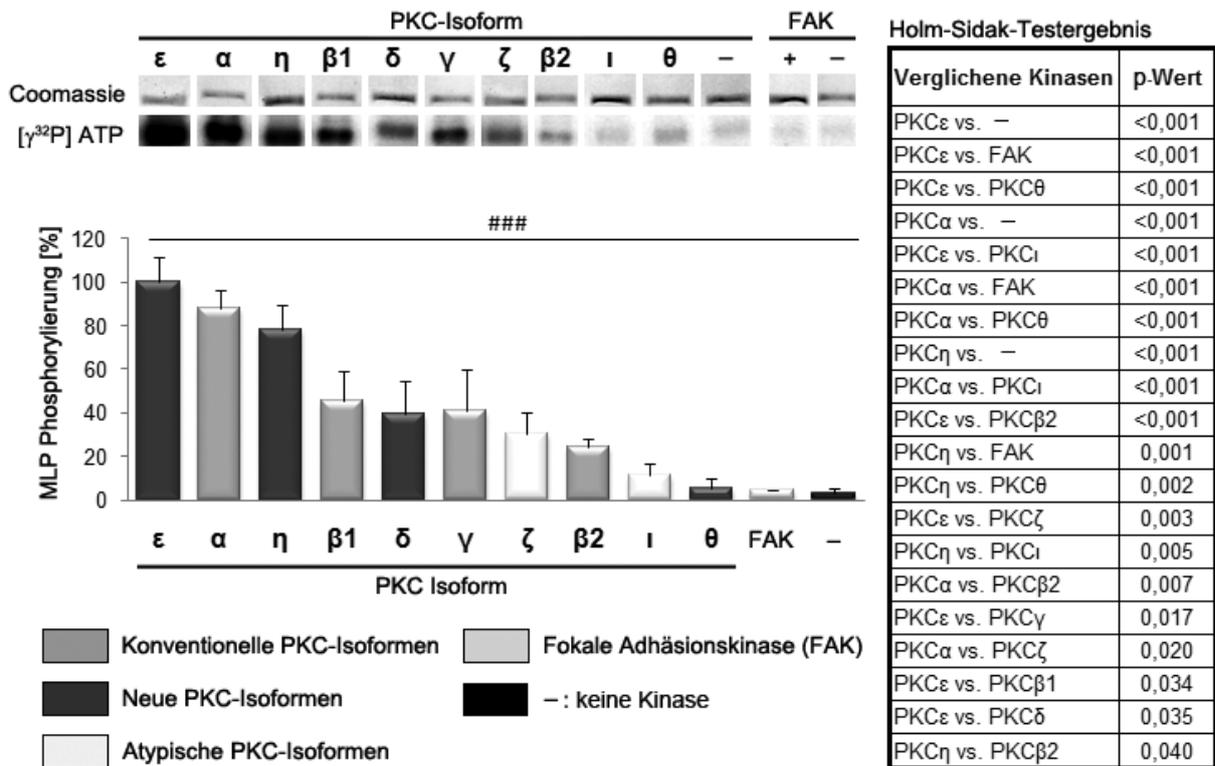


Abb. 39: Der Effekt von verschiedenen PKC Isoformen sowie von FAK auf die Phosphorylierung von rekombinantem MLP. Gezeigt sind Coomassie-gefärbte MLP-Banden (Beladungskontrollen) sowie [γ³²P] ATP-Signale nach humanem der Inkubation mit den verschiedenen Kinasen. Im Diagramm sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung (Mittelwert ± SEM; n=3) dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch ANOVA- (###: p<0,001) sowie einen Holm-Sidak-Test (Tabelle) überprüft. -: keine Kinase.

5.3.7 Die MLP S95 Phosphorylierung wird durch ERK1 und ERK2 vermittelt

Zur Identifikation der Kinasen, die MLP spezifisch an S95 phosphorylieren, wurden die ERK2- sowie PKCε-vermittelte Phosphorylierung des rekombinanten wt MLP und einer rekombinanten MLP Mutante, S95A, im Autoradiogramm miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die PKCε-vermittelte MLP Phosphorylierung in der S95A-Mutante stark erhöht, die ERK2-vermittelte Phosphorylierung um 94% reduziert war (Abb. 40).

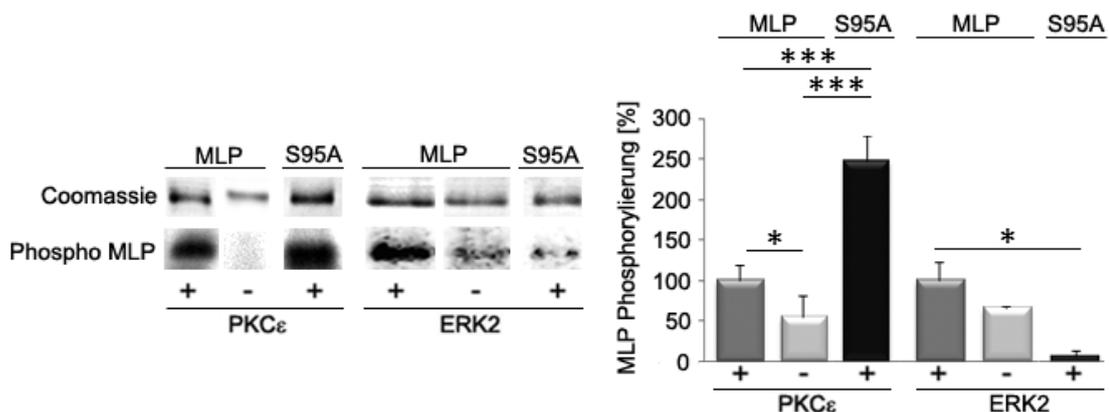


Abb. 40: Vergleich der ERK2- bzw. PKCε-vermittelten MLP Phosphorylierung in rekombinantem MLP und in der Mutante S95A. Gezeigt sind die Coomassie-gefärbten MLP Banden (Beladungskontrolle) sowie die [γ³²P] ATP-Signale im Autoradiogramm. Im Diagramm sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwert ± SEM; PKCε: n=3; ERK2: n=4.). Die Signifikanz wurde durch einen ANOVA (p<0,001) sowie den Holm-Sidak- (PKCε) bzw. den Dunn's-Test (ERK2) überprüft: *: p<0,05; ***: p<0,001. -: keine Kinase.

Das Autoradiographie-Ergebnis wurde in Western Blots überprüft. Dabei konnte nur in ERK2-behandeltem rekombinatem MLP eine S95 Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 41a). Der P-S95 MLP Antikörper detektierte weder die PKC ϵ -behandelten Ansätze noch die Negativkontrollen (ohne Kinase) oder die S95A-Mutante. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch ERK1 MLP an S95 phosphoryliert (Abb. 41b).

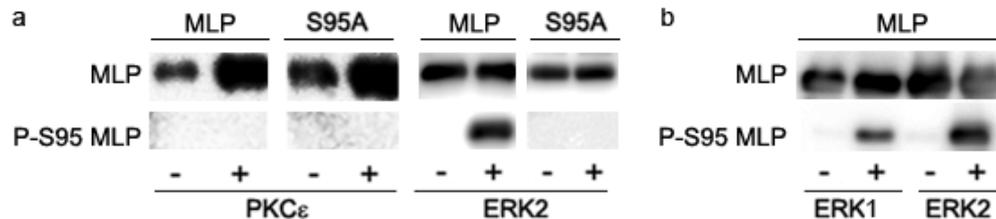


Abb. 41: ERK1 und ERK2 vermitteln die MLP S95 Phosphorylierung, PKC ϵ hingegen nicht. (a) Gezeigt sind repräsentative Western Blots von rekombinatem humanem MLP und der S95A Mutante nach *in vitro* Phosphorylierung mit PKC ϵ bzw. ERK2. (b) Repräsentative Western Blots von rekombinatem humanem MLP nach *in vitro* Phosphorylierung mit ERK1 bzw. ERK2. Verwendete Primärantikörper: MLP bzw. P-S95 MLP.

5.3.8 PKC ϵ phosphoryliert MLP an S46

Die Ergebnisse der 2-D DIGE Dephosphorylierungs-Tests deuteten darauf hin, dass MLP mehrfach phosphoryliert sein könnte. Darüber hinaus wiesen die *in vitro* Phosphorylierungsstudien auf eine PKC ϵ -vermittelte Phosphorylierung von MLP hin, die nicht an S95 erfolgt. Es stellte sich daher die Frage, ob MLP in der Tat PKC ϵ -spezifische Phosphorylierungsstellen enthält.

Die Programme *NetPhosK* sowie *GPS Phosphosite Prediction Tool* Analyse sagten weitere potentielle Phosphorylierungsstellen in MLP an Serin-46 (S46) und Serin-117 (S117) voraus. Ein *in vitro* Vergleich mittels Autoradiographie von rekombinatem wt MLP mit den MLP Mutanten S46N (Austausch von S46 gegen Asparagin) und S117A (Austausch von S117 gegen Alanin) ergab, dass der Verlust von S46 die PKC ϵ -vermittelte Phosphorylierung um 50% vermindert (Abb. 42). Hingegen hatte der Ersatz von S117 durch Alanin keinen Einfluss auf die PKC ϵ -vermittelte MLP Phosphorylierung.

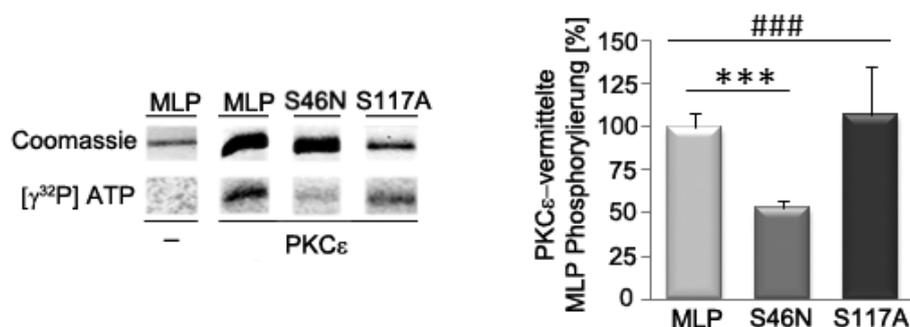


Abb. 42: Vergleich der PKC ϵ -vermittelten MLP Phosphorylierung in rekombinatem MLP und den MLP Mutanten S46N bzw. S117A. Gezeigt sind die Coomassie-gefärbten MLP-Banden (Beladungskontrolle) sowie die [γ^{32} P] ATP-Signale im Autoradiogramm nach der Inkubation mit PKC ϵ . Im Diagramm sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwert \pm SEM; n=6). Die statistische Signifikanz wurde mit einem ANOVA-Test (###: p < 0,001) sowie einem t-Test (***: p < 0,001) überprüft. -: keine Kinase.

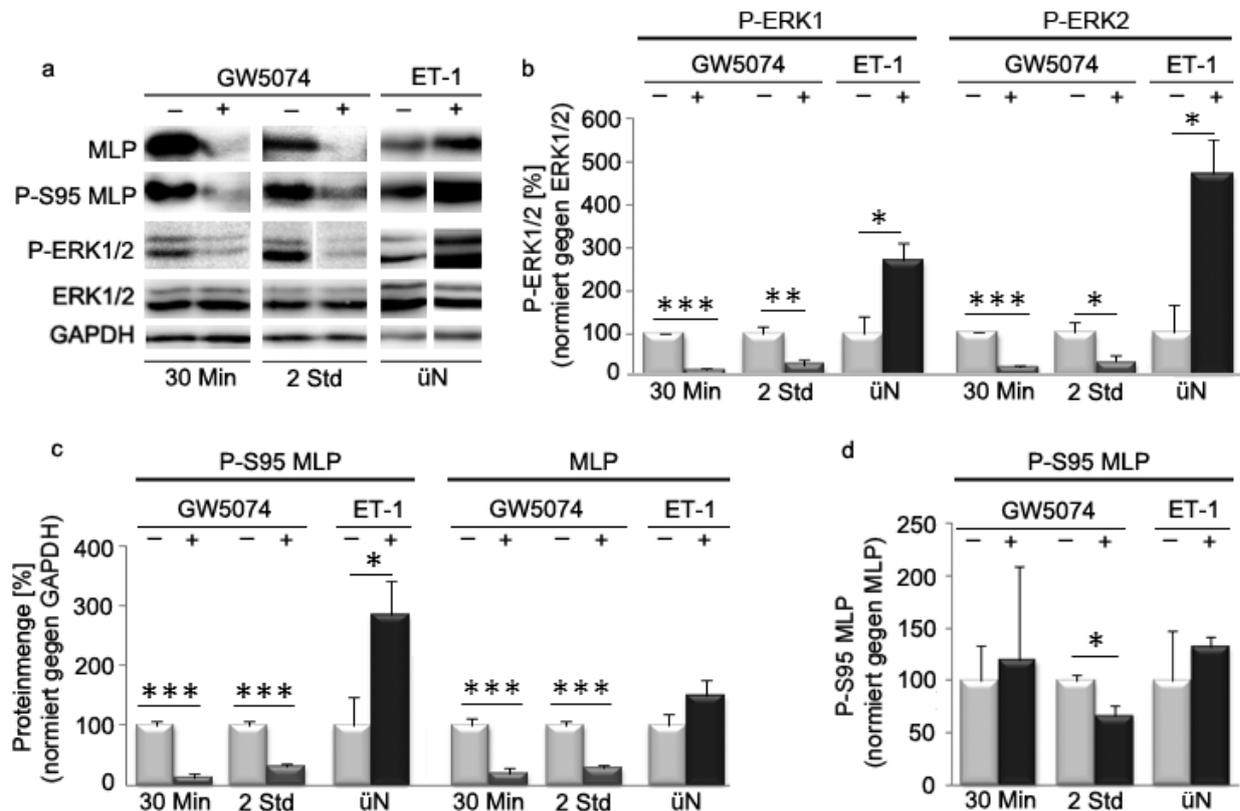


Abb. 44: Modulation der MLP S95 Phosphorylierung in NRVM durch Aktivierung bzw. Inhibierung des ERK1/2-MAPK-Signalwegs. (a) Western Blots von GW5074- bzw. ET-1-behandelten NRVM. Verwendete Primärantikörper: MLP, P-S95 MLP, ERK1/2, P-ERK1/2 und GAPDH. In den Diagrammen (b-d) sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung (Mittelwert \pm SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde durch ANOVA- ($p < 0,001$) und Holm-Sidak- (b-c) bzw. Student's t-Test (d) überprüft (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). (b) Änderung der ERK1/2 Phosphorylierung ($n = 3-5$). (c) Änderung der MLP Expression und S95 Phosphorylierung (P-S95 MLP: $n = 3-9$; MLP: $n = 4-7$). (d) Änderung der MLP S95 Phosphorylierung ($n=3-5$). -: DMSO-behandelte Kontrollen; Std: Stunde; üN: über Nacht.

5.3.11 Die MLP S95 Phosphorylierung erfolgt unabhängig von FHL-1

Die Erhöhung der FHL-1 Expression in MLP^{-/-} Mausherzen (siehe Kapitel 5.1.1) deutete auf eine Assoziation zwischen FHL-1- und MLP-Signalweg hin. Daher wurde getestet, ob der Verlust von FHL-1 die Expression und/oder S95 Phosphorylierung von MLP beeinflusst. Verglichen mit dem wt wurde in Western Blots von LV aus FHL-1^{-/-} Mäusen eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Steigerung der MLP Expression detektiert (Abb. 45). Die S95 Phosphorylierung von MLP wurde durch die FHL-1-Defizienz nicht beeinflusst. Eine Überprüfung der ERK1/2 Expression und Phosphorylierung ergab, dass die Phosphorylierung im FHL-1^{-/-} tendenziell vermindert war, ohne statistisch signifikant zu sein (Abb. 45). Die Expression von ERK1/2 war in den FHL-1-defizienten Herzen unverändert.

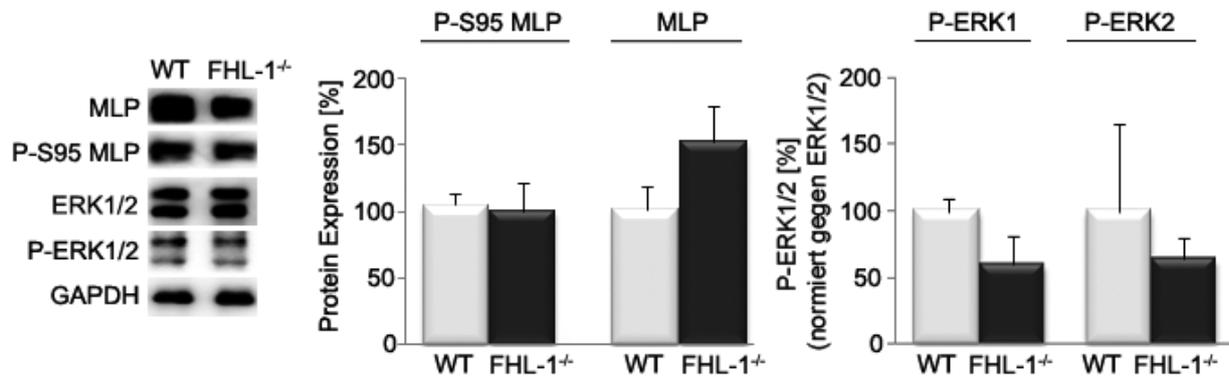


Abb. 45: Bestimmung der ERK1/2-Phosphorylierung sowie der MLP Expression und S95 Phosphorylierung in LV aus FHL-1^{-/-} und wt Mäusen. Verwendete Primärantikörper: MLP, P-S95 MLP, ERK1/2, P-ERK1/2 und GAPDH. In den Diagrammen sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung abgebildet (Mittelwerte \pm SEM; n=4).

5.3.12 CnA dephosphoryliert MLP an S95

Da bekannt ist, dass die Phosphatase CnA ein MLP-Bindungspartner ist, wurde der Einfluss von CnA auf die MLP S95 Phosphorylierung untersucht. Zunächst wurde getestet, ob CnA *in vivo* an der Regulation der MLP Expression und S95 Phosphorylierung beteiligt ist.

CnA^{-/-} Herzen zeigten im Vergleich mit dem wt keine Veränderung der MLP Expression. Allerdings war die MLP S95 Phosphorylierung im CnA^{-/-} verdoppelt (Abb. 46). Bei der Auswertung der Western Blot Signale war auffällig, dass die MLP Expression zwischen den unterschiedlichen Proben stark streute. Eine Indizierung der MLP S95 Phosphorylierung gegen den MLP-Gehalt der einzelnen Proben ergab nur noch eine tendenzielle Erhöhung der S95 Phosphorylierung, ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

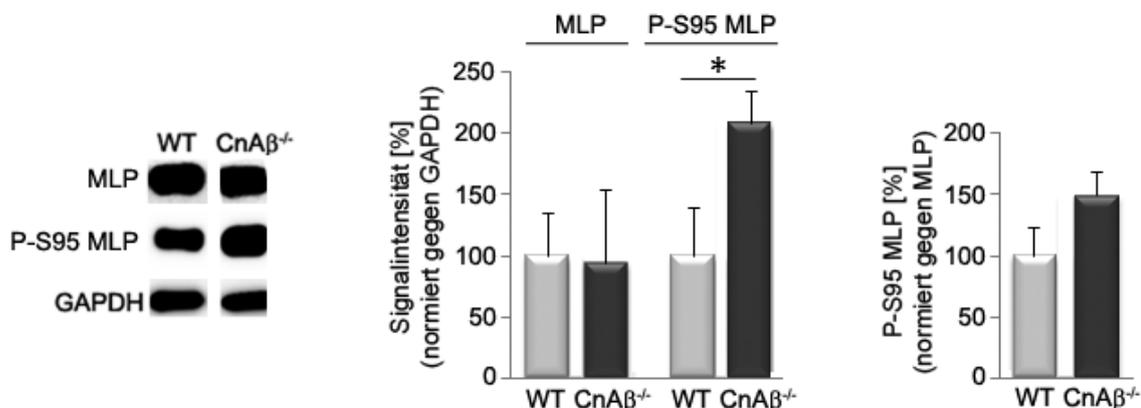


Abb. 46: CnA ist *in vivo* in die Regulation der MLP S95 Phosphorylierung involviert. Vergleich der MLP Expression und S95 Phosphorylierung in CnA^{-/-} und wt (WT) Herzen im Western Blot. Verwendete Primärantikörper: MLP, P-S95 MLP und GAPDH. In den Diagrammen sind die Ergebnis der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwerte \pm SEM; n=7). Die statistische Signifikanz wurde mit einem t-Test überprüft (*: p<0,05).

Im nächsten Schritt wurde *in vitro* der Effekt von aktivem CnA auf die MLP S95 Phosphorylierung überprüft. Die Inkubation mit CnA reduzierte die Phosphorylierung von rekombinantem humanem MLP an S95 um 70% (Abb. 47).

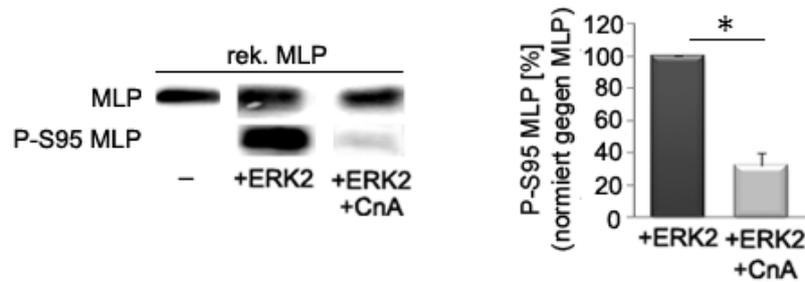


Abb. 47: CnA dephosphoryliert MLP an S95. Nachweis der CnA-vermittelten Dephosphorylierung von zuvor ERK2-behandeltem rekombinantem MLP (rek. MLP) an S95. Verwendete Antikörper: MLP und P-S95 MLP. Im Diagramm ist das Ergebnis der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwerte \pm SEM; $n=6$). Die statistische Signifikanz wurde durch einen t-Test überprüft (*: $p < 0,05$). -: ohne Kinase.

5.3.13 Die MLP S95 Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität von MLP zu CFL-2

Da S95 Teil der CFL-2-Bindungsstelle in MLP ist (Papalouka *et al.*, 2009), war zu vermuten, dass die S95 Phosphorylierung in MLP an der Regulation der MLP/CFL-2-Interaktion beteiligt sein könnte. Zur Überprüfung dieser Annahme, wurde eine *in vitro* Interaktionsstudie (Pull-down) zwischen CFL-2 und MLP bzw. S95 phosphoryliertem MLP durchgeführt. Der Pull-down ergab jedoch, dass sich S95 phosphoryliertes MLP in seiner Bindungsaffinität zu CFL-2 nicht von der des unphosphorylierten MLP unterscheidet (Abb. 48).

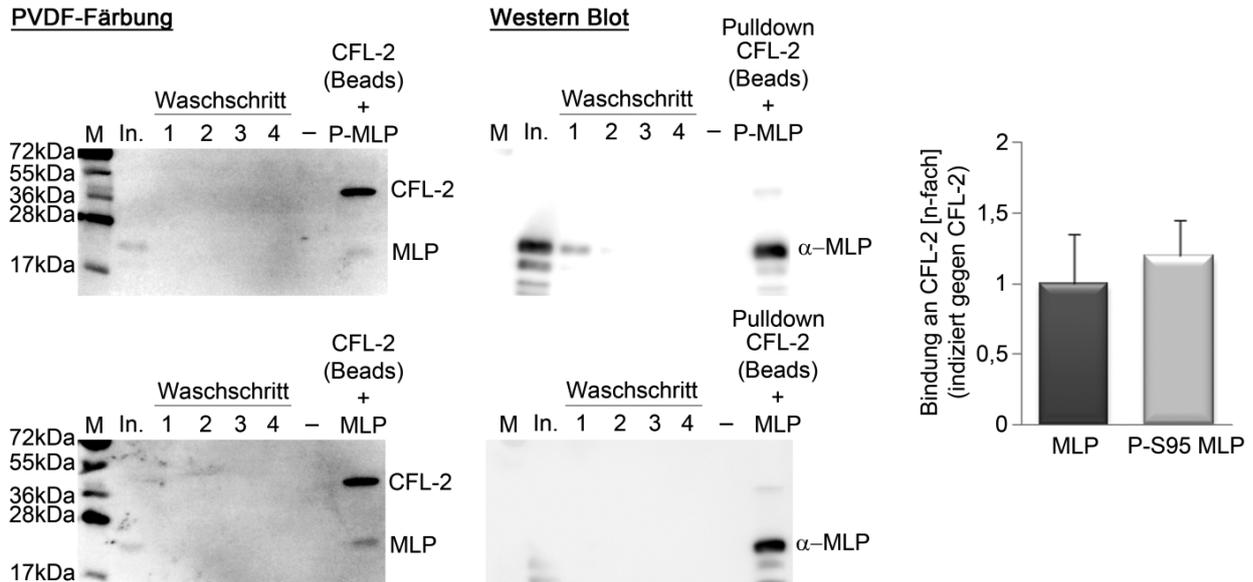


Abb. 48: *In vitro* Interaktionsstudie zwischen rekombinantem humanem CFL-2 (an Gluthation-Sepharose-Beads gekoppelt) und rekombinantem humanem MLP bzw. S95 phosphoryliertem MLP (P-S95 MLP). Gezeigt sind repräsentative Western Blots, PVDF-Färbungen der Blots sowie das Ergebnis der statistischen Auswertung (Diagramm: Mittelwert \pm SEM; $n=3$). Der verwendete Primärantikörper war gegen MLP gerichtet. -: keine Probe aufgetragen; In.: Input (Überstand nach der Kopplung = ungebundenes Protein); Waschschrift 1 – 4: Wasch-Überstände (Dokumentation von ungebundenem, ausgewaschenem MLP).

5.3.14 In Hundeherzen mit kompensatorischer Hypertrophie und DHF ist die Phosphorylierung von MLP an S95 CnA β -abhängig vermindert

Da die Dephosphorylierung von MLP S95 durch CnA-vermittelt wird, wurde vermutet, dass die S95 Phosphorylierung in solchen Herzerkrankungen dysreguliert sein könnte, die mit Veränderungen der CnA-Expression und/oder -Aktivität einhergehen. Zu diesen Herzerkrankungen zählt u.a. die DHF. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde ein Hundemodell (DHF-Hunde) untersucht, das vergleichbare Charakteristika aufweist wie humane DHF Patienten. In diesem Hundemodell führt eine bilaterale Nierenummantelung zur Entstehung einer chronischen Hypertonie und infolgedessen zur Ausprägung einer kompensatorischen Hypertrophie des Herzens mit Zeichen einer DHF. Bislang war nicht klar, ob im DHF-Hund wie bei humanen Herz-Hypertrophie Patienten eine verstärkte Aktivierung des CnA/NFAT-Signalweges vorliegt. Daher musste zunächst die CnA Expression in den DHF- und Kontrollhunden überprüft werden. Verglichen mit gesunden Hundeherzen wurde bei den hypertrophen DHF Hunden eine 2,7-fache Steigerung der CnA β Expression detektiert (Abb. 49a und Abb. 49b).

Weitere Tests ergaben, dass die MLP Expression in DHF Herzen tendenziell stärker war als in gesunden Herzen, wenn diese Unterschiede auch nicht signifikant waren. Ein signifikanter Unterschied zwischen DHF Herzen und gesunden Kontrollen wurde jedoch hinsichtlich der MLP S95 Phosphorylierung detektiert, die in DHF-Hunden um 40% reduziert war (Abb. 49a und Abb. 49c).

Überprüft wurde außerdem, ob Änderungen der ERK1/2-Aktivität die MLP S95 Phosphorylierung im Hundemodell beeinflusst haben könnten. Allerdings war zwischen DHF und gesunden Herzen kein Unterschied in der Expression oder Phosphorylierung von ERK1/2 detektierbar (Abb. 49a und Abb. 49d).

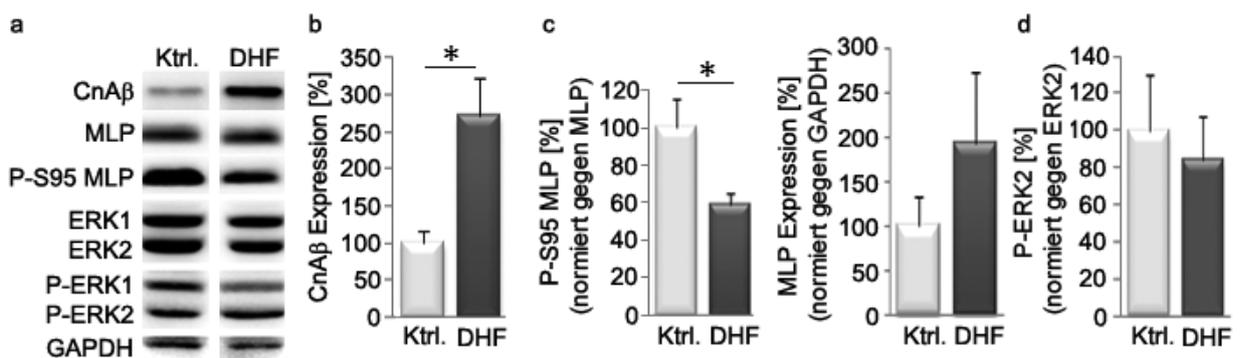


Abb. 49: Vergleich der Expression bzw. des Phosphorylierungsstatus von MLP S95, ERK2 und CnA β in gesunden und DHF Hundeherzen. (a) Repräsentative Western Blot Signale. Verwendete Primärantikörper: MLP, P-S95 MLP, CnA β , ERK1/2, P-ERK1/2 und GAPDH. (b-d) Ergebnisse der statistischen Auswertungen (Mittelwerte \pm SEM; t-Test: *: $p < 0,05$). (b) CnA β Expression (normiert gegen GAPDH; $n=4$). (c) MLP Expression und S95 Phosphorylierung ($n=6$). (d) Statistische Auswertung der ERK2 Phosphorylierung ($n=7$). Ktrl.: Kontrolle (gesund).

Eine Western Blot Analyse der MLP und P-S95 MLP Verteilung in subzellulären Proteomfraktionen von gesunden sowie DHF Hundeherzen sollte einen Hinweis darauf geben, wo die CnA-vermittelte Dephosphorylierung von MLP erfolgen könnte. Tendenziell sank der Gehalt an S95 phosphoryliertem MLP in allen subzellulären Fraktionen.

Es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede in der MLP S95-Verteilung zwischen gesunden und DHF Herzen nachgewiesen werden, allerdings war eine Tendenz zu verminderter MLP S95 Phosphorylierung in DHF-Hundeherzen erkennbar (Abb. 50).

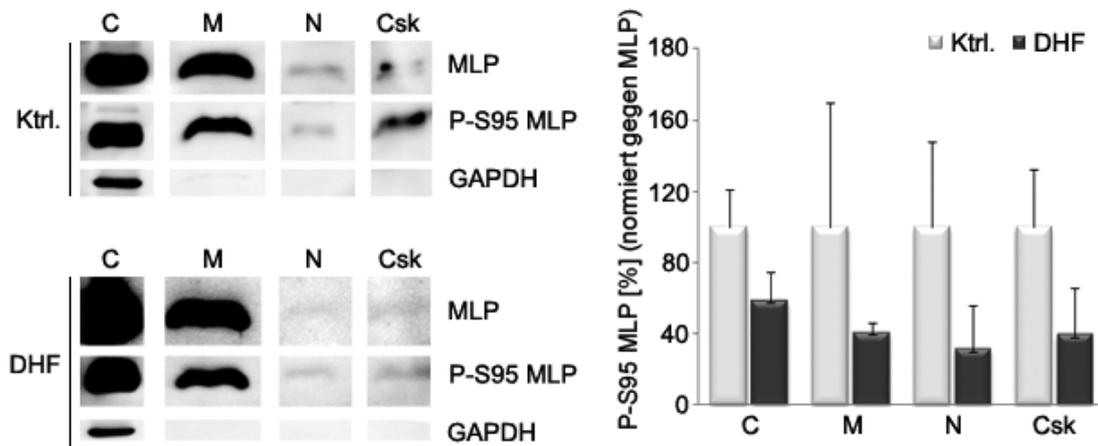


Abb. 50: Western Blot Vergleich von subzellulären Proteomfraktionen aus gesunden und DHF Hundeherzen. Im Diagramm sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung dargestellt (Mittelwerte \pm SEM; n=3). C. Cytosol; M: Membran; N: Nukleus; Csk: Cytoskelett; Ktrl.: Kontrolle (gesund).

6. Diskussion

Das Protein MLP ist an verschiedenen Knotenpunkten der Signalweiterleitung lokalisiert und in die Regulation der zellulären Stressantwort involviert. Seine Lokalisation sowie sein Einfluss auf die Entstehung von chronischen Herzerkrankungen lassen vermuten, dass MLP Teil eines putativen Dehnungs- oder Stress-Sensors sein könnte (Knöll *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2006; Heineke & Molkenin, 2006; Gunkel *et al.*, 2010; Voelkel & Linke, 2011). Obgleich zahlreiche Studien zum Thema MLP veröffentlicht wurden, ist nach wie vor unklar, welche Mechanismen die Funktion von MLP regulieren und wie die MLP-abhängige Signaltransduktion moduliert wird. Es wird vermutet, dass MLP durch verschiedene posttranslationale Modifikationen reguliert werden könnte (Gehmlich *et al.*, 2008; Geier *et al.*, 2008; Gunkel *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2008; Knöll *et al.*, 2010).

Ziel dieser Arbeit war es Faktoren bzw. Mechanismen zu identifizieren, die an der molekularen Regulation der MLP-abhängigen kardialen Signaltransduktion beteiligt sind. Dabei wurden zwei verschiedene Herangehensweisen verfolgt:

1. die Analyse des kardialen Proteoms von MLP^{-/-} und MLP^{W4R/W4R} Mäusen im Vergleich zu wt Tieren und
2. die Identifikation und Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen in MLP.

6.1 Die DCM-Entwicklung im MLP^{-/-} könnte primär durch die Dysregulation von Sarkomer-assoziierten Proteinen und Chaperonen ausgelöst werden

Proteomanalysen an Herzen aus verschiedenen MLP^{-/-} Entwicklungsstadien sollten Hinweise auf molekulare Mechanismen erbringen, die primär zur Entstehung der MLP^{-/-}-abhängigen DCM beitragen. Um zwischen frühen und späten Ereignissen in der DCM-Entwicklung unterscheiden zu können, wurde das Proteom von ein, vier und 12 Wochen alten MLP^{-/-} Herzen mit den der korrespondierenden wt Herzen verglichen. Dabei galt ein besonderes Augenmerk der Frage, welche Auswirkungen die MLP-Defizienz auf Proteine am Sarkomer bzw. an der Z-Scheibe hat.

Die 2-D DIGE Analyse ergab, dass im MLP^{-/-} vorrangig die Expression von Chaperonen sowie sarkomerischen und mitochondrialen Proteine verändert ist. Die meisten der im MLP^{-/-} verstärkt exprimierten Sarkomer-assoziierten Proteine waren an der Z-Scheibe lokalisiert, wodurch die Annahme untermauert wird, dass MLP ein Z-Scheiben Protein ist (Gunkel *et al.*, 2010). Zu den Z-Scheiben Proteinen, die im MLP^{-/-} veränderten waren, gehörten z.B. CFL-2, Cypher-1, Calsarcin-1, SRBS2 und Desmin.

SRBS2 ist ein Strukturprotein, das neben der Z-Scheibe auch am Costamer und im Nukleus lokalisiert ist. Zu seinen Bindungspartnern zählen u.a. Spektrin, α -Aktinin, Aktin und Vinculin (Cestra *et al.*, 2005; Kioka *et al.*, 2002; Sanger *et al.*, 2010_B).

In Kardiomyozyten führt die Überexpression von SRBS2 zum Kollaps des Aktin-Cytoskeletts sowie dem Verlust von Myofibrillen (Sanger *et al.*, 2010_A; Sanger *et al.*, 2010_B). Da die Expressionserhöhung von SRBS2 erst in vier Wochen alten MLP^{-/-} Herzen detektiert wurde, ist sie wahrscheinlich nicht ausschlaggebend für die DCM-Entwicklung. Ähnliches gilt für die Dysregulation von Cypher-1 und CFL-2. Beide Proteine sind zwar in die DCM-Entwicklung involviert (Donay, 2003; Zheng *et al.*, 2009), da jedoch keines von beiden in eine Woche alten MLP^{-/-} Herzen verändert. Ihre erhöhte Expression in älteren Herzen zählt möglicherweise zu den Sekundäreffekten des MLP *knock-out*.

Ebenfalls als Sekundäreffekt einzustufen ist die erhöhte Expression des CnA-Inhibitors Calsarcin-1, die vermutlich auf eine immense Verstärkung der CnAβ Expression (>9-fach) im MLP^{-/-} zurückzuführen ist. Auch die Expression von NFAT3 war im MLP^{-/-} mehr als doppelt so hoch wie im wt. Da die Aktivität von CnA und NFAT3 nicht überprüft wurde, ist nicht klar, ob auch eine verstärkte Aktivierung des CnA/NFAT-Signalwegs vorliegt. Es wird davon ausgegangen, dass der CnA/NFAT-Hypertrophie-Signalweg gehemmt wird, wenn CnA an der Z-Scheibe nicht an MLP binden kann (Heineke *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2008). Da CnA jedoch nicht nur an der Z-Scheibe lokalisiert ist, sondern z.B. auch an der Zellmembran, wo es mit L-Typ Ca²⁺-Kanälen sowie dem Ca²⁺ und Integrin bindenden Protein 1 (CIB1) interagiert (Heineke *et al.*, 2010_B; Tandan *et al.*, 2009), könnte CnA vermutlich auch in Abwesenheit von MLP aktiviert werden. Für diese Annahme spricht die gefundene Erhöhung der CnAβ Expression im MLP^{-/-}, da diese Expression einem positiven Feedbackmechanismus unterliegt, der durch hypertrophe Stimulation ausgelöst und durch GATA4 sowie NFAT reguliert wird (Oka *et al.*, 2005). Demzufolge könnte theoretisch auch eine Aktivierung des CnA/NFAT-Signalwegs zur DCM Entwicklung im MLP^{-/-} beigetragen haben. Dagegen spricht jedoch, dass der MLP/CnAβ DKO zu einer dramatischen Verschlechterung des MLP^{-/-}-Phänotyps führt. Die Ergebnisse aus Studien an der MLP/CnAβ DKO Maus legen nahe, dass CnAβ im MLP^{-/-} unter Umständen kardioprotektiv wirken könnte (Heineke *et al.*, 2010_A). Zusammenfassend ist im MLP^{-/-} die Expression von CnAβ sowie NFAT3 erhöht, was darauf hindeutet, dass der CnA/NFAT-Signalweg möglicherweise trotz MLP-Defizienz aktiviert wurde.

Desmin gehört zu den wenigen Proteinen, die bereits in eine Woche alten MLP^{-/-} Herzen verändert waren. Ebenfalls bereits nach einer Woche dysreguliert waren die Chaperone HSPB1 und CRYAB, die Cytoskelett-assoziierten Proteine FHL-1 und PGM5 sowie zwei mitochondriale Proteine. Änderungen der Expression sowie der post-translationalen Modifikation von HSPB1, CRYAB, Desmin und FHL-1 werden mit der Entstehung von DCM in Verbindung gebracht (Bullard *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2001; Goldfarb & Dalakas, 2009; Knowlton *et al.*, 1998; Scheler *et al.*, 1999; Sheikh *et al.*, 2008; Weisleder *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2000). Da eine Woche alte MLP^{-/-} Herzen noch keine DCM aufweisen, ist anzunehmen, dass die Dysregulation von HSPB1, CRYAB, Desmin und FHL-1 primär zur DCM Entwicklung im MLP^{-/-} Herzen beitragen könnte.

Den größten Effekt hatte der MLP^{-/-} auf die Expression der 32kDa Isoform von FHL-1 (bis zu >12-fach gesteigert). Lokalisationsstudien ergaben, dass das zusätzlich gebildete FHL-1 nicht in einem einzelnen Kompartiment akkumuliert, sondern sich auf mehrere zelluläre Kompartimente verteilt. Im Skelettmuskel bewirkt eine Steigerung der FHL-1 Expression hypertrophes Wachstum und diese FHL-1-abhängige Hypertrophie-Entwicklung kann durch Blockade der CnA-Aktivierung verhindert werden (Cowling *et al.*, 2008). CnAβ^{-/-} Herzen weisen keinen basalen Phänotypen auf, zeigen jedoch eine verminderte Hypertrophie-Induktionsfähigkeit (Bueno *et al.*, 2002; Heineke *et al.*, 2010_A). Da verglichen mit dem MLP^{-/-} die kardiale Dysfunktion im MLP/CnAβ-DKO verstärkt ist, stellte sich die Frage, ob im MLP/CnAβ-DKO eine ähnliche Erhöhung der FHL-1 Expression vorliegt wie im MLP^{-/-} (Heineke *et al.*, 2010_A). Die 32kDa Isoform von FHL-1 war in wt und CnAβ^{-/-} Herzen äußerst gering exprimiert. Der MLP/CnAβ-DKO wies jedoch eine vergleichbar hohe Expression der 32kDa Isoform von FHL-1 auf wie der MLP^{-/-}. Da nur zwei MLP/CnAβ-DKO Herzen für den Test zur Verfügung standen, war eine statistische Auswertung nicht möglich. Allerdings war der Unterschied zwischen MLP/CnAβ-DKO und wt bzw. CnAβ^{-/-} Herzen so groß, dass von einer extremen Steigerung der Expression der 32kDa Isoform von FHL-1 im MLP/CnAβ-DKO auszugehen ist.

Da FHL-1 u.a. den Raf1/MEK1/2/ERK2-Komplex an die Titin N2B_{US} rekrutiert (Sheikh *et al.*, 2008), wurde überprüft, ob der MLP^{-/-} auch die Expression von ERK1/2 beeinflusst. Die Expression von ERK1/2 war im MLP^{-/-} nahezu verdoppelt, weshalb anzunehmen war, dass möglicherweise auch eine verstärkte Aktivierung des ERK1/2 Hypertrophie-Signalweges vorlag. Da jedoch bekannt ist, dass eine Erhöhung der ERK1/2 Expression in der MLP^{-/-} Maus nicht unbedingt mit einer Steigerung der ERK1/2 Aktivität einhergeht (Heineke *et al.*, 2010_A), bleibt unbeantwortet ob im vorliegenden Falle eine Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs vorlag. In jedem Fall legen die Ergebnisse nahe, dass eine Verbindung zwischen dem MLP- und dem FHL-1-Signalweg besteht.

6.2 Die Titin-Degradation im MLP^{-/-} ist möglicherweise aufgrund einer Dysregulation von Chaperonen abgeschwächt

Chaperone erleichtern den Faltungsprozess von Polypeptiden, stabilisieren partiell entfaltete Proteine, verhindern Proteinaggregation und sind in die Proteindegradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System involviert (Su & Wang, 2010). CRYAB und HSPB1 unterstützen z.B. den Faltungsprozess von Desmin und interagieren mit Aktin sowie Titin (CRYAB) (Bennardini *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2007; Bullard *et al.*, 2004; Golenhofen *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2007). Angenommen wird, dass verschiedene Chaperone zur Aufrechterhaltung der Sarkomerstruktur beitragen (Willis *et al.*, 2009). Diese Annahme wird u.a. auch durch die Beobachtung gestützt, dass die Entstehung von DCM mit Veränderungen der Expression sowie posttranslationalen Modifikation von HSPB1, TCPG und CRYAB einher geht (Inagaki *et al.*, 2006; Knowlton *et al.*, 1998; Scheller, 1999; Vang *et al.*, 2005). Da diese drei Proteine im MLP^{-/-} dysreguliert waren, könnten strukturellen Veränderungen an der Z-Scheibe von MLP-defizienten Mäusen

u.a. auf eine Dysregulation dieser Chaperone zurückzuführen sein. Dazu passt auch, dass eine Störung der Titindegradation im MLP^{-/-} detektiert wurde.

Titin ist das größte bekannte Protein mit einem MW von bis zu 4,2MDa. Durch alternatives *Splicing* eines einzelnen Genproduktes entstehen verschiedene Titinisoformen, deren Komposition maßgeblich die passive Steifigkeit des Herzens beeinflusst. So wird z.B. im Laufe der Entwicklung die passive Steifigkeit des Herzens durch Veränderungen der Titinisoformen-Komposition moduliert (Linke, 2008). Embryonale und postnatale Herzen enthalten vorrangig die elastischen N2BA-Isoformen (~3,2 - 3,7MDa). Mit dem Fortschreiten der postnatalen Entwicklung verschiebt sich das Verhältnis der verschiedenen Titinisoformen weiter in Richtung der steiferen N2B-Isoform (~3MDa) bis im adulten Herzen schließlich die N2B Isoform dominiert (Linke, 2008; Opitz *et al.*, 2004; Opitz & Linke, 2005; Warren *et al.*, 2004). Auch die Entstehung von Herzerkrankungen geht mit Änderungen der Titinisoformen-Komposition einher (Linke, 2008; Guo *et al.*; 2010). Die exakten molekularen Mechanismen, die zum Umbau der Titinfilamente beitragen, sind noch weitgehend unverstanden. Vermutet wird jedoch, dass ein Austausch von Titinisoformen im Sarkomer zum verstärkten Auftreten von Titin-Degradationsprodukten, insbesondere dem sogenannten T2-Titin, führt. T2-Titin wird vermutlich durch proteolytische Spaltung innerhalb der Prolin- (P), Glutamat- (E), Valin- (V) und Lysin- (K) reichen Titin-Domäne (*PEVK-Domäne*) gebildet und besteht vorrangig aus dem im A-Band lokalisierten Titinbereich sowie der angrenzenden distalen Ig-Region. (Opitz *et al.*, 2004; Opitz & Linke, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass vier und zwölf Wochen alte MLP^{-/-} Herzen kein T2-Titin aufweisen. Auch vier und 12 Wochen alte heterozygote MLP *knock-out* Herzen, in denen die MLP Expression um 50% reduziert war, enthielten 60% weniger T2-Titin als der wt. Somit scheint die Expression von MLP die Degradation von Titin im adulten Mauserherzen maßgeblich zu beeinflussen. In eine Woche alten MLP^{-/-} Herzen war zwar T2-Titin nachweisbar, insgesamt enthielt der homozygote MLP *knock-out* jedoch nur halb so viel T2-Titin wie der wt. Demzufolge hängt sowohl die adulte als auch die postnatale Titin-Degradation von der MLP Expression ab. Wahrscheinlich ist, dass die veränderte Titindegradation ein Sekundäreffekt der MLP-Defizienz ist, der auf einer geänderten Interaktion zwischen Titin und verschiedenen Chaperonen basiert. Änderungen der Titin-Chaperon-Interaktion bei MLP^{-/-} könnte z.B. die PEVK-Domäne im Titin vor proteolytischer Spaltung schützen.

6.3 Bewirkt die MLP W4R Mutation die Entstehung von HCM?

Verschiedene Mutationen in MLP werden mit der Entstehung von DCM und HCM in Verbindung gebracht (Tab. 1) (Bos *et al.*, 2006; Knöll *et al.*, 2002; Knöll *et al.*, 2010; Hershberger *et al.*, 2008; Geier *et al.*, 2003; Mohapatra *et al.*, 2003). Unklar ist jedoch, ob für die Entstehung der Kardiomyopathie in den Patienten tatsächlich die Mutation in MLP der ausschlaggebende Faktor ist. Die W4R Mutation wurde z.B. nicht nur in Herzen von Kardiomyopathie-Patienten detektiert, sondern auch in Herzen von

(vermeintlich) gesunden Patienten (Bos *et al.*, 2006; Geier *et al.*, 2008). Deshalb wurde darüber diskutiert, ob - und wenn ja wie stark - die W4R Mutation in die Kardiomyopathie-Entstehung involviert ist (Bos *et al.*, 2006; Knöll *et al.*, 2002; Gehmlich *et al.*, 2008; Gehmlich *et al.*, 2010; Geier *et al.*, 2008; Gunkel *et al.*, 2010; Newman *et al.*, 2005).

Die genetische Ursache für die MLP W4R Mutation ist eine 10T→C (Tryptophan-4 → Arginin) *missense* Mutation in Exon 2 von *mlp*. Da Tryptophan-4 innerhalb der NH₂-terminalen T-Cap-Bindungsdomäne von MLP liegt, beeinflusst die W4R Mutation die Interaktion zwischen MLP und T-Cap negativ (Knoell *et al.*, 2002; Knoell *et al.*, 2010). Die Generierung einer MLP^{W4R/W4R} Maus sollte Aufschluss darüber geben, ob die MLP W4R Mutation Einfluss auf die Herzfunktion hat. MLP^{W4R/W4R} Mäuse zeigten im Alter von einem Jahr erste Anzeichen einer HCM (Knöll *et al.*, 2010). Sowohl in heterozygoten als auch homozygoten MLP W4R *knock-in* Herzen waren verglichen mit dem wt MLP-Transkription und -Translation vermindert. Zudem war MLP in den W4R *knock-in* Herzen verstärkt im Nukleus lokalisiert (Knöll *et al.*, 2010).

Durch einen 2-D DIGE-Vergleich von MLP^{W4R/W4R} und wt Mausherzen sollte überprüft werden, ob die MLP W4R Mutation HCM-assoziierte Proteomveränderungen bewirkt. Das Proteom von ein Jahr alten MLP^{W4R/W4R} Herzen unterschied sich deutlich von dem der wt Herzen. Da viele der veränderten 2-D Spots mehrere Proteine enthielten, konnten allerdings nur zwei Spots eindeutig einzelnen Proteinen zugeordnet werden: im MLP^{W4R/W4R} wurde eine substantielle Expressionssteigerung von Tropomyosin- α 1 und α -Aktinin-2 nachgewiesen. Tropomyosin- α 1 sowie α -Aktinin-2 sind im Sarkomer lokalisiert und Mutationen in diesen Proteinen führen zur Entstehung von chronischen Herzerkrankungen (Lakdawala *et al.*, 2010; Mörner *et al.*, 2003; Mohapatra *et al.*, 2003; Olson *et al.*, 2001; Rajan *et al.*, 2007). Bislang gibt es aber keinen zweifelsfreien Nachweis darüber, ob eine Expressionserhöhung der Proteine zur HCM Entwicklung beiträgt.

Die detektierten Proteomveränderungen im MLP^{W4R/W4R} deuten darauf hin, dass die MLP W4R Mutation auf lange Sicht eine Dysregulation von Sarkomer-Proteinen bewirkt. Demnach kann eine Aussage von Geier *et al.* (2008) nicht unterstützt werden, wonach die MLP W4R Mutation keinen Einfluss auf die Entstehung von Kardiomyopathien haben könne. Aufgrund der langen Zeit, die im MLP^{W4R/W4R} bis zum Auftreten der ersten Krankheitssymptome verging, stellt sich jedoch weiterhin die Frage, ob die MLP W4R Mutation der alleinige Auslöser für die HCM Entwicklung ist.

6.4 Die MLP S95 Phosphorylierung wird über den MAPK- sowie den CnA-Signalweg reguliert und ist Teil des kardialen Hypertrophie-Signalweges

MLP ist vermutlich Teil eines putativen kardialen Stress-Sensors, dessen Dysregulation mit der Entstehung von chronischen Herzerkrankungen in Verbindung gebracht wird (Knöll *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2006; Heineke & Molkentin, 2006; Gunkel *et al.*, 2010; Voelkel & Linke, 2011). Bislang sind die molekularen Mechanismen, die zur Regulation der MLP-Funktion sowie der MLP-abhängigen Signaltransduktion beitragen, weitestgehend unbekannt. Die Funktion vieler Proteine wird maßgeblich über posttranslationale

Modifikationen reguliert, weshalb angenommen wurde, dass auch die Regulation der MLP-Funktion über posttranslationale Modifikationen erfolgen könnte (Gehmlich *et al.*, 2008; Geier *et al.*, 2008; Gunkel *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2008; Hoffert & Knepper, 2008; Jungblut & Schlüter, 2011; Knöll *et al.*, 2010; Übersax & Ferrell, 2007). Ziel dieser Arbeit war es, bislang unbekannte posttranslationale Modifikationen im kardialen MLP zu identifizieren und zu charakterisieren. Auf diesem Weg sollten Hinweise auf die molekularen Regulationsmechanismen erlangt werden, die an der MLP-abhängigen Signalweiterleitung beteiligt sind.

Eine massenspektrometrische Analyse von 2-D Gel-Spots ergab, dass murines MLP in fünf verschiedene Spots mit unterschiedlichem pI und gleichem MW separiert. Ein solches Spot-Muster ist charakteristisch für mehrfach posttranslational modifizierte Proteine. Sofern davon ausgegangen wird, dass ein Spot ausschließlich unmodifiziertes MLP enthält, müssten demnach mindestens vier Kombinationen aus posttranslationalen Modifikationen im adulten Mausherzen existieren. Es gibt mehr als 300 verschiedene Formen von posttranslationalen Modifikationen, die der Regulation verschiedener Proteinfunktionen dienen. Die am besten charakterisierte und gleichzeitig verbreitetste Modifikation ist die Phosphorylierung der Aminosäuren Serin, Tyrosin und Threonin (Mirza & Olivier, 2008; Übersax & Ferrell, 2007). Da die Proteinsequenz von MLP einige potentielle Phosphorylierungsstellen aufweist, wurde zunächst überprüft, ob kardiales MLP phosphoryliert ist. Eine Phosphatasebehandlung von kardialem Proteinextrakt reduzierte die MLP-Spotanzahl von fünf auf ein bis zwei Spots. Damit konnte die Existenz von Phosphorylierungen im kardialen MLP eindeutig nachgewiesen werden. Darüber hinaus impliziert die starke Reduktion der Spotanzahl, dass die meisten posttranslationalen Modifikationen in MLP Phosphorylierungen sind.

Durch eine vMALDI-Analyse wurde eine Phosphorylierung von MLP an S95 identifiziert. Interessanterweise wurde vor kurzem auch in humaner Skelettmuskulatur eine Phosphorylierung von MLP an S95 detektiert, die bislang nicht näher untersucht wurde (Højlund *et al.*, 2009). Demnach beeinflusst die S95 Phosphorylierung die MLP-Funktion wahrscheinlich nicht nur im Herzen, sondern auch im Skelettmuskel.

In Mausherzen wurde eine Phosphorylierung an S95-MLP in den vier Spots mit den niedrigsten pI-Werten detektiert. Der MLP-Spot mit dem höchsten pI (M1) wies diese Phosphorylierung nicht auf, was zu erwarten war, da Phosphatgruppen den pI eines Proteins reduzieren. Generell enthalten die meisten Phosphoproteine mehrere Phosphorylierungsstellen (Mann *et al.*, 2002). Da vier von fünf MLP-Spots an S95 phosphoryliert waren, trifft dies vermutlich auch auf MLP zu. Wahrscheinlich konnten durch die vMaldi-Analyse also nicht alle MLP Phosphorylierungsstellen detektiert werden. Dies wäre nicht ungewöhnlich, da die massenspektrometrische Identifikation von Phosphorylierungsstellen von vielen Faktoren abhängt und deshalb noch immer eine große Herausforderung darstellt. Zu diesen Faktoren zählen u.a. der Gehalt an phosphorylierten Peptiden in der Probe, die Instabilität der angelagerten Phosphatgruppen, das zur Peptidherstellung verwendete Detergens, die Länge der Peptide und die Sensitivität des verwendeten Massenspektrometers (Hoffert & Knepper, 2008; Jungblut & Schlüter, 2011; Mann *et al.*, 2002; Mirza & Olivier, 2008; Palumbo & Reid, 2008; Salih, 2005).

Durch Verwendung von TiO_2 -Pipettenspitzen wurde versucht die in der Probe enthaltenen Phosphopeptide anzureichern. Die Effektivität dieser Methode ist jedoch sehr begrenzt. Eine Anreicherung von Phosphopeptiden durch eine effizientere chromatographische Methode, wie z.B. HPLC oder immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) (Hoffert & Knepper, 2008), war im Rahmen dieser Studie leider nicht möglich. Ein weiteres Problem bei der massenspektrometrischen Identifikation von Phosphorylierungsstellen ist die negative Ladung der Phosphatgruppe, welche die Ionisierbarkeit der Peptide vermindert. Infolge dessen sind Phosphopeptide schlechter detektierbar als unphosphorylierte Peptide (Mirza & Olivier, 2008). Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass weitere Phosphorylierungen im kardialen MLP existieren. Diese Annahme wurde kürzlich auch durch die Ergebnisse eines Phosphoproteom-Screens bestätigt, bei dem eine weitere Phosphorylierung im kardialen MLP an Thr-84 (T84) nachgewiesen wurde (Huttlin *et al.*, 2010).

Die statistische Auswertung der MLP-Spot Signalintensitäten ergab, dass ca. 97% des adulten kardialen Maus-MLP an S95 phosphoryliert ist. Auch die Ergebnisse von Immunfluoreszenzfärbungen an NRVM sowie von subzellulären Fraktionierungen des kardialen Mausproteoms untermauern die Annahme, dass kardiales MLP nahezu vollständig an S95 phosphoryliert ist. Sowohl MLP als auch das an S95 phosphorylierte MLP wurden im Cytoplasma, dem Nukleus, dem Sarkomer und an der Membran (inklusive Glanzstreifen und Stressfasern) nachgewiesen. Daher muss der von Geier *et al.* (2008) sowie Gehmlich *et al.* (2008) postulierten vorrangig cytoplasmatischen Lokalisation von MLP widersprochen werden. Meine Ergebnisse untermauern die von Gunkel *et al.* (2009) angeführten Argumente für die Involvierung von MLP in Myofibrillen-assoziierte Mechanismen zur Signalweiterleitung. Der hohe Gesamtanteil an S95 phosphoryliertem MLP im Herzen deutet darauf hin, dass die S95 Phosphorylierung möglicherweise eine besondere Bedeutung für die Struktur und/oder Funktion von MLP haben könnte.

Ein wichtiger Indikator für die funktionale Relevanz einer Phosphorylierung ist, wenn die phosphorylierte Aminosäure in verschiedenen Spezies konserviert ist. Da die S95 Phosphorylierung von MLP in Mensch, Hund, Maus, Ratte und Rind nachgewiesen wurde, scheint sie der Regulation einer wichtigen speziesübergreifenden Funktion von MLP zu dienen. Dafür spricht auch, dass die S95 Phosphorylierung bereits im embryonalen Herzen nachweisbar war. Die detektierten Unterschiede in der S95 Phosphorylierung von MLP in embryonalen und neonatalen Herzen deuten darauf hin, dass der S95-Phosphorylierungsanteil u.a. entwicklungsbedingt reguliert wird.

Im Allgemeinen wird die Funktion von Phosphoproteinen durch ein balanciertes Zusammenspiel zwischen Kinasen und Phosphatasen reguliert (McConnell & Wadzinski, 2009). Mittels Autoradiographie sowie einem Phospho-spezifischen MLP-Antikörper wurde nachgewiesen, dass rekombinantes MLP durch $\text{PKC}\epsilon$ und ERK1/2 phosphorylierbar ist.

Interessanterweise wurde die $\text{PKC}\epsilon$ -vermittelte Phosphorylierung von rekombinantem humanem MLP durch eine S95A Mutation gesteigert. Dieses Ergebnis ist erklärbar mit

dem Vorhandensein weiterer potentieller PKC-abhängiger Phosphorylierungsstellen an Threonin-103, Threonin-104 und Serin-105 im MLP, die z.B. durch die Programme *NetPhosK 1.0* und *GPS 2.0* vorhergesagt wurden. Die S95A Mutation könnte die Phosphorylierung dieser anderen Stellen begünstigen. Deutlich wurde, dass die PKC ϵ -abhängige MLP Phosphorylierung bei Fehlen von Serin-46 (S46) deutlich um 50% vermindert ist. Demnach phosphoryliert PKC ϵ MLP *in vitro* an S46. Da auch in Abwesenheit von S46 noch MLP Phosphorylierung detektierbar war, ist anzunehmen, dass PKC ϵ MLP noch an weiteren Stellen phosphoryliert.

Im Rahmen einer Proteom-Studie wurde MLP als Teil eines nicht näher charakterisierten PKC ϵ -Signal-Komplexes identifiziert (Edmondson *et al.*, 2002). Demnach könnte die S46 Phosphorylierung von MLP auch *in vivo* durch PKC ϵ -vermittelt werden. Möglicherweise dient die MLP/PKC ϵ -Interaktion der Regulation der MLP Phosphorylierung an S46. Um diese Annahme zu überprüfen, wären die Entwicklung eines phosphorylierungsspezifischen MLP S46 Antikörpers (P-S46 MLP) sowie die *in vivo* Charakterisierung der S46 Phosphorylierung sinnvoll. Ein vielversprechender Ansatz für die funktionelle Analyse der S46 Phosphorylierung wäre z.B. die Untersuchung von PKC ϵ ^{-/-} Mäusen. Die Analyse könnte aufzeigen, ob die PKC ϵ -vermittelte Phosphorylierung die Protein-Protein-Interaktionen und die Lokalisation von MLP beeinflusst. Mit Hilfe eines P-S46 MLP Antikörpers könnte u.a. überprüft werden, ob die S46 Phosphorylierung auch durch andere PKC Isoformen vermittelt werden kann.

Da sowohl S46 als auch die umliegenden Aminosäuren im MLP verschiedener Spezies konserviert sind, sollte auch die S46 Phosphorylierung von MLP unter den Säuger-species erhalten sein. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass eine S46 Mutation in MLP bei humanen HCM-Patienten nachgewiesen wurde (Geier *et al.*, 2003). Zudem führt die Aktivierung des PKC ϵ -Signalweges dosis-abhängig zur Entstehung von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Murphy & Frishman, 2005). Allerdings können die Aktivierung und Translokation von PKC ϵ auch kardioprotektiv wirken und mit der Entstehung von physiologischer Hypertrophie assoziiert sein (Budasz *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000). Wird die PKC ϵ -Aktivierung oder -Translokation blockiert, entwickelt sich eine maladaptive Hypertrophie mit letalem Ausgang (Chen *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000). Die PKC ϵ ^{-/-} Maus zeigt keine Abnormitäten in ihrer kardialen Entwicklung (Khasar *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2005). Demnach ist die PKC ϵ -vermittelte S46 Phosphorylierung vermutlich nicht in die Regulation von Myogenese und Differenzierung involviert. Um die Funktion der MLP Phosphorylierung an S46 aufzudecken wäre die Generierung eines MLP *knock-in* Mausmodells (z.B. S46A Maus) sinnvoll. Durch eine Phänotypisierung sowie die Analyse des Proteoms von homozygoten und heterozygoten S46A *knock-in* Herzen könnte möglicherweise die molekulare Funktion der S46 Phosphorylierung von MLP identifiziert werden.

Die ERK2-vermittelte Phosphorylierung in der S95A MLP-Mutante war um über 90% vermindert. Somit ist klar, dass ERK2 die S95 Phosphorylierung von MLP vermittelt. Die ERK2-Spezifität der MLP S95 Phosphorylierung wurde auch unter Verwendung des P-S95 MLP Antikörpers in Western Blots bestätigt. Darüber hinaus wurde in Western Blots nachgewiesen, dass auch ERK1 MLP an S95 phosphoryliert. Da die Aktivität von

ERK1/2 durch den MAPK-Signalweg reguliert wird, wurde überprüft, ob die MLP S95 Phosphorylierung durch den MAPK-Signalweg moduliert werden kann. ERK1/2 werden generell durch Stress sowie GPCR-Agonisten-induzierte hypertrophe Stimulation aktiviert (Kehat & Molkentin, 2010). Die Behandlung von Kardiomyozyten mit dem hypertrophen Stimulans ET-1 führt nicht nur zur Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs, sondern auch zu einer Expressionssteigerung von MLP (Heineke *et al.*, 2003; Kehat & Molkentin, 2010). In Zellkulturexperimenten konnte dieser Effekt von ET-1 auf NRVM bestätigt werden. Darüber hinaus bewirkte die ET-1-Behandlung auch einen Anstieg der MLP S95 Phosphorylierung. Da die Steigerung der S95 Phosphorylierung jedoch analog zum Anstieg der MLP Expression erfolgte, änderte sich der Anteil von phosphoryliertem MLP am Gesamt-MLP Gehalt nicht. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist eine relativ hohe Ausgangsphosphorylierung von MLP in neonatalen Kardiomyozyten. Sofern der Gehalt an S95 phosphoryliertem MLP in neonatalen Herzen - ähnlich wie in adulten Herzen - nahezu 100% betrüge, würde keine weitere Steigerung möglich sein.

Um eine MAPK-abhängige Regulation der MLP S95 Phosphorylierung nachzuweisen, war es sinnvoll den MAPK-Signalweg zu blockieren. Wie erwartet, wurde die Phosphorylierung von MLP an S95 in NRVM durch die Behandlung mit einem Raf-1-Inhibitor vermindert. Hierdurch wurde bewiesen, dass der MAPK-Signalweg die MLP S95 Phosphorylierung reguliert.

Überraschenderweise bewirkte die Behandlung mit dem Raf-1-Inhibitor auch eine starke Abnahme des zellulären MLP-Gehalts. Prinzipiell könnte dieser Effekt entweder durch eine gesteigerte MLP-Degradation oder durch eine verringerte MLP Transkription bzw. Translation hervorgerufen worden sein. Blockiert man die Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Komplexes, so führt dies zu einer Steigerung der zellulären Stickstoffmonoxid (NO) Bildung (Cale & Bird, 2006; Rabkin & Tsang, 2008). Eine verstärkte NO-Bildung wiederum unterdrückt die Expression von MLP (Heineke *et al.*, 2003). Dieser Effekt wurde sowohl in Zellkulturexperimenten als auch in den linken Ventrikeln von DCM Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz nachgewiesen (Heineke *et al.*, 2003). Die Verminderung der MLP Expression in den Raf-1-Inhibitor behandelten NRVM könnte also theoretisch auf eine Steigerung der NO-Bildung zurückzuführen sein. Dagegen spricht allerdings, dass der MLP-Gehalt bereits 30 Minuten nach Behandlung mit dem Raf-1-Inhibitor drastisch reduziert war. Diese relativ kurze Zeitspanne lässt vermuten, dass eher eine verstärkte MLP-Degradation die Ursache für den MLP-Verlust gewesen sein könnte.

Da der Verlust an MLP mit einer Reduktion der MLP S95 Phosphorylierung einher ging, könnte die S95 Phosphorylierung auch als Degradationsschutz für MLP fungieren. Generell können Phosphorylierungen die Halbwertszeit eines Proteins beeinflussen: sie können die Konformation eines Proteins dahingehend verändern, dass die Bindung von Degradations-vermittelnden Proteinen entweder unterstützt oder unterbunden wird (Colombo *et al.*, 2009; Coronella-Wood *et al.*, 2004; Kessler & Edelmann, 2011; McConnell & Wadzinski, 2009; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Da MLP nahezu vollständig an S95 phosphoryliert ist, wäre das unphosphorylierte MLP möglicherweise nicht in der Lage, seine spezifische Funktion zu erfüllen. Eine Degradation von unphosphoryliertem MLP

könnte dann die Folge einer anhaltend verminderten S95 Phosphorylierung sein. Dazu passt ebenfalls, dass in humanen DCM Herzen mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz eine 50%ige Reduktion des MLP-Proteingehalts nachgewiesen wurde. Da die Transkription von MLP in den DCM Herzen unverändert war, wurde vermutet, dass eine verstärkte MLP-Degradation die Ursache für den Verlust an MLP sein könnte (Zolk *et al.*, 2000).

Der auf den Zellkulturexperimenten basierenden Annahme, dass unphosphoryliertes MLP verstärkt degradiert wird, scheint zu widersprechen, dass DHF-Hundeherzen trotz verminderter S95 Phosphorylierung verglichen mit gesunden Herzen keine Änderung des MLP-Gehalts aufwiesen.

Für die Raf-1-Inhibitor-vermittelte Reduktion des zellulären MLP-Gehalts in NRVM gibt es zwei mögliche Erklärungen:

1. Nebeneffekte der Blockade des MAPK-Signalwegs könnten die Degradation von MLP ausgelöst haben oder
2. die phosphorylierungsabhängigen molekularen Mechanismen, welche die Funktion und/oder Degradation von MLP regulieren, könnten durch ein diffiziles Zusammenspiel von verschiedenen posttranslationalen Modifikationen in MLP moduliert werden. Dafür spricht, dass die Funktion, Lokalisation und Degradation eines Proteins häufig durch die gleichzeitige Modulation mehrerer posttranslationaler Modifikationen erfolgt. Dies gilt insbesondere für Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen (Hunter, 2007; Kessler & Edelmann, 2011).

Für die zweite Erklärung spricht, dass MLP gemäß einer Vorhersage mit dem Programm *UbPred* eine potentielle Ubiquitinierungsstelle an Lysin-97 aufweist (Radivojac *et al.*, 2010). Ubiquitinierungen dienen vorrangig der Markierung von Proteinen für die Degradation durch den Ubiquitin-Proteasom-Komplex, können allerdings auch die Weiterleitung von extrazellulären Signalen im Rahmen verschiedener Signalkaskaden regulieren oder Protein-Protein-Interaktionen modulieren (Colombo *et al.*, 2009; Coronella-Wood *et al.*, 2004; Hochrainer & Lipp, 2007; Hunter, 2007; Kessler & Edelmann, 2011; Su & Wang, 2010; Welchman *et al.*, 2005). Eine verminderte Phosphorylierung von MLP an S95 könnte die Ubiquitinierung von Lysin-97 positiv beeinflussen. Der veränderte Ubiquitinierungsstatus könnte die Degradation von MLP zur Folge haben.

Ob der Verlust der MLP S95 Phosphorylierung zu einer verstärkten Degradation von MLP führt und ob die S95 Phosphorylierung gleichzeitig Einfluss auf weitere posttranslationale Modifikationen in MLP hat, könnte durch die Analyse einer MLP S95A *knock-in* Maus untersucht werden. Zudem sollte die S95 Phosphorylierung von MLP in humanen DCM Herzen mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz und verminderter MLP Expression überprüft werden.

Neben einer potentiellen Schutzfunktion vor Degradation war anzunehmen, dass die S95 Phosphorylierung auch eine Rolle bei der Interaktion von MLP und Cofilin spielen könnte, durch welche die F-Aktin-Depolymerisations-Geschwindigkeit reguliert wird (Papalouka *et al.*, 2009). Da die S95 Phosphorylierungsstelle in der CFL-2-Bindungsse-

quenz von MLP lokalisiert ist, könnte eine verminderte S95 Phosphorylierung potentiell zur Dysregulation der F-Aktin-Depolymerisation und damit zur Entstehung von kardialer Hypertrophie führen (Papalouka *et al.*, 2009). Eine *in vitro* Interaktionsstudie zwischen rekombinantem humanem CFL-2 und unphosphoryliertem bzw. S95 phosphoryliertem MLP ergab jedoch, dass die S95 Phosphorylierung in MLP keinen Einfluss auf die MLP/CFL-2-Interaktion hat. Demnach ist anzunehmen, dass die S95 Phosphorylierung in MLP keinen Einfluss auf die F-Aktin-Depolymerisation hat.

ERK2 und MLP sind gemäß einer *two-hybrid* Analyse an 10T1/2 Fibroblasten keine direkten Bindungspartner (Purcell *et al.*, 2004). Daher stellt sich die Frage, wie ERK2 die MLP Phosphorylierung vermitteln kann. Die Substratbindung und -erkennung der meisten Kinasen erfolgt durch Interaktion mit den vier die Phosphorylierungsstelle flankierenden Aminosäuren (Pinna & Ruzzene, 1996). ERK1/2 phosphoryliert Proteine an Serin- oder Threonin-Resten, wobei die Konsensus-Phosphorylierungsstellen *Prolin-X-Serin/Threonin* oder *Serin/Threonin-Prolin* lauten (X: jede beliebige Aminosäure) (Cale & Bird, 2006). Substrate von ERK1/2 weisen zudem oft ein Kinase-Interaktionsmotiv und/oder eine ERK1/2-Andockstelle auf (Burkhard *et al.*, 2011; Übersax & Ferrell, 2007; Vomastek *et al.*, 2008). Das Ergebnis einer Analyse der humanen MLP Sequenz mit dem Programm *GPS 2.1* sagte voraus, dass MLP von ERK1/2 an S95 phosphoryliert werden kann. ERK1/2 phosphoryliert insgesamt mehr als 100 Substrate, wobei viele unterschiedliche Regulationsmechanismen involviert sind. Zu diesen Mechanismen gehören u.a. die Kontrolle der ERK1/2-Aktivierung durch interaktionsvermittelnde Proteine sowie die Kolokalisation mit dem Substrat durch Bindung an Ankerproteine (Ramos, 2008). Demnach ist es nicht ungewöhnlich, dass ERK1/2 ein Protein phosphoryliert, mit dem es keine direkte Bindung eingeht. Wahrscheinlich wird auch die ERK1/2-abhängige MLP S95 Phosphorylierung durch Ankerproteine, die mit MLP kolokalisieren, oder durch gemeinsame Bindungspartner vermittelt. Ein gemeinsamer Bindungspartner von MLP und ERK1/2 ist z.B. CnA (Heineke *et al.*, 2005; Sanna *et al.*, 2005). Da CnA eine antagonistische Wirkung auf die ERK1/2-vermittelte MLP S95 Phosphorylierung hat, ist es allerdings unwahrscheinlich, dass CnA die MLP/ERK1/2-Interaktion bzw. die MLP Phosphorylierung positiv befördert. Ein weiterer Kandidat zur Vermittlung der Interaktion ist das LIM-Protein FHL-1, da es sowohl mit ERK1/2 (Sheikh *et al.*, 2008) als auch mit dem MLP-Signalweg assoziiert ist. Da jedoch weder die MLP Expression noch die S95 Phosphorylierung in FHL-1^{-/-} Herzen verändert waren, ist FHL-1 wahrscheinlich nicht an der Vermittlung der MLP/ERK2-Interaktion beteiligt. Somit ist nach wie vor unklar, durch welche Mechanismen die MLP/ERK2-Interaktion vermittelt wird.

Die Funktion von Phosphoproteinen wird nicht nur durch Phosphorylierung reguliert, sondern auch durch die Phosphatase-vermittelte Dephosphorylierung (McConnell & Wadzinski, 2009; Olsen, 2006). Bislang wurden im Menschen mehr als 400 Serin/Threonin Kinasen identifiziert, jedoch nur ca. 30 Serin/Threonin Phosphatasen (Shi, 2009). Phosphatasen besitzen offenbar keine besondere Spezifität für Sequenzen oder Konsensusmotive und eine Dephosphorylierungsreaktion findet nur dann statt, wenn eine direkte Bindung der Phosphatase an das Substrat vorliegt (McConnell & Wadzinski, 2009; Virshup & Shenolikar, 2009). Ein direkter Bindungspartner von MLP ist die

Serin/Threonin Phosphatase CnA. Bislang wurde angenommen, dass die Bindung von CnA an MLP eine strukturelle Bedeutung hat und der Regulation des CnA/NFAT-Signalwegs dient (Heineke *et al.*, 2005). Nach der Identifikation der MLP Phosphorylierung an S95 lag die Vermutung nahe, dass die MLP/CnA-Interaktion zusätzlich der Regulation der MLP S95 Phosphorylierung dienen könnte. Einen ersten Hinweis darauf ergab die erhöhte MLP S95 Phosphorylierung in murinen CnA $\beta^{-/-}$ Herzen. Einen eindeutigen Nachweis der CnA-vermittelten Dephosphorylierung von MLP S95 lieferten dann *in vitro* Experimente, bei denen die MLP S95 Phosphorylierung durch Inkubation mit aktivem CnA drastisch vermindert werden konnte. Folglich wird die MLP S95 Dephosphorylierung durch den CnA-Signalweg reguliert. Die Interaktion von CnA und MLP dient demnach nicht nur der Z-Scheiben-Lokalisation von CnA bzw. der Aktivierung des CnA/NFAT-Signalwegs, sondern auch der Regulation der Phosphorylierung von MLP an S95. Da Phosphatasen ihre Substrate in der Regel an mehreren Stellen dephosphorylieren können, wäre zu überprüfen ob CnA MLP auch an der erst kürzlich identifizierten Phosphorylierungsstelle an T84 (Huttlin *et al.*, 2010) und an S46 dephosphoryliert.

Der Phosphorylierungsstatus eines Phosphoproteins ist für dessen Funktion von entscheidender Bedeutung. Daher führt die Dysregulation von Kinase- und/oder Phosphatase-Aktivität im Herzen zur Entstehung von Herzerkrankungen (McConnell & Wadzinski, 2009). Da die MLP S95 Phosphorylierung durch ERK1/2 und CnA reguliert wird, war anzunehmen, dass Herzerkrankungen, die auf eine Dysregulation von CnA und/oder ERK1/2 zurückzuführen sind, mit Veränderungen der MLP S95 Phosphorylierung einhergehen. Auch Änderungen der MLP Expression werden mit der Entstehung von chronischen Herzerkrankungen in Verbindung gebracht. Aus diesem Grund untersuchte ich, ob die MLP S95 Phosphorylierung auch in Herzen mit chronischen Erkrankungen verändert ist. In humanen Herzen ist die Entstehung von kompensatorischer Hypertrophie und Herzinsuffizienz mit einer erhöhten CnA-Expression und -Aktivität assoziiert (Diedrichs *et al.*, 2007; Haq *et al.*, 2001; Ritter *et al.*, 2002). Expression und Aktivität von ERK1/2 sind in Herzen mit kompensatorischer Hypertrophie unverändert, in insuffizienten Herzen jedoch gesteigert (Haq *et al.*, 2001; Kehat & Molkentin, 2010).

Um zu überprüfen, ob die MLP S95 Phosphorylierung bei kardialer Hypertrophie verändert ist, wurden hypertrophe Hundeherzen analysiert, die einen mit dem Menschen vergleichbaren DHF-Phänotypen aufweisen (Munagala *et al.*, 2005; Shapiro *et al.*, 2007). Analog zu humanen Patienten mit kompensatorischer Hypertrophie wurde in den hypertrophen Hundeherzen mit DHF eine gesteigerte CnA β Expression nachgewiesen, während ERK1/2-Expression und -Phosphorylierung unverändert waren. Gleichzeitig wurde eine 40%ige Reduktion der MLP S95 Phosphorylierung detektiert, die wahrscheinlich auf die gesteigerte CnA β Expression zurückzuführen ist. Eine tendenziell erhöhte MLP-Expression im DHF-Hundemodell könnte ebenfalls mit der erhöhten CnA-Expression zusammenhängen, da CnA durch die Interaktion mit MEF2C auch ein indirekter Positivregulator der MLP Expression ist (da Costa *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2009; Stronach *et al.*, 1999). Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass MLP in Herzen mit kompensatorischer Hypertrophie und diastolischer Herzinsuffizienz verstärkt an S95 dephosphoryliert wird.

Die Aktivierung des CnA/NFAT-Signalwegs führt nicht nur zur Entstehung von pathologischer, sondern auch von physiologischer Hypertrophie (Eto *et al.*, 2000; Kolwicz *et al.*, 2009). Demnach könnte die MLP S95 Phosphorylierung in Herzen mit physiologischer Hypertrophie ebenfalls vermindert sein.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit belegen, dass die Phosphorylierung von MLP über den MAPK- sowie den CnA-Signalweg reguliert wird und dass eine Verminderung der Phosphorylierung von MLP an S95 mit der Entstehung von kardialer Hypertrophie einher geht. Eine Herausforderung für die nachfolgenden Experimente ist es, die Funktion und Bedeutung der MLP Phosphorylierungen im Detail zu identifizieren. Obgleich die Funktion der S95 Phosphorylierung hier noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass eine Regulation der MLP-Signalfunktion über Phosphorylierung eine Rolle innerhalb der Hypertrophie-Signalkaskaden des Herzens spielt.

7. Zusammenfassung

Das Z-Scheiben-Protein MLP ist ein Positivregulator der kardialen Myogenese und potentieller Bestandteil eines Mechanosensor-Komplexes in Myozyten. Mutationen sowie Expressionsänderungen von MLP werden mit der Entstehung von chronischen Herzerkrankungen in Verbindung gebracht. Im Mausmodell führt ein homozygoter MLP *knock-out* zur DCM- und die MLP W4R Mutation zur HCM-Entwicklung. Bislang ist aber unklar, welche Mechanismen zur Regulation der MLP-abhängigen Signaltransduktion beitragen. Vermutet wird, dass posttranslationale Modifikationen in MLP in die Regulation involviert sind. Ziel dieser Arbeit war es, Faktoren bzw. Mechanismen zu identifizieren, die an der molekularen Regulation der MLP-abhängigen Signaltransduktion im Herzen beteiligt sind. Dafür wurden zwei Herangehensweisen gewählt.

1. Die Analyse des MLP^{-/-} sowie des MLP^{W4R/W4R} Mausmodells bezüglich kardialer Proteomveränderungen.
2. Die Identifikation und Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen im kardialen MLP.

2-D DIGE Analysen an MLP^{-/-} und wt Herzen ergaben, dass im MLP^{-/-} hauptsächlich Chaperone und Sarkomer-assoziierte Proteine sowie einige mitochondriale Proteine dysreguliert sind. Insgesamt wurden in ein, vier und zwölf Wochen alten MLP^{-/-} Herzen Veränderungen in mehr als 200 Proteinspots detektiert. 35 dieser Spots konnten 29 verschiedenen Proteinen eindeutig zugeordnet werden. Zu den am Sarkomer lokalisierten Proteinen, die im MLP^{-/-} verstärkt exprimiert wurden, gehörten vorrangig Z-Scheiben-Proteine (z.B. Desmin, CFL-2, Cypher-1, Calsarcin-1 und SRBS2). Dieses Ergebnis unterstreicht die enge Verknüpfung des MLP-Signalwegs mit der Z-Scheiben Region. Western Blots ergaben, dass auch die Expression von CnA β und NFAT3 im MLP^{-/-} erhöht war, was auf eine verstärkte Aktivierung des CnA/NFAT-Signalwegs hindeutet. Der Expressionsanstieg des CnA-Inhibitors Calsarcin-1 könnte vielleicht auf die Erhöhung des CnA β -Levels zurückzuführen sein. Da die Expression von SRBS2, Cypher, Calsarcin-1 und CFL-2 erst in vier und 12 Wochen alten MLP^{-/-} Herzen erhöht war, ist dieser Anstieg wahrscheinlich ein Sekundäreffekt der DCM-Entwicklung. Im Gegensatz dazu könnte die bereits nach einer Woche nachweisbare Dysregulation von HSPB1, CRYAB, Desmin und FHL-1 primär zur Entstehung der DCM beigetragen haben. Verglichen mit vier und 12 Wochen alten zeigten eine Woche alte MLP^{-/-} Herzen die geringste Anzahl an Proteinveränderungen. Interessanterweise war FHL-1 nicht nur eines der wenigen Proteine, die bereits vor Auftreten der DCM dysreguliert waren, sondern zeigte auch den größten Expressionsanstieg (>12-fach) aller detektierter Proteine. Dieses Ergebnis impliziert einerseits, dass eine Verbindung zwischen MLP- und FHL-1-Signalweg bestehen muss, und andererseits, dass FHL-1 vermutlich eine entscheidende Rolle bei der DCM-Entwicklung im MLP^{-/-} spielt.

Weitere Untersuchungen am MLP *knock-out* Mausmodell ergaben, dass die Defizienz von MLP die Titin-Degradation abschwächt. Möglicherweise ist die verminderte Titin-Degradation auf die Dysregulation verschiedener Chaperone im MLP^{-/-} zurückzuführen. Änderungen der Expression sowie der posttranslationalen Modifikation der Chaperone

könnte ihre Bindung an Titin beeinflussen und somit die proteolytische Spaltung von Titin z.B. in der PEVK-Domäne modulieren.

Anhand der Herzen von ein Jahr alten MLP^{W4R/W4R} Mäusen wurde untersucht, ob die MLP W4R Mutation HCM-assoziierte Proteomveränderungen zur Folge hat. 2-D DIGE Experimente ergaben, dass MLP^{W4R/W4R} Herzen eine erhöhte Expression von Tropomyosin- α 1 und α -Aktinin-2 aufweisen. Demnach führt die MLP W4R Mutation langfristig zur Dysregulation von Sarkomer-assoziierten Proteinen. Ein eindeutiger Beleg für eine HCM-Entwicklung im MLP^{W4R/W4R} Herzen konnte jedoch durch die 2-D DIGE Analyse nicht erbracht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zwei konservierte Phosphorylierungsstellen in MLP, an S95 und S46, identifiziert und charakterisiert. Zahlreiche Ergebnisse deuten außerdem auf die Existenz weiterer Phosphorylierungsstellen in MLP hin. MLP ist Bestandteil eines PKC ϵ -Signalkomplexes und *in vitro* Experimente belegen, dass PKC ϵ die Phosphorylierung von MLP an S46 vermittelt. Demnach ist anzunehmen, dass PKC ϵ MLP auch *in vivo* phosphoryliert. Der Verlust von S46 wird mit der Entstehung von HCM in Patienten in Verbindung gebracht. Weil PKC ϵ darüber hinaus ein Hypertrophie-assoziiertes Signalmolekül ist, könnte die S46 Phosphorylierung von MLP vielleicht in hypertrophe Signalmechanismen involviert sein.

Interessanterweise wird die Phosphorylierung von MLP an S95 gleich durch zwei hypertrophe Signalwege reguliert: ERK1/2 phosphoryliert und CnA dephosphoryliert MLP an S95. Demnach unterliegt der Phosphorylierungsstatus von MLP einem balancierten Zusammenspiel zwischen CnA- und MAPK-Signalweg. Die S95 Phosphorylierung tritt bereits im embryonalen Herzen auf und ihr Anteil am kardialen MLP scheint u.a. entwicklungsabhängig reguliert zu werden. Überraschenderweise verminderte die Blockade des MAPK-Signalwegs in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten nicht nur die S95 Phosphorylierung, sondern reduzierte auch den zellulären MLP-Gehalt. Da der MLP-Level bereits 30 Min nach Behandlung der Zellen drastisch reduziert war, ist dieser Effekt vermutlich eher auf eine gesteigerte MLP-Degradation zurückzuführen. Die Ursache hierfür könnte einerseits ein Nebeneffekt der Dysregulation des MAPK-Signalwegs sein. Andererseits könnte jedoch auch der Verlust der Phosphorylierung an S95 die Degradation von MLP bewirkt haben. In diesem Fall würde die Phosphorylierung an S95 MLP als Schutz vor Proteindegradation dienen. Da S95 innerhalb der MLP/Cofilin-2-Bindungsstelle liegt wurde vermutet, dass die S95 Phosphorylierung in die F-Aktin-Depolymerisation involviert sein könnte. Demnach war denkbar, dass eine verminderte S95 Phosphorylierung potentiell zu einer Dysregulation der F-Aktin-Depolymerisation führen und damit zur Entstehung von kardialer Hypertrophie beitragen könnte. Eine *in vitro* Interaktionsstudie ergab jedoch, dass die S95 Phosphorylierung die Bindung von MLP an Cofilin-2 nicht beeinflusst.

Die Funktion eines Phosphoproteins wird maßgeblich durch seinen Phosphorylierungsgrad beeinflusst. In adulten Mäusen waren ca. 97% des kardialen MLP an S95 phosphoryliert. Dieser hohe Phosphorylierungsanteil deutet darauf hin, dass die MLP-Funktion im adulten Herzen möglicherweise durch die Dephosphorylierung an S95

reguliert werden könnte. Da verschiedene Herzerkrankungen mit einer veränderten Aktivität von ERK1/2 und/oder CnA einher gehen, war anzunehmen, dass auch die S95 Phosphorylierung von MLP in erkrankten Herzen dysreguliert ist. In hypertrophen Hundeherzen mit diastolischer Herzinsuffizienz (DHF) wurde eine verstärkte CnA β Expression detektiert. Die ERK1/2-Expression sowie -Aktivierung waren unverändert. Gleichzeitig war die S95 Phosphorylierung von MLP in den DHF-Herzen um 40% vermindert. Die reduzierte MLP S95 Phosphorylierung im DHF könnte demnach auf eine verstärkte CnA-vermittelte Dephosphorylierung zurückzuführen sein.

Obschon die Funktion der MLP S95 Phosphorylierung nicht eindeutig geklärt werden konnte, machen diese Ergebnisse deutlich, dass sowohl der MAPK- als auch der CnA-Signalweg an der Regulation der molekularen Funktion von MLP beteiligt sein müssen. Darüber hinaus geht offenbar die Entwicklung von kardialer Hypertrophie mit einer Verminderung der MLP Phosphorylierung an S95 einher.

7.1 Abstract

Muscle lim protein (MLP) is a positive regulator of myogenesis and has been suggested to be part of a sarcomeric stress-sensor complex in myocytes. MLP mutations or deregulated expression levels of MLP are associated with the development of heart failure. MLP-null ($MLP^{-/-}$) mice develop a dilated cardiomyopathy (DCM) between 4 and 8 weeks after birth, and homozygous MLP W4R knock-in ($MLP^{W4R/W4R}$) mice display a hypertrophic cardiomyopathy (HCM) one year after birth. However, the underlying mechanisms contributing to the regulation of MLP-dependent signal transduction are poorly understood, although posttranslational modifications of MLP are thought to be involved. The aim of this study was to identify factors and mechanisms regulating MLP-dependent signal-transduction events in cardiomyocytes. Two different approaches were taken:

1. Comparison of the cardiac proteome from $MLP^{-/-}$ and $MLP^{W4R/W4R}$ mice with that of the corresponding wild type (wt) mice by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE);
2. Identification and characterization of posttranslational modifications in MLP.

$MLP^{-/-}$ hearts exhibited changes in the abundance of more than 200 proteins, compared to wt hearts. Out of 200 differentially expressed protein spots on 2-D DIGE gels, 35 were clearly assigned to 29 different proteins. Most of the dysregulated proteins in $MLP^{-/-}$ hearts were chaperones and sarcomeric or mitochondrial proteins. Many of the deregulated proteins were localized at the Z-disc, e.g., desmin, cofilin-2 (CFL-2), cypher-1, calsarcin-1 and sorbin and SH3 domain-containing protein 2 (SRBS2). This result supports the previously reported linkage between MLP-signaling and the Z-disc region. In Western blots a large increase in calcineurin beta ($CnA\beta$) and nuclear factor of activated T-cells 3 (NFAT3) expression levels was detected, indicating that the $CnA/NFAT$ -pathway might be activated in $MLP^{-/-}$ hearts. Presumably, the elevated $CnA\beta$ expression activated a regulatory feedback mechanism, which induced the up-regulation of calsarcin-1, a CnA -inhibitor. Increased SRBS2, cypher-1, calsarcin-1, and CFL-2 expression levels were detected in four and 12 week old $MLP^{-/-}$ hearts, but not in one week old $MLP^{-/-}$ hearts. Up-regulation of these proteins therefore was probably a secondary effect of DCM development. In contrast, the DCM-associated proteins, heat shock protein β 1 (HSPB1), α -B crystallin (CRYAB), desmin, and four-and-a-half lim domain protein 1 (FHL-1) were already dysregulated one week after birth. Hence, these proteins could be causative involved in the DCM development. Compared to four and 12 week old mice, one week old $MLP^{-/-}$ mice exhibited the smallest number of proteomic changes. FHL-1 was not only one of the few proteins already increased after one week, but it also showed the highest abundance increase (up to >12-fold) of all detected proteins. This result implies a linkage between MLP and FHL-1 signaling pathways. Furthermore, these data suggest that FHL-1 might be a crucial factor in the DCM-development of $MLP^{-/-}$ hearts.

Further analysis of the MLP knock-out mouse model revealed that loss of MLP resulted either in a reduction or in the inhibition of titin degradation. Expression and

posttranslational modifications of several chaperones were deregulated in MLP^{-/-} hearts. Hence, the increased stability of titin could presumably be caused by dysregulation of a chaperone-mediated protection of titin, perhaps within the PEVK domain.

Analyzing one year old MLP^{W4R/W4R} mouse hearts it was tested by 2-D DIGE, whether the W4R mutation causes HCM-associated changes within the cardiac proteome. MLP^{W4R/W4R} hearts showed an increased expression of tropomyosin- α 1 and α -actinin-2. Therefore, the W4R mutation resulted in the dysregulation of sarcomeric proteins.

In the second part of this study two conserved phosphorylation sites in MLP, at serine-46 (S46) and serine-95 (S95), were identified and characterized. Moreover, evidence for the existence of additional phosphorylation sites in MLP was found. In human hearts MLP participates in a sarcomeric protein kinase C ϵ (PKC ϵ) signaling complex of unknown function. *In vitro* experiments showed that PKC ϵ phosphorylates recombinant human MLP at S46. Therefore, it is likely that PKC ϵ mediates the S46 phosphorylation *in vivo*, as well. Notably, a mutation in S46 has been detected in HCM patients. Since PKC ϵ is a known regulator of hypertrophic signaling, the PKC ϵ -mediated S46 phosphorylation in MLP could be involved in hypertrophic signaling mechanisms.

Interestingly, the phosphorylation of MLP at S95 is regulated by two hypertrophic signaling pathways. Extracellular-signal-regulated kinase-1 and -2 (ERK1/2) phosphorylates and CnA dephosphorylates MLP at S95. Therefore, the S95 phosphorylation of MLP depends on a balanced interplay between the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and CnA pathways. The S95 phosphorylation was already detectable in embryonic hearts and was developmentally regulated. Treatment of cultured neonatal rat ventricular cardiomyocytes with a Raf-1-inhibitor to block MAPK signaling reduced the phosphorylation of MLP at S95. Surprisingly, this treatment also decreased the protein levels of MLP dramatically. This effect was already observable after 30 minutes of treatment. Therefore, the loss of MLP was probably the result of an increased MLP degradation. Possibly, the phosphorylation of S95 protects cardiac MLP from protein degradation. Another possible explanation is that inhibition of the MAPK signaling pathway primarily caused the MLP degradation. However, since S95 is part of the CFL-2 binding site in MLP, it was suggested that the S95 phosphorylation might also modulate the CFL-2/MLP interaction and this way the depolymerisation of F-actin. But since the S95 phosphorylation did not influence the binding of recombinant human MLP to recombinant human CFL-2 *in vitro* this hypothesis was not confirmed.

The function of a phosphoprotein is mainly regulated by its phosphorylation state. In adult mouse hearts about 97% of MLP were phosphorylated at S95. This high prevalence of phosphorylation in turn suggests that dephosphorylation of S95 might be a key mechanism in the modulation of the MLP function. Since both CnA and ERK1/2 are major players in cardiac hypertrophy and failure, the S95 phosphorylation in MLP could be dysregulated in hypertrophic or failing hearts, as well. In hypertensive dog hearts with compensated hypertrophy and diastolic heart failure (DHF), ERK1/2 expression and activity were unchanged, but CnA β expression was increased. Concomitant with this, the S95 phosphorylation of MLP was reduced by 40% in DHF.

Since CnA is also activated in physiologic hypertrophy, a decrease of cardiac S95 phosphorylation in MLP could be generally involved in the development of cardiac hypertrophy. Although the function of the S95 phosphorylation in MLP remains obscure, the results of this study suggest that the MAPK and the CnA pathways are involved in the regulation of the molecular function of MLP.

8. Literaturverzeichnis

- Agnetti, G., Bezstarosti, K., Dekkers, D.H., Verhoeven, A.J., Giordano, E., Guarnieri, C., Caldarera, C.M., van Eyk, J.E. & Lamers, J.M. Proteomic profiling of endothelin-1-stimulated hypertrophic cardiomyocytes reveals the increase of four different desmin species and alpha-B-crystallin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784 (7-8): 1068-1076 (2008).
- Akhter, S.A., Luttrell, L.M., Rockman, H.A., Iaccarino, G., Lefkowitz, R.J. & Koch, W.J. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science.* 280 (5363): 574-577 (1998).
- Akita, Y. Protein kinase C epsilon: multiple roles in the function of, and signaling mediated by, the cytoskeleton. *FEBS J.* 275 (16): 3995-4004 (2008).
- Aplin, A.E., Stewart, S.A., Assoian, R.K. & Juliano, R.L. Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J. Cell. Biol.* 153 (2): 273-282 (2001).
- Aramburu, J., Heitman, J. & Crabtree, G.R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. Workshop on the Calcium/Calcineurin/NFAT Pathway: Regulation and Function. *EMBO reports.* 5 (4): 343-348 (2004).
- Arber, S., Halder, G. & Caroni, P. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell.* 79 (2): 221-231 (1994).
- Arber, S. & Caroni, P. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev.* 10 (3): 289-300 (1996).
- Arber, S., Hunter, J.J., Ross, J. Jr., Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., Perriard, J.C., Chien, K.R. & Caroni, P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell.* 88 (3): 393-403 (1997).
- Arimura, T., Inagaki, N., Hayashi, T., Shichi, D., Sato, A., Hinohara, K., Vatta, M., Towbin, J.A., Chikamori, T., Yamashina, A. & Kimura, A. Impaired binding of ZASP/Cypher with phosphoglucomutase 1 is associated with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 83 (1): 80-88 (2009).
- Baines, C.P. & Molkentin, J.D. Stress signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38 (1): 47-62 (2005).
- Barnett, M.E., Madgwick, D.K. & Takemoto, D.J. Protein kinase C as a stress sensor. *Cell Signal.* 19 (9): 1820-1829 (2007).
- Bassel-Duby, R. & Olson, E.N. Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (4): 1133-1141 (2003).
- Battegay, E. (Hrsg.), Bakris, G.L. (Hrsg.) & Lip, G.Y.H. (Hrsg.). Hypertension: Principles and Practice. *Taylor & Francis Group*, Boca Raton, London, New York, Singapur; ISBN: 978-0-8247-2855-7 (2005).
- Benmerah, A., Scott, M., Poupon, V. & Marullo, S. Nuclear functions for plasma membrane-associated proteins? *Traffic.* 4 (8): 503-11 (2003).
- Bennardini, F., Wrzosek, A. & Chiesi, M. Alpha B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments. *Circ. Res.* 71 (2): 288-294 (1992).

- Berndt, C., Lillig, C.H. & Holmgren, A. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783 (4): 641-650 (2008).
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R. & Postel, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6 (4): 317-39 (1982).
- Blom, N., Gammeltoft, S., & Brunak, S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294 (5): 1351-1362 (1999).
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. & Brunak, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4 (6): 1633-1649 (2004).
- Boateng, S.Y., Belin, R.J., Geenen, D.L., Margulies, K.B., Martin, J.L., Hoshijima, M., de Tombe, P.P. & Russell, B. Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292 (1): H259-269 (2007).
- Boateng, S.Y. & Goldspink, P.H. Assembly and maintenance of the sarcomere night and day. *Cardiovasc. Res.* 77 (4): 667-675 (2008).
- Boateng, S.Y., Senyo, S.E., Qi, L., Goldspink, P.H. & Russell, B. Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47 (4): 426-435 (2009).
- Bos, J.M., Poley, R.N., Ny, M., Tester, D.J., Xu, X., Vatta, M., Towbin, J.A., Gersh, B.J., Ommen, S.R. & Ackerman, M.J. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol. Genet. Metab.* 88 (1): 78-85 (2006).
- Braz, J.C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T.F., Lorenz, J.N., Nairn, A.C., Liggett, S.B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E.G., DePaoli-Roach, A.A., Robbins, J., Hewett, T.E., Bibb, J.A., Westfall, M.V., Kranias, E.G. & Molkentin, J.D. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat. Med.* 10 (3): 248-254 (2004).
- Brown, S., McGrath, M.J., Ooms, L.M., Gurung, R., Maimone, M.M. & Mitchell, C.A. Characterization of two isoforms of the skeletal muscle LIM protein 1, SLIM1. Localization of SLIM1 at focal adhesions and the isoform slimmer in the nucleus of myoblasts and cytoplasm of myotubes suggests distinct roles in the cytoskeleton and in nuclear-cytoplasmic communication. *J. Biol. Chem.* 274 (38): 27083-27091 (1999).
- Brown, D.D., Christine, K.S., Showell, C. & Conlon, F.L. Small heat shock protein Hsp27 is required for proper heart tube formation. *Genesis* 45: 667-678 (2007).
- Budas, G.R., Churchill, E.N. & Mochly-Rosen, D. Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol. Res.* 55 (6): 523-536 (2007).
- Bueno, O.F., De Windt, L.J., Tymitz, K.M., Witt, S.A., Kimball, T.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Jones, S.P., Lefer, D.J., Peng, C.F., Kitsis, R.N. & Molkentin, J.D. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* 19 (23): 6341-6350 (2000).
- Bueno, O.F., Wilkins, B.J., Tymitz, K.M., Glascock, B.J., Kimball, T.F., Lorenz, J.N. & Molkentin, J.D. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin A beta-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (7): 4586-4591 (2002).

- Bueno, O.F., Lips, D.J., Kaiser, R.A., Wilkins, B.J., Dai, Y.S., Glascock, B.J., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Kimball, T.R., Aronow, B.J., Doevendans, P.A. & Molckentin, J.D. Calcineurin A beta gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction. *Circ. Res.* 94 (1): 91-99 (2004).
- Bullard, B., Ferguson, C., Minajeva, A., Leake, M.C., Gautel, M., Labeit, D., Ding, L., Labeit, S., Horwitz, J., Leonard, K.R. & Linke, W.A. Association of the chaperone alpha B-crystallin with titin in heart muscle. *J. Biol. Chem.* 279 (9): 7917-7924 (2004).
- Bullard, T.A., Protack, T.L., Aguilar, F., Bagwe, S., Massey, H.T. & Blaxall, B.C. Identification of Nogo as a novel indicator of heart failure. *Physiol. Genomics.* 32 (2): 182-9 (2008).
- Burkard, N., Becher, J., Heindl, C., Neyses, L., Schuh, K. & Ritter, O. Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation.* 111 (8): 1045-1053 (2005).
- Burkhard, K.A., Chen, F. & Shapiro, P. Quantitative analysis of ERK2 interactions with substrate proteins: roles for kinase docking domains and activity in determining binding affinity. *J. Biol. Chem.* 286 (4): 2477-2485 (2011).
- Cale, J.M. & Bird, I.M. Inhibition of MEK/ERK1/2 signalling alters endothelial nitric oxide synthase activity in an agonist-dependent manner. *Biochem. J.* 398 (2): 279-288 (2006).
- Candell-Riera, J., Romero-Farina, G., Aguadé-Bruix, S. & Castell-Conesa, J. Ischemic cardiomyopathy: a clinical nuclear cardiology perspective. *Rev. Esp. Cardiol.* 62 (8): 903-917 (2009).
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. & Righetti, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 25 (9): 1327-1333 (2004).
- Capetanaki, Y., Milner, D.J. & Weitzer, G. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell. Struct. Funct.* 22 (1): 103-116 (1997).
- Cestra, G., Toomre, D., Chang, S. & De Camilli, P. The Abl/Arg substrate ArgBP2/nArgBP2 coordinates the function of multiple regulatory mechanisms converging on the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (5): 1731-6 (2005).
- Cha, H., Kim, J.M., Oh, J.G., Jeong, M.H., Park, C.S., Park, J., Jeong, H.J., Park, B.K., Lee, Y.H., Jeong, D., Yang, D.K., Bernecker, O.Y., Kim, do H., Hajjar, R.J. & Park, W.J. PICOT is a critical regulator of cardiac hypertrophy and cardiomyocyte contractility. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45 (6): 796-803 (2008).
- Chen, C.H., Gray, M.O. & Mochly-Rosen, D. Cardioprotection from ischemia by a brief exposure to physiological levels of ethanol: role of epsilon protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (22): 12784-12789 (1999).
- Chu, P.H., Ruiz-Lozano, P., Zhou, Q., Cai, C. & Chen, J. Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system. *Mech. Dev.* 95 (1-2): 259-265 (2000).
- Churchill, E.N. & Mochly-Rosen, D. The roles of PKC δ and ϵ isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Biochem. Soc. Trans.* 35 (5): 1040-1042 (2007).
- Claeys, K.G., van der Ven, P.F., Behin, A., Stojkovic, T., Eymard, B., Dubourg, O., Laforêt, P., Faulkner, G., Richard, P., Vicart, P., Romero, N.B., Stoltenburg, G., Udd, B., Fardeau, M., Voit, T. & Fürst, D.O. Differential involvement of sarcomeric proteins

- in myofibrillar myopathies: a morphological and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.* 117 (3): 293-307 (2009).
- Clerk, A., Cullingford, T.E., Fuller, S.J., Giraldo, A., Markou, T., Pikkarainen, S. & Sugden, P.H. Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses. *J. Cell. Physiol.* 212: 311-322 (2007).
 - Colombo, A., Bastone, A., Ploia, C., Scip, A., Salmons, M., Forloni, G. & Borsello, T. JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 33 (3): 518-525 (2009).
 - Corbett, J.M., Why, H.J., Wheeler, C.H., Richardson, P.J., Archard, L.C., Yacoub, M.H. & Dunn, M.J. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 19 (11): 2031-2042 (1998).
 - Coronella-Wood, J., Terrand, J., Sun, H. & Chen, Q.M. c-Fos phosphorylation induced by H₂O₂ prevents proteasomal degradation of c-Fos in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 279 (32): 33567-33574 (2004).
 - Costa, M.L., Escaleira, R., Cataldo, A., Oliveira, F. & Mermelstein, C.S. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (12): 1819-1830 (2004).
 - Cowling, B.S., McGrath, M.J., Nguyen, M.A., Cottle, D.L., Kee, A.J., Brown, S., Schessl, J., Zou, Y., Joya, J., Bönnemann, C.G., Hardeman, E.C. & Mitchell, C.A. Identification of FHL1 as a regulator of skeletal muscle mass: implications for human myopathy. *J. Cell. Biol.* 183 (6): 1033-1048 (2008).
 - Crabtree, G.R. & Olson, E.N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell.* 109 Suppl: S67-79 (2002).
 - da Costa, N., Edgar, J., Ooi, P.T., Su, Y., Meissner, J.D. & Chang, K.C. Calcineurin differentially regulates fast myosin heavy chain genes in oxidative muscle fibre type conversion. *Cell. Tissue. Res.* 329 (3): 515-527 (2007).
 - Davies, K.J., Ermak, G., Rothermel, B.A., Pritchard, M., Heitman, J., Ahnn, J., Henrique-Silva, F., Crawford, D., *et al.* Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB J.* 21 (12): 3023-3028 (2007).
 - de Tombe, P.P., Mateja, R.D., Tachampa, K., Mou, Y.A., Farman, G.P. & Irving, T.C. Myofilament length dependent activation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48: 851-858 (2010).
 - Diedrichs, H., Chi, M., Boelck, B., Mehlhorn, U. & Schwinger, R.H. Increased regulatory activity of the calcineurin/NFAT pathway in human heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 6 (1): 3-9 (2004).
 - Diedrichs, H., Hagemeister, J., Chi, M., Boelck, B., Müller-Ehmsen, J. & Schneider, C.A. Activation of the calcineurin/NFAT signalling cascade starts early in human hypertrophic myocardium. *J. Int. Med. Res.* 35 (6): 803-818 (2007).
 - Donay, A.M. Differentielle Genexpression bei der dilatativen Kardiomyopathie des Menschen. Dissertation. *Gustav Liebig Universität Gießen*, urn:nbn:de:hebis:26-opus-11088 (2003).
 - Dorn, G.W. 2nd. Containing hypertrophy with a PICOT fence. *Circ. Res.* 99 (3): 228-230 (2006).
 - Ecartot-Laubriet, A., De Luca, K., Vandroux, D., Moisant, M., Bernard, C., Assem, M., Rochette, L. & Teyssier, J.R. Downregulation and nuclear relocation of MLP

- during the progression of right ventricular hypertrophy induced by chronic pressure overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32 (12): 2385-2395 (2000).
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W. & French, K. Tierphysiologie 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, ISBN: 3-13-664003-9; Stuttgart (2000).
 - Edmondson, R.D., Vondriska, T.M., Biederman, K.J., Zhang, J., Jones, R.C., Zheng, Y., Allen, D.L., Xiu, J.X., Cardwell, E.M., Pisano, M.R. & Ping, P. Protein kinase C ϵ signaling complexes include metabolism- and transcription/translation-related proteins. *Mol. Cell. Proteomics.* 1: 421-433 (2002).
 - Ehler, E., Horowitz, R., Zuppinger, C., Price, R.L., Perriard, E., Leu, M., Caroni, P., Sussman, M., Eppenberger, H.M. & Perriard, J.C. Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J. Cell. Biol.* 153 (4): 763-772 (2001).
 - Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kühn, U., Maisch, B., McKenna, W.J., Monserrat, L., Pankuweit, S., Rapezzi, C., Seferovic, P., Tavazzi, L. & Keren, A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* 29 (2): 270-276 (2008).
 - Elliott, P. & McKenna, W.J. How should hypertrophic cardiomyopathy be classified? Molecular diagnosis for hypertrophic cardiomyopathy: Not ready for prime time. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2 (1): 87-89 (2009).
 - Esposito, G., Santana, L.F., Dilly, K., Cruz, J.D., Mao, L., Lederer, W.J. & Rockman, H.A. Cellular and functional defects in a mouse model of heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 (6): H3101-3112 (2000).
 - Eto, Y., Yonekura, K., Sonoda, M., Arai, N., Sata, M., Sugiura, S., Takenaka, K., Gualberto, A., Hixon, M.L., Wagner, M.W. & Aoyagi, T. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation.* 101 (18): 2134-2137 (2000).
 - Faber, M.J., Dalinghaus, M., Lankhuizen, I.M., Bezstarosti, K., Dekkers, D.H., Duncker, D.J., Helbing, W.A. & Lamers, J.M. Proteomic changes in the pressure overloaded right ventricle after 6 weeks in young rats: correlations with the degree of hypertrophy. *Proteomics.* 5 (10): 2519-2530 (2005).
 - Fahlke, C., Linke, W.A., Raßler, B. & Wiesner, R. Taschenatlas Physiologie. Urban & Fischer Verlag, ISBN: 978-3-437-41917-1; München (2008).
 - Faulkner, G., Pallavicini, A., Formentin, E., Comelli, A., Ievolella, C., Trevisan, S., Bortoletto, G., Scannapieco, P., Salamon, M., Mouly, V., Valle, G. & Lanfranchi, G. ZASP: a new Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *J. Cell. Biol.* 146: 465-475 (1999).
 - Flavigny, J., Richard, P., Isnard, R., Carrier, L., Charron, P., Bonne, G., Forissier, J.F., Desnos, M., Dubourg, O., Komajda, M., Schwartz, K. & Hainque, B. Identification of two novel mutations in the ventricular regulatory myosin light chain gene (MYL2) associated with familial and classical forms of hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Med.* 76 (3-4): 208-214 (1998).
 - Flick, M.J. & Konieczny, S.F. The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta-tactinin. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 9): 1553-1564 (2000).

- Frank, D., Kuhn, C., Katus, H.A. & Frey, N. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J. Mol. Med.* 84 (6): 446-468 (2006).
- Frazier, A.H., Ramirez-Correa, G.A. & Murphy, A.M. Molecular mechanisms of sarcomere dysfunction in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Prog. Pediatr. Cardiol.* 31 (1): 29-33 (2011).
- Frey, N., Richardson, J.A. & Olson, E.N. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (26): 14632-14637 (2000).
- Frey, N. & Olson, E.N. Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J. Biol. Chem.* 277: 13998–14004 (2002).
- Frey, N. & Olson, E.N. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 45–79 (2003).
- Frey, N., Barrientos, T., Shelton, J.M., Frank, D., Rütten, H., Gehring, D., Kuhn, C., Lutz, M., Rothermel, B., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Katus, H.A., Hill, J.A. & Olson, E.N. Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat. Med.* 10 (12): 1336-1343 (2004).
- Freyd, G., Kim, S.K. & Horvitz, H.R. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature.* 344 (6269): 876-879 (1990).
- Frohlich, E.D., Apstein, C., Chobanian, A.V., Devereux, R.B., Dunstan, H.P., Dzau, V., Fouad Tarazi, F., Horan, M.J., Marcus, M., Massieb Pfeffer, M.A., Re, R.N., Rocella, E.J., Savage, D. & Shub, C. The heart in hypertension. *N. Engl. J. Med.* 327: 998–1008 (1992).
- Fürst, D.O., Osborn, M., Nave, R. & Weber, K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J. Cell. Biol.* 106 (5): 1563-1572 (1988).
- Gehmlich, K., Geier, C., Osterziel, K.J., Van der Ven, P.F. & Fürst, D.O. Decreased interactions of mutant muscle LIM protein (MLP) with N-RAP and alpha-actinin and their implication for hypertrophic cardiomyopathy. *Cell. Tissue Res.* 317 (2): 129-136 (2004).
- Gehmlich, K., Geier, C., Milting, H., Fürst, D. & Ehler, E. Back to square one: what do we know about the functions of muscle LIM protein in the heart? *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 29 (6-8): 155-158 (2008).
- Gehmlich, K., Ehler, E., Perrot, A., Fürst, D.O. & Geier, C. "MLP: A Stress Sensor Goes Nuclear" by Gunkel, S., Heineke, J., Hilfiker-Kleiner, D. & Knöll, R. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48 (2): 424-425 (2010).
- Geier, C., Perrot, A., Ozcelik, C., Binner, P., Counsell, D., Hoffmann, K., Pitz, B., Martiniak, Y., Gehmlich, K., van der Ven, P.F., Fürst, D.O., Vornwald, A., von Hodenberg, E., Nürnberg, P., Scheffold, T., Dietz, R. & Osterziel, K.J. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 107 (10): 1390-1395 (2003).

- Geier, C., Gehmlich, K., Ehler, E., Hassfeld, S., Perrot, A., Hayess, K., Cardim, N., Wenzel, K., Erdmann, B., Krackhardt, F., Posch, M.G., Osterziel, K.J., Bublak, A., Nägele, H., Scheffold, T., Dietz, R., Chien, K.R., Spuler, S., Fürst, D.O., Nürnberg, P. & Ozcelik, C. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* 17 (18): 2753-2765 (2008).
- Goldfarb, L.G. & Dalakas M.C. Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J. Clin. Invest.* 119 (7): 1806-1813 (2009).
- Goldstein, M.A., Michael, L.H., Schroeter, J.P. & Sass, R.L. Two structural states of Z-bands in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 256 (2 Pt 2): H552-559 (1989).
- Golenhofen, N., Arbeiter, A., Koob, R. & Drenckhahn, D. Ischemia-induced association of the stress protein alpha B-crystallin with I-band portion of cardiac titin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34: 309–319 (2002).
- Gray, M.O., Karliner, J.S. & Mochly-Rosen, D. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 272 (49): 30945-30951 (1997).
- Gregorio, C.C., Trombitás, K., Centner, T., Kolmerer, B., Stier, G., Kunke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Herrmann, B., Granzier, H., Sorimachi, H. & Labeit, S. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J. Cell. Biol.* 143 (4): 1013-1027 (1998).
- Grzeskowiak, R., Witt, H., Drungowski, M., Thermann, R., Hennig, S., Perrot, A., Osterziel, K.J., Klingbiel, D., Scheid, S., Spang, R., Lehrach, H. & Ruiz, P. Expression profiling of human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 59 (2): 400-411 (2003).
- Gunkel, S., Heineke, J., Hilfiker-Kleiner, D. & Knöll, R. MLP: a stress sensor goes nuclear. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48 (2): 426-427 (2010).
- Guo, W., Bharmal, S.J., Esbona, K. & Greaser, M.L. Titin diversity-alternative splicing gone wild. *J. Biomed. Biotechnol.* Artikel ID 753675 (2010).
- Gupta, M.P., Samant, S.A., Smith, S.H. & Shroff, S.G. HDAC4 and PCAF bind to cardiac sarcomeres and play a role in regulating myofilament contractile activity. *J. Biol. Chem.* 283 (15): 10135-10146 (2008).
- Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 136: 557-580 (1983).
- Hannigan, G.E., Coles, J.G., & Dedhar, S. Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease. *Circ. Res.* 100 (10): 1408-14014 (2007).
- Haq, S., Choukroun, G., Lim, H., Tymitz, K.M., del Monte, F., Gwathmey, J., Grazette, L., Michael, A., Hajjar, R., Force, T. & Molkenstein, J.D. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation.* 103 (5): 670-677 (2001).
- Heidkamp, M.C., Bayer, A.L., Martin, J.L. & Samarel, A.M. Differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades and apoptosis by protein kinase C epsilon and delta in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 89 (10): 882-890 (2001).
- Heineke, J., Kempf, T., Kraft, T., Hilfiker, A., Morawietz, H., Scheubel, R.J., Caroni, P., Lohmann, S.M., Drexler, H. & Wollert, K.C. Downregulation of cytoskeletal muscle

- LIM protein by nitric oxide: impact on cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation*. 107 (10): 1424-1432 (2003).
- Heineke, J., Ruetten, H., Willenbockel, C., Gross, S.C., Naguib, M., Schaefer, A., Kempf, T., Hilfiker-Kleiner, D., Caroni, P., Kraft, T., Kaiser, R.A., Molkentin, J.D., Drexler, H. & Wollert, K.C. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102 (5): 1655-1660 (2005).
 - Heineke, J. & Molkentin, J.D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7 (8): 589-600 (2006).
 - Heineke, J., Wollert, K.C., Osinska, H., Sargent, M.A., York, A.J., Robbins, J. & Molkentin, J.D. Calcineurin protects the heart in a murine model of dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48 (6): 1080-1087 (2010_A).
 - Heineke, J., Auger-Messier, M., Correll, R.N., Xu, J., Benard, M.J., Yuan, W., Drexler, H., Parise, L.V. & Molkentin, J.D. CIB1 is a regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* 16 (8): 872-879 (2010_B).
 - Henderson, J.R., Pomiès, P., Auffray, C. & Beckerle, M.C. ALP and MLP distribution during myofibrillogenesis in cultured cardiomyocytes. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 54 (3): 254-265 (2003).
 - Hershberger, R.E., Parks, S.B., Kushner, J.D., Li, D., Ludwigsen, S., Jakobs, P., Nauman, D., Burgess, D., Partain, J. & Litt, M. Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin. Transl. Sci.* 1 (1): 21-26 (2008).
 - Hoffert, J.D. & Knepper, M.A. Taking aim at shotgun phosphoproteomics. *Anal. Biochem.* 375 (1): 1-10 (2008).
 - Højlund, K., Bowen, B.P., Hwang, H., Flynn, C.R., Madireddy, L., Geetha, T., Langlais, P., Meyer, C., Mandarino, L.J. & Yi, Z. In vivo phosphoproteome of human skeletal muscle revealed by phosphopeptide enrichment and HPLC-ESI-MS/MS. *J. Proteome Res.* 8 (11): 4954-4965 (2009).
 - Hoshijima M. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z-disk, titin, and associated structures. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 (4): H1313-1325 (2006).
 - Houser, S.R. & Molkentin, J.D. Does contractile Ca²⁺ control calcineurin-NFAT signaling and pathological hypertrophy in cardiac myocytes? *Sci. Signal.* 1 (25): pe31 (2008).
 - Hsu, T., Trojanowska, M. & Watson, D.K. Ets proteins in biological control and cancer. *J. Cell. Biochem.* 91 (5): 896-903 (2004).
 - Hsu, S., Nagayama, T., Koitabashi, N., Zhang, M., Zhou, L., Bedja, D., Gabrielson, K.L., Molkentin, J.D., Kass, D.A. & Takimoto, E. Phosphodiesterase 5 inhibition blocks pressure overload-induced cardiac hypertrophy independent of the calcineurin pathway. *Cardiovasc. Res.* 81 (2): 301-309 (2009).
 - Huang, X. & Walker, J.W. Myofilament anchoring of protein kinase C-epsilon in cardiac myocytes. *J. Cell Sci.* 117 (10): 1971-1978 (2004).
 - Hunter, T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol. Cell.* 28 (5): 730-738 (2007).

- Hunter, J.C., Zeidan, A., Javadov, S., Kilić, A., Rajapurohitam, V. & Karmazyn, M. Nitric oxide inhibits endothelin-1-induced neonatal cardiomyocyte hypertrophy via a RhoA-ROCK-dependent pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47 (6): 810-818 (2009).
- Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villén, J., Haas, W., Sowa, M.E. & Gygi, S.P. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell.* 143 (7): 1174-1189 (2010).
- Im, S.H. & Rao, A. Activation and deactivation of gene expression by Ca²⁺/calcineurin-NFAT-mediated signaling. *Mol. Cells.* 18 (1): 1-9 (2004).
- Inagaki, N., Hayashi, T., Arimura, T., Koga, Y., Takahashi, M., Shibata, H., Teraoka, K., Chikamori, T., Yamashina, A. & Kimura, A. Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342(2):379-386 (2006).
- Jabr, R.I., Wilson, A.J., Riddervold, M.H., Jenkins, A.H., Perrino, B.A. & Clapp, L.H. Nuclear translocation of calcineurin A beta but not calcineurin A alpha by platelet-derived growth factor in rat aortic smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292 (6): C2213-2225 (2007).
- Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T. & Rao, A. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature.* 365 (6444): 352-355 (1993).
- Jeong, D., Cha, H., Kim, E., Kang, M., Yang, D.K., Kim, J.M., Yoon, P.O., Oh, J.G., Bernecker, O.Y., Sakata, S., Le, T.T., Cui, L., Lee, Y.H., Kim, do H., Woo, S.H., Liao, R., Hajjar, R.J. & Park, W.J. PICOT inhibits cardiac hypertrophy and enhances ventricular function and cardiomyocyte contractility. *Circ. Res.* 99 (3): 307-314 (2006).
- Jeong, D., Kim, J.M., Cha, H., Oh, J.G., Park, J., Yun, S.H., Ju, E.S., Jeon, E.S., Hajjar, R.J. & Park, W.J. PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling. *Circ. Res.* 102 (6): 711-719 (2008).
- Ji, Z.X., Du, C., Wu, G.S., Li, S.Y., An, G.S., Yang, Y.X., Jia, R., Jia, H.T. & Ni, J.H. Synergistic up-regulation of muscle LIM protein expression in C2C12 and NIH3T3 cells by myogenin and MEF2C. *Mol. Genet. Genomics.* 281 (1): 1-10 (2009).
- Johnson, R.S., Davis, M.T., Taylor, J.A. & Patterson, S.D. Informatics for protein identification by mass spectrometry. *Methods.* 35 (3): 223-236 (2005).
- Jungblut, P.R. & Schlüter, H. Towards the analysis of protein species: an overview about strategies and methods. *Amino Acids.* (2011) [Epub ahead of print].
- Kabaeva, Z.T., Perrot, A., Wolter, B., Dietz, R., Cardim, N., Correia, J.M., Schulte, H.D., Aldashev, A.A., Mirrakhimov, M.M. & Osterziel, K.J. Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* 10 (11): 741-748 (2002).
- Kadrmas, J.L. & Beckerle, M.C. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5 (11): 920-931 (2004).
- Kane, L.A., Yung, C.K., Agnetti, G., Neverova, I. & van Eyk, J.E. Optimization of paper bridge loading for 2-DE analysis in the basic pH region: application to the mitochondrial subproteome. *Proteomics.* 6 (21): 5683-5687 (2006).
- Kato, T., Muraski, J., Chen, Y., Tsujita, Y., Wall, J., Glembotski, C.C., Schaefer, E., Beckerle, M. & Sussman, M.A. Atrial natriuretic peptide promotes cardiomyocyte survival by cGMP-dependent nuclear accumulation of zyxin and Akt. *J. Clin. Invest.* 115 (10): 2716-2730 (2005).

- Kehat, I. & Molkentin, J.D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1188: 96-102 (2010).
- Kessler, B.M. & Edelmann, M.J. PTMs in conversation: activity and function of deubiquitinating enzymes regulated via post-translational modifications. *Cell. Biochem. Biophys.* 2011 Apr 12. [Epub ahead of print].
- Khasar, S.G., Lin, Y.H., Martin, A., Dadgar, J., McMahon, T., Wang, D., Hundle, B., Aley, K.O., Isenberg, W., McCarter, G., Green, P.G., Hodge, C.W., Levine, J.D. & Messing, R.O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron.* 24 (1): 253-260 (1999).
- Kioka, N., Ueda, K. & Amachi, T. Vinexin, CAP/ponsin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction. *Cell. Struct. Funct.* 27 (1): 1-7 (2002).
- Klein, G., Schaefer, A., Hilfiker-Kleiner, D., Oppermann, D., Shukla, P., Quint, A., Podewski, E., Hilfiker, A., Schröder, F., Leitges, M. & Drexler, H. Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial hypertrophy after pressure overload in mice lacking PKC epsilon. *Circ. Res.* 96 (7): 748-755 (2005).
- Kleinig, H. & Maier, U. Kleinig/Sitte Zellbiologie 4. Auflage. *Gustav Fischer Verlag*, ISBN: 3-437-26010-3; Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm (1999).
- Knowlton, A.A., Kapadia, S., Torre-Amione, G., Durand, J.B., Bies, R., Young, J. & Mann, D.L. Differential expression of heat shock proteins in normal and failing human hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30 (4): 811-818 (1998).
- Kochs, G., Hummel, R., Fiebich, B., Sarre, T.F., Marmé, D. & Hug, H. Activation of purified human protein kinase C alpha and beta I isoenzymes in vitro by Ca²⁺, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochem. J.* 291 (2): 627-633 (1993).
- Kolwicz, S.C., MacDonnell, S.M., Renna, B.F., Reger, P.O., Seqqat, R., Rafiq, K., Kendrick, Z.V., Houser, S.R., Sabri, A. & Libonati, J.R. Left ventricular remodeling with exercise in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297 (4): H1361-1368 (2009).
- Kong, Y., Flick, M.J., Kudla, A.J. & Konieczny, S.F. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol. Cell. Biol.* 17 (8): 4750-4760 (1997).
- Kostek, M.C., Chen, Y.W., Cuthbertson, D.J., Shi, R., Fedele, M.J., Esser, K.A. & Rennie, M.J. Gene expression responses over 24 h to lengthening and shortening contractions in human muscle: major changes in CSRP3, MUSTN1, SIX1, and FBXO32. *Physiol. Genomics.* 31 (1): 42-52 (2007).
- Knöll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H.M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M.L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., McKenna, W., Yokoyama, M., Schork, N.J., Omens, J.H., McCulloch, A.D., Kimura, A., Gregorio, C.C., Poller, W., Schaper, J., Schultheiss, H.P. & Chien, K.R. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell.* 111 (7): 943-955 (2002).
- Knöll, R., Kostin, S., Klede, S., Savvatis, K., Klinge, L., Stehle, I., Gunkel, S., Kötter, S., Babicz, K., Sohns, M., Miocic, S., Didié, M., Knöll, G., Zimmermann, W.H., Thelen, P., Bickeböller, H., Maier, L.S., Schaper, W., Schaper, J., Kraft, T., Tschöpe,

- C., Linke, W.A. & Chien, K.R. A common MLP (muscle LIM protein) variant is associated with cardiomyopathy. *Circ. Res.* 106 (4): 695-704 (2010).
- Krüger, M. & Linke, W.A. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46 (4): 490-498 (2009).
 - Kuida, K. & Boucher, D.M. Functions of MAP Kinases: Insights from gene-targeting studies. *J. Biochem.* 135: 653–656 (2004).
 - Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685 (1979).
 - Lakdawala, N.K., Dellefave, L., Redwood, C.S., Sparks, E., Cirino, A.L., Depalma, S., Colan, S.D., Funke, B., Zimmerman, R.S., Robinson, P., Watkins, H., Seidman, C.E., Seidman, J.G., McNally, E.M. & Ho, C.Y. Familial dilated cardiomyopathy caused by an alpha-tropomyosin mutation: the distinctive natural history of sarcomeric dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55 (4): 320-329 (2010).
 - Lemire, I., Ducharme, A., Tardif, J.C., Poulin, F., Jones, L.R., Allen, B.G., Hébert, T.E. & Rindt, H. Cardiac-directed overexpression of wild-type alpha1B-adrenergic receptor induces dilated cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281 (2): H931-938 (2001).
 - Leu, M., Ehler, E. & Perriard, J.C. Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 204 (3): 217-224 (2001).
 - Li, B. & Trueb, B. Analysis of the alpha-actinin/zyxin interaction. *J. Biol. Chem.* 276 (36): 33328-33335 (2001).
 - Li, H.H., Kedar, V., Zhang, C., McDonough, H., Arya, R., Wang, D.Z. & Patterson, C. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J. Clin. Invest.* 114 (8): 1058-1071 (2004).
 - Li, J. & Johnson, S.E. ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (4): 1425-1433 (2006).
 - Lim, D.S., Roberts, R. & Marian, A.J. Expression profiling of cardiac genes in human hypertrophic cardiomyopathy: insight into the pathogenesis of phenotypes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38 (4): 1175-1180 (2001).
 - Linke, W.A. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 77 (4): 637-648 (2008).
 - López, J.L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 849 (1-2): 190-202 (2007).
 - Lorenz, K., Schmitt, J.P., Schmitteckert, E.M. & Lohse M.J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* 15 (1): 75-83 (2009).
 - Lorenzen-Schmidt, I., Stuyvers, B.D., ter Keurs, H.E., Date, M.O., Hoshijima, M., Chien, K.R., McCulloch, A.D. & Omens, J.H. Young MLP deficient mice show diastolic dysfunction before the onset of dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (2): 241-250 (2005).
 - Lottspeich, F. & Zorbas, H. (Hrsg.). Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*, ISBN: 3-8274-0041-4; Heidelberg; Berlin (1998).
 - Louis, H.A., Pino, J.D., Schmeichel, K.L., Pomiès, P. & Beckerle, M.C. Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation

- and divergent patterns of gene expression. *J. Biol. Chem.* 272 (43): 27484-27491 (1997).
- Luedde, M., Katus, H.A. & Frey, N. Novel molecular targets in the treatment of cardiac hypertrophy. *Recent. Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* 1 (1): 1-20 (2006).
 - Luther, P.K. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 30 (5-6): 171-185 (2009).
 - MacDonnell, S.M., Weisser-Thomas, J., Kubo, H., Hanscome, M., Liu, Q., Jaleel, N., Berretta, R., Chen, X., Brown, J.H., Sabri, A.K., Molkentin, J.D., & Houser, S.R. CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT signaling in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 105 (4): 316-325 (2009).
 - Macián, F., López-Rodríguez, C. & Rao, A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene.* 20 (19): 2476-2489 (2001).
 - Mann, M., Ong, S.E., Grønborg, M., Steen, H., Jensen, O.N. & Pandey, A. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* 20 (6): 261-268 (2002).
 - Mann, M. & Jensen, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* 21 (3): 255-61 (2003).
 - Marian, A.J. Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. *Eur. J. Clin. Invest.* 40 (4): 360-369 (2010).
 - Maron, B.J., Towbin, J.A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A.J., Seidman, C.E. & Young, J.B. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 113 (14): 1807-18016 (2006).
 - Marouga, R., David, S. & Hawkins, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 669–678 (2005).
 - McConnell, J.L. & Wadzinski, B.E. Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development. *Mol. Pharmacol.* 75 (6): 1249-1261 (2009).
 - Mebratu, Y. & Tesfaigzi, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle.* 8 (8): 1168-1175 (2009).
 - Michal, G. (Hrsg.). Biochemical Pathways Biochemie-Atlas. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin; ISBN: 3-86025-239-9 (1999).
 - Minamisawa, S., Hoshijima, M., Chu, G., Ward, C.A., Frank, K., Gu, Y., Martone, M.E., Wang, Y., Ross, J. Jr., Kranias, E.G., Giles, W.R. & Chien, K.R. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell.* 99 (3): 313-322 (1999).
 - Minden, J.S., Dowd, S.R., Meyer, H.E. & Stühler, K. Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 30: 156–161 (2009).
 - Mirza, S.P. & Olivier, M. Methods and approaches for the comprehensive characterization and quantification of cellular proteomes using mass spectrometry. *Physiol. Genomics.* 33 (1): 3-11 (2008).

- Mörner, S., Richard, P., Kazzam, E., Hellman, U., Hainque, B., Schwartz, K. & Waldenström, A. Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35 (7): 841-849 (2003).
- Mohapatra, B., Jimenez, S., Lin, J.H., Bowles, K.R., Coveler, K.J., Marx, J.G., Chrisco, M.A., Murphy, R.T., Lurie, P.R., Schwartz, R.J., Elliott, P.M., Vatta, M., McKenna, W., Towbin, J.A. & Bowles, N.E. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol. Genet. Metab.* 80 (1-2): 207-215 (2003).
- Molkenkin, J.D. & Dorn, G.W. 2nd. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 391-426 (2001).
- Molkenkin, J.D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc. Res.* 63 (3): 467-475 (2004).
- Munagala, V.K., Hart, C.Y., Burnett, J.C. Jr, Meyer, D.M. & Redfield, M.M. Ventricular structure and function in aged dogs with renal hypertension: a model of experimental diastolic heart failure. *Circulation.* 111 (9): 1128-1135 (2005).
- Murphy, S. & Frishman, W.H. Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol. Rev.* 13 (1):3-12 (2005).
- Muslin, A.J. Role of raf proteins in cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival. *Trends Cardiovasc. Med.* 15 (6): 225-229 (2005).
- Neuhoff, V., Philipp, K., Zimmer, H.G. & Mesecke, S. A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 360 (11): 1657–1670 (1979).
- Newman, B., Cescon, D., Woo, A., Rakowski, H., Eriksson, M.J., Sole, M., Wigle, E.D. & Siminovitch, K.A. W4R variant in CSRP3 encoding muscle LIM protein in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Mol. Genet. Metab.* 84 (4): 374-375 (2005).
- Newton, P.M. & Messing, R.O. The substrates and binding partners of protein kinase Cepsilon. *Biochem. J.* 427 (2): 189-196 (2010).
- Norton, J.M. Toward consistent definitions for preload and afterload. *Adv. Physiol. Educ.* 25 (1-4): 53-61 (2001).
- O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 (10): 4007-4021 (1975).
- Oka, T., Dai, Y.S. & Molkenkin, J.D. Regulation of calcineurin through transcriptional induction of the calcineurin A beta promoter in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biol.* 25 (15): 6649-6659 (2005).
- Oka, T., Xu, J. & Molkenkin, J.D. Re-employment of developmental transcription factors in adult heart disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 18 (1): 117-131 (2007).
- Oka, T. & Komuro, I. Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure. *Circ. J.* 72 (A): A13-6 (2008).
- Okamura, H., Aramburu, J., García-Rodríguez, C., Viola, J.P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P.G. & Rao, A. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell.* 6 (3): 539-550 (2000).

- Olivotto, I., Girolami, F., Nistri, S., Rossi, A., Rega, L., Garbini, F., Grifoni, C., Cecchi, F. & Yacoub, M.H. The many faces of hypertrophic cardiomyopathy: from developmental biology to clinical practice. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2 (4): 349-367 (2009).
- Olson, T.M., Kishimoto, N.Y., Whitby, F.G. & Michels, V.V. Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33 (4): 723-732 (2001).
- Omens, J.H., Usyk, T.P., Li, Z. & McCulloch, A.D. Muscle LIM protein deficiency leads to alterations in passive ventricular mechanics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282 (2): H680-687 (2002).
- Opitz, C.A., Leake, M.C., Makarenko, I., Benes, V. & Linke, W.A. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ. Res.* 94 (7): 967-975 (2004).
- Opitz, C.A. & Linke, W.A. Plasticity of cardiac titin/connectin in heart development. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 26 (6-8): 333-342 (2005).
- Ornstein, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 321-349 (1964).
- Palumbo, A.M. & Reid, G.E. Evaluation of gas-phase rearrangement and competing fragmentation reactions on protein phosphorylation site assignment using collision induced dissociation-MS/MS and MS3. *Anal. Chem.* 80 (24): 9735-9747 (2008).
- Papalouka, V., Arvanitis, D.A., Vafiadaki, E., Mavroidis, M., Papadodima, S.A., Spiliopoulou, C.A., Kremastinos, D.T., Kranias, E.G. & Sanoudou, D. Muscle LIM protein interacts with cofilin 2 and regulates F-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 29 (22): 6046-58 (2009).
- Paulsson, A.K., Franklin, S., Mitchell-Jordan, S.A., Ren, S., Wang, Y. & Vondriska, T.M. Post-translational regulation of calsarcin-1 during pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48 (6): 1206-1214 (2010).
- Paulus, W.J., Claes, V.A. & Brutsaert, D.L. Physiological loading of isolated mammalian cardiac muscle. *Circ. Res.* 39 (1): 42-53 (1976).
- Paulus, W.J., Tschöpe, C., Sanderson, J.E., Rusconi, C., Flachskampf, F.A., Rademakers, F.E., Marino, P., Smiseth, O.A., De Keulenaer, G., Leite-Moreira, A.F., Borbély, A., Édes, I., Handoko, M.L., Heymans, S., Pezzali, N., Pieske, B., Dickstein, K., Fraser, A.G. & Brutsaert, D.L. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 28: 2539–2550 (2007).
- Paulus, W.J. Novel strategies in diastolic heart failure. *Heart.* 96 (14): 1147-1153 (2010).
- Ping, P., Zhang, J., Pierce, W.M. Jr & Bolli, R. Functional proteomic analysis of protein kinase C epsilon signaling complexes in the normal heart and during cardioprotection. *Circ. Res.* 88 (1): 59-62 (2001).
- Pinna, L.A. & Ruzzene M. How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta.* 1314: 191-225 (1996).
- Pleissner, K.P., Regitz-Zagrosek, V., Weise, C., Neuss, M., Krüdwagen, B., Söding, P., Buchner, K., Hucho, F., Hildebrandt, A. & Fleck, E. Chamber-specific expression

- of human myocardial proteins detected by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 16 (5): 841-850 (1995).
- Poetter, K., Jiang, H., Hassanzadeh, S., Master, S.R., Chang, A., Dalakas, M.C., Rayment, I., Sellers, J.R., Fananapazir, L. & Epstein, N.D. Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat. Genet.* 13 (1): 63-69 (1996).
 - Proud, C.G. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 63 (3): 403-413 (2004).
 - Porrello, E.R., Widdop, R.E. & Delbridge, L.M. Early origins of cardiac hypertrophy: does cardiomyocyte attrition programme for pathological 'catch-up' growth of the heart? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35 (11): 1358-1364 (2008).
 - Postel, R., Vakeel, P., Topczewski, J., Knöll, R. & Bakkers, J. Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Dev. Biol.* 318 (1): 92-101 (2008).
 - Purcell, N.H., Darwis, D., Bueno, O.F., Müller, J.M., Schüle, R. & Molkentin, J.D. Extracellular signal regulated kinase 2 Interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biol.* 24 (3): 1081-1095 (2004).
 - Purcell, N.H., Wilkins, B.J., York, A., Saba-EI-Leil, M.K., Meloche, S., Robbins, J. & Molkentin, J.D. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (35): 14074-14079 (2007).
 - Pyle, W.G., Hart, M.C., Cooper, J.A., Sumandea, M.P., de Tombe, P.P. & Solaro, R.J. Actin capping protein: an essential element in protein kinase signaling to the myofilaments. *Circ. Res.* 90 (12): 1299-1306 (2002).
 - Pyle, W.G. & Solaro, R.J. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ. Res.* 94 (3): 296-305 (2004).
 - Rabkin, S.W. & Tsang, M.Y. The action of nitric oxide to enhance cell survival in chick cardiomyocytes is mediated through a cGMP and ERK1/2 pathway while p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways do not alter cell death. *Exp. Physiol.* 93 (7): 834-842 (2008).
 - Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G. & Iakoucheva, L.M. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins*. 78 (2): 365-380 (2010).
 - Rajan, S., Ahmed, R.P., Jagatheesan, G., Petrashevskaya, N., Boivin, G.P., Urboniene, D., Arteaga, G.M., Wolska, B.M., Solaro, R.J., Liggett, S.B. & Wieczorek, D.F. Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity. *Circ. Res.* 101 (2): 205-214 (2007).
 - Raggiaschi, R., Lorenzetto, C., Diodato, E., Caricasole, A., Gotta, S. & Terstappen, G.C. Detection of phosphorylation patterns in rat cortical neurons by combining phosphatase treatment and DIGE technology. *Proteomics*. 6 (3): 748-756 (2006).
 - Ramos, J.W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell. B.* 40 (12): 2707-2719 (2008).

- Raskin, A.M., Hoshijima, M., Swanson, E., McCulloch, A.D. & Omens, J.H. Hypertrophic gene expression induced by chronic stretch of excised mouse heart muscle. *Mol. Cell. Biomech.* 6 (3): 145-159 (2009).
- Regitz-Zagrosek, V., Oertelt-Prigione, S., Seeland, U. & Hetzer, R. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circ. J.* 74 (7): 1265-1273 (2010).
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarfás, I., Martin, I. & Nordet, P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation.* 93 (5): 841-842 (1996).
- Ritter, O., Hack, S., Schuh, K., Röthlein, N., Perrot, A., Osterziel, K.J., Schulte, H.D. & Neyses, L. Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation.* 105 (19): 2265-2269 (2002).
- Robia, S.L., Ghanta, J., Robu, V.G. & Walker, J.W. Localization and kinetics of protein kinase C-epsilon anchoring in cardiac myocytes. *Biophys. J.* 80 (5): 2140-2151 (2001).
- Rockman, H.A., Chien, K.R., Choi, D.J., Iaccarino, G., Hunter, J.J., Ross, J. Jr., Lefkowitz, R.J. & Koch, W.J. Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (12): 7000-7005 (1998).
- Roger, V.L. The heart failure epidemic. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7: 1807-1830 (2010).
- Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D., Loirand, G. & Pacaud, P. Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 96: 1152-1160 (2005).
- Rothe, C. Toward consistent definitions for preload and afterload - revisited. *Adv. Physiol. Educ.* (1-4): 44-5; author reply 89-90 (2003).
- Rothermel, B.A., McKinsey, T.A., Vega, R.B., Nicol, R.L., Mammen, P., Yang, J., Antos, C.L., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., Olson, E.N. & Williams, R.S. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (6): 3328-3333 (2001).
- Sabri, A. & Steinberg, S.F. Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure. *Mol. Cell. Biochem.* 251 (1-2): 97-101 (2003).
- Sabounchi-Schütt, F., Aström, J., Olsson, I., Eklund, A., Grunewald, J. & Bjellqvist, B. An immobilized DryStrip application method enabling high-capacity two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 21 (17): 3649-3656 (2000).
- Sabounchi-Schütt, F., Aström, J., Eklund, A., Grunewald, J. & Bjellqvist, B. Detection and identification of human bronchoalveolar lavage proteins using narrow-range immobilized pH gradient DryStrip and the paper bridge sample application method. *Electrophoresis.* 22 (9): 1851-1860 (2001).
- Salih, E. Phosphoproteomics by mass spectrometry and classical protein chemistry approaches. *Mass Spectrom. Rev.* 24 (6): 828-846 (2005).

- Samarel, A.M. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechano-transduction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289 (6): H2291-2301 (2005).
- Sanger, J.W., Wang, J., Fan, Y., White, J. & Sanger, J.M. Assembly and dynamics of myofibrils. *J. Biomed. Biotechnol.* 858606 (2010_A).
- Sanger, J.M., Wang, J., Gleason, L.M., Chowrashi, P., Dube, D.K., Mittal, B., Zhukareva, V. & Sanger, J.W. Arg/Abl-binding protein, a Z-body and Z-band protein, binds sarcomeric, costameric, and signaling molecules. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 67 (12): 808-823 (2010_B).
- Sanna, B., Bueno, O.F., Dai, Y.S., Wilkins, B.J. & Molkentin, J.D. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol. Cell. Biol.* 25 (3): 865-378 (2005).
- Schallus, T., Fehér, K., Ulrich, A.S., Stier, G. & Muhle-Goll, C. Structure and dynamics of the human muscle LIM protein. *FEBS Lett.* 583 (6): 1017-1022 (2009).
- Schaper, J., Froede, R., Hein, S., Buck, A., Hashizume, H., Speiser, B., Friedl, A. & Bleese, N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 83 (2): 504-514 (1991).
- Scheler, C., Li, X.P., Salnikow, J., Dunn, M.J. & Jungblut, P.R. Comparison of two-dimensional electrophoresis patterns of heat shock protein Hsp27 species in normal and cardiomyopathic hearts. *Electrophoresis*. 20 (18): 3623-3628 (1999).
- Schneider, A.G., Sultan, K.R. & Pette, D. Muscle LIM protein: expressed in slow muscle and induced in fast muscle by enhanced contractile activity. *Am. J. Physiol.* 276 (4 Pt 1): C900-6 (1999).
- Shapiro, B.P., Lam, C.S., Patel, J.B., Mohammed, S.F., Kruger, M., Meyer, D.M., Linke, W.A. & Redfield, M.M. Acute and chronic ventricular-arterial coupling in systole and diastole: insights from an elderly hypertensive model. *Hypertension*. 50 (3): 503-511 (2007).
- Sheikh, F., Bang, M.L., Lange, S. & Chen, J. "Z"eroing in on the role of Cypher in striated muscle function, signaling, and human disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 17 (8): 258-262 (2007).
- Sheikh, F., Raskin, A., Chu, P.-H., Lange, S., Domenighetti, A.A., Zheng, M., Liang, X., Zhang, T., Yajima, T., Gu, Y., Dalton, N.D., Mahata, S.K., Dorn II, G.W., Heller-Brown, J., Peterson, K.L., Omens, J.H., McCulloch, A.D. & Chen, J. An FHL-1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J. Clin. Invest.* 118 (12): 3870-3880 (2008).
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858 (1996).
- Shi, Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*. 139 (3): 468-484 (2009).
- Shibasaki, F., Price, E.R., Milan, D. & McKeon, F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NFAT4. *Nature*. 382 (6589): 370-373 (1996).
- Simonis, G., Briem, S.K., Schoen, S.P., Bock, M., Marquetant, R. & Strasser, R.H. Protein kinase C in the human heart: differential regulation of the isoforms in aortic stenosis or dilated cardiomyopathy. *Mol. Cell. Biochem.* 305 (1-2):103-111 (2007).

- Singh, B.N., Rao, K.S., Ramakrishna, T., Rangaraj, N. & Rao, Ch.M. Association of alpha B-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 366 (3): 756-667 (2007).
- Srivastava, D. & Yu, S. Stretching to meet needs: integrin-linked kinase and the cardiac pump. *Genes Dev.* 20 (17): 2327-2331 (2006).
- Stronach, B.E., Renfranz, P.J., Lilly, B. & Beckerle, M.C. Muscle LIM proteins are associated with muscle sarcomeres and require dMEF2 for their expression during *Drosophila* myogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 10 (7): 2329-2342 (1999).
- Su, Z., Yao, A., Zubair, I., Sugishita, K., Ritter, M., Li, F., Hunter, J.J., Chien, K.R. & Barry, W.H. Effects of deletion of muscle LIM protein on myocyte function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280 (6): H2665-2673 (2001).
- Su, H. & Wang, X. The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective. *Cardiovasc. Res.* 85 (2): 253-262 (2010).
- Taigen, T., De Windt, L.J., Lim, H.W. & Molkentin, J.D. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (3): 1196-1201 (2000).
- Tandan, S., Wang, Y., Wang, T.T., Jiang, N., Hall, D.D., Hell, J.W., Luo, X., Rothermel, B.A. & Hill, J.A. Physical and functional interaction between calcineurin and the cardiac L-type Ca²⁺ channel. *Circ. Res.* 105 (1): 51-60 (2009).
- Tatsumi, R. & Hattori, A. Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin by electrophoresis in 2% polyacrylamide slab gels strengthened with agarose. *Anal. Biochem.* 224 (1): 28-31 (1995).
- Tirziu, D., Giordano, F.J. & Simons, M. Cell communications in the heart. *Circulation.* 122 (9):928-937 (2010).
- Ubersax, J.A. & Ferrell, J.E.Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 530-541 (2007).
- Ünlü, M., Morgan, M.E. & Minden, J.S. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 18: 2071-2077 (1997).
- van den Bosch, B.J., van den Burg, C.M., Schoonderwoerd, K., Lindsey, P.J., Scholte, H.R., de Coo, R.F., van Rooij, E., Rockman, H.A., Doevendans, P.A. & Smeets, H.J. Regional absence of mitochondria causing energy depletion in the myocardium of muscle LIM protein knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 65 (2): 411-418 (2005).
- van Eyk, J.E. & Dunn, M.J. Proteomic and genomic analysis of cardiovascular disease. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim; ISBN: 3-527-30596-3 (2003).
- Vang, S., Corydon, T.J., Børglum, A.D., Scott, M.D., Frydman, J., Mogensen, J., Gregersen, N. & Bross, P. Actin mutations in hypertrophic and dilated cardiomyopathy cause inefficient protein folding and perturbed filament formation. *FEBS J.* 272 (8): 2037-2049 (2005).
- van Rijsingen, I.A., Hermans-van Ast, J.F., Arens, Y.H., Schalla, S.M., de Die-Smulders, C.E., van den Wijngaard, A. & Pinto, Y.M. Hypertrophic cardiomyopathy family with double-heterozygous mutations; does disease severity suggest double-heterozygosity? *Neth. Heart J.* 17 (12): 458-463 (2009).

- Vatta, M., Mohapatra, B., Jimenez, S., Sanchez, X., Faulkner, G., Perles, Z., Sinagra, G., Lin, J.H., Vu, T.M., Zhou, Q., Bowles, K.R., Di Lenarda, A., Schimmenti, L., Fox, M., Chrisco, M.A., Murphy, R.T., McKenna, W., Elliott, P., Bowles, N.E., Chen, J., Valle, G. & Towbin, J.A. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 (11): 2014-2027 (2003).
- Vega, R.B., Rothermel, B.A., Weinheimer, C.J., Kovacs, A., Naseem, R.H., Bassel-Duby, R., Williams, R.S. & Olson, E.N. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (2): 669-674 (2001).
- Ventura, C., Pintus, G., Vaona, I., Bennardini, F., Pinna, G. & Tadolini, B. Phorbol ester regulation of opioid peptide gene expression in myocardial cells. Role of nuclear protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270 (50): 30115-30120 (1995).
- Vincent, F., Duquesnes, N., Christov, C., Damy, T., Samuel, J.L. & Crozatier, B. Dual level of interactions between calcineurin and PKC-epsilon in cardiomyocyte stretch. *Cardiovasc. Res.* 71 (1): 97-107 (2006).
- Virshup, D.M. & Shenolikar, S. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol. Cell.* 33 (5): 537-545 (2009).
- Vomastek, T., Iwanicki, M.P., Burack, W.R., Tiwari, D., Kumar, D., Parsons, J.T., Weber, M.J. & Nandicoori, V.K. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) phosphorylation sites and docking domain on the nuclear pore complex protein Tpr cooperatively regulate ERK2-Tpr interaction. *Mol. Cell. Biol.* 28 (2): 6954-6966 (2008).
- Wang, X., Lee, G., Liebhaber, S.A. & Cooke, N.E. Human cysteine-rich protein. A member of the LIM/double-finger family displaying coordinate serum induction with c-myc. *J. Biol. Chem.* 267 (13): 9176-9184 (1992).
- Wang, G.Y., Zhou, J.J., Shan, J. & Wong, T.M. Protein kinase C-epsilon is a trigger of delayed cardioprotection against myocardial ischemia of kappa-opioid receptor stimulation in rat ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299 (2): 603-610 (2001).
- Warren, C.M., Krzesinski, P.R., Campbell, K.S., Moss, R.L. & Greaser, M.L. Titin isoform changes in rat myocardium during development. *Mech. Dev.* 121 (11): 1301-1312 (2004).
- Weisleder, N., Soumaka, E., Abbasi, S., Taegtmeyer, H. & Capetanaki, Y. Cardiomyocyte-specific desmin rescue of desmin null cardiomyopathy excludes vascular involvement. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 36 (1): 121-128 (2004).
- Welchman, R.L., Gordon, C. & Mayer, R.J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6 (8): 599-609 (2005).
- Westermeier, R. & Naven, T. Proteomics in practice. A laboratory manual of proteome analysis. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*; ISBN: 3-527-30354-5 (2002).
- Wilding, J.R., Joubert, F., de Araujo, C., Fortin, D., Novotova, M., Veksler, V. & Ventura-Clapier, R. Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *J. Physiol.* 575 (Pt 1): 191-200 (2006).

- Wilkins, B.J. & Molkenin, J.D. Calcium-calceurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (4): 1178-1191 (2004).
- Willis, M.S., Schisler, J.C., Portbury, A.L. & Patterson, C. Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. *Cardiovasc. Res.* 81 (3): 439-448 (2009).
- Wu, G., Toyokawa, T., Hahn, H. & Dorn, G.W. 2nd. Epsilon protein kinase C in pathological myocardial hypertrophy. Analysis by combined transgenic expression of translocation modifiers and G alpha q. *J. Biol. Chem.* 275 (39): 29927-29930 (2000).
- Wu, H.Y., Tomizawa, K. & Matsui, H. Calpain-calceurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. *Acta Med. Okayama.* 61 (3): 123-137 (2007).
- Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L. & Yao, X. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol. Cell. Proteomics.* 7: 1598-1608 (2008).
- Yamamoto, R., Akazawa, H., Ito, K., Toko, H., Sano, M., Yasuda, N., Qin, Y., Kudo, Y., Sugaya, T., Chien, K.R. & Komuro, I. Angiotensin II type 1a receptor signals are involved in the progression of heart failure in MLP-deficient mice. *Circ. J.* 71 (12): 1958-1964 (2007).
- Yang, J., Moravec, C.S., Sussman, M.A., DiPaola, N.R., Fu, D., Hawthorn, L., Mitchell, C.A., Young, J.B., Francis, G.S., McCarthy, P.M. & Bond, M. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation.* 102 (25): 3046-3052 (2000).
- Zeidan, A., Javadov, S. & Karmazyn, M. Essential role of Rho/ROCK-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 72 (1): 101-11 (2006).
- Zheng, Q. & Zhao, Y. The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction. *Biol. Cell.* 99 (9): 489-502 (2007).
- Zheng, M., Cheng, H., Li, X., Zhang, J., Cui, L., Ouyang, K., Han, L., Zhao, T., Gu, Y., Dalton, N.D., Bang, M.L., Peterson, K.L. & Chen, J. Cardiac-specific ablation of Cypher leads to a severe form of dilated cardiomyopathy with premature death. *Hum. Mol. Genet.* 18: 701-713 (2009).
- Zheng, M., Cheng, H., Banerjee, I. & Chen J. ALP/Enigma PDZ-LIM domain proteins in the heart. *J. Mol. Cell. Biol.* 2 (2): 96-102 (2010).
- Zhou, Q., Ruiz-Lozano, P., Martone, M. E. & Chen, J. Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 274: 19807-19813 (1999).
- Zolk, O., Caroni, P. & Böhm, M. Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation.* 101 (23): 2674-2677 (2000).
- Zou, P., Pinotsis, N., Lange, S., Song, Y.H., Popov, A., Mavridis, I., Mayans, O.M., Gautel, M. & Wilmanns, M. Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature.* 439 (7073): 229-233 (2006).

9. Anhang

Anhang 1: Aufreinigung der MLP Antikörper durch Kreuz-Affinitäts-Chromatographie

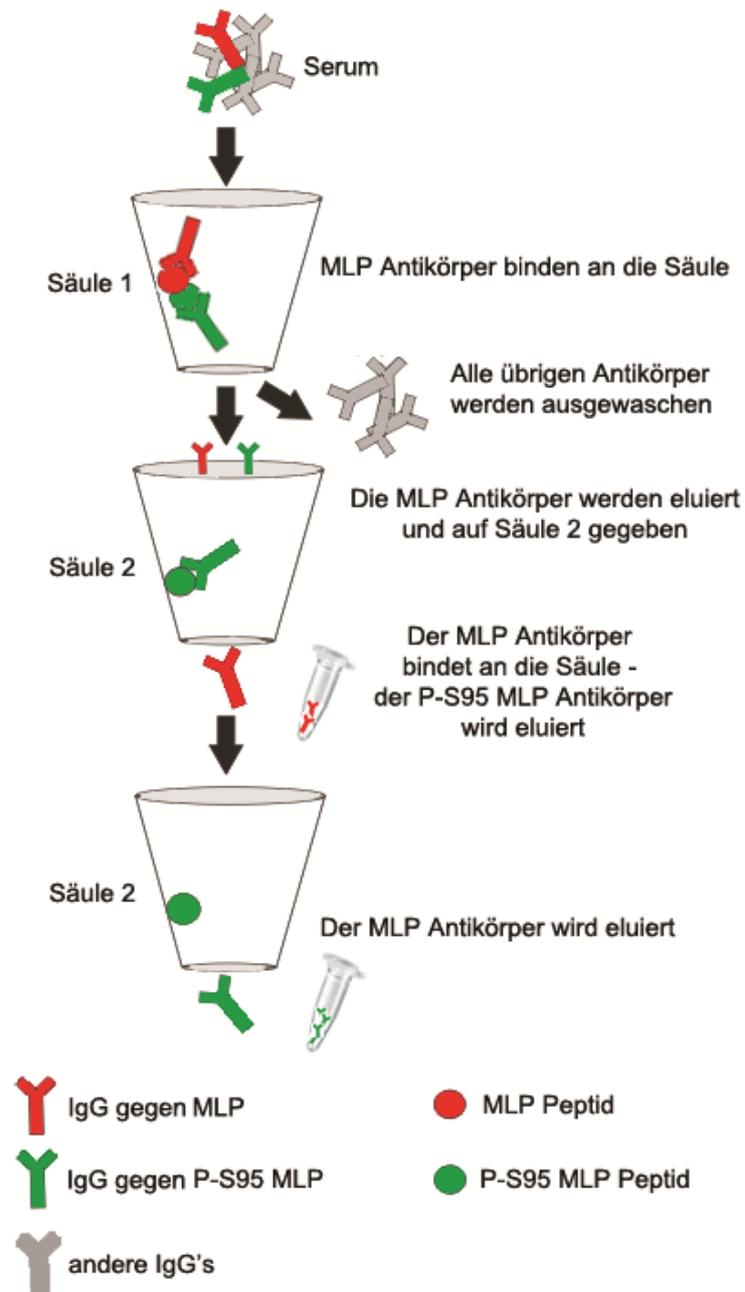


Abb. Anhang 1: Schematische Darstellung der Aufreinigung des MLP- sowie des P-S95 MLP-Antikörpers mittels Kreuz-Affinitäts-Chromatographie.

Anhang 2: Generelles Funktionsprinzip der Massenspektrometrie

Das Prinzip der Massenspektrometrie (*MS*) beruht auf der Bestimmung der Molekülmasse von freien Ionen in einem Hochvakuum anhand ihrer spezifischen Fluggeschwindigkeit. Um Proteine zu identifizieren, werden diese zunächst durch die Behandlung mit einem Enzym (z.B. Trypsin) oder Detergens in Peptide zerschnitten (Westermeier & Naven, 2002). Die Peptide werden in einer Ionenquelle im Massenspektrometer durch Aufnahme oder Abgabe eines oder mehrerer Elektronen in einen Strahl gasförmiger Ionen umgewandelt. Wie viele und welche Art von Ionen gebildet werden können, ist abhängig von der Ionisationsmethode. Zu den gängigen Methoden zur Erzeugung von Ionen gehören z.B. die matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (*MALDI*) und die Elektrospray-Ionisation (*ESI*). Die erzeugten Ionen werden in einem Massenanalysator [z.B. Flugzeitanalysatoren (*TOF*), Elektrische Ionenfallen (*ion trap*) oder Elektromagnetische Ionenfallen (*Ionencyclotron*)] gemäß ihres jeweiligen Masse/Ladungsquotienten (*m/z*) aufgetrennt (Lottspeich & Zorbas, 1998). Im letzten Abschnitt eines Massenspektrometers, dem Detektor, werden die Ionen detektiert. Gängige Detektor-Varianten sind z.B. der Szintillationszähler, die Vielkanalplatte (*multichannel plate*) oder der *Faraday Cup*. Die vom Detektor aufgenommenen Daten werden durch eine Software in ein Massenspektrum umgewandelt, dem man entnehmen kann, welche Ionen in welchen relativen Mengen erzeugt worden sind (Westermeier & Naven, 2002).

Proteine sind aus einer spezifischen Aminosäure-Sequenz aufgebaut, die zusätzlich post-translational modifiziert sein können. Da die theoretischen Molmassen von Aminosäuren sowie von posttranslationalen Modifikationen bekannt sind, ermöglicht die *MS* somit die Identifikation von Protein-ID's sowie von posttranslationalen Modifikationen. Die detektierten Massenspektren werden dazu mittels Datenbanken (z.B. *Swissprot* oder *NCBI*) mit den theoretischen Molekülmassen aller bekannten Proteine abgeglichen (Westermeier & Naven, 2002).

Anhang 2.1: Funktionsprinzip eines MALDI TOF/TOF Massenspektrometers

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ABI PRISM 4800 MALDI TOF/TOF Massenspektrometer (Applied Biosystems) verwendet (Abb. Anhang 2.1). In einem MALDI TOF Massenspektrometer werden in Matrix eingebettete Proben durch den Beschuss mit Laserphotonen ionisiert. Durch den Laserbeschuss entstehen einfach positiv geladene Peptid-Ionen (*Precursor-Ionen*). Die Detektion der *Precursor-Ionen* ergibt den so genannten Peptidmassen-Fingerabdruck (*peptide mass fingerprint*, *PMF*). Der Abgleich des *PMF*-Spektrums mit Datenbanken kann bereits zur Identifikation eines Proteins ausreichen. Um jedoch eine bessere Auflösung des Massenspektrums zu erreichen, wird die MALDI TOF oft mit einem zweiten *MS*-Schritt gekoppelt. Die Kombination von zwei aufeinander folgenden *MS*-Schritten wird generell als Tandem-Massenspektrometrie (*MS/MS*) bezeichnet (Lottspeich & Zorbas, 1998; Westermeier & Naven, 2002). Im ABI PRISM 4800 MALDI TOF/TOF Massenspektrometer werden die *Precursor-Ionen* zunächst nach Masse- und Ladungskriterien selektiert (Ionenselektierer). Anschließend wird die kinetische Energie der *Precursor-Ionen* in einem Decelerator modifiziert. Die

modifizierten *Precursor*-Ionen werden in eine Kollisionskammer geleitet, wo sie unter Zufuhr hoher Energie auf ein Kollisionsgas treffen (für gewöhnlich Stickstoff oder Argon). Durch die Kollision werden die *Precursor*-Ionen weiter dissoziiert (*collisions induced dissociation*; CID). Die dabei entstandenen Ionen werden als *MS/MS-Ionen* bezeichnet. Beim Austritt aus der Kollisionskammer werden die MS/MS-Ionen beschleunigt und durch einen zweiten TOF-Analysator geleitet (*MALDI TOF/TOF*). Im Massenspektrometer werden die Ionenstrahl über Spiegelreflektoren zu einem Linear-Detektor sowie zu einem Reflektor-Detektor geleitet (Westermeier & Naven, 2002).

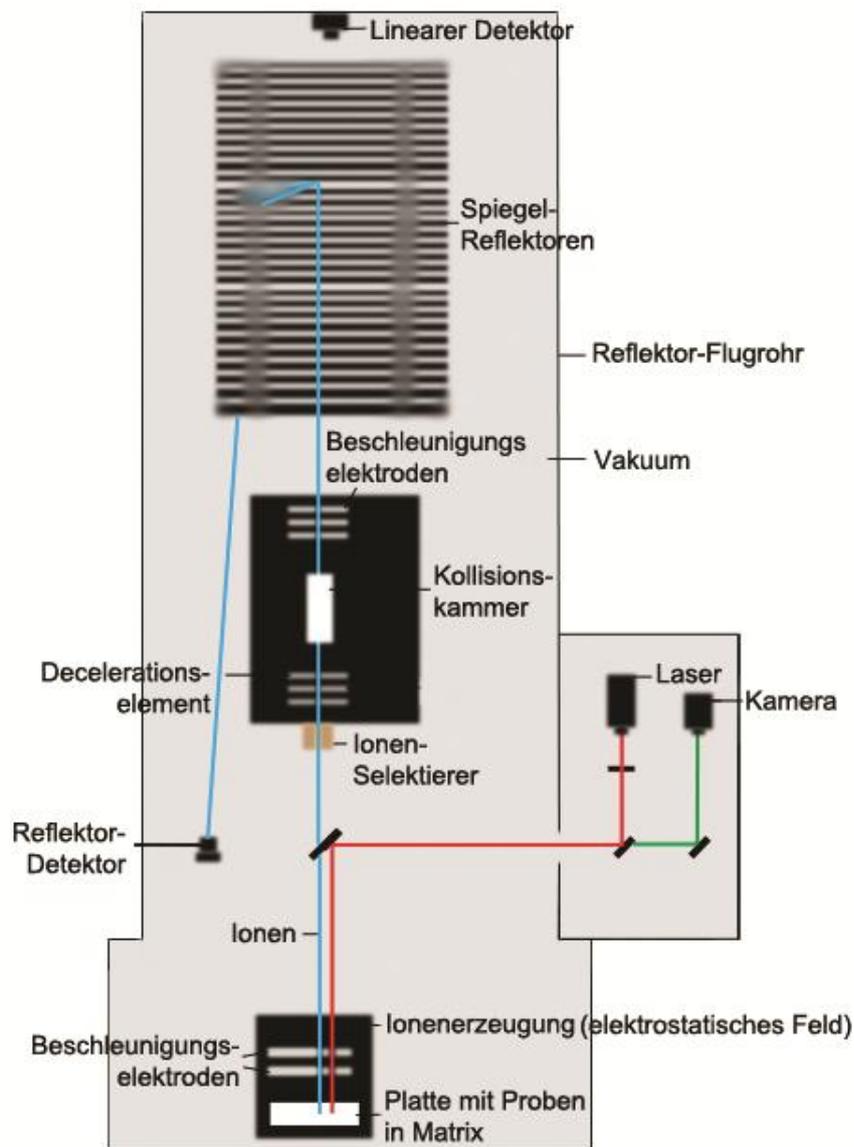


Abb. Anhang 2.1: Schematischer Aufbau sowie Funktionsweise eines ABI 4800 MALDI TOF/TOF Massenspektrometers. Die Probe wird in einer Matrix eingebettet auf eine Applikationsplatte aufgetragen, in einem elektrostatischen Feld mit einem Laser beschossen und für die erste TOF-Analyse beschleunigt. Nach der ersten TOF-Analyse werden die Precursor Ionen nach Massekriterien vorselektiert (Ionenselektierer). Die kinetische Energie der Precursor Ionen wird in einem Decelerator für die folgende Kollision mit dem Kollisionsgas angepasst. Die in der Kollisionskammer entstandener MS/MS Ionen werden beschleunigt und durchlaufen einen zweiten TOF-Analysator. Spiegel-Reflektoren leiten den Ionenstrahl zu einem Linear- und einem Reflektor-Detektor, über die die Detektion von m/z erfolgt (Herstellerangaben ABI PRISM 4800 MALDI TOF/TOF Massenspektrometer, Applied Biosystems).

Anhang 2.2: Das vMALDI LTQ Ionenfallen-Massenspektrometer

Das vMALDI-LTQ System (Fisher Scientific) besteht aus einem hochsensitiven MALDI-Analysator (vMALDI), der mit einer linearen Ionenfalle (LTQ) gekoppelt ist. Es handelt sich also, wie schon beim MALDI-TOF/TOF, um ein MS/MS System.

In einem Ionenfallen-Massenspektrometer werden die in der MALDI entstandenen *Precursor*-Ionen vor der Detektion in einem geschlossenen System gehalten und beschleunigt (Abb. Anhang 2.2). Prinzipiell besteht eine Ionenfalle aus einer Ringelektrode, die von zwei Kappen umgeben ist. Durch Anlegen von Wechselspannung entsteht auf der gesamten Ringelektrode eine quadrupolare Hochfrequenz (Lottspeich & Zorbach, 1998). Im vMALDI-LTQ System werden zunächst alle *Precursor*-Ionen durch eine Eintrittskappe in die Ionenfalle eingeschleust. Durch Modulation der Austrittskappenöffnungsweite werden *Precursor*-Ionen eines definierten m/z -Bereiches in der Ionenfalle gefangen. Alle übrigen Ionen treten aus der Ionenfalle aus und dienen der Detektion der PMF-Spektren. Die gefangenen *Precursor*-Ionen werden in stabilen Bahnen um die Ringelektrode herum geleitet, angeregt und mit dem Kollisionsgas Helium begast. Dadurch kommt es zur weiteren Fragmentierung der *Precursor*-Ionen in sogenannte *MS/MS-Ionen*. Die Detektion der MS/MS-Spektren erfolgt nach sequenzieller Ausschleusung der Ionen durch die Austrittskappe (van Eyk & Dunn, 2003).

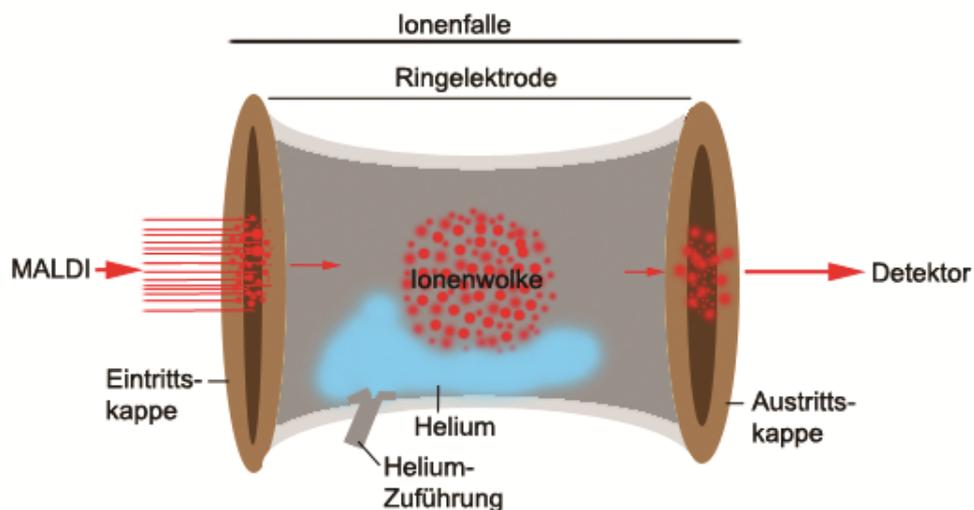


Abb. Anhang 2.2: Schema des Funktionsprinzips eines vMALDI-LTQ Massenspektrometers.

Anhang 2.3: Funktionsprinzip des Easy nLC HPLC-Systems und der HCT Ultra ESI MS/MS

Im kombinierten Easy nLC HPLC und HCT Ultra ESI MS/MS System werden methodisch HPLC und ESI MS/MS miteinander kombiniert (Abb. Anhang 2.3). Im Anschluss an die HPLC wird die gelöste Probe unter Atmosphärendruck zur Ionisation über einem elektrischen Feld versprüht (Lottspeich & Zorbias, 1998). Die Kapillaröffnung, durch welche die Probe gesprüht wird, ist dabei nur wenige Millimeter vom Ioneneinlass des Massenspektrometers entfernt. Das elektrische Feld in der HCT Ultra Elektrospray Ionenfalle wird aus zwei hintereinander geschalteten Oktopolen gebildet (Herstellerangaben, Bruker Daltonics, Bremen).

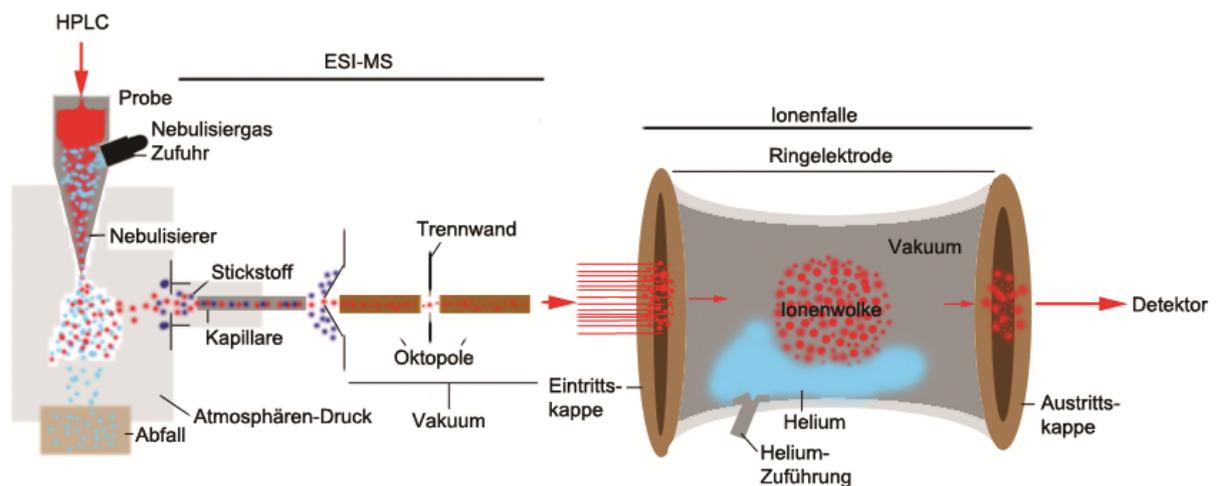


Abb. Anhang 2.3: Schematische Darstellung der Kombination aus Easy nLC HPLC-System und HCT Ultra ESI MS/MS.

Anhang 3: 2-D DIGE und MS/MS Ergebnisse des Vergleichs von MLP^{-/-} und wt Herz

Tab. Anhang 3a: Übersicht der 2-D DIGE- (pH 4-7) und MS/MS-Ergebnisse aus dem Vergleich von MLP^{-/-} - und wt Herzen.

ID	Protein	Theor. MW (kDa)	pI	Expressionsänderung im MLP ^{-/-} [n-fach]				# detektierter Peptide - MS/MS	# protein-spezifischer Peptide	Sequenzen von Peptid 1 und 2	Mr (theor.) Peptid 1 und 2	Unipro/PI #	Link zum Mascot Ergebnis (Ausnahme: Proteinlot-Ergebnisse)
				1 Woche n = 5	4 Wochen n = 5	12 Wochen n = 6	12 Wochen n = 6						
589	Hitzeschock-Protein $\beta 1$ isoform A (HSPB1)	23,06	6,12	2,53*	2,33**	x	3	3	SPSWEPRDWWYPAHSRLFDQAFGVPR VSLDWNHFAPEELTVK	3183,5316 1796,9309	P14602	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080905/FTFAobEST.dat	
973	Hitzeschock-Protein $\beta 8$ (HSPB8)	21,69	4,92	x	1,69**	x	2	2	LSSAWPQTLR FGVPAEGRSPPPFPPEPWK	1086,5822 2069,0371	Q8JK92	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080905/FTFAozSwO.dat	
739	Stress-70 Protein; 70kDa Hitzeschock-Protein 9) (GRP75)	73,77	5,91	x	x	1,49	6	5	NAVITVPAYFNDISQR DAGQISGLNVLK	1693,8424 1241,6728	P38647	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080903/FTFAzunO.dat	
664	Major Vault Protein (MVP)	96,18	5,43	2,23***	x	x	4	4	IPYYHYIHLVDQSNVSR DAGSSVLFDVTGQVR	2151,0861 1620,8108	Q8EQK5	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080902/FTFAteaOO.dat	
615				2,18**	x	x	2	2	DAGSSVLFDVTGQVR VPHNAAVQVYDYR	1620,8108 1530,7579		http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080902/FTFAteeTE.dat	
523	2-Oxoisovalerat Dehydrogenase UE α (ODBA)	42,33	5,23	-1,49*	x	x	4	0	AGFAGDDAPRAVFPISVGRPR IWHHTFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPK	2173,1392 3469,7783	P50136	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080830/FTTIOJtml.dat	
1202	Malat Dehydrogenase (MDHC)	36,66	6,16	x	x	-1,64**	2	2	GEFITVQQR FVEGLPINDFSR	11776,091 1392,7038	P14152	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080903/FTFAmeCL.dat	
947	Laminin UE $\alpha 2$ (LAMA2)	35,16	5,75	x	x	1,55**	2	2	LFVGGAPPEFQPSPLR INHADFATVQLR	1710,9083 1383,8975	Q60675	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080906/FTFAmnhTe.dat	
2953	Proteasom- Aktivator-Komplex UE 1 (PSME1)	28,83	5,73	x	2,02**	x	2	2	APLDIPVPDPVK VFELMNLHTKLEGFHTQISK	1259,7125 2506,289	P97371	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080906/FTFAmnhES.dat	
1196	Succinat Dehydrogenase [Ubiquinon] Flavoprotein UE (DHSA)	73,62	7,06	x	x	1,57**	3	3	VSDAISTQYVWDHEFDVAVVWVGGAGGLR DHVYVQLHLPPEQLATR	2928,4618 2166,1334	Q8K2B3	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080903/FTFAmncL.dat	
1223	Phosphoglucomutase-1 (PGM1)	61,76	6,3	x	x	1,79**	6	6	TOAYPDQKPGTISGLR FYMTEAIQLIVR	1617,8111 1498,7854	Q9D0F9	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080903/FTFAmamt.dat	
1623				x	-1,54*	x	8	8	LVEVAQHLGESTVTR IPVGPETLGR	1649,9101 1037,5869		http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080904/FTFAoaEem.dat	
3502	Mitochondriale ATP Synthase UE β (ATPB)	56,27	5,19	x	-1,64*	x	1	1	AHGGYSVFAGVGER	1405,6739	P56480	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080906/FTFAmnhEO.dat	
707				2,02*	1,68*	x	2	2	LVEVAQHLGESTVTR VALTGLTVAEYFR	1649,9101 1438,782		http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080830/FTTIOJtnh.dat	

Fortsetzung Tab. Anhang 3a: Übersicht der 2-D DIGE- (pH 4-7) und MS/MS-Ergebnisse aus dem Vergleich von MLP^{-/-}- und wt Herzen.

ID	Protein	Theor. MW (kDa)	pI	Expressionsänderung im MLP ^{-/-} [n-fach]				# detektierter Peptide – MS/MS	# protein-spezifischer Peptide	Sequenzen von Peptid 1 und 2	Mr (theor.) Peptid 1 und 2	Uniprot/IPI #	Link zum Mascot Ergebnis (Ausnahme: Proteinpilote-Ergebnisse)
				1 Woche n = 5	4 Wochen n = 5	12 Wochen n = 6	18 Wochen n = 6						
4330	Kininogen-1 oder -2 (KNG1)	74,14	6,05	x	-2,13*	x	x	2	1	YVIEFIAR RPPGFSPFR	1009,5596 1059,5775	O08677	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080904/FTFAortHnh.dat
1070	Myokardiales Fettsäure-bindendes Protein (FABPH)	14,81	6,11	x	x	-4,23*		2	2	SLGVGFATR LILLTHGSSVSTR	906,4923 1495,8722	P11404	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080905/FTFAoearnR.dat
1429	Ferritin leichte Kette 1 (FRIL1)	20,85	5,66	x	x	1,7*		1	1	VAGPQPAQTGAPQGSGLGYLFR	2402,2441	P29391	Proteinpilote
848	Galectin-1 (LEG1)	15,2	5,32	x	1,53**	x		3	3	DSNNLCLHFNPR FNAHGDANTVGNK	1485,6783 1660,7628	P16045	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080905/FTFAobTms.dat
432	Myosin Regulatorische Leichte Kette 2, kardiiale Isoform (MLRV)	18,85	4,86	x	x	1,69		4	4	EAFITMDQNRDGFIDKNDLRDITFAALGR GADPEETILNAFK	3280,5783 1403,6932	P51667	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080905/FTFAobcmL.dat
481	Myosin Leichte Kette 3 (MYL3)	22,52	5,03	x	1,55*	x		3	3	AAPAPAAAAPAAAPEPERPK ITYGQCGDVLRLALGNPTQAEVLR	2092,1065 2676,3653	P09542	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080904/FTFAofeEO.dat
937	Sorbin und SH3 Domäne-enthaltendes Protein 2 (SRBS2)	133,46	8,77	x	1,71**	x		2	1	APHYGGVDESIGPTAIR AQPARPPVPVQGEIGEAIAK	2046,0634 2122,1535	Q3UTJ2	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080903/FTFAmcoet.dat
4257	Desmin (DESM)	53,52	5,21	2,64*	2,02***	x		5	5	TFGGAPGFSLGSPLSSPVFPR FLEQQNAALAAEVNVR	2077,0633 1672,8532	P31001	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080904/FTFAoasTO.dat
627	Desmin (DESM)	53,52	5,21	2,64*	2,42**	x		2	2	RFLEQQNAALAAEVNRL RINLPIQIFTSALNFRE	1673,9015 1633,948	P31001	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20080829/FTFIOHfme.dat

ID #: Identifikationsnummer für die Lokalisation in Abb. 19; theor. MW: theoretisches Molekulargewicht; n: Anzahl biologischer Replika; Expressionsänderung durch 2-D DIGE-Gel Auswertung durch Ludesi Redfin Software (ANOVA, t-test: ***: p < 0.001, **: p < 0.01, *: p < 0.05); #: Anzahl; Mr (theor.) Peptid 1 und 2: theoretisches MW der Peptide, Uniprot/IPI #: Uniprot- bzw. IPI-Zugriffsnummer. Proteine, die mit der Proteinpilote Software (ABI) identifiziert wurden, sind entsprechend gekennzeichnet. UE: Untereinheit.

Tab. Anhang 3b: Übersicht der 2-D DIGE- (pH 6-11) und MS/MS-Ergebnisse aus dem Vergleich von MLP^{-/-}- und wt Herzen.

ID # Protein	Theor. MW (kDa)	pI	Expressionsänderung im MLP ^{-/-} [n-fach]					# detektierter Peptide – MS/MS	# protein-spezifischer Peptide	Peptid-Sequenzen	Mr (theor.) Peptid 1 und 2	Uniprot / IPI #	Link zu Mascot Ergebnis (Ausnahme: Proteinpilot Ergebnisse)
			1 Woche n = 4	1 Woche n = 4	1 Woche n = 5	1 Woche n = 4	1 Woche n = 5						
954 FHL-1 32kDa Isoform	33,81	8,76	1,4*	14,29*	12,65**	3	3	YWHDNCFR FTAVEDQYYVDCYK	1196,4822 1959,8019	P97447-1	http://www.matrixscience.com/cgi/master_res ults.pl?file=../data/20080902/FTAFAGEME.dat		
4 Cypher (LDB3)	77,58	7,96	x	2,7*	2,21*	2	2	VLPGFSSQR TPLCGHCNIVIRGFLVAMGR	949,5345 2402,177	Q9UKS4-3 oder Q9UKS4-1	http://www.matrixscience.com/cgi/master_res ults.pl?file=../data/20080901/FTTOfHSS.dat		
276 Calcisarin-1 (MYOZ)	29,8	8,53	x	x	1,88**	2	2	YTFENFQYESR FLAFANPLSGR	1482,6415 1191,64	Q9JLW5	http://www.matrixscience.com/cgi/master_res ults.pl?file=../data/20080901/FTTAFnHh.dat		
95 Phosphogluco-mutase-ähnliches Protein 5 (PGM5)	62,75	6,77	-1,59*	x	x	2	1	TIEEYACPDLR NIFDFNAIK	1478,7075 1080,5604	Q8BZF8	http://www.matrixscience.com/cgi/master_res ults.pl?file=../data/20080902/FTTAFxsee.dat		
238 α-Crystallin Kette B (CRYAB)	20,06	6,76	x	3,11**	2,23**	2	2	RPFPPFHSPSR IPADVDPLITSSLSDDGVLTVN	1373,6993 2623,3705	P23927	http://www.matrixscience.com/cgi/master_res ults.pl?file=../data/20080901/FTTAFnETR.dat		
76			1,61*	6,32**	6,61***	2	1	RPFPPFHSPSR QDEHGFISR	1373,6993 1070,5285		http://www.matrixscience.com/cgi/master_res ults.pl?file=../data/20080902/FTTAFHnE.dat		
419 T-Komplex Protein 1 UE γ (TCPG)	60,63	6,28	x	1,88*	x	5	1	IPGGIEDSCVLR AMTGEQWVYR	1427,7782 1336,6541	P80318	Proteinpilot		
275 Annexin A2 (ANXA2)	38,94	7,55	x	x	1,51*	3	2	TAVETAVLLLR AVAQALEVIPR AMTGEQWVYR	1184,7267 1165,7094 1352,6354	P07356	http://www.matrixscience.com/cgi/master_res ults.pl?file=../data/20080901/FTTOfEES.dat		
1241 Mitochondriale Acetyl-Coenzyme A Synthetase 2-ähnliches Protein, (ACS2L)	75,32	6,51	1,63**	x	x	3	3	GVDEVTWILNLR QDIAFAYQR	1541,8413 1110,5458	Q89NB1	http://www.matrixscience.com/cgi/master_res ults.pl?file=../data/20080902/FTTAFxST.dat		
571 CFL-2 (COF2)	18,71	7,66	x	2,03**	2,31*	1	1	AVITFNGQLR INQFYGAFTAVR	1117,6244 1335,6935	P45591	http://www.matrixscience.com/cgi/master_res ults.pl?file=../data/20080902/FTTAFGHwe.dat		
268 Elongationsfaktor 2 (EF2)	85,31	6,41	x	x	1,89*	5	2	YEWDAEAR ALLELQLEPEELYQIFQR VNFVTDQIR AYLPVNESFGFTADLR GEGQLSAER	1137,5453 2219,2 1090,6075 1798,9298 1016,5289	P58252	Proteinpilot		

ID #: Identifikationsnummer für die Lokalisation in Abb. 19; theor. MW: theoretisches Molekulargewicht; n: Anzahl biologischer Replika; Expressionsänderung durch 2-D DIGE- Gel Auswertung durch Ludesi Redfin Software (ANOVA, t-test: ***: p < 0.001, **: p < 0.01, *: p < 0.05); #: Anzahl; Mr (theor.): Peptid 1 und 2; theoretisches MW der Peptide, Uniprot/IPI #: Uniprot- bzw. IPI-Zugriffsnummer. Proteine, die mit der Proteinpilot Software (ABI) identifiziert wurden, sind entsprechend gekennzeichnet. UE: Untereinheit.

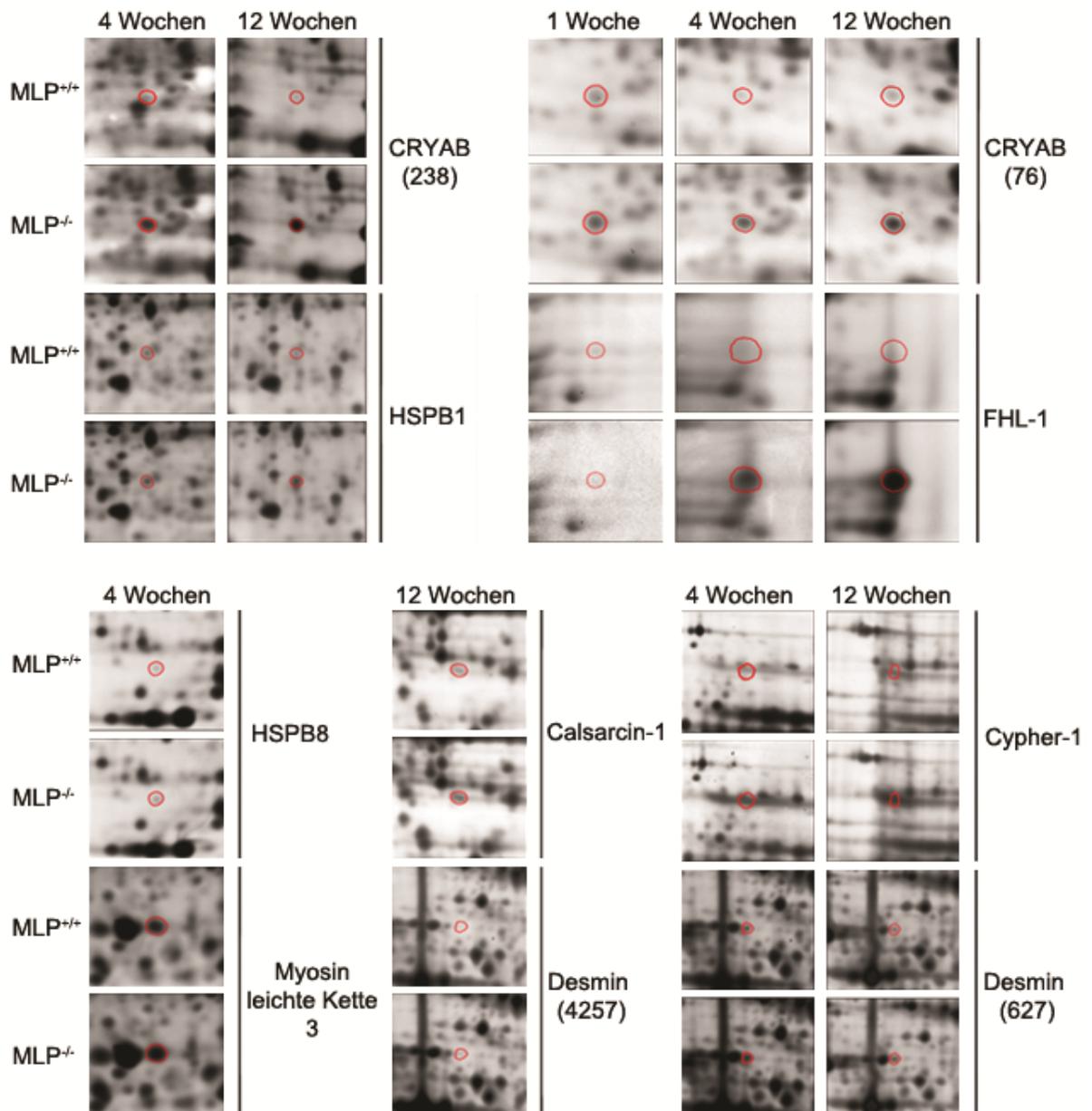
Anhang 4: Zoom auf einige 2-D DIGE Spots in MLP^{-/-} und wt Herzen

Abb. Anhang 4: Zoom auf einige 2-D DIGE Spots, die signifikante Expressionsunterschiede zwischen MLP^{-/-} und wt Mauserherzen aufwiesen (rot). CRYAB: alpha B-Crystallin; FHL-1: 32 kDa Isoform von FHL-1; HSPB8: Hitzeschockprotein beta 8.

Anhang 5: 2-D DIGE- und MS-Ergebnisse des Vergleichs von MLP^{W4R/W4R} und wt HerzenTab. Anhang 5: Übersichtstabelle der 2-D DIGE- (pH 6-11) und LC-MS/MS-Ergebnisse des Vergleichs von MLP^{W4R/W4R} und wt Herzen.

ID #	Expressions- änderung im MLP ^{W4R/W4R} [n-fach]	Protein	Uniprot #	MW [kDa]	pI	Mascot Score	# detektierter Peptide	SC [%]	m/z	MW kalk.	Z	$\Delta m/z$ [Da]	Rt [Min]	Peptid Sequenzen
98	-2,88*	Lumican (LUM)	P51885	38,24	6	85	2	9,47	837,3949	2.509,22	3	-0,0198	29,9	KSIPTVNNENLYLEWLEK F
									637,3826	1.272,67	2	0,0416	19,2	KSLQDLQLTNNKI
									714,7231	2.141,13	3	0,0049	35,9	KAVLDVAETGTEAAATGVIGGIRK
									884,3955	1.766,86	2	-0,0405	22,7	KEVFTEQADLSGITETK K
									479,2908	956,47	2	0,0477	18,3	KFSIASNYRL
									737,3308	2.208,97	3	-0,0011	30,4	KISFDPQDTFESEFYLDK R
									833,4541	2.497,38	3	-0,0129	36,7	KNPDTNMFSPLSAALALVSLGAK G
									814,9491	1.627,88	2	0,0008	27,9	KTLFPSQIEELNLPK F
									589,8323	1.177,59	2	0,0300	21,8	KTMEEILEGLK F
									720,3403	2.158,02	3	-0,0076	24,7	RALYQTEAFTADFQQPTEAK N
108	5,20***	Lumican (LUM)	P51885	38,24	6	88	2	9,47	837,7225	2.509,22	3	0,3078	30,1	KSIPTVNNENLYLEWLEK F
									637,3882	1.272,67	2	0,0472	19,5	KSLQDLQLTNNKI
									714,7378	2.141,13	3	0,0196	27,9	KAVLDVAETGTEAAATGVIGGIRK
									671,9008	1.341,69	2	0,0471	25,6	KDLQIAEFHEK T
									814,9635	1.627,88	2	0,0152	28,4	KTLFPSQIEELNLPK F
									972,0287	1.942,08	2	-0,0173	34,5	KLPAGLPTSLTLYLDNNK I
									714,7397	2.141,13	3	0,0215	27,5	KAVLDVAETGTEAAATGVIGGIRK
									671,9026	1.341,69	2	0,0489	25,3	KDLQIAEFHEK T
									1105,4715	2.208,97	2	-0,0227	30,0	KISFDPQDTFESEFYLDK R
									814,9026	1.627,88	2	-0,0457	28,0	KTLFPSQIEELNLPK F
114	8,22***	Serin-Protease-Inhibitor A3K (SPA3K)	P07759	46,85	4,9	483	6	22	815,4052	1.628,82	2	-0,0117	20,2	RMQQVEASLQPETLRK
									752,4419	1.502,82	2	0,0243	33,8	R.TLMVLVNYFEK G
									671,9026	1.341,69	2	0,0489	25,3	KDLQIAEFHEK A
									1105,4715	2.208,97	2	-0,0227	30,0	KISFDPQDTFESEFYLDK R
									691,0663	2.070,21	3	-0,0106	36,6	K.NIVFSPLSAALALVSLGAK G
									815,4052	1.628,82	2	-0,0117	20,2	RMQQVEASLQPETLRK
									666,8220	1.331,63	2	-0,0011	17,0	KATDAEADVASLNLR
									769,8747	1.537,71	2	0,0100	24,8	K.SIDDELELYAQKL
									447,7850	893,46	2	0,0474	9,0	R.KYEEVAR K
									700,3905	1.398,75	2	0,0099	20,3	R.RIQLVEEELDRA
236	3,37*	Tropomyosin- α 1 Kette (TPM1)	P58771	32,86	4,5	228	4	15,5	714,7397	1.942,08	2	-0,0173	34,5	KLPAGLPTSLTLYLDNNK I
									671,9026	1.341,69	2	0,0489	25,3	KDLQIAEFHEK T

Fortsetzung Tab. Anhang 5: Übersichtstabelle der 2-D DIGE- (pH 6-11) und LC-MS/MS-Ergebnisse des Vergleichs von MLP^{WAR/WAR} und wt Herzen.

ID #	Expressions- änderung im MLP ^{WAR/WAR} [n-fach]	Protein	Uniprot #	MW [kDa]	pI	Mascot # detektierter Peptide	SC [%]	m/z	MW kalk.	Z	Δ m/z [Da]	Rt [Min]	Peptid Sequenzen
1740	5,88*	Kininogen-1 (KNG1)	O08677	73,06	6,1	3	5,14	769,3167	1536,66	2	-0,0213	16,4	KESNTELAEDCEIKH
								625,3402	1248,57	2	0,0498	22,3	KTDGSPTFYSFKY
								556,8430	1.111,58	2	0,0477	19,4	RDIPVDSPELKE
								715,9401	1.429,79	2	0,0364	28,6	KAQQQLVIFAGKI
								830,9015	1.659,86	2	-0,0348	23,5	RALSNLSEVPGYNALR
								889,4500	2.665,43	3	-0,0327	35,4	RLQLPVFLQQMQNPESLSLTNPR
								488,7774	975,44	2	0,0496	13,6	KAGFAGDDAPRA
								677,8644	1.353,62	2	0,0491	11,4	KDSWGWDEAOSKR.G
								581,3468	1.160,61	2	0,0340	19,5	KEITALAPSTMKI
								846,0369	2.535,15	3	-0,0207	31,4	KLCWALDFENEMATAASSSSLEKS
246	1,60**	Protein NDRG2 (NDRG2)	P62737	41,98	5,1	8	33,2	750,8508	1.499,70	2	-0,0067	15,9	KQEYDEAGFSVHR.K
								895,9000	1.789,88	2	-0,0496	25,9	KSYELPDGQVITIGNER.F
								791,3658	2.371,15	3	-0,0241	22,4	RKDLYANNVLSGGTITMPGIADR.M
								978,5750	1.955,04	2	0,0495	21,5	RVAPEEHPTLLTEAPLNPKA
								729,4442	1.456,83	2	0,0208	35,2	KTVLIMLNNVAK.A
								720,4459	1.438,78	2	0,0476	30,0	RVALTGLTVAEYFRD
								766,3466	1.529,71	2	0,4821	13,3	KMADSGGQPQLTPGKLL
								798,9187	1.595,78	2	0,0231	34,1	RFGDMQELIQFVRV
								886,7424	2.657,30	3	-0,0311	29,8	RGIQHAPNLENIYWNYSNNRR
								802,7653	2.405,26	3	0,0050	29,4	RVALNHPPDTVEGLVILNIDPNAK.G
3326	2,27*	Protein Phosphatase 1 Regulatorische UE 7 (PP1R7) Mitochondrialer Cytochrom b-c1 Komplex UE 1 (QCR1)	Q3UM45	41,27	4,7	1	4,99	996,0066	1.980,06	2	-0,0318	36,5	RAENIDTLTNLESFLGKN
								677,3253	1.352,62	2	0,0059	14,5	RLCTSATESEVTR.G
								870,9655	1.739,94	2	-0,0127	25,0	RAVAIENPADVSISSRN
								858,3707	1.714,79	2	-0,0314	17,6	RDPREEIEKEQAAAEKA
								849,9293	1.697,85	2	-0,0043	29,0	RFTPGFTFNQIQAAFRE
								653,8501	1.305,64	2	0,0235	21,3	RYYDAIPCNNK.G
								880,9332	1.759,94	2	-0,0419	33,9	RDALLOYLEQQALEVKE
								523,8029	1.045,54	2	0,0254	17,7	RENATLTELRV
								446,5820	1.336,63	3	0,0310	18,6	RFYHFTQQGPRA
								686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	Protein Phosphatase 1 Regulatorische UE 7 (PP1R7) Mitochondrialer Cytochrom b-c1 Komplex UE 1 (QCR1)	Q9CZ13	52,74	5,7	1	2,5	677,3253	1.352,62	2	0,0059	14,5	RLCTSATESEVTR.G
								870,9655	1.739,94	2	-0,0127	25,0	RAVAIENPADVSISSRN
3326	2,27*	40S Ribosomales Protein SA (Laminin Rezeptor 1) (RSSA)	P14206	32,82	4,7	4	21,7	858,3707	1.714,79	2	-0,0314	17,6	RDPREEIEKEQAAAEKA
								849,9293	1.697,85	2	-0,0043	29,0	RFTPGFTFNQIQAAFRE
3326	2,27*	Tropomodulin-4 (TMOD4)	Q9JLH8	39,24	4,6	3	10,1	523,8029	1.045,54	2	0,0254	17,7	RENATLTELRV
								446,5820	1.336,63	3	0,0310	18,6	RFYHFTQQGPRA
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
								769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	686,9133	1.371,78	2	0,0162	36,0	KLMILLEVISGERL
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3	4,25	769,3683	1.536,77	2	-0,0226	24,0	RFAIQDISVEETSAAE
3326	2,27*	α-Aktinin-2 (ACTN2)	Q9J191	103,59	5,3	3							

Fortsetzung Tab. Anhang 5: Übersichtstabelle der 2-D DIGE- (pH 6-11) und LC-MS/MS-Ergebnisse des Vergleichs von MLP^{WARWAR} und wt Herzen.

ID #	Expressions- änderung im MLP ^{WARWAR} [n-fach]	Protein	Uniprot #	MW [kDa]	pI	Mascot Score	# detektierter Peptide	SC [%]	m/z	MW kalk.	Z	Δ m/z [Da]	Rt [Min]	Peptid Sequenzen
859	-1,48*	Mitochondriale Isocitrat- Dehydrogenase [NAD] UE α (IDH3A)	Q9D6R2	39,61	6,3	587	8	31,2	514,8070	1.027,51	2	0,0454	24,0	K.APIQWEER.N
									924,0023	1.845,95	2	0,0193	36,7	K.DMANPTALLLSAVMMLR.H
									523,8376	1.045,58	2	0,0419	16,9	KLITEEASKRI
									795,9270	1.589,87	2	-0,0159	27,3	K.TPIAAGHPSMNLRLK
									696,4281	1.390,75	2	0,0480	27,5	K.TPYTDVNVITRE
									835,0582	2.501,23	3	0,3081	33,5	RENTEGEYSGIEHWDGWQSIKL
									754,3846	2.259,14	3	0,3321	27,4	R.KTFDLYANWRPCVSIIEGYKT
									521,3140	1.040,56	2	0,0260	17,3	R.NVTAIQGGGK.W
									813,8857	1.625,83	2	-0,0346	24,3	K.LIASYADDEAAVPPNKKI
									627,3649	1.252,64	2	0,0390	26,8	K.MWDSAYEVK.L
									815,4409	1.628,85	2	0,0082	35,6	K.SLADELALVDVLEDKL
									624,8437	1.247,59	2	0,0400	21,2	R.VIGSGCNLDSAR.F
		L-Lactat Dehydrogenase B Kette (LDHB)	P16125	36,55	5,7	217	4	16,2						

ID #: Identifikationsnummer im 2-D Gel; Expressionsänderung gemäß der Analyse mit Ludesi Redfin Software (ANOVA Test: * : p<0,05; ** p>0,01, ***: p<0,001; n=5) (positive Wert: erhöhte Expression, negative Wert: verminderte Expression); Uniprot #: Uniprot-Zugriffsnummer; # detektierter Peptide: Anzahl der detektierten Peptide; SC [%]: prozentuale Abdeckung der Protein-Gesamtsequenz durch die detektierten Peptide; m/z: Masse/Ladung-Verhältnisse der detektierten Ionen; MW kalk.: errechnetes MW der Peptid-Sequenz; Δ m/z [Da]: Verhältnis von Massendifferenz zu Ladung; Rt [Min]: LC Laufzeit in Minuten; UE: Untereinheit.

Anhang 6: MS-Spektren einzelner Peptide, die zur Proteinidentifikation führten

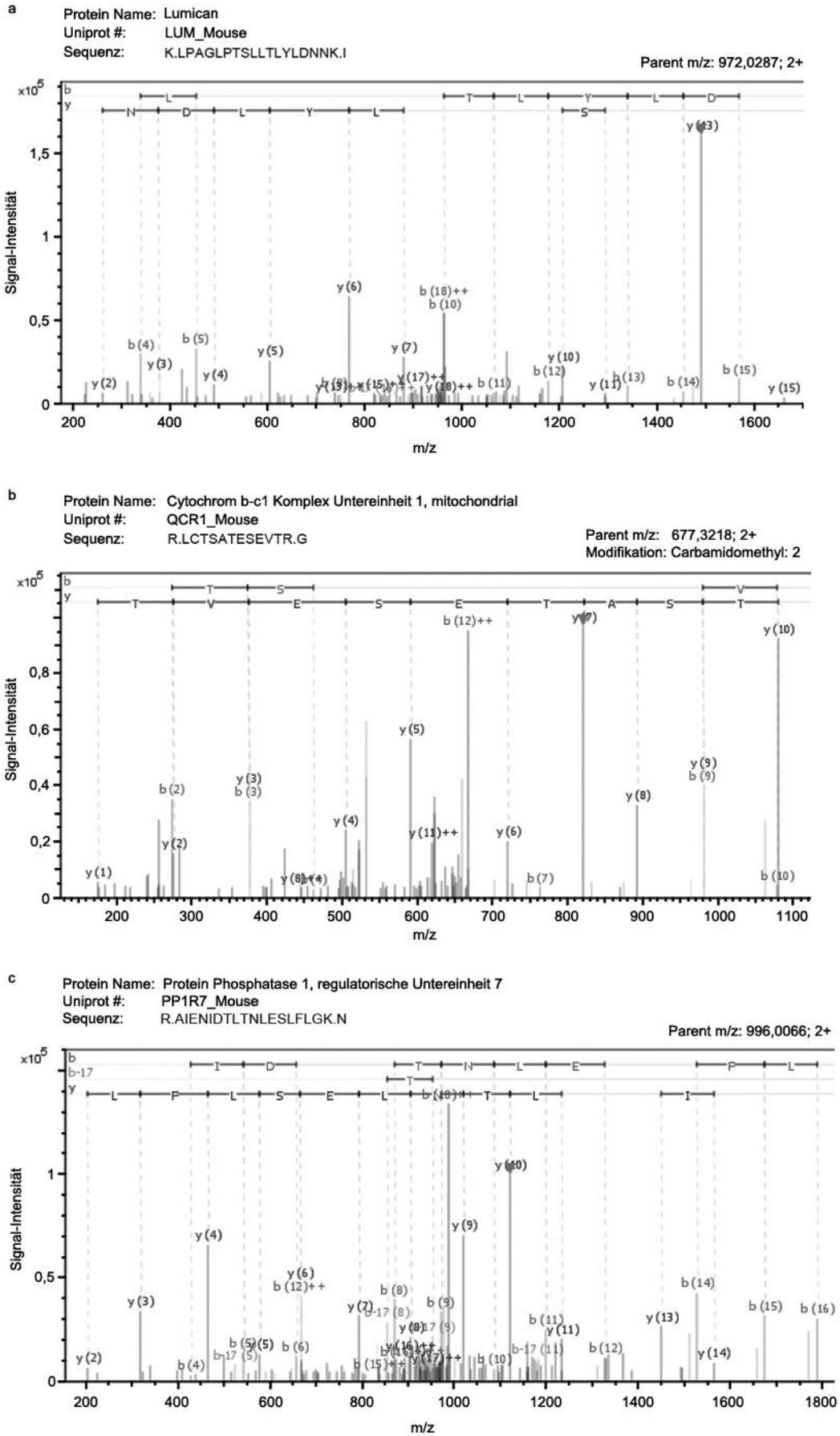


Abb. Anhang 6: Massenspektren einzelner Peptide, die zur Proteinidentifikation führten.

Anhang 7: vMaldi Spektren zu den MLP Proben M1, M2, M4 und M5

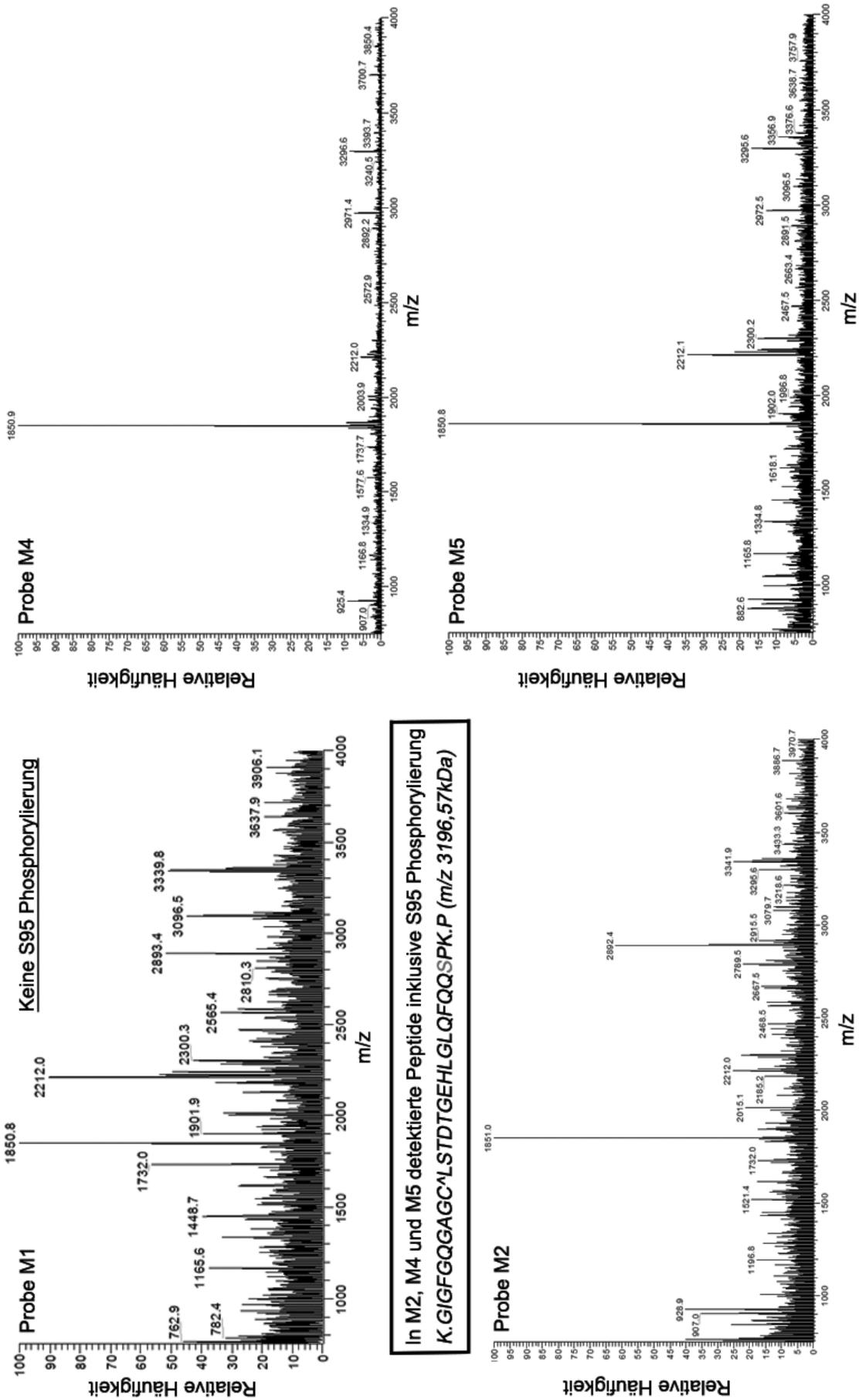


Abb. Anhang 7: vMALDI Spektren zu den MLP Proben M1, M2, M4 und M5. m/z: Masse/Ladungs-Verhältnis.

Anhang 8: Immunfluoreszenzfärbungen an NRVM mit MLP- und P-S95 MLP-Antikörpern

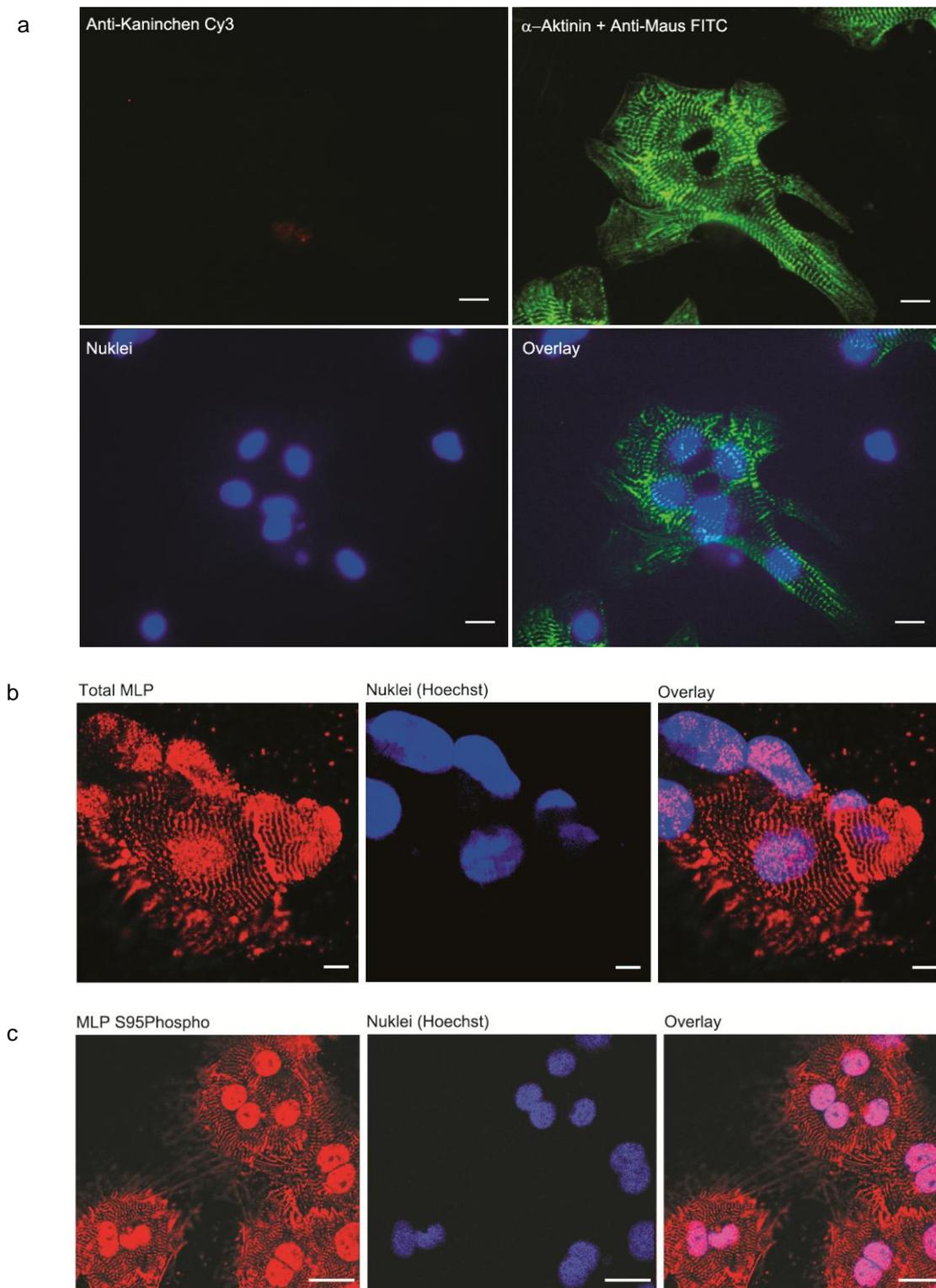


Abb. Anhang 8: Immunfluoreszenzfärbung von NRVM mit MLP und P-S95 MLP Antikörper. (a) Negativkontroll-Färbung von NRVM mit Anti-Kaninchen Cy3, Anti- α -Aktinin + Anti-Maus FITC sowie Hoechst-Farbstoff (Nuklei). Messskala entspricht 10 μ m. (b) MLP (Cy3), Nuklei (Hoechst) und Overlay. Messskala: 5 μ m. (c) P-S95 MLP (Cy3), Nuklei (Hoechst-Farbstoff) und Overlay. Messskala: 20 μ m.

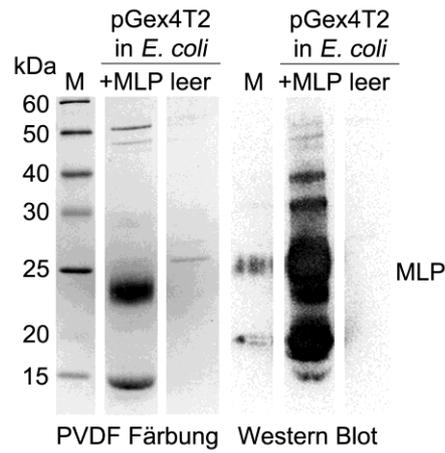
Anhang 9: Kontrolle zur Expression von MLP-pGEX4T2 in *E. coli* DH5 α 

Abb. Anhang 9: Western Blot zur Überprüfung der Expression von rekombinatem MLP in *E. coli* DH5 α -Kulturen. Gezeigt sind PVDF-Färbung und Western Blot Signale nach Inkubation mit dem MLP Antikörper. M: MW-Marker.

10. Abkürzungsverzeichnis

AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
ABC-Kinasen	Proteinkinase A, B und C
ACN	Acetonitril
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid
AMP	Ampicillin
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
AngII	Angiotensin-II
ANOVA-Test	<i>One-Way</i> ANOVA Test
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäuren
AT1A	G _{q/11} -gekoppelter GPCR Angiotensin-II Typ 1a
ATP	Adenosintriphosphat
ATPB	ATP Synthase β Untereinheit
BCA	Bicinchoninsäure
BNP	Natriuretisches Peptid (<i>brain natriuretic peptide</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
[Ca ²⁺]	Kalziumkonzentration
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-Propansulfonat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFL-2	Cofilin-2
CIB1	Ca ²⁺ und Integrin-bindendes Protein-1
CID	Kollisions-induzierte Dissoziation
CK II	Calmodulin Kinase II
CnA	Calcineurin
CRP	Cystein-reiches LIM-Domänen Protein
CRYAB	α -B-Crystallin
CSRP3	Cystein-und-Glycin-reiches Protein-3 (MLP)
C-terminus	Carboxyterminus
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
DAG	Diacylglycerin
DCM	dilatative Kardiomyopathie
ddH ₂ O	<i>aqua bidest</i>
DHF	diastolische Herzinsuffizienz
DKO	<i>doppel-knock-out</i>
DMEM	<i>low-Glucose</i> DMEM
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
2-D DIGE	<u>2</u> -dimensionale Fluoreszenz <u>D</u> ifferenz <u>G</u> eleelektrophorese
2-D GE	<u>2</u> -dimensionale <u>G</u> eleelektrophorese

E18	embryonales Entwicklungsstadium Tag 18
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extra</i> cellular <i>matrix</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
ERK1/2	Extrazelluläre signalregulierte Kinase 1 und 2
ESI	Elektrospray-Ionenfalle
<i>et al.</i>	<i>et alia / alii / aliae</i>
ET-1	Endothelin-1
EtOH	Ethanol
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	fötales Kälberserum
FHL-1	Viereinhalb-LIM-Domänen Protein 1
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fok. Ak.	Fokaler Adhäsionskomplex
g	Gramm
G _{ai} -Protein	inhibitorisches G-Protein
G _{as} -Protein	stimulatorisches G-Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA4	GATA-Sequenz-bindender Transkriptionsfaktor 4
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GST- <i>tag</i>	Glutathion-S-Transferase-Markierung
GTP	Guanosintriphosphat
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HDAC-4	Histon-Deacetylase-4
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HSPB1	Hitzeschockprotein 1 β
HSPB8	Hitzeschockprotein 8 β
IAA	Iodacetamid
ICM	ischämische Kardiomyopathie
IDCM	idiopathische dilatative Kardiomyopathie
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
ILK	Integrin-Linked-Kinase
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPG-Strip	immobilisiertes pH Gradienten Gel
IPTG	Isopropyl β -D-1 Thiogalactopyranosid
JNK	C-Jun N-terminale Kinase

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
KPr	Kaliumpropionat
LB	Luria Bertani
LC	Flüssigchromatografie (<i>liquid chromatography</i>)
LV	linker Ventrikel
μ	micro
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MARCK	myristoyliertes und alanin-reiches PKC Substrat
max.	maximal
MDa	Megadalton
mM	millimolar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF2C	Myozyten <i>Enhancer</i> Faktor 2C
MEK1/2	MAPK-Kinasen mit dualer Spezifität MEK1 und MEK2
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MetOH	Methanol
MgPr	Magnesiumpropionat
Min	Minuten
ml	Milliliter
MLP	Muskel LIM Protein
MLP ^{+/-}	heterozygoter MLP KO
MLP ^{-/-}	homozygoter MLP KO
MLP ^{W4R/W4R}	homozygoter MLP W4R <i>knock-in</i>
MLP/AT1a DKO	DKO von MLP und dem G _{q/11} -gekoppelten GPCR AngII Typ 1a
MP	Milchpulverlösung
MRF-4	Muskel-regulatorischer Faktor-4
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MVP	Major Vault Protein
MW	Molekulargewicht
MyBPC	Myosin-bindendes Protein C
m/z	Verhältnis von Ionen-Masse zu Ionen-Ladung
Nano ESI-MS	Nano Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie
NFAT	Nuklearer-Faktor von aktivierten T-Zellen
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumbicarbonat
nI	Nanoliter
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NO	Stickstoffmonoxid
NRVM	neonatale Rattenkardiomyozyten
N-terminal	aminoterminal
N-terminus	Aminoterminal
N2B _{us}	Titin Domäne N2B <i>unique sequence</i>
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
OD	optische Dichte

p	Druck
P	anorganisches Phosphat
PCAF	Lysin-Acetyltransferase 2B
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> eleelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
Para-Beads	Para-Amino-Benzamidin-Beads
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PEVK	Prolin- (<u>P</u>), Glutamat- (<u>E</u>), Valin- (<u>V</u>) und Lysin- (<u>K</u>)
PFA	Paraformaldehyd
pI	isoelektrischer Punkt
PICOT	PKC-interagierender Cousin von Thioredoxin
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A / cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PLC β	Phospholipase C β
PMF	Peptidmassenfingerrabdruck
P-S95 MLP	phosphorylierungsspezifischer MLP S95 Antikörper
PTM	posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	Radius
RACK	Rezeptor für aktivierte C-Kinasen
RCAN-1	Regulatoren von Calcineurin-1
rek. MLP	rekombinantes humanes MLP
RhoA	Ras homologes Genfamilien Mitglied A
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RV	rechter Ventrikel
S46	Serin-46
S95	Serin-95
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDM	Standardabweichung des Mittelwertes
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA 2A	Inhibitor der Ca ²⁺ -ATPase 2A des SR
SHF	systolische Herzinsuffizienz
SRBS2	Sorbin und SH3 Domänen-enthaltendes Protein 2
Std	Stunde(n)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T	Ventrikelspannung
T84	Threonin-84
Tab.	Tabelle
TAE	Trisacetat EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCPG	T-Komplex Protein 1 γ
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure

Thr	Threonin
TOF	<i>time-of-flight</i> Sensor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
t-Test	Studentischer t-Test
Tween 20	Polysorbat 20
Tyr	Tyrosin
U	Einheiten (<i>units</i>)
üN	über Nacht
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	Relative Zentrifugalkraft

Publikationen

- P-S95 MLP Paper, 2011 (in Arbeit).
- Knöll, R. Kostin, S.; Klede, S., Savvatis, K., Klinge, L., Stehle, I., Gunkel, S., Kötter, S., Babicz, K., Sohns, M., Miodic, S., Didié, M., Knöll, G., Zimmermann, W.H., Thelen, P., Bickeböller, H., Maier, L.S., Schaper, W., Schaper, J., Kraft, T., Tschöpe, C., Linke, W.A. & Chien, K.R. A common MLP (muscle LIM protein) variant is associated with cardiomyopathy. *Circ. Res.* 106 (4): 695-704 (2010).
- Krüger, M., Sachse, C., Zimmermann, W.H., Eschenhagen, T., Klede, S. & Linke, W.A. Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/ AKT pathway. *Circ. Res.* 102 (4): 439-47 (2008).

Versicherungen

Versicherungen nach § 6 Abs. 3, Nr. 5, 6, 9

Hiermit versichere ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Münster,

(Unterschrift)

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

Münster,

(Unterschrift)

Hiermit erkläre ich mich mit der Zulassung von Zuhörerinnen/Zuhörern beim öffentlichen Teil der Disputation einverstanden. *

Münster,

(Unterschrift)

* Auf begründeten schriftlichen Antrag der Kandidatin/des Kandidaten oder des Promotionskomitees an den Promotionsausschuss, kann die Öffentlichkeit von Vortrag und Diskussion ausgeschlossen werden. (§ 9 Abs. 8)

Versicherung nach § 6 Abs. 3 (2)

Hiermit versichere ich, dass ich nicht wegen einer Straftat zu einer Strafe von mehr als einem Jahr Freiheitsentzug verurteilt worden bin, zu deren Begehung ich meine wissenschaftliche Qualifikation missbraucht habe.

Münster,

(Unterschrift)

Mein herzlicher Dank...

...gilt allen, die mich bei meiner Dissertation unterstützt und zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Allen voran bedanke ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Wolfgang A. Linke, für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die geprägt war von vielen anregenden und lehrreichen Diskussionen. Die Arbeit bei Ihnen hat nicht nur meinen fachlichen, sondern auch meinen persönlichen Horizont erweitert – insbesondere, weil Sie es mir ermöglicht haben in Baltimore zu arbeiten und an zahlreichen Kongressen teilzunehmen.

Frau Prof. Eva Liebau danke ich recht herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Herrn Prof. Andreas Püschel danke ich recht herzlich für die Bereitschaft, mich als Drittprüfer zu prüfen.

Großer Dank gilt Frau Dr. Jennifer E. van Eyk, die mich herzlich in Ihrem Labor an der Johns Hopkins Universität in Baltimore (USA) aufgenommen hat und meine Arbeit durch anregende Diskussionen bereichert hat.

Großer Dank gebührt auch Dr. Robert Cole und Tatiana Boronina (Massenspektrometrie-Zentrum, Johns Hopkins Universität, Baltimore, USA) für die vMALDI Analyse an MLP.

Mein herzlicher Dank gilt der Firma Bruker Daltonics und insbesondere Frau Marina Behrens für ihre Hilfe bei der ESI MS/MS Analyse.

Herrn Sebastian Kötter möchte ich herzlich für die Bereitstellung der rekombinanten humanen MLP-Konstrukte danken.

Ein herzlicher Dank gebührt Prof. Ralph Knöll (Kings College, London) für die Bereitstellung des MLP *knock-out*- sowie des MLP/CnA β Doppel-*knock-out*-Mausmodells, Dr. Farah Sheikh (UCSD, San Diego, USA) für die Bereitstellung des FHL-1 *knock-out*-Mausmodells, Dr. Margret M. Redfield (Mayo Clinic, Rochester, USA) für das DHF-Hundemodell und Prof. Cris dos Remedios (Universität Sydney, Australien) für das humane Herzgewebe.

Für kollegiale Zusammenarbeit, anregende Diskussionen sowie engagierte organisatorische bzw. technische Unterstützung danke ich meinen lieben Kollegen aus der Abteilung für Kardiovaskuläre Physiologie: Frauke de Pasquale, Claudia Groll, Judith Krysiak, Michelle Duparc und Marion von Frieling-Salewsky.

Ich danke dem Team von Dr. Jennifer E. van Eyk am Bayview Proteomics Center für die großartige Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit, anregende Diskussionen und viele praktische Tipps. Insbesondere schulde ich Dr. Zongming Fu dafür großen Dank, dass er mich an die 2-D Elektrophorese sowie Massenspektrometrie herangeführt hat.

Weil sie mich und meine Arbeit immer wieder durch ihre konstruktive Kritik sowie durch anregende Diskussionen unterstützt haben, möchte ich Daniel Sabbagh, Maria Hartkamp, Katrin Hildebrandt und Maite Bahrenburg von ganzem Herzen "Danke" sagen.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die immer für mich da waren und mich auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt haben.

