

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pharmakologie

Die Rolle von Nukleosiddiphosphat Kinase-B und -C für die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase
bei Vorhofflimmern

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Lukas Becker
aus Olpe
2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78396

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230706-111417-7

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. D. Dobrev
2. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. P. Kleinbongard

Tag der mündlichen Prüfung: 4. April 2023

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 Nukleosiddiphosphat Kinasen.....	8
1.1.1 Einteilung der NDPKs.....	9
1.1.2 NTP/NDP-Transphosphorylase	10
1.1.3 Histidin-Kinase	11
1.2 Signaltransduktion der G-Proteine im Herzen	12
1.2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	12
1.2.2 Heterotrimere G-Proteine	13
1.2.3 Regulation der G-Proteine	14
1.2.4 Regulation der Adenylylzyklase	16
1.2.5 Effekte der NDPKs auf die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion.....	16
1.2.6 Die Folgen kardialer Erkrankungen auf die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion.....	18
1.3 Vorhofflimmern.....	19
1.3.1 Vorhofflimmern in der Klinik.....	19
1.3.2 Molekulare Mechanismen von Vorhofflimmern	21
1.3.3 Atriales Aktionspotential und Ca ²⁺ -Homöostase.....	21
1.3.4 Ca ²⁺ -Dysregulation bei VHF	23
1.3.5 Regulierung von cAMP bei VHF.....	24
1.3.6 Ektope Aktivität	25
1.3.7 Reentry.....	26
1.3.8 NDPKs und VHF	27

1.4	Ziel dieser Arbeit.....	28
2	MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1	Material.....	30
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Zellkultur und Probengewinnung.....	34
2.2.1.1	HL-1 Zellen.....	34
2.2.1.2	Durchführung der Zellkultur.....	34
2.2.1.3	Gewinnung der Zelllysate.....	35
2.2.2	Die Adenoviren.....	35
2.2.2.1	Amplifikation der Adenoviren.....	36
2.2.2.2	Validierung der Infektionseffektivität.....	37
2.2.2.3	Infektion der HL-1 Zellen mit den amplifizierten Adenoviren.....	38
2.2.3	Proteinbestimmung und Western Blot SDS-PAGE.....	40
2.2.3.1	Proteinbestimmung.....	40
2.2.3.2	Vorbereitung der Proben.....	41
2.2.3.3	Gele.....	41
2.2.3.4	Elektrophorese.....	42
2.2.3.5	Blotting.....	43
2.2.3.6	Proteinnachweis.....	44
2.2.4	Bestimmung des mRNA-Gehalts in HL-1 Zellen.....	44
2.2.4.1	Isolation der mRNA.....	44
2.2.4.2	cDNA-Synthese.....	45
2.2.4.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	45
2.2.4.4	Quantifizierung der gemessenen cDNA.....	47
2.2.5	Bestimmung des cAMP-Gehalts in den HL-1 Zellen.....	48
2.2.6	Statistische Auswertung.....	48

3	ERGEBNISSE	50
3.1	Validierung der Virusinfektion.....	50
3.2	Proteinexpression von EGFP und NDPKs in HL-1 Zellen.....	50
3.3	Einfluss der veränderten NDPK-Expression auf die Proteinexpression.....	53
3.3.1	Proteinexpression von RyR2.....	53
3.3.2	Proteinexpression von CSQ2	57
3.3.3	Proteinexpression von SERCA2a	60
3.3.4	Proteinexpression von PLB	62
3.4	Einfluss der veränderten NDPK-Expression auf die Transkription	68
3.5	Einfluss der veränderten NDPK-Expression auf den cAMP-Gehalt.....	69
4	DISKUSSION.....	71
4.1	NDPKs beeinflussen den cAMP-Gehalt.....	72
4.2	NDPKs beeinflussen die Ca ²⁺ -Homöostase	73
4.3	Klinische Relevanz der Arbeit.....	76
4.4	Limitationen der Arbeit.....	78
4.5	Schlussfolgerung	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	81
7	ANHANG	92
7.1	Abkürzungen	92
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	93

7.3 Tabellenverzeichnis	95
8 DANKSAGUNGEN	96

1 EINLEITUNG

1.1 Nukleosiddiphosphat Kinasen

Die Nukleosiddiphosphat Kinasen (NDPKs) sind multifunktionelle Enzyme, welche ubiquitär und damit in beinahe allen Zellen des Körpers existieren. NDPKs kommen im Zytoplasma, in den Mitochondrien (Milon et al., 2000), in der Plasmamembran (Barraud et al., 2002) und im Nukleolus (Kraeft et al., 1996) der Zelle vor. Somit sind sie in vielen Zellkompartimenten enthalten. NDPKs weisen einen hetero- oder homohexameren Aufbau auf (Abbildung 1), der sich aus den NDPK-Isoformen A-D zusammensetzt (Erent et al., 2001; Gilles et al., 1991; Gonin et al., 1999).

Funktionell sind die NDPKs an einigen intrazellulären Prozessen beteiligt. Aufzuführen sind hier die NTP-Synthese (Pedersen, 1973), die Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Rosengard et al., 1989), die Endozytose (Palacios et al., 2002), der vesikuläre Transport des endoplasmatischen Retikulums (Kapetanovich et al., 2005), die Apoptose (Fan et al., 2003) und die Genregulation und Transkription (Lascu & Gonin, 2000). Sie beeinflussen ebenfalls die Zellmotilität und die Metastasierung von Tumorzellen (Steeg et al., 1988; Wagner & Vu, 2000). Dabei konnte eine unterdrückende Wirkung auf die Metastasierung gezeigt werden (Fan et al., 2003; Rosengard et al., 1989). Somit scheinen sie auch auf voneinander unabhängigen Prozessen in der Zelle Einfluss nehmen zu können.

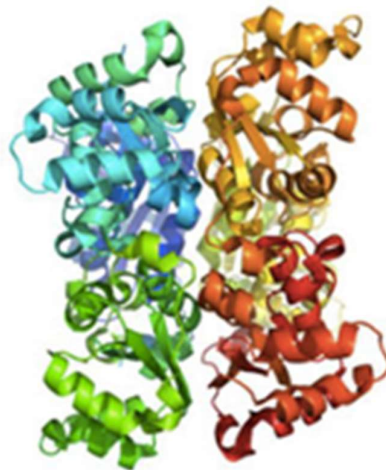


Abbildung 1: Grafische Darstellung des homoheptameren Aufbaus von NDPK-B (Dexheimer et al., 2009)

1.1.1 Einteilung der NDPKs

Die Einteilung der im Menschen existenten NDPKs erfolgt durch die codierenden Gene. Bisher wurden 10 verschiedene Gene identifiziert. Die Unterscheidung der einzelnen Gene erfolgt auf Grundlage der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen in 2 Gruppen. Zur Gruppe 1 werden NME1-NME4 (*expressed in non-metastatic cell*), auch bekannt unter NM23 (*non-metastatic clone 23*), und zur Gruppe 2 NME5-NME9 zugeordnet. Die Gene der Gruppe 1 sind zu 58-88% homolog zueinander, während die Gene der Gruppe 2 nur eine Homologie von 28-45% aufweisen. Die Homologie der beiden Gruppen zueinander beträgt nur 25-34%. Das ebenfalls existente NME10 entspricht dem XRP2 (X-linked Rinitis Pigmentosa 2) und kodiert für eine verkürzte NDPK (Boissan et al., 2009; Lacombe et al., 2000).

Die Proteine der zur Gruppe 1 gehörenden Gene (NME1-4) werden NDPK-A, NDPK-B, NDPK-C und NDPK-D genannt. Ihnen allen ist es möglich als Kinase zu fungieren (Lascu et al., 2000). Sie weisen ein Molekulargewicht von 21 kDa auf. Am häufigsten kommen NDPK-A und NDPK-B vor (Gilles et al., 1991), welche beide auf dem gleichen Genlocus 17q.21.3 (Baker et al., 1993) verortet sind und eine Homologie von 88% zueinander aufweisen (Stahl et al., 1991). Auf dem Genlocus 16q13.3 (Martinez et al., 1997) liegen die Gene von NDPK-C und NDPK-D. Sie weisen eine Homologie von ca. 55% zu NDPK-A und NDPK-B auf (Bilitou et al., 2009). NDPK-C besitzt im Vergleich zu den anderen NDPKs eine hydrophobe N-terminale 17 Aminosäuren umfassende Domäne (Erent et al., 2001), welche dem Protein die Bindung an Membranen ermöglicht. Über NDPK-C vermittelt kann so auch ein Vorliegen der anderen NDPKs oder G-Proteine an Membranen bewerkstelligt werden (Abu-Taha et al., 2017). NDPK-D wird als eine mitochondriale Isoform gewertet (Milon et al., 2000).

Die Proteine der Gruppe 2 können im Unterschied zur Gruppe 1 nicht als Kinase fungieren, wobei hier das nm23H6 eine Ausnahme bildet und ebenfalls ubiquitär vorzukommen scheint (Tsuiki et al., 1999). Die Bildung der anderen NDPKs der Gruppe 2 (außer NME6) geschieht überwiegend im menschlichen Hoden (Lacombe et al., 2000; Munier et al., 1998).

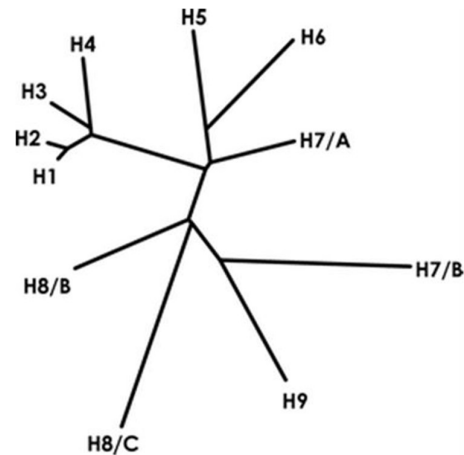


Abbildung 2: Stammbaum der NDPKs (Boissan et al., 2009).
Einzig die verkürzte Isoformen nm23H8 und XRP2 fehlen.

1.1.2 NTP/NDP-Transphosphorylase

Grundsätzlich stellt eine NTP/NDP-Transphosphorylase ein Enzym dar, welches ein γ -Phosphat von einem 5'-Nucleosidtriphosphat (NTP) auf ein 5'-Nucleosiddiphosphat (NDP) transferieren kann. Funktionell liegt hier ein Ping-Pong-Mechanismus zugrunde (Morera et al., 1994; Tepper et al., 1994), welcher über die Bildung eines phosphorylierten Histidins, hier His-118 der NDPKs, als Zwischenstufe abläuft. Wie bereits erwähnt sind ausschließlich NDPKs der Gruppe 1 (nm23H1-4) in der Lage, als Kinase zu fungieren (Lascu et al., 2000). Das aktive Zentrum der NDPKs weist hierzu die charakteristische Aminosäuresequenz NXXHG/ASD auf, welche für die Stabilität und die Kinasenfunktion entscheidend ist (Schaertl et al., 1998; Schneider et al., 1998). Ebenfalls liegt hier das His-118 vor, an welchem die hochenergetische Bindung des γ -Phosphat gebildet und entsprechend der Kinasenfunktion anschließend gelöst wird. So kann das γ -Phosphat auf ein anderes NDP übertragen werden. Prinzipiell können auf diese Weise alle vier NTPs gebildet werden: Adenosintriphosphat (ATP), Guanosintriphosphat (GTP), Cytidintriphosphat (CTP) und Thymidintriphosphat (TTP). Die Übertragung geschieht vorrangig auf GDP, welches an der $G\alpha S$ -Untereinheit gebunden vorliegt. Das γ -Phosphat wird meistens durch ATP den NDPKs zur Verfügung gestellt.

Unter ATP-Verbrauch können in unterschiedlichen Stoffwechselprozessen der Zelle NTPs synthetisiert werden, beispielsweise in der DNA/RNA-Synthese, in der Kohlenhydrat-, Lipid- und in der Proteinbiosynthese.

1.1.3 Histidin-Kinase

Einen der wichtigsten Bestandteile der intrazellulären Kommunikation stellt die Phosphorylierung von Proteinen dar. Die phosphorylierbaren Aminosäuren sind: Threonin, Serin und Histidin. Threonin und Serin weisen eine phosphorylierbare Hydroxylgruppe auf. In intrazellulären Signaltransduktionsprozessen einer eukaryonten Zelle werden zumeist Threonin und Serin phosphoryliert. In prokaryonten Zellen werden die Signaltransduktionsprozesse durch eine sehr ähnlich aufgebaute Kinasefamilie, den Histidin-Kinasen, bewerkstelligt. Jene konnten auch in eukaryonten Zellen nachgewiesen werden. Die autophosphorylierende Histidin-Kinase und die „response-regulator domains“ bilden das Zwei-Komponenten-Signaltransduktions-System (Swanson et al., 1994). Dabei bewirkt die Histidin-Kinase die Übertragung eines γ -Phosphats (PO_4^{3-}) auf Histidin, welches durch hydrolytische Spaltung von einem ATP bereitgestellt wird. Die „response-regulator domains“ übertragen dann das γ -Phosphat (PO_4^{3-}) vom Histidin auf ein Aspartat. Dies führt zu Aktivierung des Systems (Alex & Simon, 1994; Bilwes et al., 1999).

Durch die Bindung eines γ -Phosphats (PO_4^{3-}) werden die bereits angesprochenen Aminosäuren (Serin, Threonin, Tyrosin) durch Phosphorylierung ihrer Hydroxylgruppe zu einem Phosphatester. Diese Phosphatester sind im Vergleich zu dem Phosphoamid, welches durch die Übertragung eines γ -Phosphats (PO_4^{3-}) auf Histidin entsteht, wesentlich stabiler. Das instabilere Phosphoamid weist jedoch eine energetische wesentlich höhere, kovalente Bindung auf, deren Spaltungsenergie die Übertragung auf ein Substrat katalysiert.

NDPKs können wie bereits beschrieben sowohl als Transphosphorylase als auch als Histidin-Kinase fungieren (Wagner et al., 1997), welche allerdings in den in eukaryonten Zellen seltener vorkommt (Wieland & Attwood, 2015). Beide beschriebenen Kinasefunktionen sind für die hier wesentliche Aufgabe der NDPKs essenziell: Die rezeptorunabhängige Aktivierung der G-Proteine (Cuello et al., 2003; Hippe et al., 2003) (Abbildung 3).

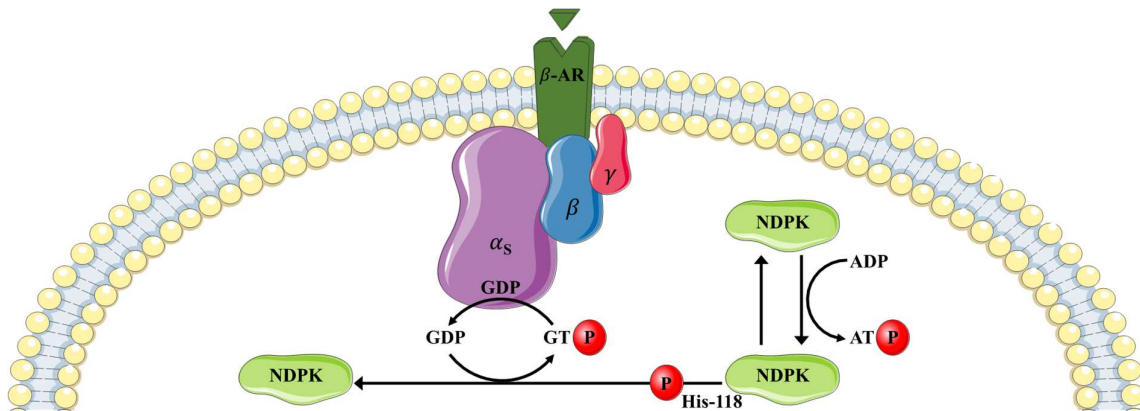


Abbildung 3: Funktion der NDPKs

Durch die NTP/NDP-Transphosphorylase und Histidin-Kinase kann die rezeptorunabhängige Aktivierung der G-Proteine mit Hilfe von ATP durch NDPKs bewerkstelligt werden (modifiziert nach (Hippe et al., 2003)).

Ebenfalls wurde der phosphorylierende Einfluss der NDPKs auf den Ionen-Kanal TRPV5 (Cai et al., 2014) oder den Kalium-Kanal KCNN4 nachgewiesen (Srivastava et al., 2006).

1.2 Signaltransduktion der G-Proteine im Herzen

Die Signaltransduktion der G-Proteine weist unterschiedliche Stationen auf, welche im Weiteren erläutert werden sollen. Zunächst bindet ein extrazellulärer Ligand an einen entsprechenden membrangebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR). Die Bindung erfolgt gemäß des „Schlüssel-Schloss-Prinzips“. Nach der Bindung gibt der GPCR seine zytosolische Bindungsstelle für die intrazellulären G-Proteine frei. Die G-Proteine übertragen das Signal auf *second messenger*, wie beispielsweise *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) oder *inositol trisphosphate* (IP3), welche sowohl den Zellstoffwechsel, die Ionenkanäle und auch die Transkription beeinflussen (Gilman, 1987; Levitzki, 1988; Pierce et al., 2002; Wieland & Michel, 2005).

1.2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) sind 7-Transmembranhelices, welche sich innerhalb der Plasmamembran befinden und sowohl ein N-terminales Ende nach extrazellulär als auch ein C-terminales Ende nach intrazellulär gerichtet aufweisen. Extrazellulär befindet sich die Bindungsstelle des Liganden, während intrazellulär die Bindung der G-Proteine möglich ist. Die sieben Helices sind über Schleifen miteinander verbunden, wobei sich drei Schleifen extrazellulär (ECL) und drei Schleifen intrazellulär befinden (ICL). Funktionell kann ein entsprechender Ligand von extrazellulär gemäß des „Schlüssel-Schloss-Prinzips“ an den GPCR binden und so eine Konformationsänderung der Helices auslösen. Daraufhin wird die

zytosolische Bindungsstelle der G-Proteine freigegeben (Gether et al., 1995; Gilman, 1987). Die Bindungsstelle für die $G\alpha$ -Untereinheit liegt an der dritten intrazellulären Schleife des GPCRs (Samama et al., 1993). Die am besten bekannten GPCRs sind die Adrenozeptoren (AR): Die $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ gekoppelten β -AR sowie die $G\alpha_q$ und $G\alpha_i$ α_1 - und α_2 -AR. Ebenfalls gut erforscht sind die $G\alpha_q$ gekoppelten Angiotensin-1-Rezeptoren (AT_1R), die Endothelin-Rezeptoren, die $G\alpha_i$ -gekoppelten Adenosin-1 Rezeptoren, und die muskarinartigen Acetylcholinrezeptoren Typ 2 (M_2R) (Salazar et al., 2007).

Allein im Herzen existieren ca. 200 verschiedene GPCR-Subtypen. Die meisten verschriebenen Medikamente für kardiovaskuläre Erkrankungen zielen auf Adreno- und Angiotensin-1-Rezeptoren ab (Hunt et al., 2005).

1.2.2 Heterotrimere G-Proteine

Die G-Proteine werden als heterotrimer bezeichnet, da sie aus drei verschiedenen Untereinheiten einen Komplex bilden. Dieser besteht aus einer $G\alpha$ -Untereinheit (35-52kDa), einer $G\beta$ -Untereinheit (33-45kDa) und einer $G\gamma$ -Untereinheit (6-10kDa) (Hamm, 1998; Offermanns, 2003), wobei die $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit kovalent miteinander verbunden sind. Sowohl die $G\alpha$ - als auch die $G\gamma$ -Untereinheit besitzen Lipidanker, welche ihnen die Bindung und die Lateraldiffusion an der Plasmamembran ermöglichen.

Die $G\alpha$ -Untereinheit stellt funktionell eine GTPase dar und hat eine Guaninnukleotid-Bindungsdomäne (GDP/GTP). Sie hat je nach Aktivitätszustand ein GDP (Guanindiphosphat), (inaktiver Zustand) oder ein GTP (aktiver Zustand) gebunden. Unterschieden werden vier Gruppen von $G\alpha$ -Untereinheiten: $G\alpha_s/G\alpha_{olf}$, $G\alpha_i/G\alpha_o$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ und $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$. Sie unterscheiden sich in ihrem Effekt auf unterschiedliche Proteine. Beispielsweise wirkt $G\alpha_s$ auf die Adenylylzyklase (AC) stimulierend, während $G\alpha_i$ inhibierend wirkt. $G\alpha_q$ stimuliert die Phospholipase C (PLC) und $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ stimuliert die GEFs („guanin nucleotid exchange factors“) kleinerer G-Proteine der Ras-Familie (Tabelle 1).

Es werden weiterhin fünf verschiedene Isoformen der β -Untereinheit (β_{1-5}) und 12 verschiedene γ -Untereinheiten (γ_{1-12}) unterschieden (Simon et al., 1991). Die kovalent dimerisierten β - und die γ -Untereinheiten wirken ebenfalls auf einige Proteine. Beispielsweise dissoziieren sie nach Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit und hemmen die AC (Wieland et al., 1992), desensibilisieren die β -adrenerge Rezeptorkinase (β -ARK) (Pitcher et al., 1992), stimulieren die Phospholipase C (PLC) (Morris & Scarlata, 1997), stimulieren die Inositoltrisphosphat-Kinase (PI3-Kinase) und regulieren direkt die Funktion einiger Ionenkanäle. Sie hemmen auch einige

spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und aktivieren den gut erforschten G-Protein-aktivierten K^{+} -Kanal, den GIRK („G-protein-activated inwardly rectifying K^{+} channel“) (Dascal, 2001) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Auszug zur Einteilung der G-Proteine und ihre Funktionen

Untereinheit	Effektoren*	<i>second messenger</i> *
$G\alpha_s / G\alpha_{olf}$	AC \uparrow	PKA/cAMP \uparrow
$G\alpha_i / G\alpha_o$	AC \downarrow	PKA/cAMP \uparrow
$G\alpha_q / G\alpha_{11}$	PLC- β \uparrow	IP3, DAG, PKC
$G\alpha_{12} / G\alpha_{13}$	RhoGEF \uparrow	MLKP \downarrow
$G\beta\gamma$ -Dimer	AC \downarrow PLC- β \uparrow VDCC \downarrow GIRK \uparrow PI3-Kinase \uparrow	PKA/cAMP \downarrow IP3, DAG, PKC,

Abkürzungen: AC = Adenylzyklase; cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat; DAG = Diacylglycerin; IP3 = Inositol-1,4,5-trisphosphat; GIRK = G-protein-activated inwardly rectifying K^{+} channel; MLKP = Myosinleichtenketten-Phosphatase; PI3-Kinase = Phosphoinositid-3-Kinase; PKA = Proteinkinase A; PKC = Proteinkinase C; PLC- β = Phospholipase C- β ; RhoGEF = Rho guanin nucleotid exchange factors; VDCC = Spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal (voltage-dependent Ca^{2+} -channel) (Offermanns, 2003)

* Aufzählung erfolgt übersichtshalber unvollständig

1.2.3 Regulation der G-Proteine

Durch die Bindung eines Agonisten verändert sich, wie bereits beschrieben, der Konformationszustand des Rezeptors (Gether et al., 1995). Die $G\alpha$ -Untereinheit kann dann mit ihrer C-terminalen Endigung an der dritten intrazellulären Schleife des 7-Transmembranhelix binden (De Lean et al., 1980; Masters et al., 1986; Samama et al., 1993). Die Guaninnukleotid-Bindungsdomäne (GDP/GTP) wird aktiviert und es kommt zum Austausch des gebundenen Guanosindiphosphats (GDP) zu einem Guanosintriphosphat (GTP) (Pierce et al., 2002; Pohl et al., 1971). Somit kann der GPCR auch als „Guanosine trisphosphat Exchange Faktor“ (GEF) bezeichnet werden. Die zuvor inaktive $G\alpha$ -Untereinheit liegt nun, GTP gebunden, aktiviert vor. Die Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit bewirkt ebenfalls eine Konformationsänderung, welche zwei Effekte hervorruft. Zum einen dissoziiert die $G\alpha$ -Untereinheit sowohl vom GPCR als auch von dem $\beta\gamma$ -Komplex ab. Des Weiteren kommt es zur Peptidexposition, welche als aktive Domäne verschiedene Effektormoleküle binden und regulieren kann. Wie bereits erwähnt können die NDPKs die G-Proteine auch rezeptorunabhängig aktivieren (Cuello et al., 2003; Hippe et al., 2003).

Sowohl die aktivierte $G\alpha$ -Untereinheiten als auch die nun freie $G\beta\gamma$ -Untereinheit können *second messenger* und Effektorproteine unabhängig voneinander aktivieren (Gilman, 1987; Levitzki, 1988; Pierce et al., 2002; Wieland et al., 2005). Beispielsweise ist über die $G\alpha$ -

Untereinheiten die Aktivierung der AC mit Steigerung des intrazellulären cAMP-Gehalts möglich. Die Deaktivierung der G-Proteine erfolgt für die $G\alpha$ -Untereinheiten durch die Hydrolyse von GTP zu GDP. Die $G\alpha$ -Untereinheit weist selbst eine intrinsische GTPase-Aktivität auf, welche durch sogenannte *regulators of G-protein signaling* (RGS) beschleunigt werden kann (Neubig & Siderovski, 2002). Sie erhöhen die GTPase-Aktivität um das 10- bis 100-fache (Watson et al., 1996). Ebenfalls beeinflusst die Konzentration von Mg^{2+} die Aktivität der G-Proteine. Bei höher Mg^{2+} Konzentration wird der rezeptorkatalysierte GDP/GTP-Austausch gefördert, während bei niedriger Mg^{2+} Konzentration die GTP-Hydrolyse begünstigt wird (Gilman, 1987). Die inaktivierte $G\alpha$ -Untereinheit kann die freie $G\beta\gamma$ -Untereinheit binden, sodass diese ebenfalls inaktiviert wird (Wieland & Chen, 1999) (Abbildung 4).

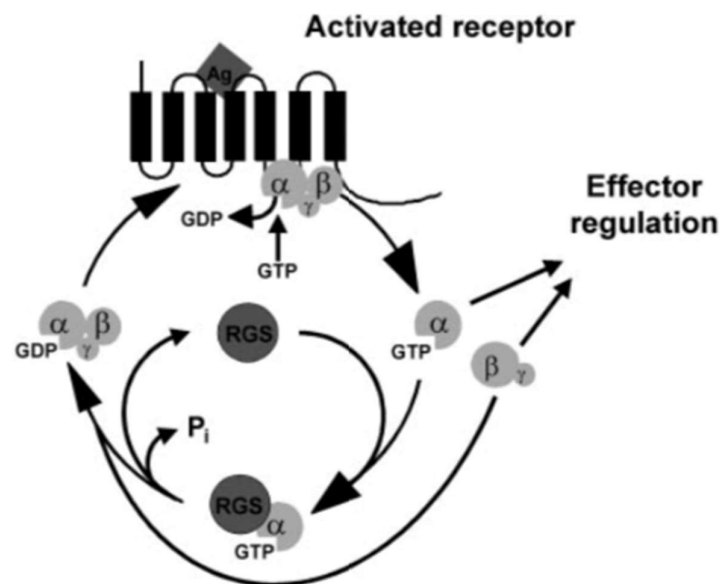


Abbildung 4: Aktivierungszyklus der heterotrimeren G-Proteine (Wieland et al., 1999)

Es sind sowohl die Aktivierung der G-Proteine durch eine Rezeptoraktivierung als auch die Deaktivierung durch den Einfluss der RGS dargestellt.

Am Beispiel des G_s -Signalwegs ist hinzuzufügen, dass hier ein positiver Verstärkermechanismus existiert. Durch die Bindung eines Agonisten werden insgesamt ca. 100 zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Moleküle gebildet (Levitzki, 1988). Durch den GPCR werden nach Bindung des Agonisten ca. zehn $G\alpha$ -Untereinheiten aktiviert, ehe er wieder in den inaktiven Zustand übergeht (Tolkovsky & Levitzki, 1978a, 1978b). Ebenfalls kann die $G\alpha$ -Untereinheit mehrerer ACs aktivieren, ehe durch die GTPase-Aktivität das GTP in GDP hydrolysiert wird. Die AC bildet schließlich das als *second messenger* fungierende cAMP.

G-Proteinaktivierung beobachtet. Als Transphosphorylase ist es den NDPKs möglich, ein GDP, welches im klassischen Signaltransduktionsweg gegen GTP ausgetauscht werden muss, zu phosphorylieren und somit ein GTP für die Aktivierung des G-Proteins bereitzustellen (Hippe et al., 2003). Als Histidin-Kinase kann NDPK-B mit der G β -Untereinheit interagieren und diese phosphorylierend aktivieren. Auch scheint NDPK-C diese Funktion aufzuzeigen (Abu-Taha et al., 2017). Untereinander formen sie Heterohexamere, welche mit den G-Proteinen Komplexe bilden (Cuello et al., 2003). Sowohl NDPK-B als auch NDPK-C können dem G-Proteinkomplex ein benötigtes GTP bereitstellen. Der Ablauf dieser Aktivierung besteht in der Autophosphorylierung der Histidin-Kinase an His-118, unter Spaltung von zytosolischem ATP zu ADP mit Übertragung der Phosphorylgruppe (PO_3^{2-}). Im Folgenden wird dann die Phosphorylgruppe auf das Histidin His-266 der G β -Untereinheit transferiert (Cuello et al., 2003; Hippe et al., 2007; Hippe et al., 2003). Es entsteht eine hochenergetische Phosphoamidbindung. Die G β -Untereinheit kann die Phosphorylgruppe auf ein GDP übertragen, welches als GTP in der Lage ist, die G α -Untereinheit zu binden (Wieland, 2007). Somit wird rezeptorunabhängig der G-Protein-Signalweg aktiviert (Abbildung 6). Da nur NDPK-C in der Lage ist, das G-Protein zu binden, wird es zur Bindung von NDPK-B an den G-Proteinkomplex als Co-Faktor benötigt. Des Weiteren ist NDPK-C durch die hydrophobe N-terminale Domäne an der Plasmamembran gebunden (Abu-Taha et al., 2017).

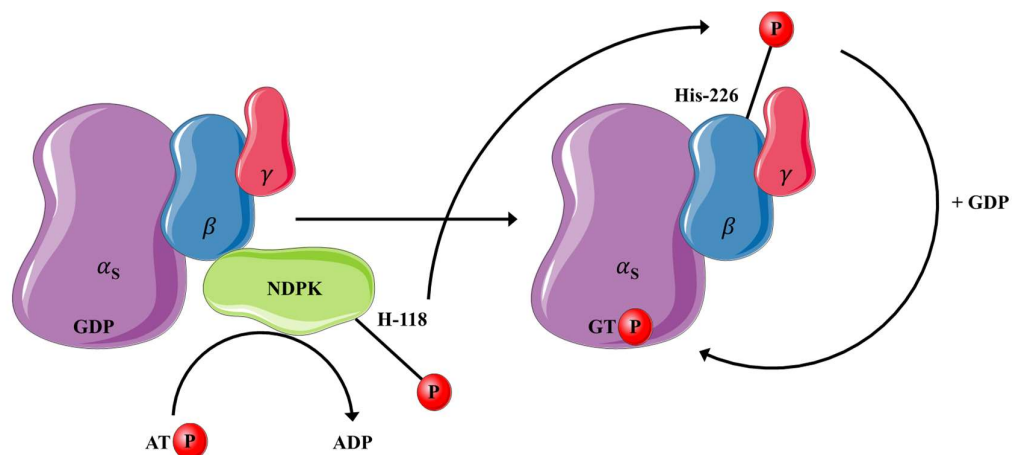


Abbildung 6: Aktivierung der G-Proteine durch NDPKs

Es erfolgte zunächst die Autophosphorylierung von NDPK-B oder NDPK-C an His-118 mit nachfolgender Übertragung des Phosphats auf His-266 der G β -Untereinheit, welches wiederum auf ein GDP übertragen wird und dann als GTP an der G α -Untereinheit bindet.

Funktionell steigern sowohl NDPK-B als auch NDPK-C das Vorliegen der G-Proteine an der Plasmamembran (Hippe et al., 2009). Überexprimiert erhöhen NDPK-B und NDPK-C in Kardiomyozyten den cAMP-Gehalt (Abu-Taha et al., 2017; Hippe et al., 2007; Hippe et al.,

2009) mit einer gleichzeitig resultierenden Steigerung der Kontraktilität (Abu-Taha et al., 2017). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von NDPK-B oder NDPK-C einen Abfall des cAMP-Gehalts, eine verminderte G-Protein-Expression und eine Abnahme der Kontraktilität der Kardiomyozyten bedingt (Abu-Taha et al., 2017; Hippe et al., 2009). Eine Validierung der Aussage *in vivo* konnte durch einen Knockdown in Zebrafisch-Herzen mit kongruenter Senkung des cAMP-Gehalts und Abnahme der Kontraktilität erreicht werden (Abu-Taha et al., 2017; Hippe et al., 2009).

Grundsätzlich stellen die NDPKs also in physiologischer Expression für viele unterschiedliche Prozesse in der Zelle notwendige Proteine dar. So wird auch der Einfluss von NDPK-B auf das Vorhandensein von Caveolen an der Plasmamembran diskutiert. Hier konnte ein vermindertes Auftreten von Cav1, ein Bestandteil der Caveolen, an der Plasmamembran durch einen Knockdown von NDPK-B *in vivo* bei Zebrafischen gezeigt werden. Dies bedingte auch ein verringertes Auftreten der β -AR an der Plasmamembran (Abu-Taha et al., 2018).

1.2.6 Die Folgen kardialer Erkrankungen auf die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion

Die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion kann durch verschiedene kardiale Erkrankungen gestört werden. Im Besonderen ist hier das Vorhofflimmern (VHF) zu nennen. Bei chronischem VHF (cVHF) konnte ein gestörter cAMP-Gehalt aufgrund von Dysregulationen in Form einer pathologisch gesteigerten Aktivierung des G_{α_s} -gekoppelten β -AR in den Kardiomyozyten gezeigt werden (Voigt et al., 2012). Durch chronische Stimulation von β -AR wird eine Desensibilisierung der Zelle gegenüber Katecholaminen beobachtet, welche das Entstehen von kardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz und Fibrose bewirken. Dieser Prozess wird auch als katecholamin-induziertes kardiales Remodeling bezeichnet (Abu-Taha et al., 2017; Tilley & Rockman, 2006).

Über den G_{α_i} -gekoppelten M_2R -Signalweg wurde bei cVHF eine durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit vermittelte gesteigerte Aktivität der $I_{K_{ACh}}$ Kanäle beobachtet. Dies bedingt eine proarrhythmische Verkürzung der Aktionspotentialdauer der Kardiomyozyten (Dobrev et al., 2005; Voigt et al., 2014a). Die Aktivität der $I_{K_{ACh}}$ Kanäle wird ebenfalls durch die NDPKs gesteigert (Heidbuchel et al., 1991). Bei einer Herzinsuffizienz scheint ebenfalls ein erhöhter NDPK-Gehalt vorzuliegen, welcher allerdings über eine Stimulation des $G_{\alpha_{i2}}$ -gekoppelten Signalwegs zu einer charakteristischen Abnahme des cAMP-Gehalts und der Kontraktilität führt (Abu-Taha et al., 2017; Lutz et al., 2001).

Auch werden die von der Proteinkinase-C (PKC) gebildeten *second messenger* Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) im Rahmen kardialer Erkrankungen

diskutiert. Die Signaltransduktion erfolgt hier über G_q -gekoppelten Rezeptoren. Das Hormon Angiotensin II scheint bei einigen kardiovaskulären Erkrankungen pathologisch erhöht zu sein (Salazar et al., 2007). Es bindet den AT_1R , der ein G_q -gekoppelter Rezeptor ist. Dieser wird bei VHF ebenfalls vermehrt exprimiert. Bei cVHF konnte beobachtet werden, dass das Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE), welches aus Angiotensin I Angiotensin II bildet, ebenfalls pathologisch erhöht ist. Dies zeigt zum einen profibrotische als auch proarrhythmische Effekte, bedingt durch eine Ca^{2+} -Dysregulation (Gassanov et al., 2006; Goudis et al., 2012). Eine weitere Ursache für das Entstehen von VHF scheint eine verringerte Deaktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit durch RGS zu sein (Opel et al., 2015).

1.3 Vorhofflimmern

1.3.1 Vorhofflimmern in der Klinik

In Deutschland stellen die Krankheiten des Kreislaufsystems mit ca. 35% für 2019 die Haupttodesursache dar (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021a). Davon beträgt der Anteil derer, die an Vorhofflattern und Vorhofflimmern versterben 6,3% (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021b). Hier liegt das Verhältnis von Frauen (13.368) zu Männern (7.347) bei etwa 2:1 (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2021).

Vorhofflimmern (VHF) ist eine progressive kardiale Rhythmusstörung, die sich auf das Vorhofmyokard bezieht. Sie ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung mit ansteigender Prävalenz und Inzidenz (Chugh et al., 2014). Das Lebenszeitrisiko beläuft sich auf ca. 33%. Die Inzidenz nimmt mit dem Alter deutlich zu, wobei Männer etwas früher und häufiger betroffen sind. Die aktuelle Prävalenz wird für Europa mit 2-4% angegeben. (Hindricks et al., 2021). Als wichtigste epidemiologische Risikofaktoren sind die Arterielle Hypertonie, Adipositas, Rauchen, Diabetes mellitus und die Chronische Niereninsuffizienz zu nennen (Virani et al., 2021). Weitere Risikofaktoren für die Entstehung und Aufrechterhaltung stellen die Herzinsuffizienz und das VHF selbst dar (Allessie et al., 2002).

Klinisch präsentiert sich das VHF häufig symptomarm, wobei auch Herzrasen und Palpitationen bestehen können. Die durch VHF assoziierte Symptomatik sowie die Einschränkung der Alltagsaktivitäten werden durch die EHRA-Symptomskala abgebildet (Abbildung 7). Zu den sechs Leitsymptomen von VHF gehören: Palpitationen, Fatigue, Schwindel, Luftnot, Brustschmerz und Angst (Hindricks et al., 2021).

Score	Symptoms	Description
1	None	AF does not cause any symptoms
2a	Mild	Normal daily activity not affected by symptoms related to AF
2b	Moderate	Normal daily activity not affected by symptoms related to AF, but patient troubled by symptoms
3	Severe	Normal daily activity affected by symptoms related to AF
4	Disabling	Normal daily activity discontinued

Abbildung 7: EHRA-Symptomskala

Mit zunehmender Symptomschwere steigt dieser quantitativ beschreibende Score an. Abgebildet werden die Symptomschwere sowie die Reduktion der noch möglichen Alltagsaktivität. Anhand dieses Scores ist es auch möglich, die symptomatische Behandlung von VHF auszurichten (Hindricks et al., 2021).

Hämodynamisch resultiert aus VHF ein Vorhofstillstand mit Stagnation des Blutes, welcher eine Thrombenbildung im Vorhof begünstigt. Diese wiederum kann, je nach Lage des Thrombus im rechten oder linken Vorhof, zu einer embolischen Einschwemmung des thrombotischen Materials in lebenswichtige Organe führen. Hier sind besonders die Lungenembolie, der ischämische Schlaganfall, der Mesenterialinfarkt, Infarkte von Niere und Milz sowie der akute arterielle Verschluss der Beinarterien aufzuführen. Ebenfalls sinkt bedingt durch den Wegfall der Vorhofkontraktion bei Patienten mit bereits vorgeschädigtem Myokard das Herzminutenvolumen mit einer verminderter Herzleistung als Konsequenz (Hindricks et al., 2021).

Rhythmologisch ist VHF den supraventrikulären Rhythmusstörungen zuzuordnen und ist im Elektrokardiogramm (EKG) durch fehlende p-Wellen, Flimmerwellen und unregelmäßige RR-Abstände („Arrhythmia absoluta“) charakterisiert. Ebenso kann rhythmologisch eine Einteilung in ein typisches zumeist linksatriales und ein atypisches zumeist rechtsatriales VHF getroffen werden (Hindricks et al., 2021).

Man unterscheidet im Wesentlichen vier verschiedene Arten von VHF: paroxysmales, persistierendes, langanhaltendes und permanentes VHF. Das paroxysmale VHF (pVHF) ist über eine Dauer von maximal 7 Tagen charakterisiert und konvertiert in der Regel spontan (meist bereits nach 48 Stunden) in den Sinusrhythmus zurück. Das persistierende VHF ist über eine Dauer von einer Woche bis zu einem Jahr gekennzeichnet und kann in den Sinusrhythmus konvertiert werden. Das langanhaltende und das permanente VHF werden auch als chronisches VHF bezeichnet (cVHF). Nur gelegentlich lässt sich das langanhaltende VHF, welches für mindestens ein Jahr besteht, in den Sinusrhythmus konvertieren. Das permanente VHF kann dagegen nicht in den Sinusrhythmus konvertiert werden. Es ist also therapieresistent (Hindricks et al., 2021).

1.3.2 Molekulare Mechanismen von Vorhofflimmern

Bei VHF handelt es sich um eine supraventrikuläre Rhythmusstörung, bei welcher zwei dominierende pathophysiologische Ursachen vermutet werden. Diese sind die ektope Aktivität mit spontaner Depolarisation des Vorhofmyokards und der Reentry, welcher kreisende Erregungen darstellt. Beide resultieren aus dem pathophysiologischen Prozess des atrialen Remodelings, welches wiederum durch elektrophysiologische und strukturelle Veränderungen charakterisiert ist. Diese basieren auf einem veränderten cAMP-Gehalt und einer Ca^{2+} -Dysregulation. Das Remodeling ist sowohl der Auslöser als auch der Grund für das Aufrechterhalten von VHF (Dobrev, 2006; Nattel et al., 2008; Wakili et al., 2011). Des Weiteren bedingt es ein reduziertes therapeutisches Ansprechen sowie eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für ein Wiederauftreten nach initial erfolgreicher Kardioversion (Hindricks et al., 2021).

1.3.3 Atriales Aktionspotential und Ca^{2+} -Homöostase

Bei elektrophysiologischer Betrachtung ist der Ablauf des Aktionspotentials in den Vorhofkardiomyozyten von großer Bedeutung. Das Ruhemembranpotential der atrialen Kardiomyozyten liegt bei ca. -80mV . Aufrechterhalten wird es durch das Zusammenspiel der Na^+ - K^+ -ATPase und dem einwärts gerichteten K^+ -Strom des K_{IR} (*inward rectifier*). Durch einen Einstrom von Kationen über die *gap junctions* mit Überschreiten des Schwellenpotentials und Öffnen der spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle kommt es zur Depolarisation der Zelle (Bernstein & Morley, 2006). Die anschließende Repolarisation basiert auf einem Ausstrom von Kalium durch die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle wie den K_{DR} (*delayed rectifier*). Ausgelöst durch den Ca^{2+} -Einstrom der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle während der Depolarisation öffnen sich zusätzlich die membranständigen Ryanodin-Rezeptor-Kanäle Typ-2 (RyR2) des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Diese sind Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Kanäle, sodass nun gespeichertes Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol der Zelle strömt. Beides hat zur Folge, dass sich der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt erhöht. Das intrazelluläre Ca^{2+} bindet an Troponin C und ermöglicht die Interaktion von Aktinfilament und Myosinkopf zur Kontraktion im Querbrückenzyklus. Dieser Prozess wird auch als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Der beschriebene, nach intrazellulär gerichtete, Ca^{2+} -Strom kann für eine kurze Zeit den K^+ -Ausstrom der Kardiomyozyten elektrisch ausgleichen. Dies bedingt die Entstehung einer für Kardiomyozyten charakteristische Plateauphase im Ablauf des Aktionspotentials (Hodgkin & Huxley, 1952). Durch den späteren Abfall des Ca^{2+} -Spiegels kommt es dann zur Relaxation der Kardiomyozyten. Etwa 70% des intrazellulären Ca^{2+} wird durch die SR- Ca^{2+} -ATPase 2a

(SERCA2a) in das SR zurück gepumpt und so dem Querbrückenzyklus wieder entzogen. Durch cAMP vermittelt wird die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) reguliert, welche das Protein Phospholamban (PLB) phosphoryliert. PLB ist ein SERCA2a-Inhibitor und wird durch Phosphorylierung inaktiviert. Die SERCA2a kann das Ca^{2+} vermehrt zurück in das SR pumpen. Etwa 28% des intrazellulären Ca^{2+} werden gegen je drei Na^+ durch den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher Typ-1 (NCX1) nach extrazellulär gepumpt. Zu 1-2% wird das nach intrazellulär geströmte Ca^{2+} durch weitere Calcium-Transportproteine, wie die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und der Mitochondriale- Ca^{2+} -Transporter nach extrazellulär bzw. nach intramitochondrial befördert (Bers, 2000). Schließlich bedingt die Na^+ - K^+ -ATPase die Rückführung zum Ruhemembranpotential. Des Weiteren ist die Proteinausstattung und die Funktion der einzelnen Proteine in den atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten verschieden. Auch sind die T-Tubuli in der atrialen Kardiomyozyte geringer vorhanden, wobei der mitochondriale Ca^{2+} -Fluss ausgeprägter ist. Somit unterscheidet sich also die atriale und ventrikuläre Ca^{2+} -Homöostase (Goette et al., 2017) (Abbildung 8).

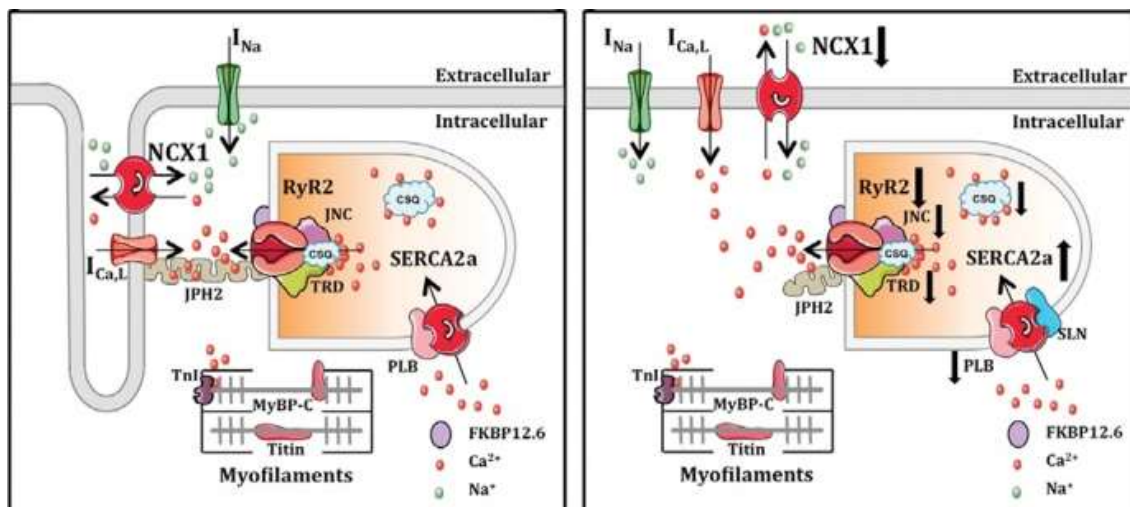


Abbildung 8: Zellulärer Ca^{2+} -Fluss

Das Ca^{2+} gelangt von extrazellulär und aus dem SR in das Zytosol und vermittelt mit Bindung an Troponin C den Ablauf des Querbrückenzyklusses. Durch die diastolischen Ca^{2+} -Ströme wird der intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt reduziert. Dies wird durch die SERCA2a, den NCX1 und die PMCA sowie auch durch mitochondriale Transporter bewerkstelligt. Die Pfeile kennzeichnen die unterschiedliche Expression und/oder Funktion der an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligten Proteine im Vergleich von atrialen (rechts) zu ventrikulären (links) Kardiomyozyten. CSQ, Calsequestrin Typ-2; FKBP12.6, FK506-binding protein 12.6; I_{Na} , Na^+ -Kanal; $I_{\text{Ca,L}}$, L-Typ Ca^{2+} -Kanal; JNC, Junc-tin; JPH2, Junc-tophilin Typ-2; MyBP-C, Myosin binding protein-C; NCX1, Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher Typ-1; PLB, Phospholamban; RyR2, Ryanodin-Rezeptor-Kanal Typ-2; SERCA2a, SR- Ca^{2+} -ATPase 2a; SLN, Sarcolipin; TnI, Troponin-I; TRD, Triadin (modifiziert nach (Goette et al., 2017)).

1.3.4 Ca^{2+} -Dysregulation bei VHF

In der Ca^{2+} -Dysregulation, welche für die elektrophysiologischen Veränderungen durch atriales Remodeling verantwortliche ist, spielen Ionenkanäle eine maßgebliche Rolle.

Ryanodin-Rezeptoren sind Ca^{2+} -Kanäle, welche Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol der Kardiomyozyte abgeben. Der Ryanodin-Rezeptor-Kanal Typ-1 kommt vorrangig in der Skelettmuskulatur vor, während der RyR2 eher in der Herzmuskulatur zu finden ist. Namengebend ist das giftige Alkaloid Ryanodin der *Ryania speciosa*, welches die Öffnung des RyR2 bewirkt und so eine Muskelkontraktion auslösen kann. Therapeutisch spielt das Ryanodin selbst keine Rolle. Diese RyR2 haben einen großen Anteil an der Ca^{2+} -Homöostase des SRs, sowie der Zelle im Gesamten. Der schließlich vorliegende zytosolische Ca^{2+} -Gehalt wird maßgeblich durch die Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 bestimmt. Auf diese nehmen folgende Regulatorproteine Einfluss: Calsequestrin Typ-2 (CSQ2), Junctin (JNC), Junctophilin Typ-2 (JPH2) und Triadin. CSQ2 ist ein Ca^{2+} -bindendes Protein, welches in den terminalen Cisternen des SRs und als Monomer oder Dimer vorliegt. Es bindet 65 Ca^{2+} -Ionen mit geringer Affinität, sodass sowohl die Bindung als auch die rasche Abgabe von Ca^{2+} möglich ist. Durch die CSQ2-bedingte Ca^{2+} -Bindung arbeitet die SERCA2a gegen einen geringeren Konzentrationsgradienten an. CSQ2 ist über JNC und Triadin mit dem RyR2 verbunden (Zhang et al., 1997). So kann CSQ2 die Offenwahrscheinlichkeit von RyR2 regulieren (Gyorke et al., 2004). Dies ist für die Ca^{2+} -Freisetzung während der Systole von Bedeutung (Wei et al., 2009). Des Weiteren können Mutationen von CSQ2 wie auch von RyR2 Ursache von catecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardien (CPVT) sein, welche maligne Rhythmusstörungen auslösen (Baltogiannis et al., 2019).

Posttranslationale Modifikationen, insbesondere Phosphorylierungen, erlauben eine Feinregulation von RyR2. Die Phosphorylierung von RyR2 erfolgt durch die PKA und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). In Abhängigkeit des cAMP-Gehalts bewirkt die PKA eine Phosphorylierung der Phosphorylierungsstelle Ser2808 und die CaMKII eine Phosphorylierung von Ser2814 (Marx et al., 2000). Dies erhöht die Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 und bedingt dadurch spontane Ca^{2+} -Freisetzungen des SRs (Vest et al., 2005). Dies kann auch als Ca^{2+} -Leck bezeichnet werden kann (Dobrev & Nattel, 2008; Marx et al., 2000; Wehrens et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine Applikation von CaMKII-Inhibitoren zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Lecks, während die PKA-Inhibitoren zu keiner nachweisbaren Reduktion führten. Die CaMKII-vermittelte Ser2814-Phosphorylierung an RyR2 scheint somit bei VHF eine größere Bedeutung zu haben. Diese wird vor allem bei Patienten mit cVHF beobachtet und als eine Hauptursache von *spontaneous SR Ca^{2+} -release*

events (SCaEs) angesehen (Voigt et al., 2012). Des Weiteren konnte eine intrinsische RyR2-Dysfunktion, ausgelöst durch eine Ca^{2+} -Überladung des SRs, bei Patienten mit pVHF beobachtet werden. Diese intrinsische Dysfunktion beruht auf einer erhöhten Proteinexpression und einer gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 (Voigt et al., 2014b).

Außerdem ist neben einer intrinsischen RyR2-Dysfunktion und Phosphorylierung als Ursache der Ca^{2+} -Dysregulation der Einfluss der SERCA2a anzuführen. Bei Patienten mit cVHF konnte eine reduzierte Funktion der SERCA2a nachgewiesen werden. Daraus resultiert eine kompensatorisch erhöhte Funktion des NCX1 mit vermehrt elektrogenem Transport von Na^+ . Die resultierende Potentialänderung stellt eine proarrhythmische Ursache mit Entstehung von späten Nachdepolarisationen (DADs) und getriggerten Aktionspotentialen dar (Dobrev et al., 2011; Voigt et al., 2012). Hingegen zeigen Patienten mit pVHF eine erhöhte (Voigt et al., 2014b) und Patienten nach Operation am offenen Herzen und bestehendem VHF (post-operatives VHF, poVHF) eine tendenziell erhöhte Funktion von SERCA2a (Voigt et al., 2014b). Die SERCA2a wird durch Sarcolipin und PLB, welche endogene Inhibitoren darstellen, reguliert. Durch Phosphorylierung von PLB an der Phosphorylierungsstelle Ser16 durch die PKA und an Thr17 durch die CaMKII wird dieses inaktiviert, sodass eine enthemmte Funktion der SERCA2a resultiert und diese mehr Ca^{2+} in das SR pumpt (Brixius et al., 2003; Simmerman & Jones, 1998). Mit nachfolgender Zunahme des sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Gehalts erhöht sich ebenfalls der Ca^{2+} -Leckstrom der RyR2 mit begünstigtem Auftreten von DADs. Außerdem scheint eine Hyperphosphorylierung von PLB auch durch eine verminderte Aktivität der sarkoplasmatischen Protein-Phosphatase 1 (PP1) bedingt zu sein. Auch dies trägt zur Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF bei (El-Armouche et al., 2006).

1.3.5 Regulierung von cAMP bei VHF

Der *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) scheint eine zentrale Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF einzunehmen. Durch die cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinasen wird Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle sowie deren Dysregulation genommen. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit cVHF einen erhöhten cAMP-Gehalt in den atrialen Kardiomyozyten aufweisen. Aus einem gesteigerten cAMP-Gehalt resultiert direkt eine allosterische Aktivierung der PKA. Außerdem erfolgt eine indirekte durch das *exchange protein directly activated by cAMP 2* (Epac2) vermittelte Aktivierung der CaMKII, nach Bindung von zwei Ca^{2+} -Ionen (Pereira et al., 2013), mit der Folge eines proarrhythmischen SR- Ca^{2+} -Lecks (Voigt et al., 2012). Die Gründe für einen erhöhten cAMP-Gehalt in den atrialen Kardiomyozyten können zum einen durch eine gesteigerte Synthese und

zum anderen durch einen verminderten Abbau erklärt werden. Die Synthese von cAMP erfolgt durch die membranständige AC, welche durch G-Proteine reguliert wird. Allerdings konnte gezeigt werden, dass im Vergleich von Patienten mit normalem Sinusrhythmus und VHF sowohl die basale als auch die unter Stimulation mit Isoprenalin gemessene Aktivität der AC unverändert war (Schotten et al., 2002). Eine erhöhte Aktivität der AC lässt sich aber auch durch eine gesteigerte Aktivierung des G-Protein-Signalweges erklären. Hierfür kann sowohl eine vermehrte Ligandenbindung an den GPCRs als auch eine rezeptorunabhängige Aktivierung des G-Protein-Signalweges durch die NDPKs verantwortlich sein (Cuello et al., 2003; Hippe et al., 2003).

Für einen verminderten Abbau von cAMP ist vor allem eine verminderte Aktivität der Phosphodiesterasen (PDEs) verantwortlich. Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse von cAMP zu 5'-AMP. Es sind derzeit fünf kardiale Isoformen bekannt (PDE 1-4 und PDE 8). Bei Nagern erfüllen PDE 3 und PDE 4 den größten Anteil der cAMP-Umsetzung (Rochais et al., 2006). Bei Patienten mit cVHF ist die Aktivität der PDE 4 gemindert. Eine gleichzeitige Hemmung der PDE 4 während einer Stimulation des β -ARs hat eine proarrhythmische Wirkung auf humanes Vorhofgewebe zur Folge (Molina et al., 2012).

Also können sowohl die vermehrte Bildung als auch der reduzierte Abbau von cAMP bei VHF relevant sein.

1.3.6 Ektopie Aktivität

Die ektopie Aktivität stellt lokalisierte elektrische Entladungen dar, welche gehäuft im Einmündungsbereich der Pulmonalvenen in den linken Vorhof auftreten. Dies geschieht unabhängig von der physiologisch regelmäßigen Aktivierung der atrialen Kardiomyozyten durch den Sinusknoten. Ihr Entstehen ist für das Auftreten und Aufrechterhalten von VHF von Bedeutung (Wakili et al., 2011). Als Ursache werden folgende Mechanismen postuliert: Ein veränderter cAMP-Gehalt in den atrialen Kardiomyozyten, eine Dysregulation der Ca^{2+} -Homöostase sowie die chronische sympathische Überaktivierung des autonomen Nervensystems (Chen et al., 2014; Dobrev & Wehrens, 2017; Voigt et al., 2012).

Die ektopie Aktivität tritt auf zellulärer Ebene in Form von Nachdepolarisationen und getriggerten Aktionspotentialen in Erscheinung. Dabei werden frühe Nachdepolarisationen (*early afterdepolarisations*, EADs) mit Auftreten vor Ende der vollständigen Repolarisation, von den DADs unterschieden. Diese DADs sind für den Pathomechanismus der ektopen Aktivität im Vorhofmyokard bedeutsamer. Sie stellen mit dem möglichen Auslösen von getriggerten Aktionspotentialen eine Depolarisation der atrialen Kardiomyozyten nach

vollständiger Repolarisation in der Diastole dar. Im Folgenden können die umliegenden Myokardzellen erregt werden, wenn sie nicht mehr refraktär sind. Es entsteht eine Erregungsfront, welche zur Aufhebung von Sinusrhythmus und VHF führen kann (Heijman et al., 2014; Nattel et al., 2008; Wakili et al., 2011).

Im Weiteren ist bei Vorschädigung des Vorhofs die Entstehung von kreisenden Erregungen um ein arrhythmogenes Substrat, ausgelöst durch eine ektope Aktivität, eine Episode von VHF möglich (Wakili et al., 2011).

1.3.7 Reentry

Ein Reentry entsteht auf Grundlage von elektrophysiologischen und strukturellen Veränderungen. Er stellt das Wiedereintreten der Erregungsfront über dem Vorhofmyokard in das unter physiologischen Bedingungen eigentlich refraktäre umliegende Myokard dar. Durch das Vorliegen einer veränderten Repolarisation, veränderten Ausbreitungsverhältnissen und den funktionellen oder anatomischen Hindernissen kann eine sich selbst unterhaltende kreisende Erregung entstehen, welche auf einer Kreisbahn kontinuierlich zirkuliert. Die elektrophysiologischen Veränderungen der atrialen Kardiomyozyten sind durch eine veränderte Funktion von Ionenkanälen charakterisiert. Diese bedingt vorrangig eine verkürzte Aktionspotentialdauer als auch eine damit verkürzte effektive Refraktärperiode. Dies bewirkt eine gesteigerte Heterogenität der Repolarisation der atrialen Kardiomyozyten und ermöglicht eine zeitlich asynchrone Weitergabe der Erregung von Zelle zu Zelle (Van Wagoner et al., 1999).

Unter strukturellen Veränderungen des Vorhofs werden atriale Fibrose, gestörte Zell-Zell-Kontakte, Vorhofhypertrophie und Vorhofdilatation verstanden, welche auf Entzündungen, Apoptosen und die hohe Frequenz bei VHF selbst zurückzuführen sind. Sie bedingen eine verlangsamte Leitungsgeschwindigkeit und stellen so elektrophysiologische Hindernisse für die Erregungsausbreitung über den Vorhöfen dar (Nattel, 2017). Im Kontext der Ursachenforschung von VHF ist die erwähnte atriale Fibrose von großem Interesse. Hier zeigt sich die große Komplexität der Vorhofschädigung durch entsprechende kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen. Es wird beispielsweise zwischen *reactive (intestinal) fibrosis* und *replacement (reparative) fibrosis* unterschieden, wobei Letztere ein größeres elektrophysiologisches Hindernis darstellt (Nattel, 2017). In der Entstehung von atrialer Fibrose spielt das bereits thematisierte Angiotensin II eine große Rolle. Hier können sich neue therapeutischen Ansätze ergeben (Nattel, 2017).

Durch genetische Prädisposition, kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen können im Vorhofmyokard auch lokalisierte Bereiche verkürzter Refraktärperiode und verlangsamer Leitungsgeschwindigkeit existieren, welche zur Ausbildung eines arrhythmogenen Substrates führen können. Diese funktionellen Hindernisse werden durch anatomische Hindernisse ergänzt und spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von kreisenden Erregungen (Dobrev, 2006; Nattel et al., 2008; Wakili et al., 2011).

1.3.8 NDPKs und VHF

Im Kontext der bisherigen Erkenntnisse über die Pathophysiologie von VHF zeigen sich für die NDPKs mögliche Einflüsse auf den cAMP-Gehalt und die Ca^{2+} -Homöostase. Zum einen konnte bei cVHF ein erhöhter cAMP-Gehalt mit erhöhtem SR- Ca^{2+} -Leck nachgewiesen werden (Voigt et al., 2012). Andererseits konnte unsere Arbeitsgruppe auch eine erhöhte NDPK-Expression bei cVHF aufzeigen. Bestätigend zeigte sich in einem VHF-simulierenden Modell mit elektrischer Stimulation von Hundekardiomyozyten eine erhöhte NDPK-Expression und ein erhöhter cAMP-Gehalt. Auch unter adenoviraler Überexpression von NDPK-B und NDPK-C konnte ein erhöhter cAMP-Gehalt aufgezeigt werden (Abu-Taha et al., 2018; Schaefer et al., 2017). Des Weiteren konnte unter dem Einfluss erhöhter und erniedrigter NDPK-Expression eine verstärkte bzw. abgeschwächte Kontraktion der Kardiomyozyte beobachtet werden (Abu-Taha et al., 2017).

Bezogen auf die molekularen Mechanismen der Ca^{2+} -Dysregulation werden durch eine veränderte NDPK-Expression auch eine veränderte Proteinexpression und Proteinphosphorylierung der SR Proteine beobachtet (Voigt et al., 2012). Die konkreten Mechanismen der Ca^{2+} -Dysregulation sind hier unvollständig verstanden. Sie bedingen aber ein erhöhtes diastolischen SR- Ca^{2+} -Leck, SCaEs und DADs sowie getriggerte Aktionspotentiale und so ein Entstehen von ektopter Aktivität. Eine sich daraus ableitende proarrhythmische Wirkung erhöhter NDPK-Expression muss weiter aufgeklärt werden.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Im Themenkomplex der molekularen Mechanismen von VHF scheint den NDPKs eine einflussreiche Bedeutung zuzukommen. Nicht nur ihr Einfluss auf den cAMP-Gehalt selbst, sondern auch die dadurch bedingt veränderte Proteinexpression mit Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase der Zelle, scheinen von zentraler Bedeutung in der pathophysiologischen Betrachtung von VHF zu sein. Auch konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass Vorhofgewebe von Patienten mit cVHF eine erhöhte NDPK-B- und NDPK-C-Expression aufweist (Abu-Taha et al., 2018).

Diese Arbeit hat zum Ziel, die mechanistische Untersuchung einer proarrhythmischen Wirkung von NDPKs und der Entstehung von SCAEs, DADs sowie getriggerten Aktionspotentialen zu ergänzen. Hier soll besonders die Ca^{2+} -Dysregulation der atrialen Kardiomyozyten im Vordergrund stehen. Auch kann Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit einer erhöhten Probenanzahl nachgegangen werden. Der Einfluss der unphysiologischen Überexpression von NDPK-B und NDPK-C auf die Proteine des SRs soll so verifiziert werden. Hierzu wird zur Klärung der Fragestellungen die gut etablierte murine HL-1 Vorhofzelllinie genutzt. Die Herunterregulierung von NDPK-B in HL-1 Zellen soll Aufschlüsse über die Regulation der Expression und Phosphorylierung bestimmter Proteine durch NDPK-B liefern.

Bezogen auf die Proteinexpression und Proteintranskription werden die charakteristische Veränderung von RyR2, CSQ2, SERCA2a und PLB untersucht. Besonderes Augenmerk richtet sich auch auf die Phosphorylierungen von RyR2 und PLB, welche bereits als eine Ursache einer Vergrößerung des SR- Ca^{2+} -Lecks und Auftreten von SCAEs mit Entstehung von DADs bei pVHF postuliert wurden (Dobrev et al., 2011; Voigt et al., 2014b). Zur Klärung der grundlegenden Annahme der Bedeutung von NDPKs auf den cAMP-Gehalt wird in den jeweiligen Versuchsansätzen der cAMP-Gehalt zur jeweiligen Kontrolle verglichen. Insgesamt sollen die Ergebnisse die Bedeutung der NDPKs für proarrhythmische Veränderungen der SR Proteine und für die Ca^{2+} -Dysregulation atrialer Kardiomyozyten aufklären.

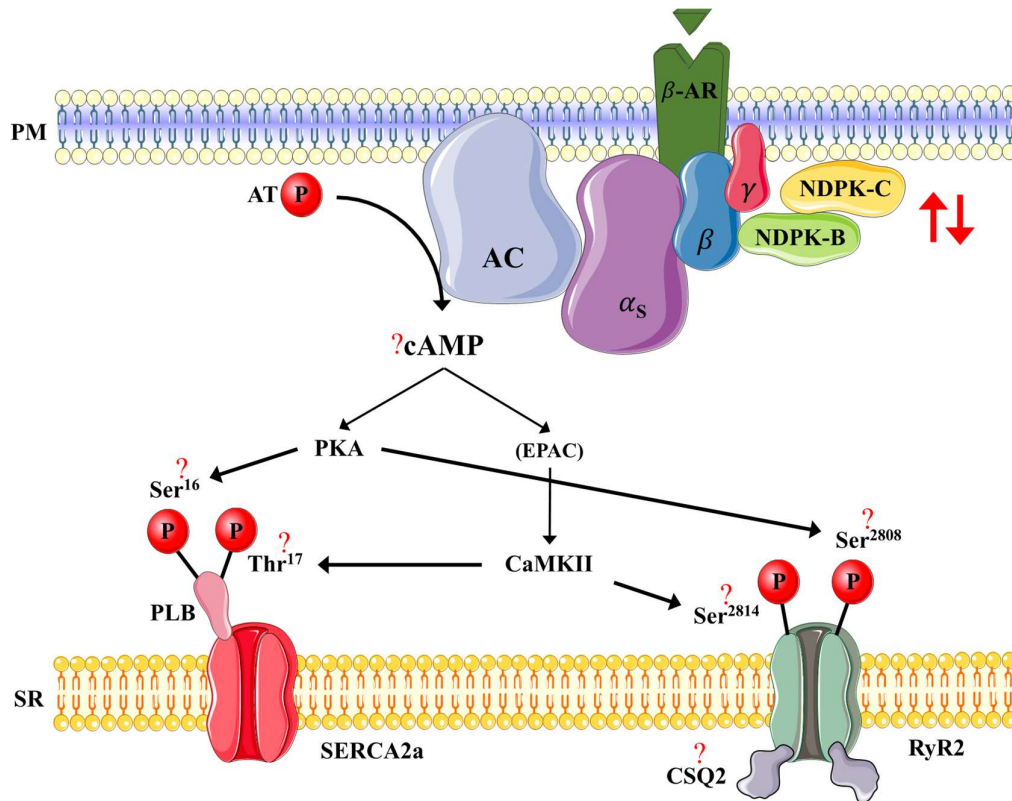


Abbildung 9: Mögliche Folgen einer veränderten NDPK-Konzentration auf den cAMP-Gehalt und die Ca²⁺-Homöostase in atrialen Kardiomyozyten

Zu klären ist der Einfluss von erhöhter NDPK-B- und NDPK-C-Konzentration sowie erniedrigter NDPK-B-Konzentration auf die G-Proteingekoppelte Signaltransduktion mit folgend verändertem cAMP-Gehalt der HL-1-Zelle. Dadurch kann es zu Veränderungen der Phosphorylierung von PLB und RyR2 kommen. Des Weiteren wird die Proteinexpression der SR Proteine bestimmt.

PM, Plasmamembran; SR, Sarkoplasmatisches Retikulum; ?, fragliche Einflüsse veränderter NDPK-Konzentration

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Tabelle 2: Chemikalien

Substanzen	Firma
Acrylamid	Carl Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth
Aqua dest.	Braun
Bromphenolblau	Carl Roth
Cäsiumchlorid (CsCl ₂)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Balanced Salt Solution (PBS)	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose	Invitrogen
Eisessig	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Isopropanol	RPE
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka
Phosphatase Inhibitor Cocktail (PhosStop)	Roche
Polysorbat 20 (Tween 20)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Carl Roth
Protease Inhibitor Cocktail (Complete Mini)	Roche
Roti-Block	Carl Roth
Salzsäure (rauchend, 37%)	Carl Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Tris Ultrapure	AppliChem
Triton X-100	Carl Roth
Trypsin	Sigma-Aldrich

Tabelle 3: Nährmedien für die Zellkultur

Nährmedium	Zusammensetzung
Claycomb-Komplettmedium (HL-1 Zellen)	Claycomb Medium FKS 10% / 2% L-Glutamin 0,002 M Penicillin 100 U/ml

DMEM-Komplettmedium (HEK-293 Zellen)	Streptomycin 0,1 mg/ml DMEM, high glucose FKS 10% L-Glutamin 0,002 M Penicillin 100 U/ml Streptomycin 0,1 mg/ml Pyruvat
--------------------------------------	---

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Lysepuffer	Zusammensetzung
TE-Puffer	Tris 0,01 M, pH 7,4 NaCl 0,150 M EDTA 0,001 M PhosStop 1:10 Complete Mini 1:10 PMSF 1:1000 Triton X-100 1% (v/v)
Puffer für Western Blott	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	Aqua dest. Acrylamid 30% Tris 1,5 M, pH 8,8 SDS 10% APS 10% TEMED
Sammelgelpuffer	Aqua dest. Acrylamid 30% Tris 1 M, pH 6,8 SDS 10% APS 10% TEMED
6 x Laemmli	Tris 0,06 M, pH 6,8 SDS 12% DTT 0,6 M Glycerol 60% Bromphenolblau 0,06%
Elektrophoresepuffer	Tris 0,025 M Glycin 0,192 M SDS 0,1% ad. 1000ml Aqua dest.
Blotpuffer	Tris 25 mM Glycin 0,19 M Methanol 20% ad. 1000ml Aqua dest.
TBST-Puffer (pH 7,4)	Tris 0,01 M NaCl 0,15 M Tween 20 0,2% ad. 1000ml Aqua dest.
Ponceau S	Ponceau S 0,2% Eisessig 5%
Blockpuffer	TBST-Puffer

	Roti-Block 1:10
10 x VSB-Puffer (virus standard buffer)	Tris 0,1 M, pH 7,4 KCl 0,05 M NaCl 1,37 M
CsCl ₂ heavy Stock	CsCl ₂ 21,1g ad. 50ml 1 x VSB-Puffer 42,2% (w/w)
CsCl ₂ light Stock	CsCl ₂ 11,02g ad. 50ml 1 x VSB-Puffer 22,4% (w/w)

Tabelle 5: Proteinmarker

Proteinmarker	Firma
HiMark Pre-Stained Protein Standard	Gibco/Invitrogen
Precison Plus Protein Dual Xtra Standard	Bio-Rad

Tabelle 6: Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung für Western Blot	Firma	Spezies
Anti-Flag	1:5000	Sigma-Aldrich	Mouse
CSQ	1:2500	Thermo Scientific	Rabbit
GAPDH	1:20000	HyTest	Mouse
NDPK-B	1:10000	Eurogentic	Rabbit
NDPK-B	1:1000	Origene	Mouse
NDPK-B	1:5000	Prof. Postel*	Rabbit
NDPK-C	1:10000	Eurogentic	Rabbit
NDPK-C	1:1000	Prof. Lascu*	Rabbit
PLB-Total	1:1000	Abcam	Mouse
PLB-Ser16	1:1000	Abcam	Rabbit
PLB-Ser17	1:1000	Badrilla	Rabbit
RyR2-Total	1:1000	Thermo Scientific	Mouse
RyR2-Ser2808	1:2000	Prof. Wehrens*	Rabbit
RyR2-Ser2814	1:1000	Prof. Wehrens*	Rabbit
SERCA2a	1:1000	Santa Cruz	Goat

* Diese Antikörper wurden freundlicherweise von den genannten Professoren zur Verfügung gestellt.

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung für Western Blot	Firma
IRDye 680RD Donkey anti-Goat IgG	1:10000	Li-cor Biosciences
IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG	1:10000	Li-cor Biosciences
IRDye 680RD Goat anti-Rabbit IgG	1:10000	Li-cor Biosciences
IRDye 800CW Donkey anti-Goat IgG	1:10000	Li-cor Biosciences
IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG	1:10000	Li-cor Biosciences
IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG	1:10000	Li-cor Biosciences

Tabelle 8: Fertigkits

Kit	Firma
Cyclic AMP Competitive ELISA Kit	Invitrogen
GoTaq® Probe qPCR Master Mix	Promega
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Pierce Protein BCA Assay Kit	Thermo Scientific
My Budget RNA mini Kit	Qiagen
RNase free DNase Set	Qiagen

Tabelle 9: Geräte

Geräte	Firma
CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific
Feinwaage	Santorius
Fluoreszenzmikroskop	Nikon
Gefrierschrank (-20°C)	Thermo Scientific
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific
Gradientenmischer	Carl Roth
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr
LifeTouch Thermal Cycler	Biozym
Magnetrührer	NeoLab
Microplate Reader Infinite M200 Pro	Tecan
Mikroskopiekamera	Imagingsource
Mini PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
Vertikale Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad
Mixer	Scientific Ind.
Odyssey CLx Imaging System	Li-cor Biosciences
Pallet Pestle	Sigma-Aldrich
PicoReal 96 Real-Time PCR System (Thermocycler)	Thermo Scientific
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe (Pipetus)	Hirschmann
Power PAC HC High-Current Power Supply	Bio-Rad
Schüttler	NeoLab
Sterilbank SAFE 2020	Thermo Scientific
Thermomixer	Eppendorf
Trans-Blot Turbo Blotting System	Bio-Rad
Überkopfschüttler	NeoLab
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter
Ultra-Turrax	IKA-Werke
Wärmeschrank	Memmert
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge	Thermo Scientific

Tabelle 10: Software

Software	Firma
Graph Pad Prism Version 9	GraphPad Software
Endnote X9	Clarivate Analytics
i-control-Microplate Reader Software	Tecan
IC Capture	Imagingsource
Image J	National Institute of Health
Image Studio	Li-cor Bioscience

Magellan Software	Tecan
PicoReal Software 2.2	Thermo Scientific
Smart Servier Medical Art	Servier
Windows 7 Excel	Microsoft Corporation
Windows 7 Power Point	Microsoft Corporation
Windows 7 Word	Microsoft Corporation

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Probengewinnung

2.2.1.1 HL-1 Zellen

HL-1 Zellen sind immortalisierte atriale Kardiomyozyten der Maus. Sie entstammen der Zellreihe der AT-1 Zellen, welche aus einem atrialen Tumor eines Mäuseherzens gewonnen werden konnten (Lanson et al., 1992). Auch weisen die HL-1 Zellen ein mit adulten murinen Kardiomyozyten übereinstimmendes Genom auf. Sie sind weiterhin in der Lage sich zu teilen. Es handelt sich um adherente Zellen, welche auch kontrahieren können (Claycomb et al., 1998). In den nachfolgend durchgeführten Experimenten wurde stets darauf geachtet, dass die miteinander verglichenen Versuchsansätze aus der gleichen Zellpassage stammen.

2.2.1.2 Durchführung der Zellkultur

Die Zellkultur der HL-1 Zellen wurde mit Passage 92 begonnen. Der Ablauf richtet sich nach den Angaben der Firma Sigma-Aldrich. Wesentlicher Bestandteil des Nährmediums ist das Claycomb-Medium. Wie vorgegeben werden dem Claycomb-Medium zusätzlich fetales Kälberserum (FKS, 10%), Penicillin (100U/ml), Streptomycin (0,1mg/ml), Norepinephrin (0,1mM), L-Ascorbinsäure und L-Glutamin (200mM) hinzugesetzt. Das Wachstum der HL-1 Zellen ist auf dem Boden einer mit 10ml 0,02% Gelantine beschichteten T75-Flasche möglich. Zusätzlich werden die Zellen bei 37°C mit 5% CO₂ bedampft. Nach einigen Tagen im Inkubator, mit einem Nährmediumswechsel nach 2 Tagen, wurden das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Da es sich um adherente Zellen handelt, kann mit Trypsin ein Ablösen der Zellen von der Oberfläche erreicht werden. Durch die Zugabe von bovinem Kälberserum wird das Trypsin wiederum inaktiviert. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) der entstandenen Zellsuspension können das bovine Kälberserum und das Trypsin von der Zellmasse getrennt werden. Die Zellen sind hier weiterhin vital. Durch Zugabe des HL-1 Nährmediums kann wieder eine Zellsuspension erreicht werden, welche auf die bereits ebenfalls mit 2,5ml 0,02% Gelantine beschichteten 6-

well-plates gegeben wird. Auf diese Weise entstehen jetzt im wiederholten Verfahren mehrere Zellproben, welche im weiteren Verlauf mit den unterschiedlichen Viren infiziert werden können, nachdem auch hier die Zellen adhären auf dem Boden der *6-well-plate* wachsen. Die Dichte der Zellbesiedlung sowie die Vitalität der HL-1 Zellen konnte durch Mikroskopie mit einer Neubauer-Zählkammer validiert werden. Pro einzelnes Well betrug die Zellzahl ca. $1,5 \times 10^6$. Auch die *6-well-plates* wurden ebenfalls mit Nährmediumwechsel unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach zusätzlicher Behandlung der Zellen, einer Infektion mit Adenoviren, und anschließender erneuter Inkubationszeit kann eine Fixierung der Zellen in ihrem momentanen Zustand nach Waschen mit PBS durch flüssigen Stickstoff erreicht werden. Im Anschluss erfolgt die Lyse zur endgültigen Gewinnung der Proben.

2.2.1.3 Gewinnung der Zelllysate

Zur Lyse der behandelten Zellen, welche durch flüssigen Stickstoff in ihrem aktuellen Zustand fixiert wurden, musste der TE-Puffer hergestellt werden. Er besteht aus 10mM Tris mit pH 7,4, 150mM NaCl, 1mM EDTA. Der fertige Lysepuffer wurde dann durch 9ml TE-Puffer mit 1ml 10% Triton-Lösung sowie PhosStop, Complete Mini und 100 μ l PMSF hergestellt. Dieser wird auf die gefrorenen Zellen gegeben, welche zusätzlich mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der *6-well-plates* vollständig gelöst werden konnten. In jedes Well wurden 800 μ l Lyse-Puffer gegeben. Im Anschluss wurde die Zellsuspension der einzelnen Wells in die beschrifteten Eppendorf Tube transferiert. Zur besseren Lyse der Zellen wurden alle Zellsuspensionen auf Eis für eine Stunde jede zehn Minuten gemischt. Durch anschließende Zentrifugation bei 4°C und 10000g für 10min kommt es zur Trennung der Zellbestandteile am Boden und der wässrigen Phase darüber. Die wässrige Phase, welche die intrazellulären Proteine der Zelle enthält, kann schließlich in ein neues Eppendorf Tube überführt werden. Damit wurde die eigentliche Probe der vorbehandelten Zellen und ihrer Kontrollen gewonnen.

2.2.2 Die Adenoviren

Die für diese Arbeit genutzten Adenoviren zeigen als Gemeinsamkeit die Bildung des *enhanced green fluorescent proteins* (EGFP) auf. Nach entsprechender Synthese in den infizierten Zellen wird EGFP durch Blaulicht angeregt und unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Dies stellt sowohl die Kontrolle über die erfolgreiche Infektion der HL-1-Zellen als auch eine Möglichkeit zur Beurteilung der Infektionsstärke dar. Des Weiteren spiegelt sich so der Einfluss der Vireninfection selbst nicht in den Ergebnissen wider. So können die Ad-EGFP-Proben als Kontrolle für die weiteren Virenproben dienen. Ad-NDPK-B und Ad-flag-NDPK-C wiederum

führen zu einer Überexpression von NDPK-B bzw. NDPK-C. Das Ad-flag-NDPK-C Virus weist als Besonderheit ein an NDPK-C gebundenes *flag-tag* auf, welches bei der Proteinbestimmung den spezifischen Nachweis der *Flag*-Domäne erlaubt und so NDPK-C detektiert wird. Die Bildung von EGFP, NDPK-B und NDPK-C wird durch die Einschleusung der für diese Proteine codierende humane komplementär DNS (cDNA) bewerkstelligt.

Ad-sh-NDPK-B induziert sowohl die Bildung von EGFP als auch die Bildung einer *small hairpin RNA* (shRNA). Die shRNA weist eine namensgebende Haarnadelstruktur auf und ist für die NDPK-B-codierende mRNA spezifisch. Durch RNA-Interferenz gelingt das Herunterregulieren der NDPK-B-Expression. Die shRNA wird über das Drosha- (im Zellkern) und Dicer-Enzym (im Zytoplasma) weiterverarbeitet und gelangt auf den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC). Es kommt zur Interaktion mit der komplementären NDPK-B-mRNA und im Weiteren zur Stilllegung dieses komplementären Gens.

2.2.2.1 Amplifikation der Adenoviren

Die Amplifikation der rekombinanten Adenoviren wird nach He et al., 1998 und Luo et al., 2007 durchgeführt. Es erfolgte eine getrennte Synthese der einzelnen Adenoviren. Hierfür werden die humanen HEK293-Zellen (Human Embryonic Kidney) genutzt. Sie sind adhaerente Zellen und zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus. Sie werden auf 30 Petrischalen à 15cm ausgesät. Es wird das Zellmedium DMEM-Komplettmedium verwendet. Die Infektion mit den Adenoviren erfolgt nach Erreichen einer Zelldichte von 80-90%. Nach drei bis fünf Tagen kann der durch die Virusinfektion bedingte zytopathische Effekt mit Verlust der Adhaerenz auf die HEK293-Zellen beobachtet werden. Die Adenoviren haben die Zellen infiziert und werden von den Zellen im Zytoplasma gebildet. Darauf folgend werden die HEK293-Zellen durch Resuspension abgelöst und in Eppendorf Tubes bei 360g für 5 min zentrifugiert. Während der Überstand verworfen wird, werden die Pallets mit je 3ml PBS versetzt und dann bei -20°C gelagert oder direkt weiterverwendet. Im darauffolgenden Schritt werden die HEK293-Zellen lysiert, damit möglichst alle Viren aus dem Zytoplasma der Zelle heraus gelangen. Hierzu wird die Zellsuspension dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Durch erneute Zentrifugation bei nun 2500g über 5min kann der virusenthaltende Überstand in ein weiteres Eppendorf Tube pipettiert werden. Für die Gewinnung der reinen Adenoviren muss eine CsCl₂-Gradienten-Zentrifugation durchgeführt werden. Dazu werden 4,5ml des virusenthaltenden Überstandes mit 4ml Light-Stock und 4,5ml Heavy-Stock in ein Ultra Clear Röhrchen pipettiert und in der Ultrazentrifuge bei 12°C und 100000g für die Dauer von 4h zentrifugiert. Die Zentrifugation bewirkt ein Auftrennen der in der Zellsuspension

enthaltenen Makromoleküle gemäß ihrer Schwebedichte in der CsCl_2 -Lösung. Die Adenoviren verweilen somit in ihrer isopyknischen Zone und sind wie auch die leeren Viruskapside, welche eine andere Schwebedichte aufweisen, durch das Ultra Cleare Röhrchen zu erkennen (Abbildung 10). Mit einer 1ml Spritze und feiner Kanüle ist es möglich, die Adenoviren durch die Wand des Ultra Cleare Röhrchen zu entnehmen. Es folgt die Aufbereitung der Adenoviren durch eine Dialyse gegen den VSB-Puffer bei 4°C über 12-20h mit dreimaligem Wechseln des Puffers. Hierdurch ist es möglich das restliche CsCl_2 zu entfernen. Die anschließende Lagerung der Adenovirensuspension erfolgt in VSB/Glycerol-Einfriermedium bei -20°C (He et al., 1998; Luo et al., 2007).

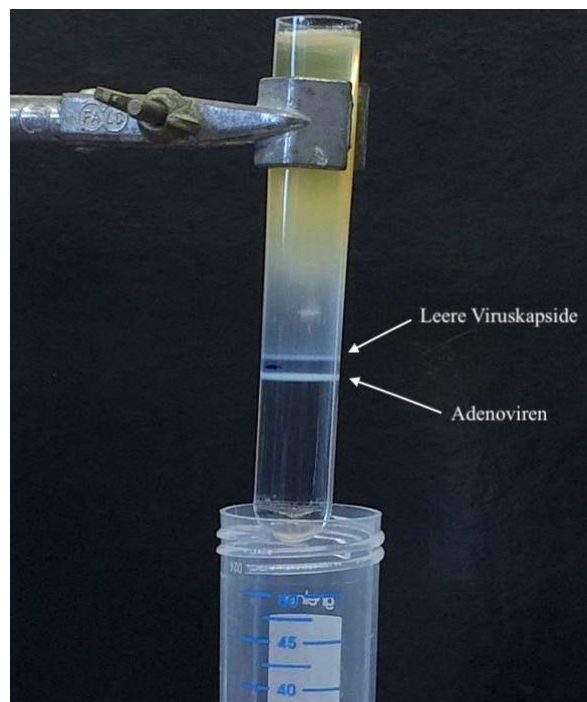


Abbildung 10: Amplifikation der Adenoviren

Nach CsCl_2 -Gradienten-Zentrifugation zeigen sich die cDNA- bzw. shRNA-enhaltenen Adenoviren in einer hellen Bande, welche gut zu der Bande der leeren Viruskapside abzugrenzen ist. Diese wiederum enthalten keine genetischen Informationen.

2.2.2.2 Validierung der Infektionseffektivität

Im Verfahren der Infektion der HL-1 Zellen mit den rekombinant hergestellten Adenoviren wird eine unterschiedlich Kontagiösität der einzelnen Viren festgestellt. Alle Viren enthalten zusätzlich die cDNA, welche für EGFP codiert. Nach Infektion der Zellen bilden diese das EGFP vermehrt, welches dann die Zellen unter Blaulicht durch ein Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszierend erscheinen lässt. Folglich müssen die zugegebenen Virusmengen zur

Vergleichbarkeit der Ergebnisse ein nahezu identisches Fluoreszenzsignal erzielen. Dies erfolgt durch visuelle Auswertung gemäß der Menge an EGFP-Expression.

Die *multiplicity of infection* (MOI) gibt das Verhältnis von infizierenden Einheiten zu den zu infizierenden Einheiten an. Sie ist der Quotient aus Anzahl von Viruspartikel zu der Anzahl der Zellen in einem Well. Die MOI für die HEK293-Zellen beträgt 1. Für die Infektion einer Zelle, wird also ein Virus benötigt. Für die Bestimmung der benötigten Virusmengen wird nach 24h bei unterschiedlichen Virusmengen von 0,0001 μ l bis 20 μ l pro Well die niedrigste Virusmenge bestimmt, bei welcher nahezu 100% der Zellen infiziert sind. Dies wird in einem *12-well-plate* mit HEK293-Zellen (ca. 1×10^6 Zellen pro Well), die mit einer Dichte von 80-90% vorliegen, durchgeführt (Abbildung 10). Hier kann die *plaque forming unit* (PFU) als Verhältnis aus Viruseinheit pro Volumeneinheit ermittelt werden. Da bei der Infektion von HL-1 Zellen eine MOI von 150 benötigt wird (Fechner et al., 2007), ergeben sich für die verschiedenen amplifizierten Viren die genutzten Virusmengen (Tabelle 11).

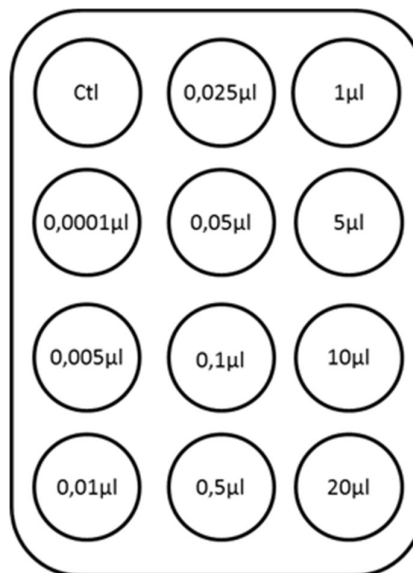


Abbildung 11: Pipettierschema zur Bestimmung der benötigten Virusmengen in HEK293-Zellen

2.2.2.3 Infektion der HL-1 Zellen mit den amplifizierten Adenoviren

Die auf *6-well-Plates* ausgesäten HL-1 Zellen werden mit dem bereits beschriebenen Nährmedium für 48h bei 37°C unter kontinuierlicher 5%-CO₂-Bedampfung inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle des Wachstums über das gesamte Well werden die Zellen mit den Adenoviren infiziert. Hierzu werden die aliquotierten Viren aufgetaut und zunächst in dem HL-1 Zellnährmedium gelöst. Es ergeben sich nach Validierung der Infektionseffektivität und

mehreren Kontrolldurchläufen die Virusmengen, welche für die Infektion der HL-1 Zelle genutzt werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Benötigte Virusmenge für die jeweiligen Versuchsansätze

Virus	Virusmenge pro 2ml	Inkubationsdauer	FKS-Zugabe
Ad-EGFP	0,5µl	48h	10% bzw. 2%
Ad-NDPK-B	50µl	48h	10%
Ad-Flag-NDPK-C	1µl	48h	10%
Ad-sh-NDPK-B	1µl	48h	2%

Zeitgleich wird das Nährmedium der Zellen gewechselt. Die Viren werden in 2ml Nährmedium pro Well und nach festem Pipettierschema gegeben (Abbildung 12). Im Folgenden werden die nun infizierten Zellen 48h bei 37°C unter kontinuierlicher 5%-CO₂-Bedampfung inkubiert. Durch Fluoreszenzmikroskopie kann die Infektionsrate von infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen abgeschätzt werden. Hier ist das Ziel eine vergleichbare Infektionsrate bei der Nutzung von verschiedenen Adenoviren von jeweils 80-100% zu erreichen. Aufgrund der Infektion mit den Adenoviren kann eine Ablösung einiger Zellen beobachtet werden. Dies wird als zytotoxischer Effekt bezeichnet und stellt eine Limitation für die zugegebene Virusmenge dar. Durch den anschließenden Waschprozess gehen die abgelösten Zellen nicht in die Ergebnisse der nachfolgenden Proteinbestimmung ein. Nach abgeschlossenen 48h wird mit Hilfe des Fluoreszenzmiroskops die Infektion der Zellen durch die Viren kontrolliert und schließlich das Nährmedium entfernt. Die Wells werden mit 2,5ml vorgewärmtem 37°C PBS einmalig gewaschen. Nach diesem Waschvorgang wird das *6-well-plate* in flüssigem Stickstoff eingefroren, um so die Zellen in ihrem aktuellen Zustand zu fixieren.

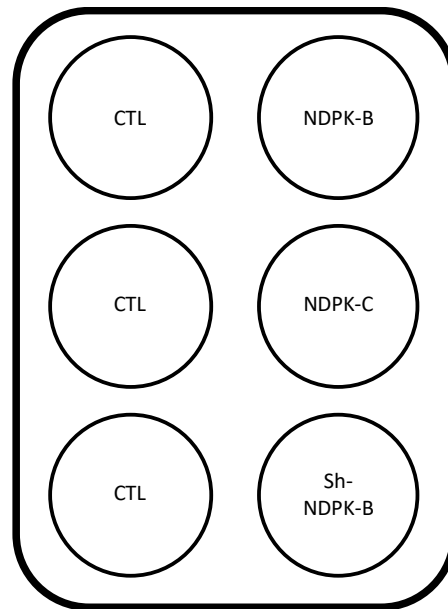


Abbildung 12: Pipettierschema der Virusinfektion von HL-1 Zellen mit den Adenoviren
CTL = Kontrolle; Die Kontrolle erfolgt durch die Virusinfektion mit Ad-EGFP.

2.2.3 Proteinbestimmung und Western Blot SDS-PAGE

2.2.3.1 Proteinbestimmung

Vor der Proteinbestimmung der einzelnen Lysate wird stets eine Standardkurve mit definierten Proteinmengen erstellt. Grundlegend ist die sich hier in höherer Verdünnung ergebende nahezu lineare Funktion, welche sich aus den Proteinmengen der Standards ergibt. Durch fotometrische Bestimmung und dem Vergleich mit den Standardproben kann hier die Proteinmenge pro μl Probe der einzelnen Lysate bestimmt werden (Magellan Software, Tecan). Es wird die Extinktion des hier entstehenden Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen (Microplate Reader Infinity M200 Pro, Tecan). Dieser entsteht durch die Chelatbildung der in Reagenz A enthaltenen Bicinchoninsäure (BCA) und dem Kupfersulfat des Reagenzes B. Die Proben, welche mit beiden Reagenzien auf eine 96 Well Microplate aufgetragen wurden, müssen zur Gewährleistung einer vollständig ablaufenden Reaktion bei 37°C für 30min inkubiert werden. Beide Reagenzien entstammen dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Sowohl von den Standardproben als auch von den Lysaten wird stets eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nur eine exakte Proteinbestimmung kann exakte Ergebnisse garantieren.

2.2.3.2 Vorbereitung der Proben

Nach einer erfolgreichen Proteinbestimmung müssen die Lysatproben der virusinfizierten HL-1 Zellen mit Laemmli versetzt werden. Dieser Hilfsstoff enthält unterschiedliche Substanzen, welche die Flusseigenschaften der aufgetragenen Proben in dem Gel des Western Blots verbessern und auch die Ladungsfront der wandernden Proteine sichtbar macht. So ist es möglich, den Verlust der kleineren Proteine zu verhindern, da sie somit nicht unbemerkt vollständig durch das Gel hindurch wandern. Die enthaltenen Substanzen weisen folgende Eigenschaften auf: Das Glycerol bindet an die Proteine und sorgt im pH neutraleren Sammelgel für einen bremsenden Effekt durch positive Ladungen. Dieser Effekt wird im alkalischen Trenngel schließlich aufgehoben, da nun negative Ladungen vorherrschen. Dies führt nun zu einem scharfen Auftrennen der unterschiedlichen Proteine, bedingt durch die nun negative Ladung von Glycerol und der Größe der Proteine. Dithiothreitol (DTT) wirkt als Reduktionsmittel auf die Disulfidbrücken der Proteine. Durch Reduktion werden diese gespalten, welches die Stabilität der Proteine verringert und so ein Proteinwandern ermöglicht. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Tensid, welches an nichtkovalenten Bindungen der Proteine bindet. So werden den Proteinen zusätzlich negative Ladungen zugeführt, welche die Wanderung zum Pluspol während der Elektrophorese fördern. Des Weiteren wird so die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgehoben. Es resultieren linear vorliegende Proteine. Tris Ultrapure stabilisiert als anorganischer Puffer den alkalischen pH-Wert, wodurch das Vorliegen von positiven Ladungen verringert werden kann. Bromphenolblau zeigt als Farbstoff und besonders kleines Molekül die Ladungsfront bläulich gefärbt an.

Einen notwendigen Schritt der Probengewinnung stellt die vollständige Denaturierung der Proteine dar, welche durch die Auflösung der Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine charakterisiert ist. Hierbei kommt es aber nicht zur Zerstörung von kovalenten Bindungen, sodass die Primärstruktur der Proteine erhalten bleibt. Die dazu benötigte hohe Aktivierungsenergie kann durch Erhitzen der Proben bei 95°C unter ständigem Mischen für 5 Minuten zugeführt werden. Ebenfalls unterstützt auch die beschriebene SDS Wirkung eine vollständige Denaturierung. So erfolgt die Proteinauftrennung in der Elektrophorese hauptsächlich in Abhängigkeit der Proteinkettenlänge. Die Proben werden schließlich bei -40°C gelagert.

2.2.3.3 Gele

Die Gele, in denen die mit Laemmli versetzten Lysatproben aufgetragen werden, werden wie folgt hergestellt: Es werden zwei Glasplatten, wovon die erste zwei seitliche Abstandshalter

von 1,5mm trägt, gegeneinander abgedichtet. So entsteht zwischen ihnen ein Hohlraum, in den die Polyacrylamid-Lösung gefüllt wird. Die Glasplatten werden zuvor gründlich mit Wasser und Ethanol gereinigt, um das gleichmäßige Verteilen des Gels zu gewährleisten. Die Polyacrylamid Lösung enthält folgende Substanzen: Aqua dest., 30% Acrylamid (AA), Tris-Ultrapur und 10% SDS. Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumperoxdisulfat (APS) werden versetzt erst kurz vor dem Gießen dem Trenn- oder Sammelgelpuffer hinzugefügt. TEMED übernimmt hier die Rolle des Polymerisationskatalysators während APS als Radikalbildner den Polymerisationsstarter darstellt. Die letztendliche Konzentration von AA gibt schließlich die Konzentration des Trenngels an (6% bis 15%). Die unterschiedlichen Konzentrationen führen analog zur Dichte des entstehenden Trenngels zu einem unterschiedlichen Laufverhalten der Proteine in Abhängigkeit ihrer Größe. 6%-Gele weisen den Vorteil auf, dass auch sehr große Proteine wie RyR2 in das Trenngel gelangen und aufgetrennt werden. 15% Gele führen gegenüber den 6%-Gelen zu einer klaren Auftrennung von sehr kleinen Proteinen wie PLB oder NDPKs. Tris-Ultrapur ist maßgeblich für die Einstellung des pH-Wertes verantwortlich. So wird das Sammelgel pH-neutral gegenüber dem Trenngel, welches alkalisch hergestellt wird. Grundlegend für die Aushärtung der Gele ist der Ablauf der radikalischen Polymerisation von AA mit Ausbildung von Quervernetzungen.

Zuerst erfolgt das Gießen des Trenngels versetzt mit APS und TEMED bis ca. 2cm vor der Glaskante des Hohlraumes. Zum Schutz vor Sauerstoff in der Raumluft, welcher als Radikalfänger die Polymerisation behindern würde und die oberste Schicht des Trenngels austrocknet, wird diese transient mit Isopropanol bedeckt. Da sich die beiden Substanzen nicht mischen, entsteht eine glatte Trennschicht zum Trenngel. Nach 30 Minuten ist das Trenngel ausgehärtet und das Isopropanol kann vorsichtig ohne Kontakt mit dem Trenngel entfernt werden. Danach wird der angesetzte Sammelgelpuffer mit APS und TEMED versetzt und auf das polymerisierte Trenngel bis zur Glaskante gegossen. Durch Einführen eines Probenkamms mit 10 oder 15 Zinken werden später nach Polymerisation die Taschen zum Auftragen der Proben geschaffen. Die Aushärtung des Sammelgels ist ebenfalls nach 30 Minuten abgeschlossen. Die Gele können schließlich sofort verwendet oder bei 4°C befeuchtet gelagert werden.

2.2.3.4 Elektrophorese

In Vorbereitung zur Elektrophorese ist der Elektrophoresepuffer anzufertigen. Dieser besteht aus 0,25M Tris-Ultrapur, 1,92M Glycin und 1% SDS. Die Gele werden in der Regel zu zweit in eine Elektrophoresekammer eingespannt, welche dann mit dem Elektrophoresepuffer, der

leitfähigen Flüssigkeit, befüllt wird. Nach vollständiger Befüllung werden die Kämme aus den Gelen entfernt, sodass keine Luftblasen in die Taschen gelangen. Dann werden in die seitlichen Taschen die molekularen Marker definierter Proteingrößen pipettiert (DualXtra oder Hi Mark), welche als Referenz zu den Proteinen der Proben dienen. Durch ein doppeltes Auftragen des Markers kann eine schräge Wanderung der Proteine erkannt und in die Verwertung einfließen. Die Proben von meist 30µg werden dann nacheinander in die einzelnen Taschen pipettiert. Durch Anlage eines Gleichstroms wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode, welche den Pluspol darstellt. Durch die unterschiedliche Größe der Proteine resultiert eine differente Wanderungsgeschwindigkeit, sodass die kleinen Proteine gegenüber den großen wesentlich schneller wandern. Die Elektrophorese läuft unter stetiger Kühlung mit Eis in zwei Phase ab: Zunächst wird für 15 Minuten eine Spannung von 80 Volt angelegt. Infolgedessen wandern die Proteine durch das Sammelgel (neutraler pH) bis zur Trennschicht im Übergang zum Trenngel. Nun wird die Spannung für ca. 55 Minuten auf bis zu 150 Volt erhöht. Die Proteine trennen sich nun ihrer Größe nach im Trenngel auf.

2.2.3.5 Blotting

Zur Vorbereitung muss auch hier zunächst der sogenannte Blotpuffer hergestellt werden. Dieser besteht aus 0,025M Tris Ultrapur, 0,19M Glycin und 20% Methanol. Das Blotting bezeichnet das Transferverfahren, welches die im Gel zur Anode gewanderten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Proteine, deren Molekülmasse etwa 150kDa nicht überschreitet, werden durch das Trans Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) durch das semi-dry-Verfahren geblottet. Dazu werden pro Gel vier Whatman Paper und eine Nitrozellulosemembran, auf welches das Gel gelegt wird, benötigt. Der Transfer des Gels auf die Nitrozellulose erfolgt ohne Blasenbildung in Blotpuffer. Somit ergibt sich für das Blotting die Reihenfolge von zwei Whatman Paper, Nitrozellulosemembran, Gel, zwei Whatman Paper. Es wird eine Spannung von 25 Volt mit einer maximalen Stromstärke von 1 A für 30min angelegt. Die Proteine wandern nun seitlich aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran.

Für Proteine, deren Molekülmasse größer als 150kDa beträgt, wird ein Nass-Transfer-Verfahren angewendet. Hier werden die Gele mit der Nitrozellulosemembran und den vier Whatman Papern mit zwei Schwämmen in eine Blottingkammer eingespannt, welche dann mit Blotpuffer gefüllt wird. Dieses Transverfahren beruht ebenfalls auf der Proteinwanderung in Richtung der Anode und wird bei einer Stromstärke von 0,15 A über ca. 19h bei 4°C durchgeführt.

2.2.3.6 Proteinnachweis

Zur quantitativen Analyse der zu untersuchenden Proteine muss die Nitrozellulosemembran zunächst gemäß der Proteingröße geschnitten werden. Dies dient dazu, unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern sowie die Antikörper sparsam einsetzen zu können. Mit 0,1% Ponceau S in 5% Eisessig können die Proteine unspezifisch gebunden und als Banden sichtbar gemacht werden. Vor der Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem ersten Antikörper werden die unspezifischen Proteinbindungsstellen durch Roti Block® nach Semi-dry-Verfahren für eine Stunde und nach Nass-Transfer-Verfahren für vier Stunden geschwenkt. Nachfolgend soll nun der spezifische Nachweis der einzelnen Proteine erfolgen. Dazu wird der in TBST gelöste proteinspezifische Primärantikörper in einer bestimmten Verdünnung (Tabelle 6) auf die Nitrozellulosemembran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird die Nitrozellulosemembran mit TBST dreimal je 10min geschwenkt. Im Anschluss erfolgt für eine Stunde die Inkubation mit dem fluoreszierenden antikörperspezifischen Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 (Tabelle 7). Im Anschluss wird nochmals dreimal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Blots (Schnipsel der Nitrozellulosemembran) können schließlich durch das Odyssey CLx Imaging System (Li-cor Biosciences) mittels digitaler Fluoreszenz gemessen werden. Hier wird die Nah-Infrarot-Fluoreszenz der Sekundärantikörper durch zwei Laser (700nm und 800nm) gemessen. Die Quantifizierung erfolgt durch die Image Studio Software (Li-cor Biosciences), bei der die GAPDH als konsekutiv exprimiertes Gen (*housekeeping gene*) zur relativen Quantifizierung herangezogen wird.

2.2.4 Bestimmung des mRNA-Gehalts in HL-1 Zellen

Die Bestimmung der mRNA, welche für die Proteine SERCA2a und RyR2 kodiert, die unter dem Einfluss veränderten NDPK-Konzentration stehen, verläuft in folgenden Schritten.

2.2.4.1 Isolation der mRNA

Zunächst erfolgt die Isolation der Gesamt-RNA der infizierten HL-1 Zellen mit Hilfe des my-Budget RNA mini Kits nach den Angaben der Herstellerfirma Qiagen. Hierzu ist eine Reinigung der Proben nachfolgenden Schritten erforderlich: Durch das RNase free DNase Set (Qiagen) erfolgte eine Reinigung von RNA. Die verbliebende RNA wird in 70% Ethanol ausgefällt und über 2 Waschschrte weiter gereinigt. Es schließt sich eine Chromatographie an: Die RNA-Lösung stellt die stabile Phase und das RNase freie Wasser die mobile Phase (Eluent) dar. Es ergibt sich das ausreichend gereinigte Eluat. Anschließend wird im Doppelansatz die

Konzentration der Gesamt-RNA photometrisch (260 nm und 280 nm) bestimmt. Die isolierte Gesamt-RNA, kann bei -80°C gelagert werden.

2.2.4.2 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits erfolgt nun die Synthese der komplementären DNA (cDNA) aus der isolierten RNA. Gemäß der Anleitung des Kits wird der zuvor hergestellte Master Mix der cDNA-Synthese (Tabelle 12) mit 1 µl der isolierten RNA-Proben und RNase freiem Wasser versetzt (Gesamtvolumen: 20 µl).

Tabelle 12: Master Mix für cDNA-Synthese

Reagenzien	Volumen
10 x Reaktionspuffer	2 µl
25 x dNTP Mix	0,8 µl
10 x Random Primer	2 µl
MultiScribe Reverse Transkriptase	1 µl

Nun folgt die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA durch eine reverse Transkriptase im Thermocycler (PicoReal 96 Real-Time PCR System) durch ein vorgegebenes Protokoll (Tabelle 13). Es erfolgt die Lagerung der neu synthetisierten cDNA-Proben bei -20°C.

Tabelle 13: Protokoll Thermocycler: Reverse Transkription

Temperatur und Dauer	Vorgang
25°C, 10 min	Anlagerung der Primer
37°C, 120 min	cDNA-Synthese
85°C, 5 min	Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase
4°C	Abkühlung

2.2.4.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Aus der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) kann der Gehalt der für die Proteine kodierenden mRNA bestimmt werden. Die Messung erfolgt quantitativ mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs und der Amplifikation der neu synthetisierten cDNA *in vitro*. Zusätzlich zu einer normalen PCR wird diese somit durch eine *real-time* Fluoreszenzmessung des Reporterfarbstoffs ergänzt. Die TeqMan Sonde (FAM), welche als Reporter bezeichnet wird, gibt nach Lichtexposition bestimmter Wellenlänge ($\lambda = 495 \text{ nm}$) das messbare Fluoreszenzsignal ($\lambda = 520 \text{ nm}$) ab. Der Reporter bindet am 5'-Ende der zu amplifizierenden cDNA. Am 3'-Ende der cDNA bindet eine weitere nicht fluoreszierende TeqMan Sonde (NFQ), welche als Quencher bezeichnet wird. Eine Lichtexposition führt zwar zur Anregung des

Reporters, welcher aber bei weiterhin bestehender räumlicher Nähe zum Quencher die Energie an diesen abgibt. Dies wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) bezeichnet. In diesem Falle ist also kein Fluoreszenzsignal messbar. Bei Amplifikation durch die Polymerasen kommt es jedoch zur Ablösung beider Sonden und somit zur Trennung von Reporter und Quencher, sodass nun quantitativ bei Lichtexposition eine Zunahme des Fluoreszenzsignals bei fortschreitender PCR beobachtet werden kann (Abbildung 13).

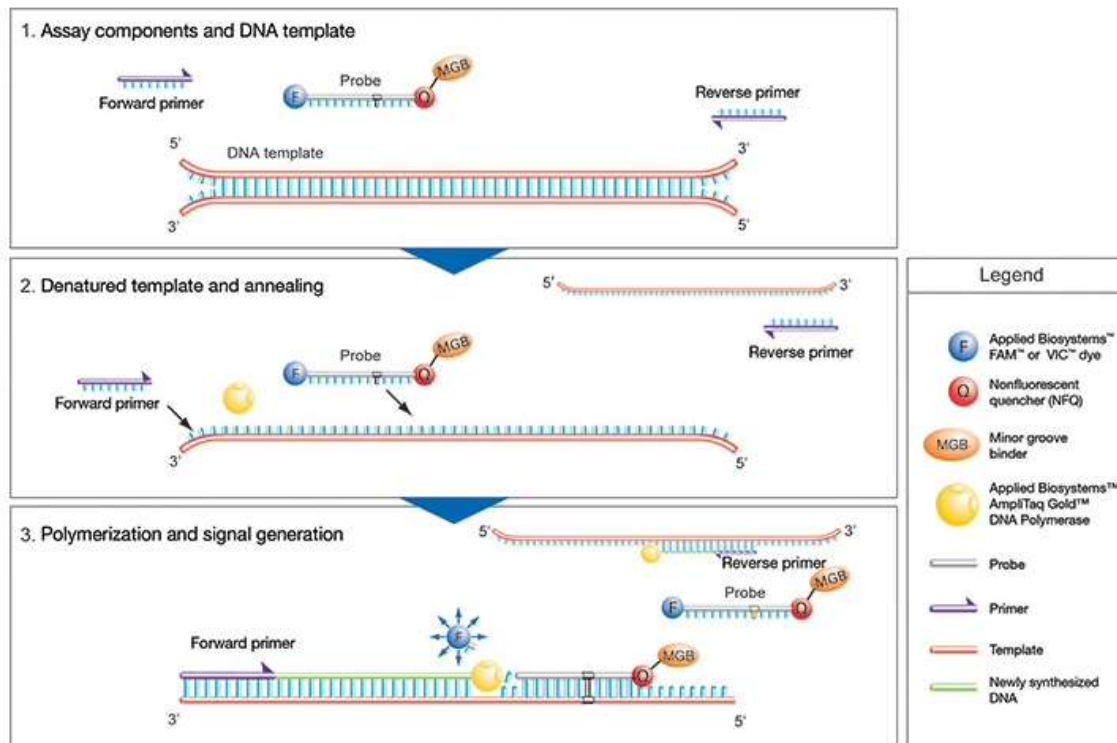


Abbildung 13: Beispielhafter Ablauf des qPCR TaqMan Genexpressionsassays

In der Durchführung der qPCR steht zu Beginn eine Verdünnung der cDNA-Proben 1:5 mit RNase-freiem Wasser. Es folgt die Verwendung des GoTaq® Probe qPCR Master Mix mit Herstellung des Taq Man Fast Advanced Master Mix (Tabelle 14) sowie der einzelnen qPCR-Ansätze (Tabelle 15).

Tabelle 14: Taq Man Fast Advanced Master Mix für qPCR

Master Mix	Zusammensetzung
	10 x Reaktionspuffer
	MgCl ₂ 0,025 M
	dNTPs 0,0025 M
	Uracil-N-Glykosylase (UNG)
	AmpliTaq Gold Polymerase 5 U/μl
	RNase-freies Wasser

Tabelle 15: PCR-Ansatz

Reagenzien	Volumen
------------	---------

cDNA (1:5)	1 μ l
Taq Man Fast Advanced Master Mix	10 μ l
Spezifischer Primer (TaqMan Probe)	1 μ l
RNase-freies Wasser	8 μ l

Anschließend werden die für die jeweiligen Proteine spezifischen Primer der Firma Thermo Scientific zugesetzt (Tabelle 16). Die Durchführung der qPCR erfolgt im Doppelansatz mit RNase-freiem Wasser als Negativkontrolle sowie nach einem festgelegten Protokoll im Thermocycler (PicoReal 96 Real-Time PCR System) (Tabelle 17).

Tabelle 16: Spezifische Primer

Protein	Gen	TaqMan Probe Assay-Kennung
Hydroxymethylbilane Synthase	HMBS	Hs00609296_g1
Beta-2-Microglobulin	B2M	Hs99999907_ml
Transkriptionsfaktor GATA4	GATA4	Hs00171403_ml
SERCA2a	Atp2a2	Mm01201431_ml
RyR2	RYR2	Mm00465877_ml

Tabelle 17: Protokoll Thermocycler: qPCR

Zyklen	Temperatur und Dauer	Vorgang
1x	50°C, 2 min	UNG-Inkubation
1x	95°C, 10 min	Initiale Denaturierung
45x	95°C, 15 sek	Denaturierung
	60°C, 45 sek	Annealing und Extension
1x	60°C, 30 sek	
1x	60°C – 95°C	Analyse
1x	20°C	Kühlen

2.2.4.4 Quantifizierung der gemessenen cDNA

Die Höhe des gemessenen Fluoreszenzsignals verhält sich zur Menge des synthetisierten Amplikons proportional und ermöglicht so Rückschlüsse auf den Gehalt von mRNA der infizierten HL-1 Zellen. Hier ist der sogenannte C_T -Wert (*cycle threshold*) entscheidend. Dieser ist definiert als der Schwellenwert-Zyklus, an dem erstmalig ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz gemessen wird. Folglich bedeutet ein kleinerer C_T -Wert das Vorliegen einer erhöhten cDNA-Konzentration in der Probe. Die Auswertung erfolgt in Form einer relativen Quantifizierung bezogen auf die Haushaltsgene (*housekeeping genes*) HBMS, B2M und GATA4. Diese Berechnung wird nach Pfaffl durchgeführt (Pfaffl et al., 2004). Folglich kann nun der durch die Virusinfektion bedingte unterschiedliche mRNA Gehalt der einzelnen Proben vergleichend ausgewertet werden.

2.2.5 Bestimmung des cAMP-Gehalts in den HL-1 Zellen

Das cAMP-Assay wird nach dem Protokoll des Direct cAMP Assay Kit (Enzo Life Science) durchgeführt. Zur Vorbereitung werden die infizierten Zellen nach regulärem Wachstum auf den *12-well-plates* für 30min mit dem Phosphodiesterasehemmer 1mM IBMX behandelt. Danach werden die Zellen mit PBS zweimalig gewaschen. Die Zelllyse erfolgt hier dann mit 200µl 0,1M HCl pro Well mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Anschließend werden die Lysate bei 600g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in Eppendorf Tubes überführt und bei 4°C gekühlt. Damit später eine Normierung des cAMP-Gehaltes im Verhältnis zur Proteinmenge möglich ist, erfolgt eine Proteinbestimmung der in den Eppendorf Tubes verbleibenden Pallets, welche dazu mit jeweils 100µl 0,1M NaOH (Natronlauge) versetzt und mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Kapitel 3.4.1 gemessen wird. Im Folgenden wird der non-acetylated Ansatz gemäß den Vorgaben des Cyclic AMP Competitiv ELISA Kits (Invitrogen) durchgeführt. Hierzu wird eine vergleichende Standardreihe von cAMP im Doppelansatz mit 200; 50; 12,5; 3,13 und 0,78pmol/ml hergestellt. Danach werden sowohl die Standards, die Lysatproben und die Blanks auf die *8-well-strips* des cAMP-Assay Kits aufgetragen. In jedes Well der Standards und der Lysatproben werden 50µl Neutralizing Reagent, 50µl cAMP-AP Conjugate (Alkine Phosphatase conjugated cAMP) und 50µl cAMP Antikörper hinzu pipettiert. Durch eine Klebefolie werden die Wells nun verschlossen und für 2h auf einem Schüttler mit 500rpm inkubiert. Die Wells waren bereits zuvor mit spezifischen Antikörpern (IgG anti-rabbit) am Boden beschichtet. Im Weiteren werden die Wells nun geleert und dreimalig mit 400µl Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurden 200µl pNpp Substratlösung und 50µl Stop-Lösung in jedes Well gegeben.

Die Bestimmung des cAMP-Gehaltes erfolgt durch die Magellan Software mit dem Tecan bei 405nm (mit Korrektur zwischen 570 und 590nm). Der cAMP-Gehalt (pmol/ml) der Proben im Verhältnis zum Proteingehalt kann somit berechnet werden.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt durch die Software GraphPad Prism Version 9.1.2. Dabei sind die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) der Proben angegeben. Vor der Auswertung wurde durch den D'Agostino & Pearson Test das Vorliegen einer Normalverteilung der Stichproben überprüft. Demnach erfolgte dann die Auswertung durch den Student's *t*-test. Bei gepaarten Proben wurde der paired Student's *t*-test verwendet. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die Auswertung durch den Wilcoxon Test bzw. Mann-Whitney

Test. In der Auswertung selbst wurden Werte mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant angegeben und mit * gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Validierung der Virusinfektion

Zur Erstellung der verschiedenen Versuchsansätze wurden die HL-1 Zellen mit den verschiedenen Adenoviren infiziert. Die Infektion mit Ad-EGFP stellt die Kontrolle zu Infektion mit Ad-NDPK-B, Ad-NDPK-C und Ad-sh-NDPK-B dar. Allen Viren ist gemein, dass sie die cDNA zur Synthese von EGFP beinhalten. Dies dient dem Nachweis der Infektion sowie der Validierung einer ausreichenden Infektionsrate. Unter der Einwirkung von blauem Licht werden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop durch die EGFP-Expression sichtbar. Es war möglich, eine Infektionsrate der HL-1 Zellen von 80-100% nach 48h Inkubationszeit zu erreichen. Zunächst wurde durch visuelle Auswertung gemäß der Menge an EGFP-Expression die Virusmenge bestimmt, bei der eine ausreichende Infektionsrate erreicht wurde, um die Effekte veränderter NDPK-Expression im Western Blot-Verfahren aufzuzeigen (Tabelle 11). Aufgrund des toxischen Effekts der Virusinfektion ist die genutzte Virusmenge nicht unbegrenzt steigerbar. Wurde eine zu hohe Virusmenge gewählt, wird nach den notwendigen nachfolgenden Reinigungsschritten eine zu geringe Proteinmenge für das Western Blot-Verfahren resultieren (Abbildung 14).

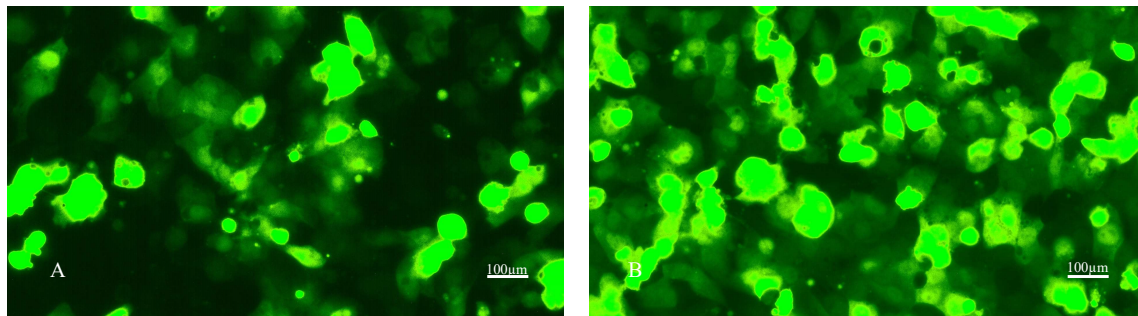


Abbildung 14: Infizierte HL-1 Zellen mit Ad-sh-NDPK-B nach 48h
Darstellung von HL-1 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop im *6-well-plate*.
A: Korrekte Menge an Virus; B: Fälschlich hohe Menge an Virus.

3.2 Proteinexpression von EGFP und NDPKs in HL-1 Zellen

Wichtig für die weitere Auswertung der nachweislichen Veränderungen in der Proteinausstattung und Transkription der virusinfizierten Zellen ist, dass keine Unterschiede der Proteinzusammensetzung zwischen nicht-infizierten Zellproben und mit Ad-EGFP infizierten Zellproben besteht. Die Einschleusung der für EGFP codierenden cDNA führt zu

keiner unerwarteten Zellreaktion in Form veränderter Proteinexpression, Transkription oder Translation, ausgenommen der Bildung von EGFP. Das Vorliegen von EGFP ist zur Kontrolle der stattgefundenen Infektion der HL-1 Zellen essenziell und erfolgt visuell durch ein Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 15 + 16).

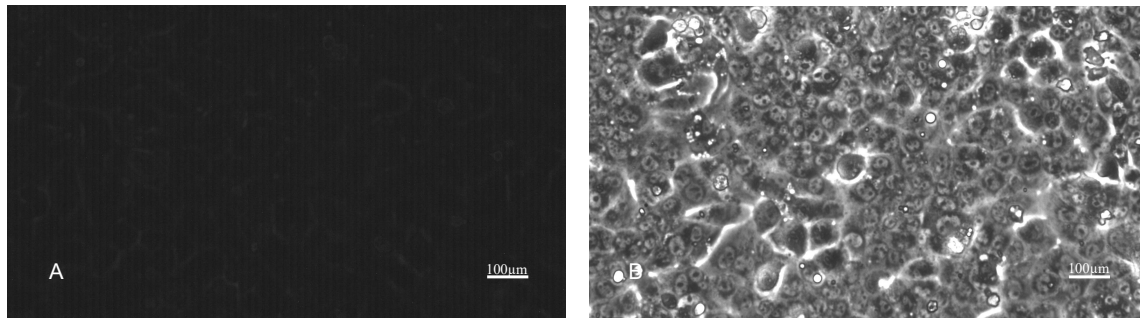


Abbildung 15: Nicht-infizierte vs. infizierte HL-1 Zellen

A: Darstellung von HL-1 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop im *6-well-plate*. Hier ist keine Fluoreszenz bei nicht-infizierten Zellen sichtbar. Die Zellen sind nur schwer erkennbar.

B: Darstellung von HL-1 Zellen unter dem Mikroskop im *6-well-plate* mit einer Infektionsrate von 80-100% mit Ad-NDPK-B. Es sind weiterhin intakte Zellverbände trotz nachweislicher Zellinfektion zu erkennen. Allerdings zeigt sich der toxische Effekt der Adenovireninfektion in Form einiger Zellablösungen und Zellschwellung. Diese Zellen werden durch den Waschvorgang abgelöst.

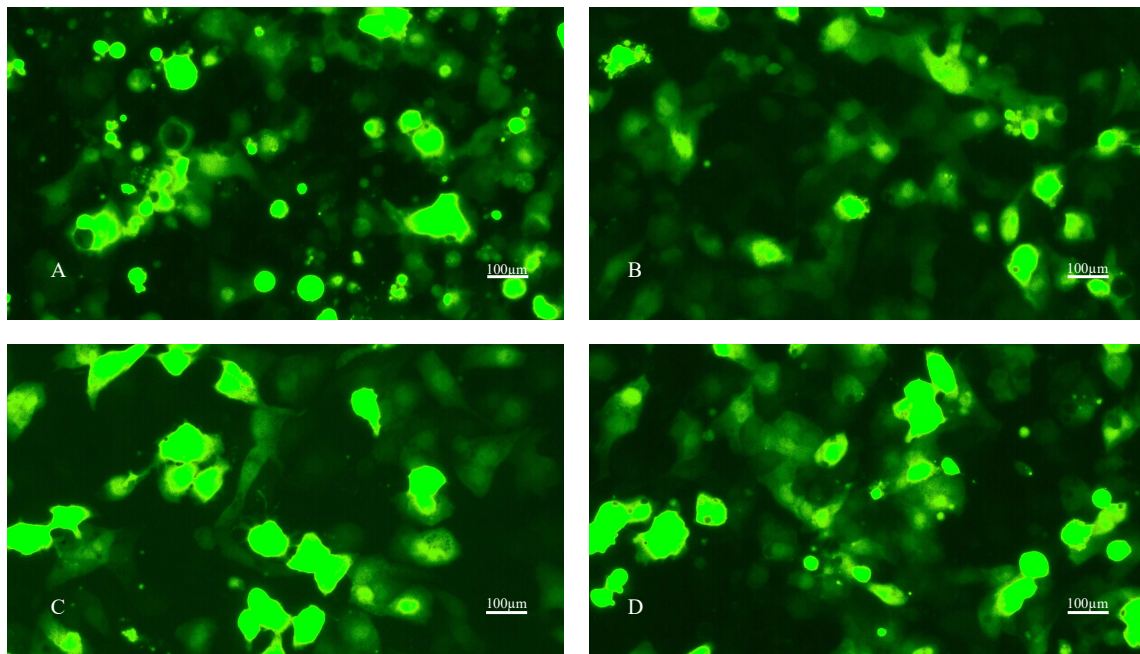


Abbildung 16: Infizierte HL-1 Zellen der verschiedenen Versuchsansätze

Darstellung von HL-1 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop im *6-well-plate* mit einer Infektionsrate von 80-100%. Gezeigt werden die verschiedenen Versuchsansätze.

A: Ad-EGFP; B: Ad-NDPK-B; C: Ad-Flag-NDPK-C; D: Ad-sh-NDPK-B

Im Hinblick auf die Untersuchung der von NDPKs beeinflusste Proteinausstattung der Zelle, ist eine Bestätigung der durch die Infektion veränderten NDPK-Proteinexpression notwendig.

Hier kann nach der Virusinfektion eine signifikant erhöhte Expression von NDPK-B sowie eine signifikant erniedrigte Expression an NDPK-B in den jeweiligen Versuchsansätzen erreicht werden (Abbildung 17). Voraussetzung hierfür ist den Nachweis von NDPK-B und NDPK-C im Western Blot. Ebenso wurde der Nachweis der im Western Blot nachgewiesenen Proteine durch die jeweiligen Erst- und Zweitantikörper etabliert, um ein einheitliches Vorgehen und valide Ergebnisse zu ermöglichen. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen der Erstantikörper und teilweise auch Antikörper unterschiedlicher Hersteller getestet, um den Nachweis der Proteinbanden zu optimieren und zu validieren (Tabelle 6).

In der Auswertung der im Western Blot bestimmten Proteinexpression der NDPKs sind folgende Ergebnisse für die einzelnen Versuchsansätze festzustellen. Es zeigt sich eine um ca. 70% erhöhte NDPK-B-Expression (EGFP: $1,000 \pm 0,047$ vs NDPK-B: $1,713 \pm 0,151$; $n=8$; $p = 0,0026$) sowie eine Erniedrigung der NDPK-B-Expression um 30% (EGFP: $1,000 \pm 0,06$ vs sh-NDPK-B: $0,7 \pm 0,064$; $n=8$; $p = 0,0075$) in den jeweiligen Versuchsansätzen.

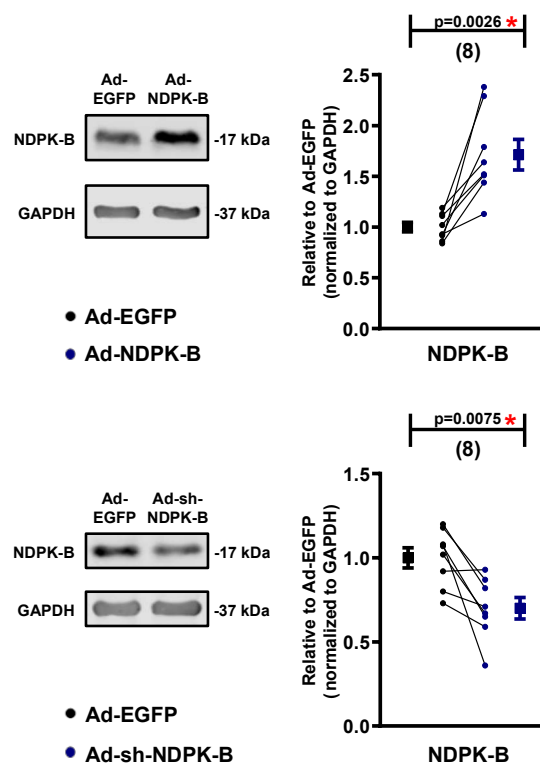


Abbildung 17: Nachweis der Virusinfektion im Western Blot nach genetisch veränderter NDPK-B-Expression

Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) und Quantifizierung der NDPK-Expression (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's *t*-Test).

Für den NDPK-C-Versuchsansatz zeigen sich im Western Blot deutlich erkennbare Banden mit Nachweis des *flag-tags* an NDPK-C, gegenüber dem Ausbleiben von Banden in den EGFP-Kontrollen (Abbildung 18).

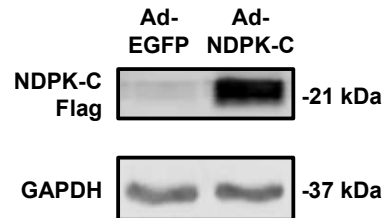


Abbildung 18: Nachweis der Virusinfektion im Western Blot mit erhöhter NDPK-C-Expression

Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) mit Nachweis des *flag-tags*, welches an NDPK-C gebunden vorliegt, und in der EGFP-Kontrolle nicht zu detektieren ist.

3.3 Einfluss der veränderten NDPK-Expression auf die Proteinexpression

Die Proteinexpressionen von RyR2, CSQ2, SERCA2a und PLB wurden nach Überexpression von NDPK-B oder NDPK-C bzw. nach Herunterregulation von NDPK-B untersucht, um mögliche Beiträge der NDPKs zur Ca^{2+} -Dysregulation der atrialen Kardiomyozyten nachzuweisen (Dobrev et al., 2011; Heijman et al., 2014).

3.3.1 Proteinexpression von RyR2

Die Darstellung der gesamten RyR2-Expression (RyR2-Total) wird im Folgenden durch die Untersuchungen der Phosphorylierungsstellen Ser2808 und Ser2814 ergänzt. Die NDPKs bedingen über einen erhöhten cAMP-Spiegel eine gesteigerte Aktivierung der PKA und der CaMKII. In 3.4 wird ebenfalls der mRNA Gehalt von RyR2 unter erhöhter NDPK-B- und NDPK-C-Expression dargestellt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine vorrangig bei pVHF diskutierte Ursache die intrinsische RyR2-Dysfunktion darstellt. Diese entsteht aus einer erhöhten Proteinexpression und einer gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit von RyR2 (Dobrev et al., 2011; Voigt et al., 2014b). Hier konnte nun für das gesamte RyR2 eine erhöhte Proteinexpression bei Überexpression von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,074$ vs NDPK-B: $2,629 \pm 0,2388$; $n=8$; $p = 0,0001$) und NDPK-C (EGFP: $1,000 \pm 0,04$ vs NDPK-C: $1,645 \pm 0,103$; $n=8$; $p = 0,0003$) und eine gegensätzlich erniedrigte Proteinexpression bei Herunterregulation von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,145$ vs sh-NDPK-B: $0,696 \pm 0,09$; $n=8$; $p = 0,0028$) gezeigt werden (Abbildung 19).

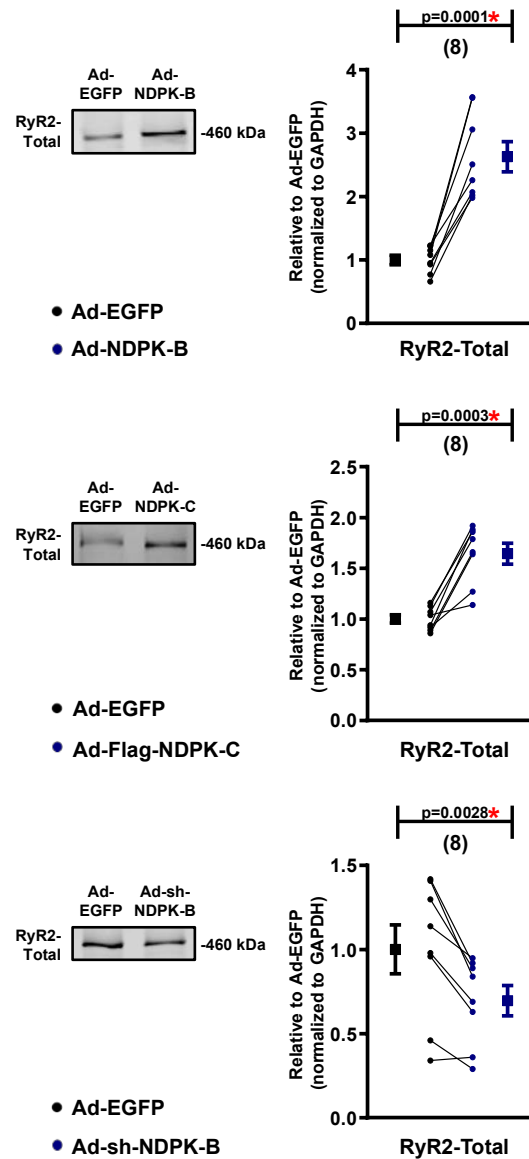


Abbildung 19: Proteinexpression der gesamten RyR2 (RyR-Total) nach genetisch veränderter NDPK-Expression

Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) und Quantifizierung der RyR2-Expression (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's t -Test).

Bezogen auf die Phosphorylierung, welche an RyR2 eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit bedingt (Vest et al., 2005; Voigt et al., 2014b; Voigt et al., 2012), zeigt sich für die Phosphorylierungsstelle Ser2808 eine erhöhte Phosphorylierung unter der Überexpression von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,079$ vs NDPK-B: $2,386 \pm 0,212$; $n=8$; $p = 0,0078$) und NDPK-C (EGFP: $1,000 \pm 0,105$ vs NDPK-C: $1,556 \pm 0,1519$; $n=8$; $p = 0,0076$) und eine erniedrigte

Phosphorylierung bei Herunterregulation von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,135$ vs sh-NDPK-B: $0,74 \pm 0,073$; $n=8$; $p = 0,0491$) (Abbildung 20).

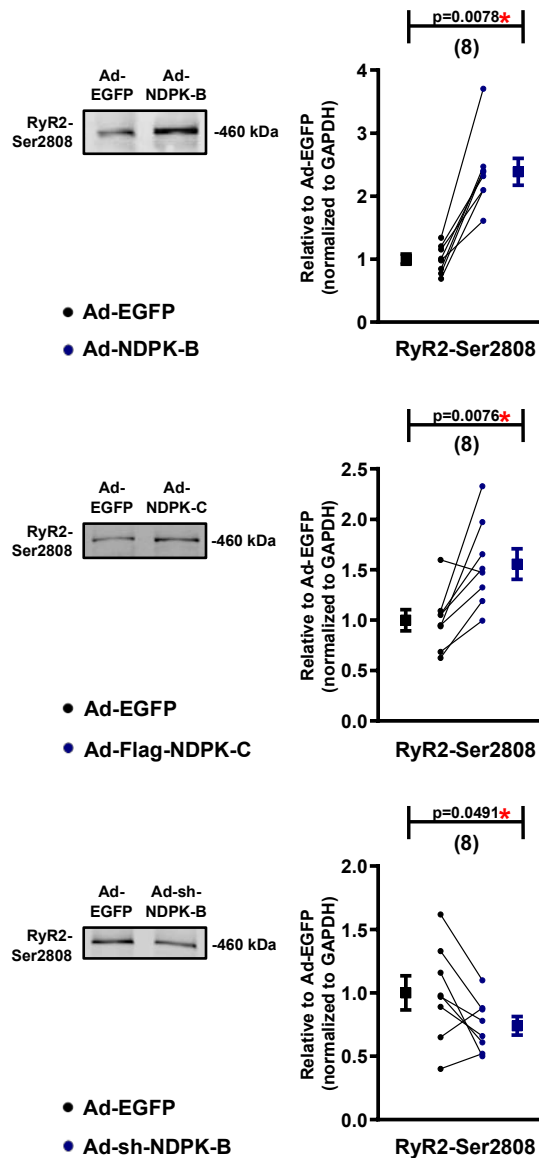


Abbildung 20: Phosphorylierung von RyR2 an Ser2808 nach genetisch veränderter NDPK-Expression
Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) und Quantifizierung der RyR2-Ser2808-Expression (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's t -Test).

Weiterhin konnte auch eine erhöhte Phosphorylierung an Ser2814 bei Überexpression von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,083$ vs NDPK-B: $2,333 \pm 0,297$; $n=8$; $p = 0,0009$), aber keine erhöhte Phosphorylierung bei Überexpression von NDPK-C (EGFP: $1,000 \pm 0,144$ vs NDPK-

C: $1,627 \pm 0,448$; $n=8$; $p = 0,1678$) nachgewiesen werden. Gegenätzlich zeigt sich auch hier eine erniedrigte Phosphorylierung bei Herunterregulation von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,148$ vs sh-NDPK-B: $0,593 \pm 0,099$; $n=8$; $p = 0,033$) (Abbildung 21).

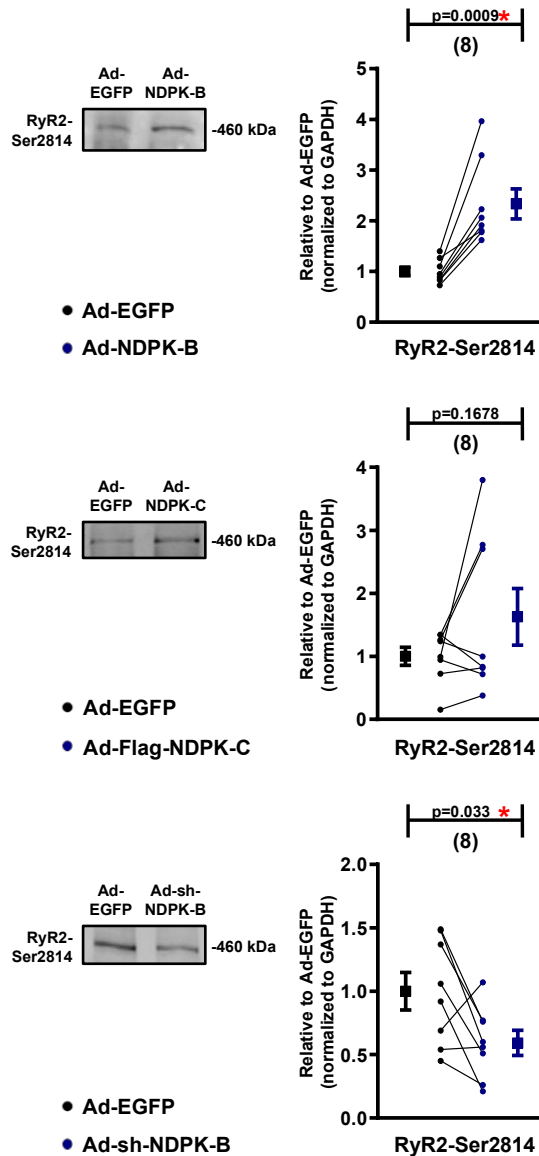


Abbildung 21: Phosphorylierung von RyR2 an Ser2814 nach genetisch veränderter NDPK-Expression
Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) und Quantifizierung der RyR2-Ser2814-Expression (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's *t*-Test).

In den zugrundeliegenden Mechanismen von DADs wird bei cVHF eine Hyperphosphorylierung von RyR2 an Ser2814 durch die CaMKII postuliert (Voigt et al., 2012).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass weder Ser2808 noch Ser2814 im Verhältnis zur gesamten RyR2-Expression eine Veränderung durch die NDPKs aufweisen (Abbildung 22).

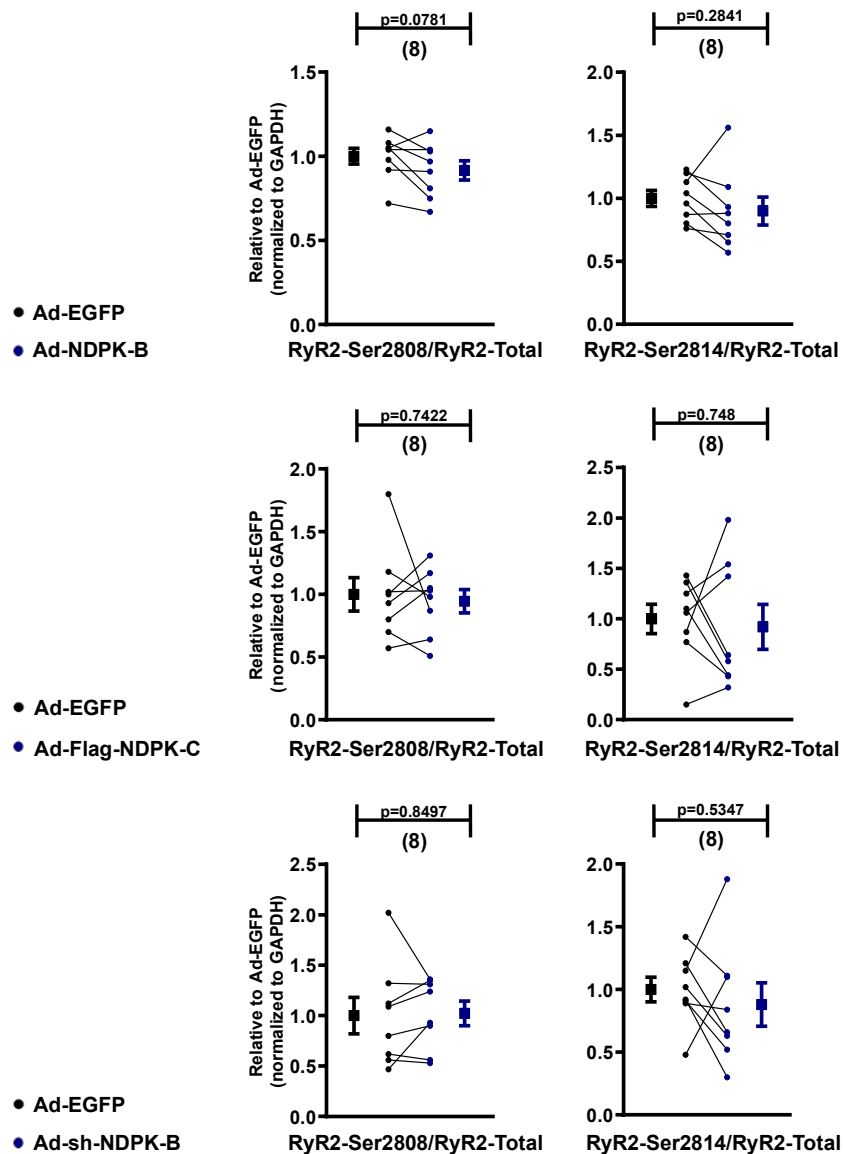


Abbildung 22: Verhältnis der beiden RyR2-Phosphorylierungen an Ser2808 und Ser2814 zur gesamten RyR2-Expression

Darstellung der Quantifizierung der RyR2-Ser2808 und RyR2-Ser2814 Phosphorylierung im Verhältnis zur gesamten RyR2-Expression. Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (Student's *t*-Test).

3.3.2 Proteinexpression von CSQ2

Die Darstellung der Proteinexpression von CSQ2 wird durch das Verhältnis der CSQ2-Expression zur gesamten RyR2-Expression ergänzt. CSQ2 moduliert die

Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 (Gyorke et al., 2004). Dabei kann sowohl eine vermehrte CSQ2- als auch eine geminderte CSQ2-Expression potenziell zu Rhythmusstörungen beitragen (Terentyev et al., 2003). Hier kann nun eine erniedrigte Proteinexpression bei Überexpression von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,067$ vs NDPK-B: $0,637 \pm 0,096$; n=6; p = 0,0024) und NDPK-C (EGFP: $1,000 \pm 0,196$ vs NDPK-C: $0,573 \pm 0,117$; n=8; p = 0,0314) beobachtet werden. Des Weiteren ist das Verhältnis von CSQ2-Expression zur gesamten RyR2-Expression sowohl bei Überexpression von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,286$ vs NDPK-B: $0,23 \pm 0,071$; n=8; p = 0,0313) als auch von NDPK-C (EGFP: $1,000 \pm 0,217$ vs NDPK-C: $0,351 \pm 0,089$; n=8; p = 0,0078) erniedrigt. Dies könnte auf eine quantitativ reduzierte Bindung von RyR2 mit CSQ2 unter NDPK-B- und NDPK-C-Einfluss hinweisen. Unter Herunterregulation von NDPK-B zeigen sich sowohl von CSQ2 selbst (EGFP: $1,000 \pm 0,093$ vs sh-NDPK-B: $0,875 \pm 0,053$; n=8; p = 0,2873) als auch im Verhältnis von CSQ2 zur gesamten RyR2-Expression (EGFP: $1,000 \pm 0,201$ vs sh-NDPK-B: $1,201 \pm 0,242$; n=8; p = 0,3828) keine Veränderungen (Abbildung 23).

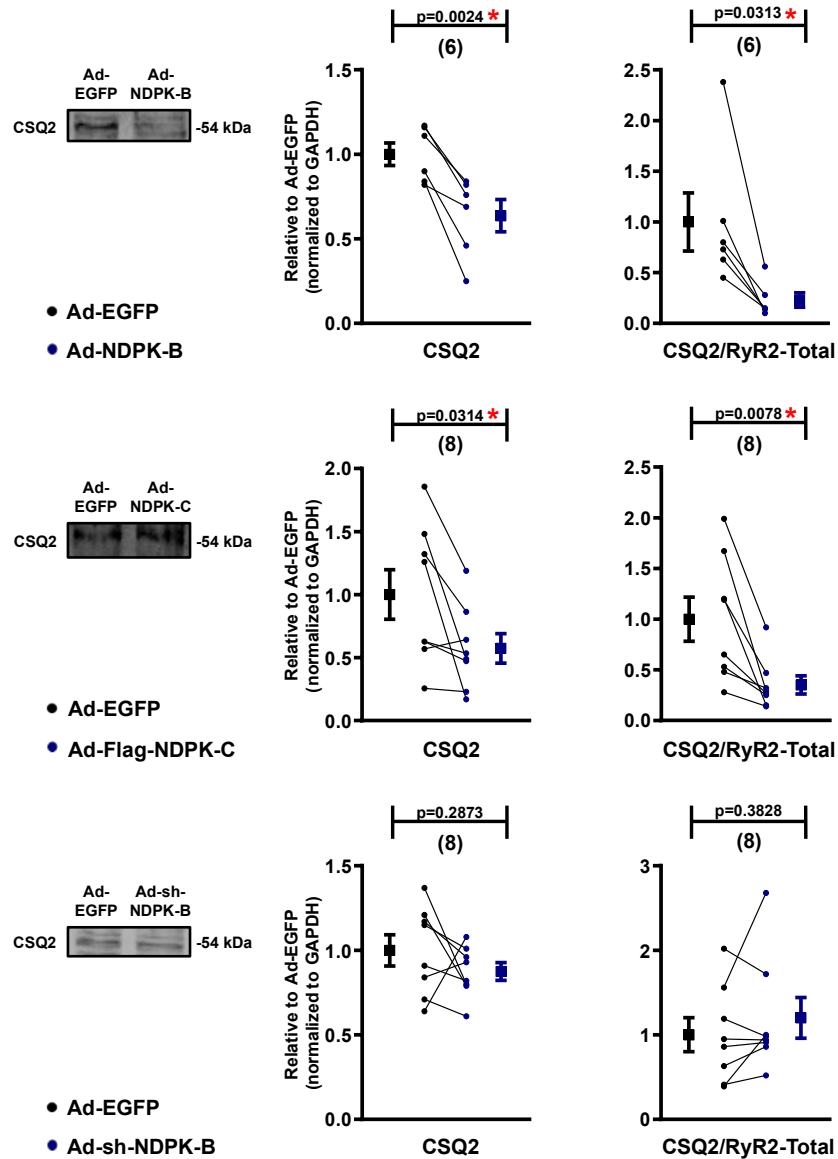


Abbildung 23: Proteinexpression von CSQ2 nach genetisch veränderter NDPK-Expression sowie das Verhältnis von CSQ2-Expression zur gesamten RyR2-Expression

Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) und Quantifizierung der CSQ2-Expression (relativ zur EGFP-Kontrolle). Ebenso wird die Quantifizierung der CSQ-Expression im Verhältnis zur gesamten RyR2-Expression der Probe dargestellt. Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's t -Test).

3.3.3 Proteinexpression von SERCA2a

Die SERCA2a transportiert Ca^{2+} unter ATP-Verbrauch aus dem Zytosol in das SR. Die Funktion der SERCA2a ist bereits bei cVHF, pVHF und poVHF untersucht worden und scheint eine mögliche Ursache der diastolischen Ca^{2+} -Dysregulation darzustellen (Heijman et al., 2020; Voigt et al., 2014b; Voigt et al., 2012). Bezüglich der Proteinexpression konnte trotz gesteigerter Funktion eine erniedrigte SERCA2a-Expression bei pVHF festgestellt werden (Voigt et al., 2014b). Folgend zeigt sich auch in dieser Arbeit eine erniedrigte Proteinexpression bei Überexpression von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,211$ vs NDPK-B: $0,313 \pm 0,028$; $n=8$; $p = 0,0156$) und NDPK-C (EGFP: $1,000 \pm 0,05$ vs NDPK-C: $0,6741 \pm 0,096$; $n=7$; $p = 0,0348$) und ebenso eine erniedrigte Proteinexpression bei Herunterregulation von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,057$ vs sh-NDPK-B: $0,7188 \pm 0,057$; $n=8$; $p = 0,0007$) (Abbildung 24). Dies weist auf mögliche noch unbekannte Einflüsse der NDPKs auf die Proteintranslation der SERCA2a hin. In 3.4 wird ebenfalls der mRNA Gehalt der SERCA2a unter erhöhter NDPK-B- und NDPK-C-Expression dargestellt.

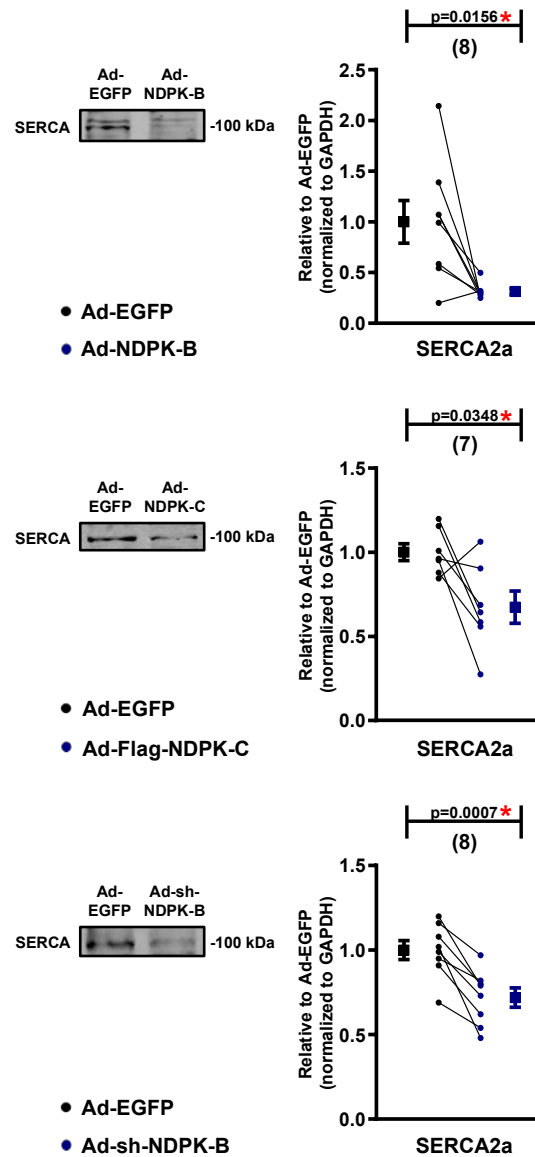


Abbildung 24: Proteinexpression der SERCA2a nach genetisch veränderter NDPK-Expression

Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) und Quantifizierung der SERCA2a-Expression (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's t -Test).

3.3.4 Proteinexpression von PLB

PLB ist ein kleines Membranprotein des SRs, welches mit der SERCA2a assoziiert ist. Dabei übt es einen hemmenden Effekt auf die SERCA2a aus. Durch Phosphorylierung kann der hemmende Effekt aufgehoben werden und es resultiert eine gesteigerte SERCA2a-Funktion (Brixius et al., 2003). Bei der Proteinexpression von PLB sind die Monomere und Pentamere getrennt zu betrachten. Auch folgt die Darstellung der untersuchten Phosphorylierungsstelle von PLB-Monomere an Ser16 und PLB-Pentamere an Thr17 sowie ebenfalls der Anteil der Phosphorylierung an der jeweiligen gesamten PLB-Expression. Es zeigte sich eine erhöhte Proteinexpression der PLB-Monomere bei Überexpression von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,125$ vs NDPK-B: $3,77 \pm 0,5521$; $n=8$; $p = 0,0017$) und NDPK-C (EGFP: $1,000 \pm 0,126$ vs NDPK-C: $3,634 \pm 0,4254$; $n=8$; $p = 0,0003$) sowie eine gegensätzlich erniedrigte Proteinexpression bei Herunterregulierung von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,079$ vs sh-NDPK-B: $0,208 \pm 0,033$; $n=8$; $p < 0,0001$). Eine veränderte PLB-Pentamer-Expression ist aber in allen Versuchsansätzen nicht zu beobachten (Abbildung 25).

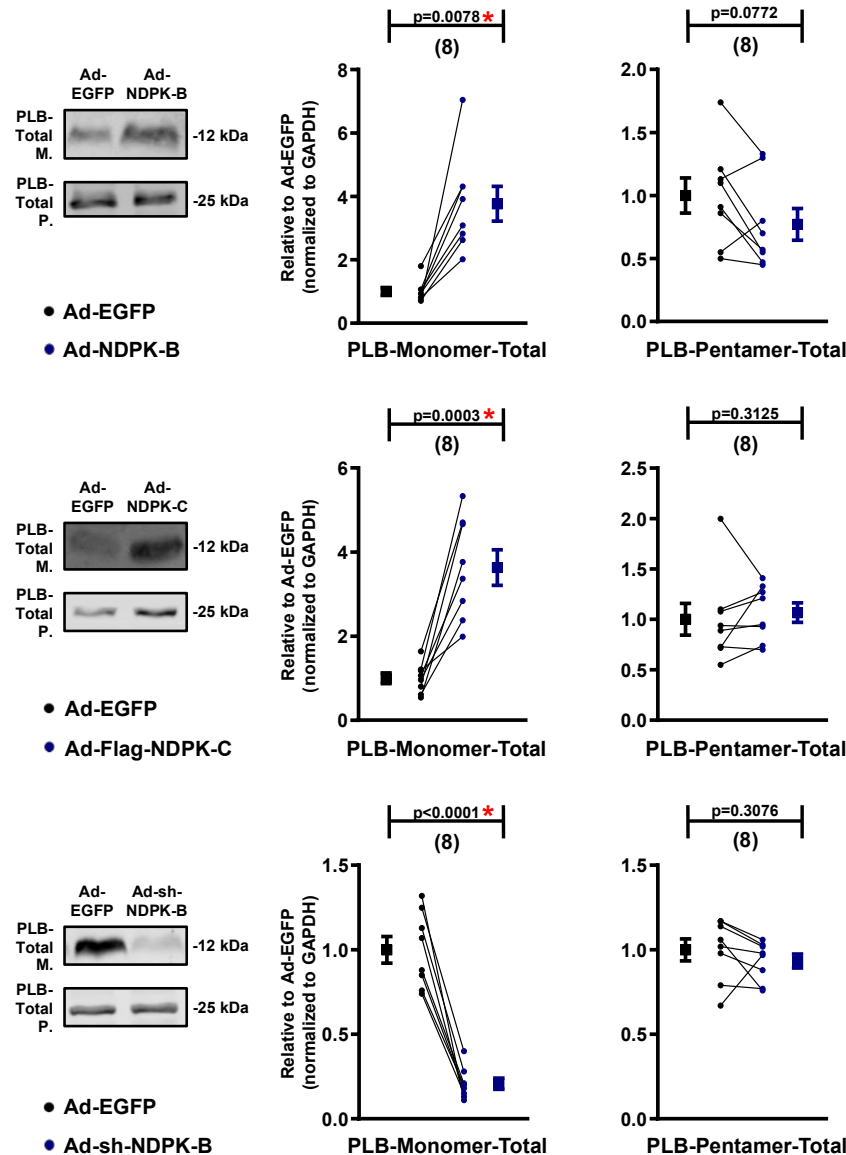


Abbildung 25: Proteinexpression von PLB-Monomeren und PLB-Pentameren nach genetisch veränderter NDPK-Expression

Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) und Quantifizierung der PLB-Monomer- und PLB-Pentamer-Expression (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's t -Test).

Des Weiteren kann eine erhöhte Phosphorylierung an Ser16 bei Überexpression von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,027$ vs NDPK-B: $2,281 \pm 0,1274$; $n=8$; $p < 0,0001$) und NDPK-C (EGFP: $1,000 \pm 0,094$ vs NDPK-C: $3,975 \pm 0,2253$; $n=8$; $p < 0,0001$) sowie eine erniedrigte Phosphorylierung bei Herunterregulation von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,043$ vs sh-NDPK-B: $0,3313 \pm 0,032$; $n=8$; $p < 0,0001$) aufgezeigt werden (Abbildung 26).

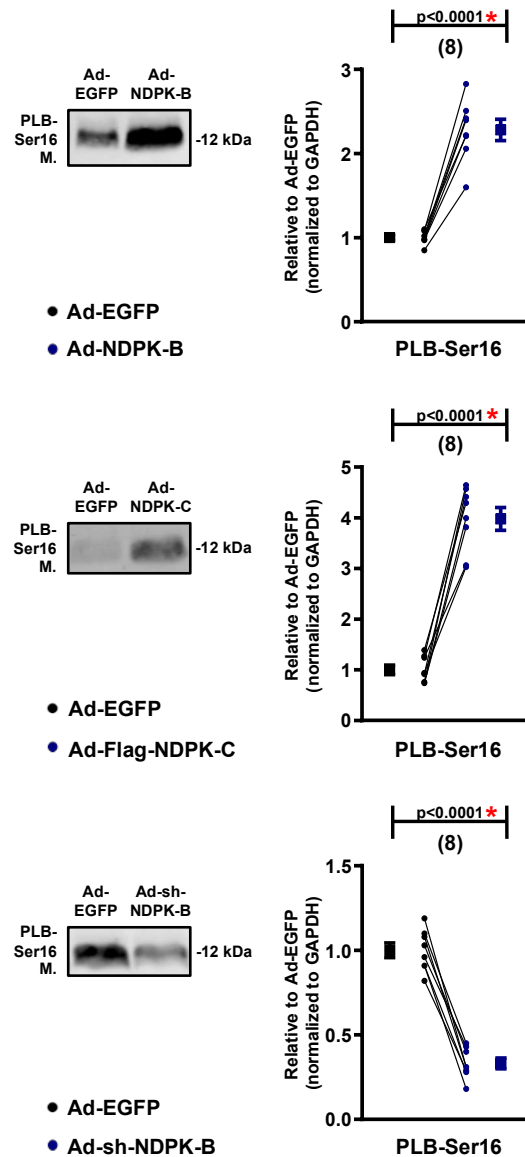


Abbildung 26: Phosphorylierung von PLB an Ser-16 nach genetisch veränderter NDPK-Expression

Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) und Quantifizierung der PLB-Ser16-Expression (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's *t*-Test)

Für die Phosphorylierung an Thr17 zeigt sich eine Erniedrigung bei Überexpression von NDPK-B (EGFP: $1,000 \pm 0,125$ vs NDPK-B: $0,719 \pm 0,092$; $n=8$; $p = 0,0391$) aber keine erniedrigte Phosphorylierung bei Überexpression von NDPK-C (EGFP: $1,000 \pm 0,2347$ vs NDPK-C: $0,619 \pm 0,12$; $n=7$; $p = 0,188$). Dagegen hatte die erniedrigte NDPK-B-Expression keinen Einfluss auf die Thr17-Phosphorylierung (EGFP: $1,000 \pm 0,095$ vs sh-NDPK-B: $0,996 \pm 0,102$; $n=7$; $p = 0,9447$) (Abbildung 27).

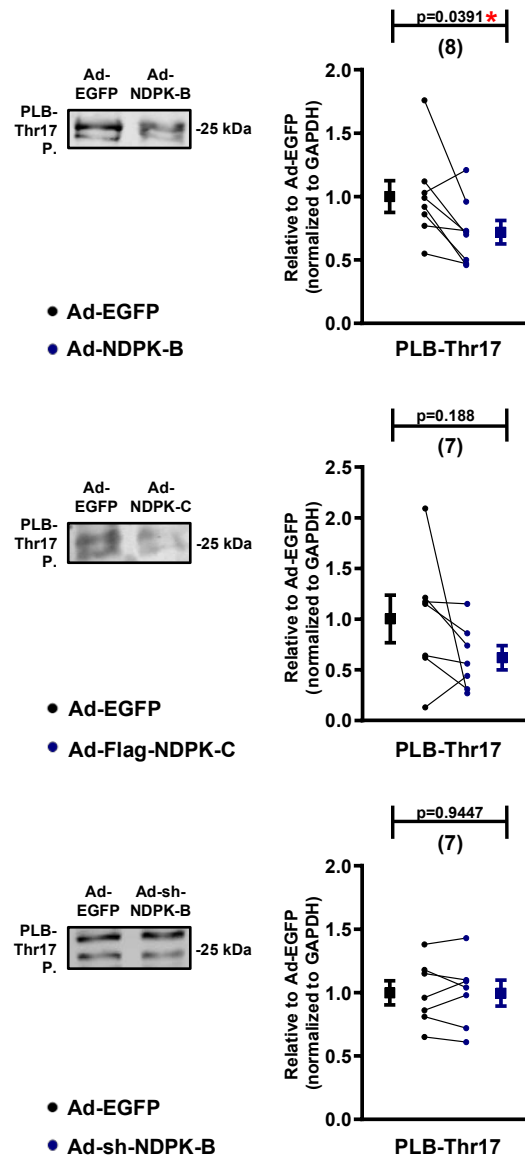


Abbildung 27: Phosphorylierung von PLB an Thr-17 nach genetisch veränderter NDPK-Expression

Darstellung repräsentativer Western Blots (normalisiert auf GAPDH) und Quantifizierung der PLB-Thr17-Expression (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's *t*-Test).

Aufgrund des erniedrigten Verhältnisses von Ser16-Phosphorylierung zu PLB-Monomer-Expression (EGFP: $1,000 \pm 0,083$ vs NDPK-B: $0,6413 \pm 0,086$; $n=8$; $p = 0,0156$) kann eine Hypophosphorylierung bei Überexpression von NDPK-B angenommen werden. Entgegengesetzt zeigt sich eine Hyperphosphorylierung bei Herunterregulation von NDPK-B-Expression durch das erhöhte Verhältnis von Ser16-Phosphorylierung zu PLB-Monomer-Expression (EGFP: $1,000 \pm 0,07$ vs sh-NDPK-B: $1,685 \pm 0,209$; $n=8$; $p = 0,0089$). Die jeweiligen Verhältnisse von PLB-Thr17-Phosphorylierung bei erhöhter oder erniedrigter

NDPK-B-Expression verbleiben unverändert. Durch die Überexpression von NDPK-C kann ein erniedrigtes Verhältnis von PLB-Thr17-Phosphorylierung zur PLB-Pentamer-Expression als Hypophosphorylierung aufgezeigt werden (EGFP: $1,000 \pm 0,17$ vs NDPK-C: $0,597 \pm 0,085$; $n=7$; $p = 0,0496$). Das Verhältnis von PLB-Ser16-Phosphorylierung zur PLB-Monomer-Expression bei Überexpression von NDPK-C ist unauffällig (Abbildung 28).

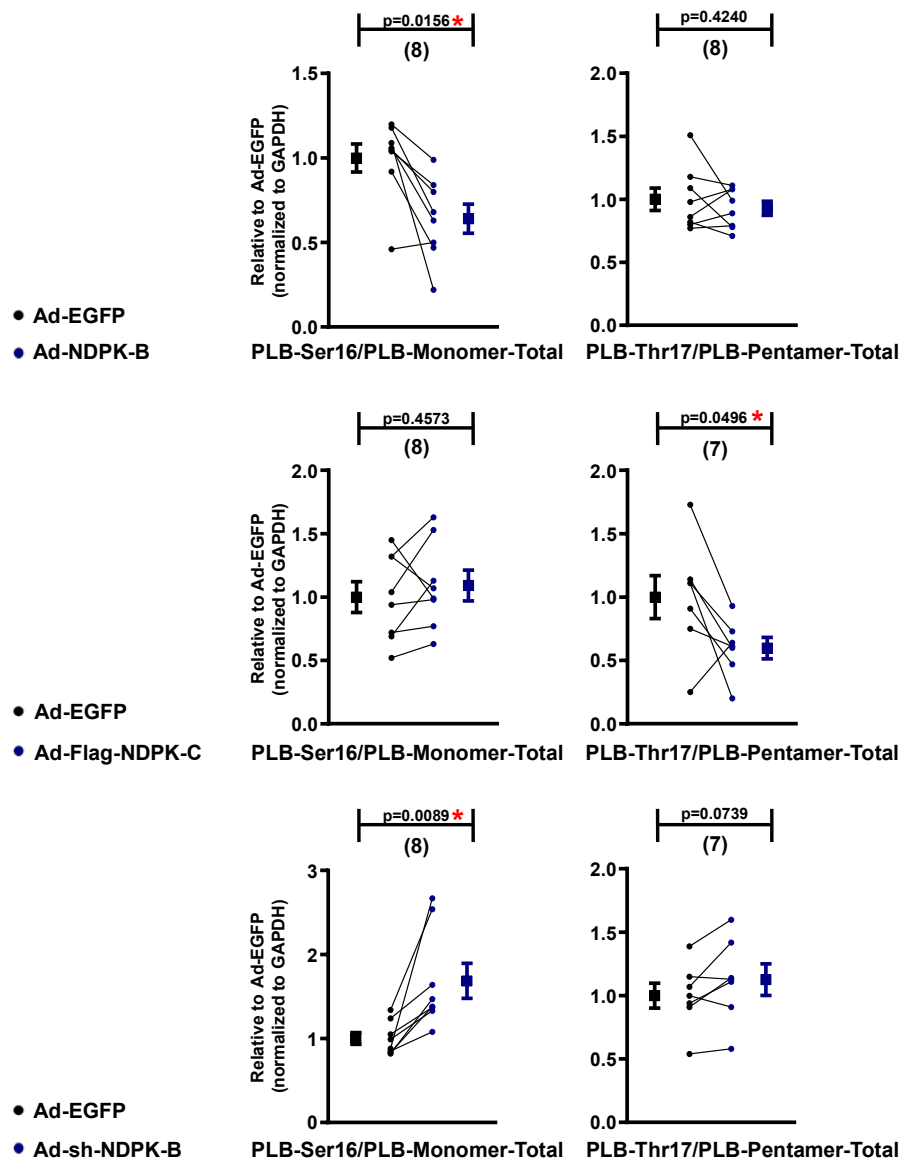


Abbildung 28: Verhältnis der beiden PLB-Phosphorylierungen an Ser-16 und Thr-17 zur PLB-Monomer- bzw. PLB-Pentamer-Expression

Darstellung der Quantifizierung der PLB-Ser16- und PLB-Thr17-Phosphorylierung im Verhältnis zur gesamten PLB-Monomer- bzw. PLB-Pentamer-Expression. Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's t -Test).

Bezogen auf die Funktion der SERCA2a lässt sich bei Überexpression von NDPK-B eine vermehrte Hemmung durch PLB diskutieren, während gegensätzlich eine gesteigerte Funktion durch die Herunterregulation von NDPK-B zu vermutet ist. Die Überexpression von NDPK-C führt wie bei Überexpression von NDPK-B in diesem Kontext zu einer möglichen Abnahme der SERCA2a-Funktion.

3.4 Einfluss der veränderten NDPK-Expression auf die Transkription

Bei Betrachtung der Transkription wurde hier der mRNA-Gehalt von RyR2 und SERCA2a bei Überexpression von NDPK-B und NDPK-C gemessen. Im Vergleich mit den Ergebnissen des Western Blots zeigt sich für RyR2 ein kongruent erhöhter mRNA-Gehalt (EGFP: $1,000 \pm 0,102$ vs NDPK-B: $1,448 \pm 0,157$; $n=8$; $p = 0,0076$) (EGFP: $1,000 \pm 0,113$ vs NDPK-C: $1,529 \pm 0,15$; $n=8$; $p = 0,0004$). Während die Proteinexpression der SERCA2a im Western Blot erniedrigt ist, zeigt sich hier ein erhöhter mRNA-Gehalt (EGFP: $1,000 \pm 0,132$ vs NDPK-B: $1,914 \pm 0,108$; $n=8$; $p = 0,0007$) (EGFP: $1,000 \pm 0,1495$ vs NDPK-C: $2,471 \pm 0,268$; $n=8$; $p < 0,268$), welcher wie auch bei RyR2 auf eine gesteigerte Transkription dieser Proteine hinweist (Abbildung 29).

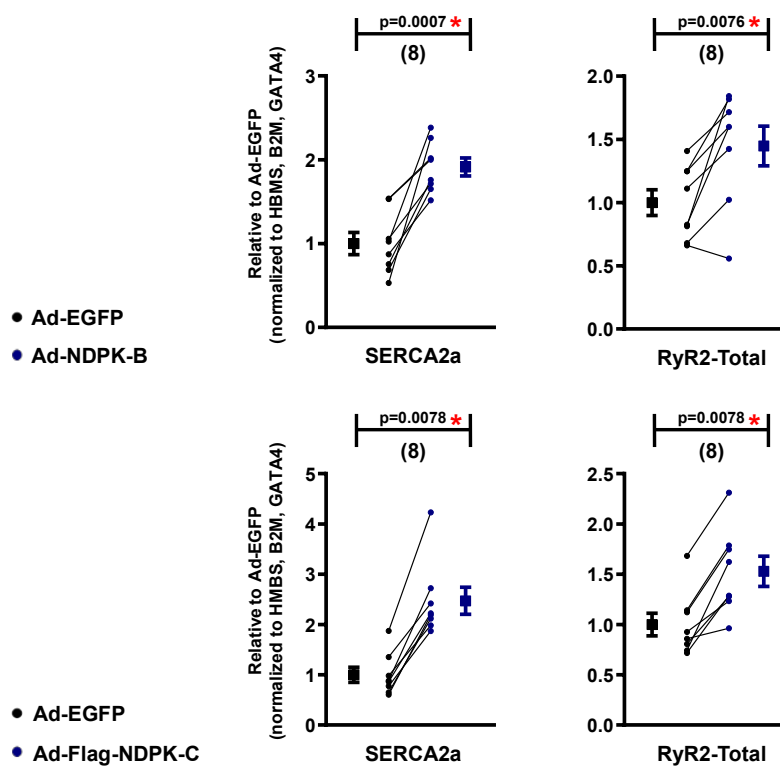


Abbildung 29: mRNA-Gehalt von SERCA2a und RyR2 nach genetisch veränderter NDPK-Expression

Darstellung der Quantifizierung (normalisiert auf HBMS, B2M und GATA4) des mRNA-Gehalts von SERCA2a und RyR2 (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's *t*-Test).

3.5 Einfluss der veränderten NDPK-Expression auf den cAMP-Gehalt

Wie bereits aus Daten unserer Arbeitsgruppe bekannt, führt sowohl eine erhöhte NDPK-B- als auch eine erhöhte NDPK-C-Expression zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehalts (Abu-Taha et al., 2018). In den auf der HL-1 Zellkultur basierenden Ergebnissen dieser Arbeit kann ein signifikant erhöhter cAMP-Gehalt bei Überexpression von NDPK-B (EGFP: $68,22 \pm 3,729$ vs NDPK-B: $94,92 \pm 8,949$; $n=7$; $p = 0,0146$) und NDPK-C (EGFP: $63,01 \pm 4,512$ vs NDPK-C: $74,73 \pm 4,279$; $n=7$; $p = 0,008$) nachgewiesen werden. Die bisherigen Kenntnisse erweiternd kann gezeigt werden, dass bereits eine um ca. 30% erniedrigte NDPK-B-Expression eine signifikante Senkung des cAMP-Gehalts in den atrialen Kardiomyozyten zur Folge hat (EGFP: $77,85 \pm 3,718$ pmol/mg vs sh-NDPK-B: $70,6 \pm 5,125$ pmol/mg; $n=6$; $p = 0,0294$).

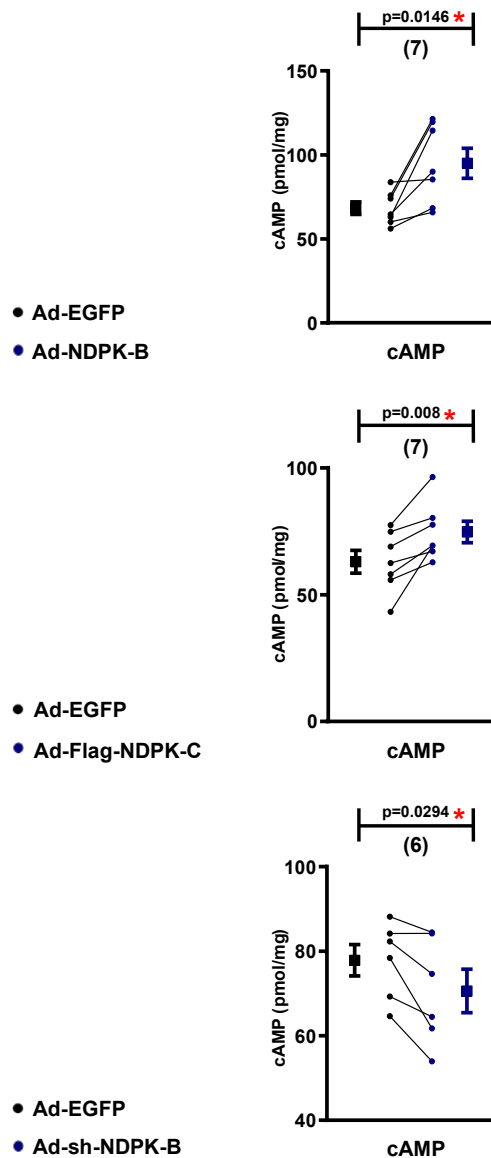


Abbildung 30: cAMP-Gehalt nach genetisch veränderter NDPK-Expression

Darstellung der Quantifizierung des cAMP-Gehalts (pmol/mg) der Proben (relativ zur EGFP-Kontrolle). Die Zahl in den Klammern entspricht der Anzahl der verglichenen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus den Proben und den jeweiligen Kontrollen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur EGFP-Kontrolle, Student's t -Test).

4 DISKUSSION

VHF ist eine progressive kardiale Rhythmusstörung, die sich auf das Vorhofmyokard bezieht, aber auch Einfluss auf die ventrikuläre Funktion nehmen kann. Sie ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung mit ansteigender Prävalenz und Inzidenz (Chugh et al., 2014). Die aktuelle Prävalenz wird mit 2-4% angegeben (Hindricks et al., 2021). Aufgrund dieser hohen aktuellen Zahlen von betroffenen Patienten, der Korrelation mit steigendem Lebensalter, der möglichen gefährlichen Folgeerkrankungen und im Hinblick auf den demografischen Wandel in der Bevölkerungsstruktur kommt VHF einer bedeutenden Volkskrankheit nahe. Demnach ist besonders die Erforschung der Grundmechanismen auf zellulärer Ebene essenziell, um die therapeutischen Möglichkeiten in der Zukunft zu ergänzen und die Bestehenden zu verbessern. NDPKs sind als Histidin-Kinasen in der Lage, den G-Proteinsignalweg rezeptorunabhängig durch direkte Phosphorylierung zu aktivieren. Hierbei erfolgt die Interaktion im Zusammenspiel von NDPK-B und NDPK-C beispielsweise an der $G\alpha_s$ -Untereinheit und bewirkt einen Anstieg des cAMP-Gehalts in Kardiomyozyten (Abu-Taha et al., 2017; Hippe et al., 2007; Wieland, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die NDPKs einen essenziellen Beitrag für die physiologische Kontraktion ventrikulärer Kardiomyozyten aufweisen. Gleichzeitig korreliert eine erhöhte NDPK-Expression mit einem erhöhten cAMP-Gehalt und einer gesteigerten Kontraktion (Abu-Taha et al., 2017). Im Kontext von cVHF zeigen Patienten einen erhöhten cAMP-Gehalt in den atrialen Kardiomyozyten und eine gesteigerte Frequenz an DADs auf. Dies könnte in einer durch cAMP vermittelten Hyperphosphorylierung der RyR2 mit konsekutiv erhöhtem Ca^{2+} -Leck aus dem SR begründet sein (Voigt et al., 2012).

Zur Untersuchung der exakten Funktion der NDPKs in atrialen Kardiomyozyten und ihrer Bedeutung bei cVHF wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Überexpression sowie eine Herunterregulation von NDPK-B und NDPK-C in atrialen Hundekardiomyozyten durchgeführt, in welchen ein proarrhythmisch erhöhter bzw. ein erniedrigter cAMP-Gehalt resultierte (Abu-Taha et al., 2018; Schaefer et al., 2016). Erweiternd zeigt diese Arbeit ebenfalls einen reduzierten cAMP-Gehalt als Folge der Herunterregulation von NDPK-B auf und stellt die damit veränderte Expression entscheidender sarkoplasmatischer Proteine in der etablierten murinen HL-1 Zellkultur dar. Durch dieses Modell, mit sowohl erhöhter als auch erniedrigter zellulärer Expression der NDPKs durch die spezifischen Viren, wird die weitere Aufdeckung der proarrhythmischen Wirkweise wie auch die Ursache der Ca^{2+} -Dysregulation mit veränderter Proteinexpression in gesunden atrialen Kardiomyozyten untersucht. Die Befunde

liefern neue Erkenntnisse bezüglich der molekularen Mechanismen von VHF und stellen die NDPKs als eine mögliche therapeutische Zielstruktur dar.

4.1 NDPKs beeinflussen den cAMP-Gehalt

In der Betrachtung des cAMP-Gehalts atrialer Kardiomyozyten konnten bereits einige Mechanismen aufgedeckt werden, welche durch eine Erhöhung des cAMP-Gehalts proarrhythmische Veränderungen in Proteinexpression und Proteinphosphorylierung bewirken. Bei Patienten mit cVHF konnte ein erhöhter cAMP-Gehalt beobachtet werden (Voigt et al., 2012). Erweiternd konnte in atrialen Kardiomyozyten von Hunden sowohl in einem VHF-simulierenden Modell mit elektrischer Stimulation der Kardiomyozyten als auch unter adenoviraler Überexpression von NDPK-B und NDPK-C ein erhöhter cAMP-Gehalt nachwiesen werden (Abu-Taha et al., 2018). Dies wurde in dieser Arbeit in atrialen Kardiomyozyten der Maus bestätigt. Es zeigte sich ein erhöhter cAMP-Gehalt um ca. 40% bei NDPK-B und um ca. 20% bei NDPK-C. Außerdem zeigte sich bei Herunterregulation von NDPK-B um ca. 30% eine Verringerung des cAMP-Gehalts um ca. 10%. Neuere unpublizierte Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe konnten einen ebenfalls verminderten cAMP-Gehalt in HL-1 Zellen bei erniedrigter NDPK-C-Expression aufzeigen. Aus diesen gegenläufigen Ergebnissen nach Über- bzw. Herunterregulation der NDPKs kann die positive Korrelation von NDPK-Expression zum cAMP-Gehalt in atrialen Kardiomyozyte nachgewiesen und bestätigt werden. Des Weiteren kann aus dieser Korrelation und der nachweislich erhöhten NDPK-Expression bei Patienten mit VHF angenommen werden, dass VHF sich selbst begünstigt: „*AF begets AF*“ (Li et al., 1999).

In der Betrachtung des gesamten G-Proteinsignalweges scheinen sich so die angenommenen Mechanismen zu bestätigen: Die NDPKs sind in der Lage die $G\alpha_s$ -Untereinheit rezeptorunabhängig zu aktivieren, die wiederum mit der AC interagiert. Genauer betrachtet ist NDPK-C als Co-Faktor für NDPK-B bei Interaktion mit dem G-Proteinen essenziell und fixiert dabei den NDPK-C/NDPK-B-Komplex mit Hilfe des Lipidankers an der Plasmamembran (Abu-Taha et al., 2017). Es kommt also zur gesteigerten Komplexbildung und Interaktion der NDPKs mit den G-Proteinen, wobei zusätzlich die $G\alpha_s$ -Untereinheit auch vermehrt exprimiert wird. Letztlich bedingt sich somit der Anstieg des cAMP-Gehalts (Abu-Taha et al., 2018). Gleichzeitig führt eine verringerte NDPK-Expression zu Reduzierung der ablaufenden Mechanismen mit Verringerung des cAMP-Gehalts. Folglich weisen die Proteintranslation und Proteinexpression, welche auch unter dem Einfluss eines veränderten cAMP-Gehalts stehen, ebenfalls gegenläufige Ergebnisse auf. Um die Rolle einer pathologischen Überexpression der

NDPKs weiter zu charakterisieren und den daraus resultierenden proarrhythmischen Effekt abzuleiten, folgt die Betrachtung der Ca^{2+} -Homöostase. Hier stellt der veränderte cAMP-Gehalt eine mechanistische Ursache dar: In Betrachtung der Proteinsynthese erfolgt die Bindung von cAMP an das *cAMP-response element binding protein* (CREB)/*CRE modulator* (CREM), über welches schließlich die Transkription verschiedener Proteine beeinflusst wird. Bereits in genetisch modifizierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Expression einer humanen kardialen Isoform von CREM die Entstehung von VHF mit Vorhofhypertrophie und Vorhofdilatation zur Folge hat (Muller et al., 2005). Dazu weist das NDPK-C-Gen eine Bindungsstelle für CREBP1 auf (Martinez et al., 1997). Für eine genauere Betrachtung dieses Mechanismus bezogen auf die hier thematisierten Proteine des SRs müssen weitere Untersuchungen erfolgen.

In Rahmen dieser Arbeit resultiert aus dem erhöhten cAMP-Gehalt bei Überexpression von NDPK-B und NDPK-C ein erhöhter mRNA-Gehalt von RyR2 und SERCA2a in den HL-1 Zellen. Vergleichend zeigt sich für RyR2 ebenfalls eine erhöhte Proteinexpression, wohingegen die Proteinexpression der SERCA2a bei Überexpression von NDPK-B und NDPK-C reduziert ist. Dies weist auf mögliche noch unbekannte Einflüsse in der Proteintranslation der SERCA2a hin, welche in nachfolgenden Arbeiten zu klären sind.

4.2 NDPKs beeinflussen die Ca^{2+} -Homöostase

Bei Ablauf des Aktionspotentials müssen die Mechanismen zur Ca^{2+} -Freisetzung als auch zum Ca^{2+} -Entzug aus dem Zytosol schnell und exakt funktionieren. Als mögliche pathologische Mechanismen dieses Systems können, bezogen auf VHF, folgende ausgemacht werden: Der in der Systole von extrazellulär einströmende Ca^{2+} -Strom bewirkt das Freisetzen des im SR gespeicherten Ca^{2+} durch den RyR2. Dieses ist zum großen Anteil an CSQ2 gebunden. In dieser Arbeit zeigt eine Überexpression von NDPK-B und NDPK-C eine erhöhte Proteinexpression von RyR2. In Kombination mit einer gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit und der Ca^{2+} -Überladung des SRs wird von einer intrinsischen RyR2-Dysfunktion gesprochen (Voigt et al., 2014b). Unter Beachtung der von cAMP vermittelten Phosphorylierung durch die PKA an Ser2808 und der CaMKII an Ser2814 an RyR2 kann die postulierte Hyperphosphorylierung im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Diese wird als mögliche Ursache von SR- Ca^{2+} -Lecks und SCAEs bei Patienten mit cVHF angenommen (Voigt et al., 2012). Nichtsdestotrotz nimmt die Phosphorylierung zu gleichem Anteil wie die Proteinexpression zu. Es zeigt sich also auch absolut mehr Phosphorylierung von RyR2, sodass der Mechanismus weiterhin über eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von RyR2 zu vermehrten SR- Ca^{2+} -Lecks und SCAEs

beitragen kann. Unter dem Einfluss verminderter NDPK-B-Expression wird keine veränderte Phosphorylierungsrate von RyR2 beobachtet. Allerdings nehmen auch hier gegenteilig zur Überexpression die Proteinexpression sowie die Phosphorylierung zu gleichen Teilen ab. Unpublizierte Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen bei verstärkter Herunterregulation von NDPK-B und NDPK-C eine Hypophosphorylierung von RyR2, was die These der potenziellen antiarrhythmischen Wirkung einer NDPK-Senkung unterstützt und die proarrhythmische Wirkung von NDPK-B und NDPK-C nochmals unterstreicht. Ob daraus folgend ein verringerter SR-Ca²⁺-Leck mit weniger SCaEs und ebenfalls ein geringeres Auftreten von DADs resultiert, sollte in weiterführenden Untersuchungen experimentell nachgewiesen werden.

Bezüglich des an RyR2 gebundenen CSQ2 zeigt sich in den HL-1 Zellen sowohl bei Überexpression von NDPK-B und NDPK-C als auch bei Herunterregulation von NDPK-B eine reduzierte CSQ2-Expression. Des Weiteren ist das Verhältnis von CSQ2 zu RyR2 bei Überexpression von NDPK-B und NDPK-C erniedrigt. Dabei ist zu beachten, dass CSQ2 zwar die Offenwahrscheinlichkeit von RyR2 erhöht und so in dem Prozess einer RyR2-Dysfunktion mitwirken könnte, allerdings nicht das gesamte CSQ2 des SRs auch an RyR2 gebunden ist (Wei et al., 2009). Inwieweit das an RyR2 gebundene CSQ2 verändert ist, muss in nachfolgenden Studien überprüft werden. Dennoch wurde bereits eine verminderte CSQ2-Expression als proarrhythmische Ursache von ventrikulären Arrhythmien postuliert (Terentyev et al., 2003) und eine relative CSQ2-Verarmung der RyR2-Kanäle bei Patienten mit pVHF nachgewiesen (Beavers et al., 2013).

Im Rahmen der Ca²⁺-Homöostase dient SERCA2a als eine Schlüsselstelle für den Entzug des zytosolischen Ca²⁺ und damit der Beendigung des Querbrückenzyklusses. Da SERCA2a physiologisch den größten Anteil der diastolischen Ca²⁺-Verschiebung ausmacht (Bers, 2000), kann eine veränderte Funktion große Auswirkungen auf den Ca²⁺-Gehalt bewirken. Im Bezug zur Ca²⁺-Dysregulation weist SERCA2a eine verringerte Funktion bei cVHF auf (Voigt et al., 2012). Ebenfalls ist auch eine verminderte Proteinexpression erweiternd denkbar. Dies verschiebt den Ca²⁺-Entzug des Zytosols auf die weiteren Ca²⁺-Transporter. Hier ist besonders der elektrogene NCX1 an der Plasmamembran zu nennen, welcher nun vermehrt ein Ca²⁺-Ion gegen drei Na⁺-Ionen tauscht und so eine Depolarisation bewirkt. Dies stellt bei Überschreiten des Schwellenpotentials mit Auftreten von getriggerten Aktionspotentialen einen bekannten Pathomechanismus von VHF dar (Dobrev et al., 2011). In dieser Arbeit zeigt sich eine reduzierte Proteinexpression der SERCA2a sowohl bei Überexpression von NDPK-B und NDPK-C als auch bei Herunterregulation von NDPK-B. Auch sind Veränderungen in der

Proteinexpression der SERCA2a-Regulatoren wie Sarcolipin und PLB denkbar, welche eine verringerte Funktion der SERCA2a bedingen. In Betrachtung der Proteintranskription zeigt sich in dieser Arbeit bei Überexpression von NDPK-B und NDPK-C ein gegenläufig erhöhter mRNA-Gehalt der SERCA2a. Daher müssen, bedingt durch die Überexpression von NDPK-B und NDPK-C, weitere regulatorische Mechanismen existieren, welche nach gesteigerter Transkription die Translation der SERCA2a hemmend beeinflussen. Der mRNA-Gehalt der SERCA2a sollte bei Herunterregulation von NDPK-B ebenfalls untersucht werden. Dies zeigt weiterhin auf, dass die unphysiologische Überexpression der NDPKs eine Vielzahl von Einflüssen und möglichen Interaktionen mit noch unbekanntem Proteinen zeigt und so eine Herunterregulation der NDPKs zur mechanistischen Abklärung ihrer Funktionen notwendig ist. Zum anderen wird als mechanistische Ursache des SR- Ca^{2+} -Lecks eine erhöhte Ca^{2+} -Überladung des SRs postuliert, welche auf einer gesteigerten Funktion der übrigen SERCA2a basiert. In der Regulation der SERCA2a ist auf die beobachteten Veränderungen von PLB hinzuweisen. Die hemmende Wirkung von PLB auf die SERCA2a wird durch die inaktivierende Phosphorylierung von PLB an Ser16 durch die PKA und Thr17 durch die CaMKII aufgehoben. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hyperphosphorylierung von PLB zu einer gesteigerten Ca^{2+} -Überladung des SRs mit resultierendem gesteigertem SR- Ca^{2+} -Leck in Kardiomyozyten führen könnte (El-Armouche et al., 2006). Dies zeigte sich auch in den Untersuchungen zu Patienten mit pVHF (Voigt et al., 2014b). In dieser Arbeit kommt es jedoch nach Überexpression von NDPK-B zu einer Hypophosphorylierung von PLB an Ser16. Entgegengesetzt zeigte sich für eine Herunterregulation von NDPK-B eine Hyperphosphorylierung. Eine Überexpression von NDPK-C zeigte keine Veränderungen bei PLB-Ser16, wobei eine Hypophosphorylierung von PLB an Thr17 festgestellt wurde. Bezogen auf die Pathophysiologie von VHF wird durch die Hypophosphorylierung von PLB die Funktion der SERCA2a gehemmt, sodass mehr Ca^{2+} als Substrat für den NCX1 verbleibt und so das Auftreten von getriggerten Aktionspotentialen in der Diastole begünstigt werden könnte. Anders würde eine Hyperphosphorylierung in diesem Kontext für eine reduzierte Hemmung der SERCA2a sprechen, sodass weniger Ca^{2+} über den NCX1 transportiert wird. Dies steht allerdings in der gegenteiligen Annahme der VHF begünstigenden Hyperphosphorylierung von PLB mit erhöhter Ca^{2+} -Überladung des SRs und konsekutiv erhöhtem SR- Ca^{2+} -Leck (El-Armouche et al., 2006; Voigt et al., 2012). Ergänzend für die durch Überexpression von NDPK-B und NDPK-C festgestellte Hypophosphorylierung von PLB ist ebenfalls eine erhöhte Funktion der Protein-Phosphatasen Typ-1 und Typ-2 (PPs) denkbar (Heijman et al., 2014). Diese Hypothese sollte in nachfolgenden Untersuchungen überprüft werden.

Der erhöhte cAMP-Gehalt und die resultierenden Mechanismen der Ca^{2+} -Dysregulation zeigen die proarrhythmische Wirkung einer erhöhten NDPK-Expression auf. So bedingt diese eine gesteigerte Kontraktion mit erhöhten Ca^{2+} -Transienten in Kardiomyozyten (Abu-Taha et al., 2018). Gegensätzlich zeigt der Knockdown von NDPK-B und NDPK-C in Zebrafischen und Mäusen eine Abnahme der Kontraktion der Kardiomyozyten (Abu-Taha et al., 2017; Hippe et al., 2009). Durch die in dieser Arbeit festgestellte Abnahme des cAMP-Gehalts bei Herunterregulation von NDPK-B mit verringerter Proteinexpression von RyR2 und SERCA2a sollte auch ein potenziell antiarrhythmischer Effekt einer reduzierten NDPK-B-Expression diskutiert werden. So könnte eine pharmakologisch induzierte Reduktion von NDPK-B und NDPK-C zur Behandlung von VHF in Betracht gezogen werden.

Des Weiteren sind bei Überexpression von NDPK-B und NDPK-C erhöhte Frequenzen von SCAEs mit zusätzlich verringerter Latenz und ein vergrößertes SR- Ca^{2+} -Leck zu beobachten (Abu-Taha et al., 2018). Es zeigte sich ein vermehrtes Auftreten von DADs, welches ebenfalls vermehrt getriggerte Aktionspotentiale bedingt. Aus diesen resultieren dann Zentren ektopter Aktivität, welche sowohl das Auslösen als auch das Aufrechterhalten von VHF bedingen. Dennoch sind NDPKs in physiologischer Expression aufgrund der vielfältigen Interaktionen für viele Signalabläufe in der Zelle essenziell (Abu-Taha et al., 2018; Heijman et al., 2014).

4.3 Klinische Relevanz der Arbeit

Gemäß der aktuellen Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) von 2020 erfolgt die Behandlung von VHF nach dem ABC-Schema. Dieses besteht aus einer Antikoagulation (A), einem verbesserten Symptommanagement (B) und der Optimierung des Herz-Kreislauf-Systems und der Komorbiditäten (C). In der Behandlung der Rhythmusstörung VHF werden aktuell zwei Therapieansätze unterschieden. Zum einen kann in der Regel bei pVHF oder persistentem VHF, dieses durch eine elektrische oder pharmakologische Kardioversion zurück in den Sinusrhythmus überführt werden. Zum anderen erfolgt meist bei langanhaltendem oder permanentem VHF unter Inkaufnahme der Rhythmusstörung selbst nur eine Therapie der assoziierten Symptomatik (Hindricks et al., 2021). In der symptomatischen Therapie von VHF spielen vor allem β -Blocker wie Metoprolol und Bisoprolol, Calcium-Kanal-Blocker wie Verapamil und Diltiazem, Herzglykoside wie Digoxin und Digitoxin und Natrium-Kanal-Blocker wie Amiodaron eine entscheidende Rolle. Zur medikamentösen Konversion von VHF in einen Sinusrhythmus können die Antiarrhythmika genutzt werden. Zu nennen sind insbesondere Flecainid, Propafenon, Vernakalant und Amiodaron, welche allerdings nur mit begrenztem Erfolg zur dauerhafte Kardioversion beitragen und zum andern mit einem erhöhten

Risiko von ventrikulären Rhythmusstörungen einhergehen. Demnach ist die Entwicklung von neuen Medikamenten mit neuen therapeutischen Ansatzpunkten essenziell (Dobrev & Nattel, 2010).

Die Behandlungen, welche VHF nicht-medikamentös dauerhaft zu therapieren versuchen, stellen die katheterbasierten minimalinvasiven Verfahren wie beispielsweise die Pulmonalvenenisolation dar. Hier werden die oft von den Pulmonalvenen ausgehenden Trigger isoliert (abladiert). Dies führt in vielen Fällen zu einem dauerhaft vorliegenden Sinusrhythmus ohne erneute Vorhofflimmerepisoden.

In der Betrachtung des in dieser Arbeit thematisierten G-Protein-Signalwegs wurde zumeist der GPCR als pharmakologisches Ziel ausgemacht. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass die G-Proteine zum einen ubiquitär vorkommen und zum anderen keine extrazellulären Domänen aufweisen. Im Vergleich bieten die GPCRs den Vorteil, dass sie differenziert auf unterschiedlichen Zellen exprimiert werden. So ist beispielsweise eine gezielte Pharmakotherapie an den Kardiomyozyten möglich. Bei kardiovaskulären Erkrankungen stellen deshalb die β -Blocker, ACE-Hemmer und AT_1R -Antagonisten in der Therapie von Herzinsuffizienz, Hypertonie und VHF wichtige therapeutische Säulen dar (Heijman et al., 2016).

Bezüglich der in dieser Arbeit ebenfalls festgestellten veränderten Phosphorylierungen von RyR2 werden bei cVHF Inhibitoren der CaMKII diskutiert, welche womöglich den spontanen diastolischen SR- Ca^{2+} -Leck, bedingt durch die RyR2-Dysfunktion, reduzieren könnten (Voigt et al., 2012). In Betrachtung von pVHF ist allerdings eine Inhibition der SERCA2a von größerer Bedeutung, um den ursächlichen Effekt der Ca^{2+} -Überladung des SRs anzugehen (Voigt et al., 2014a).

Durch die Feststellung der Beeinflussung von cAMP-Gehalt und Ca^{2+} -Homöostase durch die NDPKs stellen diese einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt dar, da sie sowohl die Proteinausstattung als auch die Proteinphosphorylierung in der Zelle beeinflussen. Hier ist bei verringerter NDPK-Expression über den reduzierten cAMP-Gehalt das seltenere Auftreten von spontanen SR- Ca^{2+} -Lecks mit SCaEs sowie DADs mit letztlich Verhinderung von ektopter Aktivität denkbar. Nichtsdestotrotz kann eine alleinige Reduktion von NDPKs nicht das Ziel einer möglichen pharmakologischen Behandlung darstellen. Zum einen sind NDPKs auch potenziell in der Lage mit weiteren noch unbekannt Proteinen zu interagieren, zum anderen sind sie grundsätzlich in zahlreichen Signalwege von physiologischer Bedeutung. Dies erfordert also weitere Untersuchungen bezüglich noch unbekannter Proteininteraktionen und deren Auswirkungen. Schließlich konnte auch gezeigt werden, dass ein Knockdown von

NDPK-B zu einer Abnahme der Kontraktilität der ventrikulären Kardiomyozyte führt (Hippe et al., 2009), welches wiederum kein therapeutisches Ziel darstellt. Ergänzend muss das ubiquitäre Vorkommen der NDPKs und das Fehlen einer extrazellulären Domäne angeführt werden, welches die Pharmakokinetik verkompliziert. Potenzielle Inhibitoren müssten also über eine lokale, beispielsweise katheterunterstützte, Applikation in das Vorhofmyokard gelangen können.

Die NDPKs als mögliche therapeutische Ansatzpunkte müssen also weiter diskutiert und schließlich auch in klinischen Studien überprüft werden.

4.4 Limitationen der Arbeit

Mit der Nutzung der HL-1 Zellkultur wurde ein gut etabliertes Modell für atriale Kardiomyozyten verwendet. Hier lässt sich ohne den Einfluss von extrazellulärem Gewebe und Fibroblasten, welchen eine große Bedeutung in Bezug auf die Pathomechanismen von VHF zukommt (Nattel, 2017), also in Abwesenheit strukturellen Remodelings, die Proteinausstattung der Zellen untersuchen. Ebenso kann eine ausreichende Menge an Probenmaterial für aussagekräftige Ergebnisse gewonnen werden. Des Weiteren ist es möglich nahezu jeder Zelle die genetischen Informationen über die NDPK-Expression mit Hilfe von Adenoviren zu applizieren. Auch kann eine EGFP-positive Kontrolle zu den einzelnen Versuchsansätzen erzeugt werden, sodass die Effekte der Virusinfektion selbst in die Ergebnisse vermindert einfließen. Problematisch ist der zytotoxische Effekt durch die Virusinfektion, der besonders im Ad-sh-NDPK-B-Ansatz eine Schwierigkeit darstellt. Durch die Infektion mit den Adenoviren waren einige Zellen, welche unter dem Einfluss der shRNA die entsprechenden Proteine im Vergleich zur Kontrolle unterschiedlich exprimierten, in Lyse gegangen. Zeitgleich teilten sich noch nicht infizierte Zellen mit normaler Proteinausstattung weiter. Dadurch bedingt konnte die NDPK-B-Expression trotz maximal erhöhter Virusmenge um lediglich 30% gesenkt werden. In nachfolgenden noch unpublizierten Daten unserer Arbeitsgruppe mit einem neuen effektiveren Ad-sh-NDPK-B Virus, konnte die NDPK-B-Expression um ca. 70% reduziert werden. Des Weiteren stellt der Ad-sh-NDPK-B Virus eine Besonderheit dar, da die shRNA gegen die mRNA einer Ratte gerichtet ist. Möglicherweise könnte dies Ergebnisse mit größeren Veränderungen vermuten lassen. Weiterhin sind die HL-1 Zellen immortalisierte Zellen, sodass diese Eigenschaft möglicherweise Auswirkungen auf die Ergebnisse nehmen könnte. Auch handelt es sich um eine murine Zelllinie, welche zwar nachweislich mit adulten Kardiomyozyten einer Maus verglichen werden kann (Lanson et al., 1992), doch ist die Übertragung der Ergebnisse auf humane Kardiomyozyten dennoch nur

bedingt möglich. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse sollte also in humanen Zellproben überprüft werden.

4.5 Schlussfolgerung

Diese Arbeit klärt die mechanistischen Vorgänge einer veränderten NDPK-Expression in Bezug auf die Ca^{2+} -Dysregulation auf und kann im Besonderen durch die Einflüsse einer Herunterregulation von NDPK-B die Korrelation von NDPK-Expression zum cAMP-Gehalt in den atrialen Kardiomyozyten validieren. Erweiternd wurde der Zusammenhang einer erhöhten oder reduzierten NDPK-Expression mit einer veränderten Proteinexpression und Proteinphosphorylierung der Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums erklärt. Diese Veränderungen können als Ursachen der Entstehung von DADs und getriggerten Aktionspotentialen angesehen werden. Letztlich können die Erkenntnisse aus dieser Arbeit der zukünftigen pharmakologischen Behandlung von VHF dienen und zur Entwicklung neuer Antiarrhythmika beitragen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die über den veränderten zyklischen Adenosinmonophosphat-Gehalt (cAMP) proarrhythmische Wirkung der Nukleosiddiphosphat-Kinasen (NDPKs) untersucht. Durch eine Herunterregulation von Nukleosiddiphosphat-Kinasen-B und -C (NDPK-B, NDPK-C) resultierte auch eine Abnahme des cAMP-Gehalts. Es wurde weiterhin der Grundmechanismus des atrialen Remodelings bezüglich der Calcium (Ca^{2+})-Dysregulation weiter aufgeklärt. Hier zeigte sich eine durch die NDPKs bedingte proarrhythmisch veränderte Proteinausstattung: Die Zunahme der Ryanodin-Rezeptor-Kanäle Typ-2-Expression (RyR2) sowie die absolut erhöhte Phosphorylierung von RyR2 könnten die intrinsische RyR2-Dysfunktion mit einer gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit verstärken. So würden sowohl ein erhöhtes Ca^{2+} -Leck des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) als auch vermehrte *spontaneous SR Ca^{2+} -release events* (SCaEs) resultieren, welche späte Nachdepolarisationen (DADs) und über getriggerte Aktionspotentiale ektope Aktivität auslösen. Des Weiteren zeigte sich bei Überexpression von NDPK-B und NDPK-C eine verminderte SR- Ca^{2+} -ATPase 2a-Expression (SERCA2a) mit einer gleichzeitigen Hypophosphorylierung von Phospholamban (PLB). Dies könnte den elektrogenen Ca^{2+} -Strom über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher Typ-1 (NCX1) an der Plasmamembran verstärken, was wiederum einen depolarisierenden Na^+ -Strom zur Folge hätte und so eine diastolisch verfrühte Potentialzunahme mit möglichem Überschreiten des Schwellenpotentials bedingen könnte. Obwohl dieser beschriebene Mechanismus in Gegensatz zu dem postulierten spontanen SR- Ca^{2+} -Leck, welches durch eine enthemmte SERCA2a-Funktion mit nachfolgender Ca^{2+} -Überladung des SRs und so erhöhtem Ca^{2+} -Leck-Strom durch die RyR2 charakterisiert ist, steht, könnten doch beide Mechanismen zu einer proarrhythmischen diastolischen Zunahme des zellulären Potentials führen.

Abschließend stellt diese Arbeit neue Erkenntnisse über die proarrhythmische Wirkung von NDPKs und deren Einfluss auf die Ca^{2+} -Dysregulation im Kontext der Pathophysiologie von Vorhofflimmern (VHF) dar. Diese positionieren die NDPKs als eine mögliche therapeutische Zielstruktur einer pharmakologischen Behandlung von VHF.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abu-Taha, I. H., Heijman, J., Feng, Y., Vettel, C., Dobrev, D., Wieland, T. (2018): Regulation of heterotrimeric G-protein signaling by NDPK/NME proteins and caveolins: an update. *Lab Invest* 98, 190-197.
2. Abu-Taha, I. H., Heijman, J., Hippe, H. J., Wolf, N. M., El-Armouche, A., Nikolaev, V. O., Schafer, M., Wurtz, C. M., Neef, S., Voigt, N., Baczko, I., Varro, A., Muller, M., Meder, B., Katus, H. A., Spiger, K., Vettel, C., Lehmann, L. H., Backs, J., Skolnik, E. Y., Lutz, S., Dobrev, D., Wieland, T. (2017): Nucleoside Diphosphate Kinase-C Suppresses cAMP Formation in Human Heart Failure. *Circulation* 135, 881-897.
3. Alex, L. A., Simon, M. I. (1994): Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* 10, 133-138.
4. Allesie, M., Ausma, J., Schotten, U. (2002): Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54, 230-246.
5. Baker, A. H., Ridge, S. A., Hoy, T., Cachia, P. G., Culligan, D., Baines, P., Whittaker, J. A., Jacobs, A., Padua, R. A. (1993): Expression of the colony-stimulating factor 1 receptor in B lymphocytes. *Oncogene* 8, 371-378.
6. Baltogiannis, G. G., Lysitsas, D. N., di Giovanni, G., Ciconte, G., Sieira, J., Conte, G., Kolettis, T. M., Chierchia, G. B., de Asmundis, C., Brugada, P. (2019): CPVT: Arrhythmogenesis, Therapeutic Management, and Future Perspectives. A Brief Review of the Literature. *Front Cardiovasc Med* 6, 92.
7. Barraud, P., Amrein, L., Dobremez, E., Dabernat, S., Masse, K., Larou, M., Daniel, J. Y., Landry, M. (2002): Differential expression of nm23 genes in adult mouse dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 444, 306-323.
8. Beavers, D. L., Wang, W., Ather, S., Voigt, N., Garbino, A., Dixit, S. S., Landstrom, A. P., Li, N., Wang, Q., Olivotto, I., Dobrev, D., Ackerman, M. J., Wehrens, X. H. T. (2013): Mutation E169K in junctophilin-2 causes atrial fibrillation due to impaired RyR2 stabilization. *J Am Coll Cardiol* 62, 2010-2019.
9. Bernstein, S. A., Morley, G. E. (2006): Gap junctions and propagation of the cardiac action potential. *Adv Cardiol* 42, 71-85.
10. Bers, D. M. (2000): Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* 87, 275-281.
11. Bilitou, A., Watson, J., Gartner, A., Ohnuma, S. (2009): The NM23 family in development. *Mol Cell Biochem* 329, 17-33.
12. Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R., Simon, M. I. (1999): Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* 96, 131-141.

13. Boissan, M., Dabernat, S., Peuchant, E., Schlattner, U., Lascu, I., Lacombe, M. L. (2009): The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Mol Cell Biochem* 329, 51-62.
14. Brixius, K., Wollmer, A., Bolck, B., Mehlhorn, U., Schwinger, R. H. (2003): Ser16-, but not Thr17-phosphorylation of phospholamban influences frequency-dependent force generation in human myocardium. *Pflugers Arch* 447, 150-157.
15. Cai, X., Srivastava, S., Surindran, S., Li, Z., Skolnik, E. Y. (2014): Regulation of the epithelial Ca(2)(+) channel TRPV5 by reversible histidine phosphorylation mediated by NDPK-B and PHPT1. *Mol Biol Cell* 25, 1244-1250.
16. Chen, P. S., Chen, L. S., Fishbein, M. C., Lin, S. F., Nattel, S. (2014): Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ Res* 114, 1500-1515.
17. Chugh, S. S., Havmoeller, R., Narayanan, K., Singh, D., Rienstra, M., Benjamin, E. J., Gillum, R. F., Kim, Y. H., McAnulty, J. H., Jr., Zheng, Z. J., Forouzanfar, M. H., Naghavi, M., Mensah, G. A., Ezzati, M., Murray, C. J. (2014): Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 129, 837-847.
18. Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., Izzo, N. J., Jr. (1998): HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2979-2984.
19. Cuello, F., Schulze, R. A., Heemeyer, F., Meyer, H. E., Lutz, S., Jakobs, K. H., Niroomand, F., Wieland, T. (2003): Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer via nucleoside diphosphate kinase (NDPK) B and Gbeta subunits. Complex formation of NDPK B with Gbeta gamma dimers and phosphorylation of His-266 IN Gbeta. *J Biol Chem* 278, 7220-7226.
20. Dascal, N. (2001): Ion-channel regulation by G proteins. *Trends Endocrinol Metab* 12, 391-398.
21. De Lean, A., Stadel, J. M., Lefkowitz, R. J. (1980): A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255, 7108-7117.
22. Dexheimer, T. S., Carey, S. S., Zuohe, S., Gokhale, V. M., Hu, X., Murata, L. B., Maes, E. M., Weichsel, A., Sun, D., Meuillet, E. J., Montfort, W. R., Hurley, L. H. (2009): NM23-H2 may play an indirect role in transcriptional activation of c-myc gene expression but does not cleave the nuclease hypersensitive element III(1). *Mol Cancer Ther* 8, 1363-1377.
23. Dobrev, D. (2006): Electrical remodeling in atrial fibrillation. *Herz* 31, 108-112; quiz 142-103.
24. Dobrev, D., Friedrich, A., Voigt, N., Jost, N., Wettwer, E., Christ, T., Knaut, M., Ravens, U. (2005): The G protein-gated potassium current $I_{K,ACH}$ is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 112, 3697-3706.

25. Dobrev, D., Nattel, S. (2008): Calcium handling abnormalities in atrial fibrillation as a target for innovative therapeutics. *J Cardiovasc Pharmacol* 52, 293-299.
26. Dobrev, D., Nattel, S. (2010): New antiarrhythmic drugs for treatment of atrial fibrillation. *Lancet* 375, 1212-1223.
27. Dobrev, D., Voigt, N., Wehrens, X. H. (2011): The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: pathophysiological and therapeutic implications. *Cardiovasc Res* 89, 734-743.
28. Dobrev, D., Wehrens, X. H. T. (2017): Calcium-mediated cellular triggered activity in atrial fibrillation. *J Physiol* 595, 4001-4008.
29. El-Armouche, A., Boknik, P., Eschenhagen, T., Carrier, L., Knaut, M., Ravens, U., Dobrev, D. (2006): Molecular determinants of altered Ca²⁺ handling in human chronic atrial fibrillation. *Circulation* 114, 670-680.
30. Erent, M., Gonin, P., Cherfils, J., Tissier, P., Raschella, G., Giartosio, A., Agou, F., Sarger, C., Lacombe, M. L., Konrad, M., Lascu, I. (2001): Structural and catalytic properties and homology modelling of the human nucleoside diphosphate kinase C, product of the DRnm23 gene. *Eur J Biochem* 268, 1972-1981.
31. Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D., Lieberman, J. (2003): Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112, 659-672.
32. Fechner, H., Pinkert, S., Wang, X., Sipo, I., Suckau, L., Kurreck, J., Dorner, A., Sollerbrant, K., Zeichhardt, H., Grunert, H. P., Vetter, R., Schultheiss, H. P., Poller, W. (2007): Coxsackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited by vector-mediated RNA interference targeting their common receptor. *Gene Ther* 14, 960-971.
33. Gassanov, N., Brandt, M. C., Michels, G., Lindner, M., Er, F., Hoppe, U. C. (2006): Angiotensin II-induced changes of calcium sparks and ionic currents in human atrial myocytes: potential role for early remodeling in atrial fibrillation. *Cell Calcium* 39, 175-186.
34. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. (2021, 18.03.2021). Sterbefälle für die 10 häufigsten Todesursachen. Online-Publikation; https://www.gbe-bund.de/gbe/!pkg_olap_tables.prc_set_orientation?p_uid=gastd&p_aid=96685079&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=516&p_ansnr=15047496&p_version=5&D.000=1&D.001=3&D.002=3&D.003=2 (abgerufen am 13.07.2021)
35. Gether, U., Lin, S., Kobilka, B. K. (1995): Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J Biol Chem* 270, 28268-28275.
36. Gilles, A. M., Presecan, E., Vonica, A., Lascu, I. (1991): Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *J Biol Chem* 266, 8784-8789.
37. Gilman, A. G. (1987): G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56, 615-649.

38. Goette, A., Kalman, J. M., Aguinaga, L., Akar, J., Cabrera, J. A., Chen, S. A., Chugh, S. S., Corradi, D., D'Avila, A., Dobrev, D., Fenelon, G., Gonzalez, M., Hatem, S. N., Helm, R., Hindricks, G., Ho, S. Y., Hoit, B., Jalife, J., Kim, Y. H., Lip, G. Y., Ma, C. S., Marcus, G. M., Murray, K., Nogami, A., Sanders, P., Uribe, W., Van Wagoner, D. R., Nattel, S. (2017): EHRA/HRS/APHRS/SOLAECE expert consensus on atrial cardiomyopathies: Definition, characterization, and clinical implication. *Heart Rhythm* 14, e3-e40.
39. Gonin, P., Xu, Y., Milon, L., Dabernat, S., Morr, M., Kumar, R., Lacombe, M. L., Janin, J., Lascu, I. (1999): Catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinase investigated using nucleotide analogues, viscosity effects, and X-ray crystallography. *Biochemistry* 38, 7265-7272.
40. Goudis, C. A., Kallergis, E. M., Vardas, P. E. (2012): Extracellular matrix alterations in the atria: insights into the mechanisms and perpetuation of atrial fibrillation. *Europace* 14, 623-630.
41. Gyorke, S., Gyorke, I., Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Williams, S. C. (2004): Modulation of sarcoplasmic reticulum calcium release by calsequestrin in cardiac myocytes. *Biol Res* 37, 603-607.
42. Hamm, H. E. (1998): The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273, 669-672.
43. He, X., Goldsmith, C. M., Marmary, Y., Wellner, R. B., Parlow, A. F., Nieman, L. K., Baum, B. J. (1998): Systemic action of human growth hormone following adenovirus-mediated gene transfer to rat submandibular glands. *Gene Ther* 5, 537-541.
44. Heidbuchel, H., Vereecke, J., Carmeliet, E. (1991): Atrial membranes contain nucleoside diphosphate kinase (NDPK) activity: its role in regulation of muscarinic K⁺ channels. *Pacing Clin Electrophysiol* 14, 1721-1727.
45. Heijman, J., Algalarrondo, V., Voigt, N., Melka, J., Wehrens, X. H., Dobrev, D., Nattel, S. (2016): The value of basic research insights into atrial fibrillation mechanisms as a guide to therapeutic innovation: a critical analysis. *Cardiovasc Res* 109, 467-479.
46. Heijman, J., Muna, A. P., Veleva, T., Molina, C. E., Sutanto, H., Tekook, M., Wang, Q., Abu-Taha, I. H., Gorka, M., Kunzel, S., El-Armouche, A., Reichenspurner, H., Kamler, M., Nikolaev, V., Ravens, U., Li, N., Nattel, S., Wehrens, X. H. T., Dobrev, D. (2020): Atrial Myocyte NLRP3/CaMKII Nexus Forms a Substrate for Postoperative Atrial Fibrillation. *Circ Res* 127, 1036-1055.
47. Heijman, J., Voigt, N., Nattel, S., Dobrev, D. (2014): Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res* 114, 1483-1499.
48. Hindricks, G., Potpara, T., Dagres, N., Arbelo, E., Bax, J. J., Blomstrom-Lundqvist, C., Boriani, G., Castella, M., Dan, G. A., Dilaveris, P. E., Fauchier, L., Filippatos, G., Kalman, J. M., La Meir, M., Lane, D. A., Lebeau, J. P., Lettino, M., Lip, G. Y. H., Pinto, F. J., Thomas, G. N., Valgimigli, M., Van Gelder, I. C., Van Putte, B. P., Watkins, C. L., Group, E. S. C. S. D. (2021): 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of

Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J* 42, 373-498.

49. Hippe, H. J., Luedde, M., Lutz, S., Koehler, H., Eschenhagen, T., Frey, N., Katus, H. A., Wieland, T., Niroomand, F. (2007): Regulation of cardiac cAMP synthesis and contractility by nucleoside diphosphate kinase B/G protein beta gamma dimer complexes. *Circ Res* 100, 1191-1199.

50. Hippe, H. J., Lutz, S., Cuello, F., Knorr, K., Vogt, A., Jakobs, K. H., Wieland, T., Niroomand, F. (2003): Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer via nucleoside diphosphate kinase (NDPK) B and Gbeta subunits. Specific activation of G α by an NDPK B.Gbetagamma complex in H10 cells. *J Biol Chem* 278, 7227-7233.

51. Hippe, H. J., Wolf, N. M., Abu-Taha, I., Mehringer, R., Just, S., Lutz, S., Niroomand, F., Postel, E. H., Katus, H. A., Rottbauer, W., Wieland, T. (2009): The interaction of nucleoside diphosphate kinase B with Gbetagamma dimers controls heterotrimeric G protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16269-16274.

52. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117, 500-544.

53. Hunt, S. A., Abraham, W. T., Chin, M. H., Feldman, A. M., Francis, G. S., Ganiats, T. G., Jessup, M., Konstam, M. A., Mancini, D. M., Michl, K., Oates, J. A., Rahko, P. S., Silver, M. A., Stevenson, L. W., Yancy, C. W., Antman, E. M., Smith, S. C., Jr., Adams, C. D., Anderson, J. L., Faxon, D. P., Fuster, V., Halperin, J. L., Hiratzka, L. F., Jacobs, A. K., Nishimura, R., Ornato, J. P., Page, R. L., Riegel, B., American College of, C., American Heart Association Task Force on Practice, G., American College of Chest, P., International Society for, H., Lung, T., Heart Rhythm, S. (2005): ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 112, e154-235.

54. Kapetanovich, L., Baughman, C., Lee, T. H. (2005): Nm23H2 facilitates coat protein complex II assembly and endoplasmic reticulum export in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16, 835-848.

55. Kraeft, S. K., Traincart, F., Mesnildrey, S., Bourdais, J., Veron, M., Chen, L. B. (1996): Nuclear localization of nucleoside diphosphate kinase type B (nm23-H2) in cultured cells. *Exp Cell Res* 227, 63-69.

56. Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H. A., Tang, W. J., Feinstein, P. G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. R., Gilman, A. G. (1989): Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* 244, 1558-1564.

57. Lacombe, M. L., Milon, L., Munier, A., Mehus, J. G., Lambeth, D. O. (2000): The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* 32, 247-258.

58. Lanson, N. A., Jr., Glembotski, C. C., Steinhilper, M. E., Field, L. J., Claycomb, W. C. (1992): Gene expression and atrial natriuretic factor processing and secretion in cultured AT-1 cardiac myocytes. *Circulation* 85, 1835-1841.
59. Lascu, I., Gonin, P. (2000): The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* 32, 237-246.
60. Levitzki, A. (1988): From epinephrine to cyclic AMP. *Science* 241, 800-806.
61. Li, D., Fareh, S., Leung, T. K., Nattel, S. (1999): Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 100, 87-95.
62. Luo, J., Deng, Z. L., Luo, X., Tang, N., Song, W. X., Chen, J., Sharff, K. A., Luu, H. H., Haydon, R. C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., He, T. C. (2007): A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2, 1236-1247.
63. Lutz, S., Mura, R., Baltus, D., Movsesian, M., Kubler, W., Niroomand, F. (2001): Increased activity of membrane-associated nucleoside diphosphate kinase and inhibition of cAMP synthesis in failing human myocardium. *Cardiovasc Res* 49, 48-55.
64. Martinez, R., Venturelli, D., Perrotti, D., Veronese, M. L., Kastury, K., Druck, T., Huebner, K., Calabretta, B. (1997): Gene structure, promoter activity, and chromosomal location of the DR-nm23 gene, a related member of the nm23 gene family. *Cancer Res* 57, 1180-1187.
65. Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemlit, N., Marks, A. R. (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-376.
66. Masters, S. B., Stroud, R. M., Bourne, H. R. (1986): Family of G protein alpha chains: amphipathic analysis and predicted structure of functional domains. *Protein Eng* 1, 47-54.
67. Milon, L., Meyer, P., Chiadmi, M., Munier, A., Johansson, M., Karlsson, A., Lascu, I., Capeau, J., Janin, J., Lacombe, M. L. (2000): The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem* 275, 14264-14272.
68. Molina, C. E., Leroy, J., Richter, W., Xie, M., Scheitrum, C., Lee, I. O., Maack, C., Rucker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P., Verde, I., Llach, A., Hove-Madsen, L., Conti, M., Vandecasteele, G., Fischmeister, R. (2012): Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 59, 2182-2190.
69. Morera, S., Lascu, I., Dumas, C., LeBras, G., Briozzo, P., Veron, M., Janin, J. (1994): Adenosine 5'-diphosphate binding and the active site of nucleoside diphosphate kinase. *Biochemistry* 33, 459-467.
70. Morris, A. J., Scarlata, S. (1997): Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes. *Biochem Pharmacol* 54, 429-435.
71. Muller, F. U., Lewin, G., Baba, H. A., Boknik, P., Fabritz, L., Kirchhefer, U., Kirchhof, P., Loser, K., Matus, M., Neumann, J., Riemann, B., Schmitz, W. (2005): Heart-directed

- expression of a human cardiac isoform of cAMP-response element modulator in transgenic mice. *J Biol Chem* 280, 6906-6914.
72. Munier, A., Feral, C., Milon, L., Pinon, V. P., Gyapay, G., Capeau, J., Guellaen, G., Lacombe, M. L. (1998): A new human nm23 homologue (nm23-H5) specifically expressed in testis germinal cells. *FEBS Lett* 434, 289-294.
73. Nattel, S. (2017): Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol* 3, 425-435.
74. Nattel, S., Burstein, B., Dobrev, D. (2008): Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1, 62-73.
75. Neubig, R. R., Siderovski, D. P. (2002): Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 1, 187-197.
76. Offermanns, S. (2003): G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 83, 101-130.
77. Opel, A., Nobles, M., Montaigne, D., Finlay, M., Anderson, N., Breckenridge, R., Tinker, A. (2015): Absence of the Regulator of G-protein Signaling, RGS4, Predisposes to Atrial Fibrillation and Is Associated with Abnormal Calcium Handling. *J Biol Chem* 290, 19233-19244.
78. Palacios, F., Schweitzer, J. K., Boshans, R. L., D'Souza-Schorey, C. (2002): ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nat Cell Biol* 4, 929-936.
79. Pedersen, P. L. (1973): Coupling of adenosine triphosphate formation in mitochondria to the formation of nucleoside triphosphates. Involvement of nucleoside diphosphokinase. *J Biol Chem* 248, 3956-3962.
80. Pereira, L., Cheng, H., Lao, D. H., Na, L., van Oort, R. J., Brown, J. H., Wehrens, X. H., Chen, J., Bers, D. M. (2013): Epac2 mediates cardiac beta1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmia. *Circulation* 127, 913-922.
81. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P. (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26, 509-515.
82. Pierce, K. L., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J. (2002): Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.
83. Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L., Kwatra, M. M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1992): Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257, 1264-1267.
84. Pohl, S. L., Birnbaumer, L., Rodbell, M. (1971): The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. I. Properties. *J Biol Chem* 246, 1849-1856.

85. Rochais, F., Abi-Gerges, A., Horner, K., Lefebvre, F., Cooper, D. M., Conti, M., Fischmeister, R., Vandecasteele, G. (2006): A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 98, 1081-1088.
86. Rosengard, A. M., Krutzsch, H. C., Shearn, A., Biggs, J. R., Barker, E., Margulies, I. M., King, C. R., Liotta, L. A., Steeg, P. S. (1989): Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 342, 177-180.
87. Ross, E. M., Gilman, A. G. (1980): Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Annu Rev Biochem* 49, 533-564.
88. Salazar, N. C., Chen, J., Rockman, H. A. (2007): Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1006-1018.
89. Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., Lefkowitz, R. J. (1993): A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 268, 4625-4636.
90. Schaefer, M., Abu-Taha, I., Naud, P., Qi, X. Y., Gundlach, V., Kamler, M., Wieland, T., Nattel, S., Dobrev, D. (2016): Abstract 13235: Enhanced Receptor-independent Nucleoside Diphosphate Kinase Mediated Gs Protein Signaling Contributes to Arrhythmogenic Calcium Mishandling in Atrial Fibrillation. *Circulation* 134, A13235-A13235.
91. Schaefer, M., Abu-Taha, I., Qi, X. Y., Gundlach, V., Naud, P., Heijman, J., Kamler, M., Wieland, T., Nattel, S., Dobrev, D. (2017): Abstract 16396: Atrial Fibrillation Upregulation of Nucleoside Diphosphate Kinase, Induces Proarrhythmic Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Canine Atria. *Circulation* 136, A16396-A16396.
92. Schaertl, S., Konrad, M., Geeves, M. A. (1998): Substrate specificity of human nucleoside-diphosphate kinase revealed by transient kinetic analysis. *J Biol Chem* 273, 5662-5669.
93. Schneider, B., Xu, Y. W., Janin, J., Veron, M., Deville-Bonne, D. (1998): 3'-Phosphorylated nucleotides are tight binding inhibitors of nucleoside diphosphate kinase activity. *J Biol Chem* 273, 28773-28778.
94. Schotten, U., Greiser, M., Benke, D., Buerkel, K., Ehrenteidt, B., Stellbrink, C., Vazquez-Jimenez, J. F., Schoendube, F., Hanrath, P., Allessie, M. (2002): Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res* 53, 192-201.
95. Simmerman, H. K., Jones, L. R. (1998): Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78, 921-947.
96. Simon, M. I., Strathmann, M. P., Gautam, N. (1991): Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
97. Srivastava, S., Li, Z., Ko, K., Choudhury, P., Albaqumi, M., Johnson, A. K., Yan, Y., Backer, J. M., Unutmaz, D., Coetzee, W. A., Skolnik, E. Y. (2006): Histidine phosphorylation of the potassium channel KCa3.1 by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of KCa3.1 and CD4 T cells. *Mol Cell* 24, 665-675.

98. Stahl, J. A., Leone, A., Rosengard, A. M., Porter, L., King, C. R., Steeg, P. S. (1991): Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 51, 445-449.
99. Statistisches Bundesamt (Destatis). (2021a, 30.11.2020). Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2019. Online-Publikation; https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html (abgerufen am 13.07.2021)
100. Statistisches Bundesamt (Destatis). (2021b, 30.09.2020). Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2019. Online-Publikation; <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html> (abgerufen am 13.07.2021)
101. Steeg, P. S., Bevilacqua, G., Pozzatti, R., Liotta, L. A., Sobel, M. E. (1988): Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res* 48, 6550-6554.
102. Stryer, L., Bourne, H. R. (1986): G proteins: a family of signal transducers. *Annu Rev Cell Biol* 2, 391-419.
103. Swanson, R. V., Alex, L. A., Simon, M. I. (1994): Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci* 19, 485-490.
104. Tang, W. J., Gilman, A. G. (1995): Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin. *Science* 268, 1769-1772.
105. Tepper, A. D., Dammann, H., Bominaar, A. A., Veron, M. (1994): Investigation of the active site and the conformational stability of nucleoside diphosphate kinase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 269, 32175-32180.
106. Terentyev, D., Viatchesenko-Karpinski, S., Gyorke, I., Volpe, P., Williams, S. C., Gyorke, S. (2003): Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11759-11764.
107. Tilley, D. G., Rockman, H. A. (2006): Role of beta-adrenergic receptor signaling and desensitization in heart failure: new concepts and prospects for treatment. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 4, 417-432.
108. Tolkovsky, A. M., Levitzki, A. (1978a): Coupling of a single adenylate cyclase to two receptors: adenosine and catecholamine. *Biochemistry* 17, 3811-3817.
109. Tolkovsky, A. M., Levitzki, A. (1978b): Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry* 17, 3795.
110. Tsuiki, H., Nitta, M., Furuya, A., Hanai, N., Fujiwara, T., Inagaki, M., Kochi, M., Ushio, Y., Saya, H., Nakamura, H. (1999): A novel human nucleoside diphosphate (NDP) kinase, Nm23-H6, localizes in mitochondria and affects cytokinesis. *J Cell Biochem* 76, 254-269.

111. Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., Lamorgese, M., Rossie, S. S., McCarthy, P. M., Nerbonne, J. M. (1999): Atrial L-type Ca^{2+} currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 85, 428-436.
112. Vest, J. A., Wehrens, X. H., Reiken, S. R., Lehnart, S. E., Dobrev, D., Chandra, P., Danilo, P., Ravens, U., Rosen, M. R., Marks, A. R. (2005): Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation* 111, 2025-2032.
113. Virani, S. S., Alonso, A., Aparicio, H. J., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Cheng, S., Delling, F. N., Elkind, M. S. V., Evenson, K. R., Ferguson, J. F., Gupta, D. K., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Lee, C. D., Lewis, T. T., Liu, J., Loop, M. S., Lutsey, P. L., Ma, J., Mackey, J., Martin, S. S., Matchar, D. B., Mussolino, M. E., Navaneethan, S. D., Perak, A. M., Roth, G. A., Samad, Z., Satou, G. M., Schroeder, E. B., Shah, S. H., Shay, C. M., Stokes, A., VanWagner, L. B., Wang, N. Y., Tsao, C. W., American Heart Association Council on, E., Prevention Statistics, C., Stroke Statistics, S. (2021): Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 143, e254-e743.
114. Voigt, N., Abu-Taha, I., Heijman, J., Dobrev, D. (2014a): Constitutive activity of the acetylcholine-activated potassium current $I_{K,ACH}$ in cardiomyocytes. *Adv Pharmacol* 70, 393-409.
115. Voigt, N., Heijman, J., Wang, Q., Chiang, D. Y., Li, N., Karck, M., Wehrens, X. H. T., Nattel, S., Dobrev, D. (2014b): Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 129, 145-156.
116. Voigt, N., Li, N., Wang, Q., Wang, W., Trafford, A. W., Abu-Taha, I., Sun, Q., Wieland, T., Ravens, U., Nattel, S., Wehrens, X. H., Dobrev, D. (2012): Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak and increased $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 125, 2059-2070.
117. Wagner, P. D., Steeg, P. S., Vu, N. D. (1997): Two-component kinase-like activity of nm23 correlates with its motility-suppressing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9000-9005.
118. Wagner, P. D., Vu, N. D. (2000): Phosphorylation of geranyl and farnesyl pyrophosphates by Nm23 proteins/nucleoside diphosphate kinases. *J Biol Chem* 275, 35570-35576.
119. Wakili, R., Voigt, N., Kaab, S., Dobrev, D., Nattel, S. (2011): Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 121, 2955-2968.
120. Watson, N., Linder, M. E., Druey, K. M., Kehrl, J. H., Blumer, K. J. (1996): RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits. *Nature* 383, 172-175.
121. Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., Marks, A. R. (2004): Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70.

122. Wei, L., Hanna, A. D., Beard, N. A., Dulhunty, A. F. (2009): Unique isoform-specific properties of calsequestrin in the heart and skeletal muscle. *Cell Calcium* 45, 474-484.
123. Wieland, T. (2007): Interaction of nucleoside diphosphate kinase B with heterotrimeric G protein betagamma dimers: consequences on G protein activation and stability. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374, 373-383.
124. Wieland, T., Attwood, P. V. (2015): Alterations in reversible protein histidine phosphorylation as intracellular signals in cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 6, 173.
125. Wieland, T., Chen, C. K. (1999): Regulators of G-protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360, 14-26.
126. Wieland, T., Michel, M. C. (2005): Can a GDP-liganded G-protein be active? *Mol Pharmacol* 68, 559-562.
127. Wieland, T., Ronzani, M., Jakobs, K. H. (1992): Stimulation and inhibition of human platelet adenylylcyclase by thiophosphorylated transducin beta gamma-subunits. *J Biol Chem* 267, 20791-20797.
128. Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M., Jones, L. R. (1997): Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 272, 23389-23397.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
Ad	Adenovirus
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
AT ₁ R	Angiotensin-1-Rezeptor
Ca ²⁺	Kalzium
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CRE	cAMP-response element
CREB	cAMP-response element binding protein
CREM	cAMP-response element modulator
CSQ2	Calsequestrin-2
C _T	cycle threshold
CTP	Cytosintriphosphat
cVHF	chronisches Vorhofflimmern
DADs	delayed afterdepolarisations
DAG	Diacylglycerin
EADs	early afterdepolarisations
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EHRA	European Heart Rhythm Association
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbant assay
Epac2	exchange protein directly activated by cAMP 2
FAM	Reporter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanosin triphosphate exchange factor
GIRK	G-protein-activated inwardly rectifying K ⁺ channel
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
His	Histidin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNC	Junctin
JPH2	Junctophilin Typ-2
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
Mg ²⁺	Magnesium
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger ribonucleotide acid
M ₂ R	muskarinartiger Acetylcholinrezeptor Typ-2
MLKP	Myosinleichtketten-Phosphatase
Na ⁺	Natrium
NCX1	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher Typ-1

NDP	Nukleosiddiphosphat
NDPKs	Nukleosiddiphosphat-Kinasen
NDPK-A	Nukleosiddiphosphat-Kinasen-A
NDPK-B	Nukleosiddiphosphat-Kinasen-B
NDPK-C	Nukleosiddiphosphat-Kinasen-C
NDPK-D	Nukleosiddiphosphat-Kinasen-D
NFQ	Quencher
nm23H1-9	non metastatic clone 23 of human 1-9
NTP	Nukleosidtriphosphat
P	Phosphat
PDE	Phosphodiesterase
PFU	plaque forming unit
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PLC- β	Phospholipase C- β
PM	Plasmamembran
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
PPs	Protein-Phosphatasen
PP1	Protein-Phosphatase 1
PP2	Protein-Phosphatase 2
pVHF	paroxysmales Vorhofflimmern
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RGS	regulators of G protein signaling
RhoGEF	Rho guanin nucleotid exchange factors
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
rpm	rounds per minute
RyR2	Ryanodin-Rezeptor-Kanäle Typ-2
SCaEs	spontaneous SR Ca ²⁺ -release events
SEM	standard error of the mean
Ser	Serin
SERCA2a	SR-Ca ²⁺ -ATPase 2a
shRNA	small hairpin ribonucleotide acid
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Thr	Threonin
TTP	Thymidintriphosphat
VDCC	Spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanal (voltage-dependent Ca ²⁺ -channel)
VHF	Vorhofflimmern
XRP2	X-linked Retinitis Pigmentosa 2
α_1 -AR	α_1 -adrenerger Rezeptor
α_2 -AR	α_2 -adrenerger Rezeptor
β -AR	β -adrenerger Rezeptor
β -ARK	β -adrenerge Rezeptorkinase

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grafische Darstellung des homohexameren Aufbaus von NDPK-B (Dexheimer et al., 2009)	8
--	---

Abbildung 2: Stammbaum der NDPKs (Boissan et al., 2009).....	10
Abbildung 3: Funktion der NDPKs.....	12
Abbildung 4: Aktivierungszyklus der heterotrimeren G-Proteine (Wieland et al., 1999)	15
Abbildung 5: Einfluss des vegetativen Nervensystems auf die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion des Herzens	16
Abbildung 6: Aktivierung der G-Proteine durch NDPKs.....	17
Abbildung 7: EHRA-Symptomskala.....	20
Abbildung 8: Zellulärer Ca^{2+} -Fluss.....	22
Abbildung 9: Mögliche Folgen einer veränderten NDPK-Konzentration auf den cAMP-Gehalt und die Ca^{2+} -Homöostase in atrialen Kardiomyozyten.....	29
Abbildung 10: Amplifikation der Adenoviren.....	37
Abbildung 11: Pipettierschema zur Bestimmung der benötigten Virusmengen in HEK293-Zellen	38
Abbildung 12: Pipettierschema der Virusinfektion von HL-1 Zellen mit den Adenoviren	40
Abbildung 13: Beispielhafter Ablauf des qPCR TaqMan Genexpressionsassays	46
Abbildung 14: Infizierte HL-1 Zellen mit Ad-sh-NDPK-B nach 48h	50
Abbildung 15: Nicht-infizierte vs. infizierte HL-1 Zellen.....	51
Abbildung 16: Infizierte HL-1 Zellen der verschiedenen Versuchsansätze	51
Abbildung 17: Nachweis der Virusinfektion im Western Blot nach genetisch veränderter NDPK-B-Expression	52
Abbildung 18: Nachweis der Virusinfektion im Western Blot mit erhöhter NDPK-C-Expression	53
Abbildung 19: Proteinexpression der gesamten RyR2 (RyR-Total) nach genetisch veränderter NDPK-Expression.....	54
Abbildung 20: Phosphorylierung von RyR2 an Ser2808 nach genetisch veränderter NDPK-Expression.....	55
Abbildung 21: Phosphorylierung von RyR2 an Ser2814 nach genetisch veränderter NDPK-Expression.....	56
Abbildung 22: Verhältnis der beiden RyR2-Phosphorylierungen an Ser2808 und Ser2814 zur gesamten RyR2-Expression	57
Abbildung 23: Proteinexpression von CSQ2 nach genetisch veränderter NDPK-Expression sowie das Verhältnis von CSQ2-Expression zur gesamten RyR2-Expression.....	59
Abbildung 24: Proteinexpression der SERCA2a nach genetisch veränderter NDPK-Expression	61

Abbildung 25: Proteinexpression von PLB-Monomeren und PLB-Pentameren nach genetisch veränderter NDPK-Expression.....	63
Abbildung 26: Phosphorylierung von PLB an Ser-16 nach genetisch veränderter NDPK-Expression.....	64
Abbildung 27: Phosphorylierung von PLB an Thr-17 nach genetisch veränderter NDPK-Expression.....	65
Abbildung 28: Verhältnis der beiden PLB-Phosphorylierungen an Ser-16 und Thr-17 zur PLB-Monomer- bzw. PLB-Pentamer-Expression.....	66
Abbildung 29: mRNA-Gehalt von SERCA2a und Ryr2 nach genetisch veränderter NDPK-Expression.....	68
Abbildung 30: cAMP-Gehalt nach genetisch veränderter NDPK-Expression.....	70

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auszug zur Einteilung der G-Proteinen und ihre Funktionen.....	14
Tabelle 2: Chemikalien.....	30
Tabelle 3: Nährmedien für die Zellkultur.....	30
Tabelle 4: Puffer und Lösungen.....	31
Tabelle 5: Proteinmarker.....	32
Tabelle 6: Primärantikörper.....	32
Tabelle 7: Sekundärantikörper.....	32
Tabelle 8: Fertigkits.....	33
Tabelle 9: Geräte.....	33
Tabelle 10: Software.....	33
Tabelle 11: Benötigte Virusmenge für die jeweiligen Versuchsansätze.....	39
Tabelle 12: Master Mix für cDNA-Synthese.....	45
Tabelle 13: Protokoll Thermocycler: Reverse Transkription.....	45
Tabelle 14: Taq Man Fast Advanced Master Mix für qPCR.....	46
Tabelle 15: PCR-Ansatz.....	46
Tabelle 16: Spezifische Primer.....	47
Tabelle 17: Protokoll Thermocycler: qPCR.....	47

8 DANKSAGUNGEN

Liebe Leserin und lieber Leser,

an dieser Stelle möchte ich mich am Ende dieser Dissertation rechtfertigen. Ich möchte mich rechtfertigen auf die Frage nach dem Grund. Aus welchem Grunde heutzutage noch promovieren? Nach meinen Erfahrungen aus dem langen Medizinstudium mit Erteilung der Approbation und den ersten beruflichen Erfahrungen würde ich niemals behaupten, dass es eine Dissertation benötigt, um ein „guter“ Arzt zu sein. Denn der „gute“ Arzt ist so viel mehr als seine fachliche Expertise und besteht meiner Meinung nach in der hingebungsvollen Annahme der Berufung Arzt mit allen Konsequenzen. Dies ist mein Weg und dies ist mein Ziel. Aber dennoch bietet eine Dissertation zweierlei. Erfahrung und Wahrheit. Sie ist die Möglichkeit in einer turbulenten Welt mit zahlreichen Falschmeldungen und einer unüberprüfbaren Informationsmenge bei exaktem und selbstkritischem Arbeiten Konstanten zu formulieren, die der Wahrheit zwar immer noch nicht gänzlichen entsprechen, aber nahe an sie heranreichen. Dieses Arbeiten durfte ich im Institut für Pharmakologie der Universität Duisburg-Essen lernen. Durch die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit Ergebnissen der medizinischen Forschungswelt ist es möglich, die für den Patienten wichtigen Informationen zu verstehen und sie im Kontext der fachlichen Beratung zu deuten. Dies bilden den Grundstein für eine vollumfassende ärztliche Beratung, die auf dem neusten Stand der Wissenschaft die optimale Behandlung ermöglicht. Dies ist eine Lebensaufgabe und an ihr möchte ich mich versuchen.

Ihnen, Herrn Prof. Dr. Dobrev, möchte ich für die großartige Möglichkeit und die zahlreichen Gespräche zu dieser Dissertation danken. Sie haben mir auf eindrucksvolle Weise gezeigt, wie reizvoll das wissenschaftliche Arbeiten auch in meiner Zukunft ist. Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Issam Abu-Taha danken. Diese Dissertation ist Teil deines Projektes, in welches du dein Herzblut jahrelang investiertest. Ich danke dir für so viele Ratschläge und bin stolz dein Freund geworden zu sein. Liebe Marina, du stehst für mich wie keine andere für diese schöne Laborzeit, hast mich stets unterstützt und begleitet und ich hoffe sehr, dass wir uns nie aus den Augen verlieren. Auch möchte ich dem Team der Pharmakologie für die wunderschöne Zeit danken. Liebe Betty, liebe Barbara, liebe Iris und liebe Ramona, ich danke euch für eure ganzen Tipps und Kniffe. Ihr habt es mir alles beigebracht. Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken. Liebe Mama, lieber Papa, lieber Thomas, ihr habt mich das ganze Studium begleitet und unterstützt. Alle Zeit habt ihr mir geschenkt, selbstlos, wie immer. Ich liebe euch.

Liebste Thalia, wir teilen so viel wie auch die Leidenschaft hinter dieser Dissertation. Ich danke dir für deine immerwährende Unterstützung. Auf ein Leben in Glück.