

Marc-Oscar Hoting

Dr. med.

## **Identifizierung und Charakterisierung neuer Zielproteine der Calcium/Calmodulin abhängigen Proteinkinase II und ihre Rolle in der Entstehung der physiologischen Hypertrophie des Herzens**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Johannes Backs

Die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Kinase II ist eine weit verbreitete Proteinkinase. In Kardiomyozyten werden ihre Isoformen CaMKII $\gamma$  und CaMKII $\delta$  exprimiert. Mit Hilfe eines kardiomyozytenspezifischen Doppelknockouts (DKO) der beiden Isoformen von Mäusen konnte ihre Expression im Herzen ausgeschaltet werden. Diese Tiere stellen somit ein optimales loss-of-function Modell dar.

Im ersten Teil der Arbeit wurde dieser DKO für ein SILAC-basiertes (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids*) Hochdurchsatzverfahren verwendet. Von einer sehr großen Anzahl an unterschiedlich phosphorylierten Peptiden wurden drei ausgewählt, die das klassische CaMKII Konsensus Muster enthielten und stark reguliert waren. Die Wahl fiel auf kardiales Troponin I (cTnI), Synaptopodin (Synpo) und die regulatorische Untereinheit 1A der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (Prkar1a).

Im *in vitro* Kinase Assay erfolgte dann die Bestätigung bzw. Widerlegung der Phosphorylierungsstelle auf den potenziellen neuen Zielproteinen. Threonin an Stelle 32 auf cTnI konnte nicht bestätigt werden. Serin 18 auf Synaptopodin und Serin 77 auf Prkar1a stellten sich aber als tatsächliche neue Zielaminosäuren von CaMKII heraus. Im weiteren wurde Prkar1a als besonders interessantes Protein untersucht.

Es liegt nahe, dass die direkte Beeinflussung einer Untereinheit von PKA durch CaMKII einen Einfluss auf die PKA Aktivität hat. Daher wurde im nächsten Teil der Arbeit die Aktivität von PKA unter Wegfall des Einflusses durch CaMKII untersucht. Wiederum diente dabei der oben erwähnte herzspezifische CaMKII $\gamma$ /CaMKII $\delta$  DKO als Grundlage

für den PKA Assay. Im Vergleich zum WT war in Gewebe dieser Mäuse in der Tat die Aktivität von PKA deutlich und signifikant erhöht.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Rolle von CaMKII in der Entwicklung der physiologischen Hypertrophie beleuchtet. Dafür wurden sowohl WT als auch CaMKII DKO Mäuse einem 14-tägigen Schwimmprotokoll unterzogen. Diese Mäuse entwickelten im Vergleich zu Mäusen, die geruht hatten, eine kardiale Hypertrophie. Durch Untersuchung von Fibrosemenge und Herzfunktion konnte diese als physiologische Hypertrophie bestätigt werden. Dabei fiel auf, dass es in DKO Mäusen zu einer stärkeren Entwicklung von physiologischer Hypertrophie kam. Dies deutet auf eine Beteiligung von CaMKII in deren Entwicklung hin. Möglicherweise spielt dabei ein direkter PKA-CaMKII *crossstalk* eine Rolle.

Um diese Beteiligung noch näher zu durchleuchten wurde zunächst die Proteinexpression in WT Mäusen nach Schwimmbelastung gemessen, die sich als unverändert herausstellte. Allerdings fiel im Rahmen des aktivitätsabhängigen HDAC4-GST Pulldowns von CaMKII eine Verminderung von deren Aktivität nach Schwimmen auf.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit im Rahmen eines SILAC-PP einige neue mögliche Zielproteine von CaMKII gefunden. Synaptopodin und Prkar1a konnten im Kinase Assay als solche bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität von PKA in Herzen von CaMKII DKO Mäusen signifikant erhöht ist. Zuletzt wurde bewiesen, dass sich eine physiologische Hypertrophie nach Belastung im CaMKII DKO Mausmodell stärker entwickelt. Dabei war die Aktivität von CaMKII bei Belastung in Kardiomyozyten stark vermindert. Der genaue Mechanismus und eventuelle therapeutische Konsequenzen müssen in weiteren Untersuchungen geklärt werden.