

Aus dem Zentrum für Pharmakologie  
der Universität zu Köln  
Institut I für Pharmakologie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. Dietmar Fischer

**Protektive Effekte eines  $G\alpha_{i3}$ -Mangels in einem durch  
 $\beta_1$ -Adrenozeptor Überexpression vermittelten  
Mausmodell der Herzinsuffizienz**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Tobias Schröper  
aus Köln

promoviert am 07. Oktober 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Professor Dr. med. J. Matthes
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. F. Nguemo

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Im Rahmen der kumulativen Promotion wurde folgende Publikation eingebunden:

Schröper T, Mehrkens D, Leiss V et al. (2023). Protective effects of  $G\alpha_{i3}$  deficiency in a murine heart-failure model of  $\beta_1$ -adrenoceptor overexpression. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. doi: 10.1007/s00210-023-02751-8

Den wesentlichen Teil der Arbeit im Rahmen der Publikation habe ich selbst geleistet. Dabei habe ich maßgeblich folgende Arbeitsprozesse durchgeführt und getragen: Erarbeitung und Entwicklung des Studiendesigns, Planung und Mitverantwortung der Tierzucht, Organisation/ Koordination der Versuche, Durchführung der Experimente (in-vivo- und in-vitro-Versuche, Echokardiographie, Expressions- und Überlebensanalysen), Dokumentation und Auswertung sowie Erarbeitung des Manuskripts.

Die vorliegende Einschätzung über die erbrachte Eigenleistung wurde mit den am Artikel beteiligten Co-Autor\*innen einvernehmlich abgestimmt.

Technische Unterstützung erfolgte durch Cora Fried, Sigrid Kirchmann-Hecht, Mourad Ben Said, Carsten Korte und Simon Grimm. Es erfolgte eine statistische Beratung durch Petra Schiller, Mitarbeiterin des Instituts für Medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Graduiertenprogramm Pharmacology and Experimental Therapeutics/ Pharmakologie und Therapieforschung der Universität zu Köln und der Bayer Schering Pharma.

**Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:**

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 05.05.2024

Tobias Schröper

## Danksagung

An diesem Punkt möchte ich allen Personen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Jan Matthes herzlichst bedanken. In diesem Zusammenhang danke ich für das freundliche Überlassen dieses hoch interessanten Themas und das kontinuierlich entgegengebrachte Vertrauen, welches letztlich zum erfolgreichen Abschluss des Projektes führen sollte. Dabei genoss ich einerseits Freiheiten in der Projektgestaltung mit der Möglichkeit des selbständigen Einbringens und Umsetzens von individuellen, kreativen Ideen und andererseits war ich durch sein ständiges Engagement stets auf höchstem Niveau fachlich hervorragend beraten und betreut. Besonders beeindruckend habe ich dabei seine gelebte exzellente wissenschaftliche Praxis und fachliche Expertise wahrnehmen und schätzen dürfen, die Prof. Dr. Jan Matthes als Vorbild der Wissenschaft hervorheben. Nicht unerwähnt möchte ich hier das außerordentliche Maß an Menschlichkeit und Empathie meines Doktorvaters lassen, das ihn als besondere Führungskraft auszeichnet. Gleichzeitig ist es ihm gelungen, ein Arbeitsumfeld zu kreieren, in dem ich mich stets wohlfühlte und dabei zur Erbringung höchster Leistung motiviert war. Ich danke für eine sehr schöne, erfüllte sowie erfahrungs- und lehrreiche Zeit im Rahmen meiner Promotion.

Einen Dank möchte ich richten an Herrn Universitätsprofessor Dr. Dietmar Fischer, Direktor des Zentrums für Pharmakologie der Universität zu Köln, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Ebenso danke ich Herrn Universitätsprofessor Dr. Stephan Baldus, Direktor der Klinik III für Innere Medizin - Allgemeine und interventionelle Kardiologie, Elektrophysiologie, Angiologie, Pneumologie und internistische Intensivmedizin der Uniklinik Köln, und dem Laborteam für die sehr gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit, die Laboreinrichtung und Arbeitsmaterialien nutzen zu dürfen.

Ich bedanke mich bei Cora Fried, Sigrid Kirchmann-Hecht, Mourad Ben Said, Carsten Korte, Carolin Waldau, Andrea Lierz und allen Mitarbeitern der Labor-/ Arbeitsgruppe Matthes und des Zentrums für Pharmakologie der Universität zu Köln sowie Mitarbeitern innerhalb der Tierzucht, ohne deren wertvolle und tatkräftige Unterstützung die Realisierung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Darüber hinaus gilt ein Dank an Petra Schiller, Mitarbeiterin des Instituts für Medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln, für die erfolgte statistische Beratung.

Ein großer Dank geht an das Graduiertenprogramm Pharmacology and Experimental Therapeutics/ Pharmakologie und Therapieforschung der Universität zu Köln und der Bayer Schering Pharma für die Förderung im Rahmen meiner Promotion.

Weiterhin gilt ein Dank meinen Co-Autor\*innen, insbesondere Dennis Mehrkens und Veronika Leiss, für die Mitarbeit an dem Projekt und der gemeinsamen Publikation.

Abschließend möchte ich einen ganz besonderen Dank an meine Familie und Freunde richten. Hervorheben möchte ich in diesem Rahmen meine Eltern Hildegard, Wolfgang und Monika Schröper und Sophie Wolandt. Ich danke für Eure selbstlose, bedingungslose und liebevolle Unterstützung während meines Studiums und weit darüber hinaus sowie für Eure Hilfe und nahe Begleitung als Weggefährten in allen Lebenslagen. Vielen Dank!

## **Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>11</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>12</b>
<b>3. Protective effects of <math>G\alpha_{i3}</math> deficiency in a murine heart-failure model of <math>\beta_1</math>-adrenoceptor overexpression</b>	<b>16</b>
3.1 Abstract	16
3.2 Introduction	17
3.3 Methods	17
3.4 Results	20
3.5 Discussion	24
3.6 References	33
<b>4. Diskussion</b>	<b>36</b>
4.1 Therapeutische Überlegungen bei der Herzinsuffizienz	36
4.2 Rolle der $G_i$ -Proteine in einem durch $\beta_1$ -Adrenozeptor Überexpression vermittelten Mausmodell der Herzinsuffizienz	43
4.3 Limitationen	48
4.4 Schlussfolgerung	49
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>50</b>
<b>6. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen</b>	<b>59</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
AHT	Arterielle Hypertonie
Akt	Proteinkinase B
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ARNI	Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitor
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B- (brain) natriuretisches Peptid
$\beta$ -AR	$\beta$ -Adrenozeptor
$\beta$ ARK	$\beta$ -AR Kinase
$\beta$ -Blocker	Betablocker
$\beta_1$ -AR	$\beta_1$ -Adrenozeptor
$\beta_1$ -tg	$\beta_1$ -transgen
$\beta_2$ -AR	$\beta_2$ -Adrenozeptor
$\beta_2$ -tg	$\beta_2$ -transgen
$Ca^{2+}$	Calcium
CaMKII	$Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
EF	(linksventrikuläre) Ejektionsfraktion
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GDP	Guanosindiphosphat
$G_i$	Inhibitorische G-Proteine
<i>Gnai(2/3)</i>	$G\alpha_{i(2/3)}$ -Protein kodierendes Gen
$G_s$	Stimulierende G-Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
$G\alpha_{i2}^{-/-}$	$G\alpha_{i2}$ -Knockout (homozygot)
$G\alpha_{i3}^{-/-}$	$G\alpha_{i3}$ -Knockout (homozygot)
HFrEF	Herzinsuffizienz (Heart failure) mit reduzierter Ejektionsfraktion

HZV	Herzeitvolumen
H <sub>2</sub> O	Wasser
I <sub>CaL</sub>	L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Ströme
IPA	Ingenuity pathway analysis
ISA	Intrinsische sympathomimetische Aktivität
KHK	Koronare Herzkrankheit
Kir3/GIRK-Kanal	G-Protein-gekoppelter einwärts gleichrichtender Kaliumkanal/ G protein- coupled inward-rectifier potassium channel
LTCC	L-Typ-Calciumkanal
mAChR	Muskarinerner Acetylcholin-Rezeptor
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
mRNA	Messenger RNA
Na <sup>+</sup>	Natrium
PDE	Phosphodiesterase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ras	Akronym für rat sarcoma - Proto-Onkogen, das für ein kleines G-Protein kodiert
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma/ rat fibrosarcoma - eine Familie von Proteinkinasen
RNAi	RNA-Interferenz
RyR(2)	Ryanodinrezeptor
SGLT2	Sodium-glucose linked transporter 2
siRNA	Small interfering RNA
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Src	Akronym für sarcoma – eine Tyrosinkinase
Tnl	Troponin I
WHO	World Health Organisation

## Anmerkungen

Auf den Seiten 16-35 ist die Publikation mit dem Titel „Protective effects of  $G\alpha_{i3}$  deficiency in a murine heart-failure model of  $\beta_1$ -adrenoceptor overexpression“ abgedruckt.

Der Artikel wurde am 16. Oktober 2023 in dem Journal „Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology“ online veröffentlicht.

Die Publikation ist online unter <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02751-8> einsehbar.

Im Folgenden ist regelhaft von einem  $G\alpha_i$ -Mangel die Rede. Dabei handelt es sich um einen absoluten Mangel im Sinne eines globalen Knockout-Modells.

Der im Text verwendete Begriff „Signifikanz/ signifikant“ wurde gewählt bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0.05$ , bzw. wenn  $p < 0.05$ .

# 1. Zusammenfassung

**Hintergrund und Ziele:** In einem durch  $\beta_1$ -Adrenozeptor ( $\beta_1$ -AR) Überexpression vermittelten Mausmodell der Herzinsuffizienz war das Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  in einer Vorgängerstudie mit schädlichen Effekten assoziiert.<sup>43</sup> Aufgrund einer zunehmenden Evidenz hinsichtlich Isoform-spezifischer Funktionen der inhibitorischen G-Proteine ( $G\alpha_i$ ) war das Ziel unserer aktuellen Studie, die Rolle und Auswirkungen eines (absoluten)  $G\alpha_{i3}$ -Mangels in diesem etablierten Modell der Herzinsuffizienz zu evaluieren und inhibitorische G-Proteine als potentiell therapeutisches Target zu identifizieren.<sup>91</sup>

**Methoden:** Es wurden Mäuse mit  $\beta_1$ -AR Überexpression ( $\beta_1$ -tg),  $\beta_1$ -tg Mäuse mit zusätzlich komplettem  $G\alpha_{i3}$ -Mangel ( $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ), C57BL/6 Wildtypen und Mäuse mit alleinigem, globalen  $G\alpha_{i3}$ -Knockout ( $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ) miteinander verglichen und jeweils im Alter von 300 Tagen und 550 Tagen untersucht. Dabei wurden kardiale Funktionsparameter in vivo, Hypertrophie- und Fibrosemessungen, Expressionslevel auf mRNA- und Protein-Ebene, Proteom- sowie Überlebensdaten analysiert.<sup>91</sup>

**Ergebnisse:** Im Alter von 300 Tagen waren die Herzfunktion und das Überleben in allen Gruppen ähnlich. Im Alter von 550 Tagen zeigten die  $\beta_1$ -tg, jedoch nicht die  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  Mäuse, eine signifikant reduzierte ventrikuläre Herzfunktion (z.B. linksventrikuläre Ejektionsfraktion [EF]:  $35 \pm 18\%$  vs.  $52 \pm 16\%$ ;  $p < 0.05$ ) verglichen mit dem Wildtyp ( $59 \pm 4\%$ ) und den  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  Mäusen ( $60 \pm 5\%$ ). Die EF war bei den  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  Mäusen signifikant höher als bei den  $\beta_1$ -tg Tieren. Auch eine diastolische Funktionsstörung wurde in den  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu den  $\beta_1$ -tg Tieren verhindert. Ein Anstieg des Biomarkers ANP auf mRNA-Ebene sowie eine ventrikuläre Fibrose in den Herzen von  $\beta_1$ -tg Mäusen waren signifikant reduzierter ausgeprägt in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  Mäusen. Die Transkriptionslevel von Phospholamban, des Ryanodinrezeptors 2 und kardialem Troponin I waren in allen Gruppen ähnlich. In  $\beta_1$ -tg, jedoch nicht in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  Ventrikeln, war die Expression von Phospholamban auf Proteinebene erniedrigt, während die Phosphorylierung erhöht war. Das Überleben der  $\beta_1$ -tg Mäuse war relevant verkürzt, jedoch bei den Tieren signifikant verlängert, wenn zusätzlich  $G\alpha_{i3}$  fehlte (95%-CI: 592-655 vs. 644-747 Tage;  $p < 0.05$ ).<sup>91</sup>

**Schlussfolgerung:** Ein  $G\alpha_{i3}$ -Mangel verlangsamt oder verhindert sogar die Entwicklung einer Herzinsuffizienz in  $\beta_1$ -tg Mäusen und zeigt sich hier vorteilhaft.<sup>91</sup> Da demgegenüber im gleichen Herzinsuffizienzmodell ein  $G\alpha_{i2}$ -Mangel eine eingeschränkte kardiale Funktion vielmehr aggraviert und dies mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet ist, deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass Isoform-spezifische Eingriffe in die  $G_i$ -abhängige Signalübertragung eine vielversprechende kardioprotektive Strategie und Therapieoption, insbesondere der Herzinsuffizienz, darstellen könnten.<sup>43,91</sup>

## 2. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit über einem Drittel die Haupttodesursache in Deutschland, insbesondere aufgrund einer stetig alternden Gesellschaft erlangen sie eine fortan größere Bedeutung.<sup>1</sup> Die Prävalenz der Herzinsuffizienz mit den dazugehörigen Hospitalisierungsraten und Gesundheitsausgaben steigen kontinuierlich an, während die Häufigkeit des plötzlichen Herztods auf Basis eines akuten Herzinfarktes, bedingt durch eine Koronarokklusion, abnimmt.<sup>2-4</sup> Durch eine in den letzten Jahren erreichte Reduktion der Herzinfarktletalität mit konsekutiv höherer Anzahl an Überlebenden mit eingeschränkter Ventrikelfunktion sowie eine Verbesserung der Prognose nach Erstmanifestation einer Herzinsuffizienz per se resultiert eine wachsende Erkrankungslast.<sup>2</sup> Insgesamt belief sich die Prävalenz der Herzinsuffizienz in Deutschland im Jahr 2017 bei 3,4% mit exponentiellem Anstieg im höheren Alter.<sup>2</sup> In der Bevölkerung von 60-74 Jahren lag die durchschnittliche Prävalenz bei 5,6% und bei den über 85-Jährigen sogar bei 27,8%.<sup>2</sup> In Deutschland ist die Herzinsuffizienz die häufigste stationäre Aufnahmediagnose mit zunehmender Tendenz und hoher Mortalitätsrate.<sup>5,6</sup> Die World Health Organisation (WHO) definiert Herzinsuffizienz als verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung mit verringertem Herzzeitvolumen.<sup>7</sup> Dabei besteht eine Dysbalance zwischen dem Sauerstoffbedarf des Organismus und dem tatsächlichen Sauerstoffangebot als Folge einer inadäquaten kardialen Funktionsleistung.<sup>8</sup> Klassische Symptome als Konsequenz der kardialen Dysfunktion sind u.a. Dyspnoe, Leistungsminderung und hydropische Dekompensation mit Bildung von Ödemen.<sup>7</sup> Die Ätiologie der Herzinsuffizienz als komplexes klinisches Syndrom ist heterogen und kann dabei aufgrund geographischer Determinanten variieren.<sup>9</sup> In den westlichen Nationen sind die Koronare Herzerkrankung (KHK) und Arterielle Hypertonie (AHT) meist ursächlich, aber auch andere Faktoren wie beispielsweise Herzklappenerkrankungen, Erkrankungen des Myo-, Endo- und Perikards sowie Arrhythmien können als pathologischer Stimulus durch kardiale Schädigung im Krankheitsbild einer Herzinsuffizienz resultieren.<sup>9</sup> Pathophysiologisch führen Kompensationsmechanismen mittels vermehrter ADH-Ausschüttung, Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des Sympathikus zu einer vorübergehenden Verbesserung des Herzzeitvolumens und der Organperfusion.<sup>7,10</sup> Dies wird im Wesentlichen erwirkt durch eine Erhöhung der Herzfrequenz/ Kontraktilität, eine Vasokonstriktion mit Blutdruckanstieg sowie eine vermehrte Natrium- und Wasserretention.<sup>7,10</sup> Langfristig können diese Mechanismen, darunter auch eine übermäßige (chronische) Sympathikusaktivierung und Katecholaminausschüttung, zum (negativen) kardialen Remodeling führen, welches die Hämodynamik und das kardiovaskuläre Outcome, bzw. die kardiale Prognose verschlechtert und die bestehende Herzinsuffizienz aggraviert.<sup>7,10</sup> Diesen Circulus vitiosus gilt es therapeutisch zu adressieren.  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten, in der klinischen Praxis besser bekannt unter dem Namen  $\beta$ -Blocker/ Betablocker, sind

essentieller Bestandteil einer adäquaten medikamentösen Herzinsuffizienz-Therapie, da sie unabhängig vom Patientenalter und -geschlecht mortalitätsreduzierend wirken.<sup>11,12</sup> Der kardioprotektive und vor  $\beta$ -adrenerger (Über-) Stimulation schützende Effekt scheint in erster Linie auf einer verminderten  $G_s$ -Protein vermittelten Signalkaskade zu beruhen (Abb. 1).<sup>13</sup>  $G_s$ -Proteine sind via direkter Rezeptorbindung unmittelbare Interaktionspartner der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren ( $\beta_1$ -AR).<sup>14,15</sup> Eine Überexpression von  $\beta_1$ -AR führt im Mausmodell zu einer schweren Herzinsuffizienz.<sup>16,17</sup> Zwar resultiert auch eine Überexpression an  $\beta_2$ -Adrenozeptoren ( $\beta_2$ -AR) in einer relevanten Herzinsuffizienz, jedoch ist hier ein signifikant höheres Ausmaß an Expression erforderlich.<sup>18</sup>  $\beta_2$ -AR binden sowohl an stimulierende ( $G_s$ ), als auch an inhibitorische ( $G_i$ ) G-Proteine (Abb. 2).<sup>14</sup> Es wird angenommen, dass  $G_i$ -Proteine am Schutz vor übermäßiger  $\beta$ -adrenerger Stimulation bei der Herzinsuffizienz beteiligt sind und somit protektiv wirken.<sup>19,20</sup>  $\beta_2$ -AR nachgeschaltete,  $G_i$ -Protein-vermittelte Signale haben sich als anti-apoptotisch erwiesen.<sup>21</sup> Bei Herzinsuffizienz ist das Expressionsniveau von  $G_s$ -Proteinen unverändert, während dies der  $G_i$ -Proteine gesteigert ist.<sup>14,22,79-81</sup> Trotz augenscheinlicher Unterschiede zwischen den  $\beta$ -Adrenozeptor-Isoformen hinsichtlich der G-Protein-Kopplung, scheinen  $G_i$ -Proteine grundsätzlich sowohl die  $\beta_1$ - als auch die  $\beta_2$ -adrenerge vermittelte Signalkaskade zu beeinflussen.<sup>23-25</sup> Die Literatur ist uneinheitlich bezüglich eines postulierten  $G_i$ -Protein vermittelten kardioprotektiven Effekts der  $\beta_2$ -AR-Stimulation, bzw. wird von einigen Autoren die Annahme angezweifelt, dass der  $G_i$ -Protein-Signalweg per se einen kardial schützenden Effekt habe.<sup>26-28</sup> Im Wesentlichen werden zwei  $G\alpha_i$ -Isoformen,  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_{i3}$ , unterschieden, die im kardiovaskulären System exprimiert werden und dabei eine vergleichbare bis entgegengesetzte Wirkung zu haben scheinen (Abb. 2).<sup>29-39</sup> Hierbei wird augenscheinlich  $G\alpha_{i2}$  im Vergleich zu  $G\alpha_{i3}$  quantitativ stärker exprimiert.<sup>35,40</sup> Mäuse mit globalem  $G\alpha_{i2}$ - und  $G\alpha_{i3}$ - Mangel zeigten keinen offensichtlichen kardialen Phänotyp in vivo und ex vivo.<sup>41</sup> In einem Infarktmodell mit induziertem myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden bei Mäusen führte das Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  zu einer Aggravation des kardialen Schadens, wohingegen das Fehlen von  $G\alpha_{i3}$  vorteilhaft war.<sup>35</sup> Die im geschädigten, bzw. insuffizienten Myokard beobachtete vermehrte  $G\alpha_{i2}$ -Expression könnte als kompensatorisch interpretiert werden, wohingegen die Rolle von  $G\alpha_{i3}$  unklar bleibt.<sup>40,42</sup>

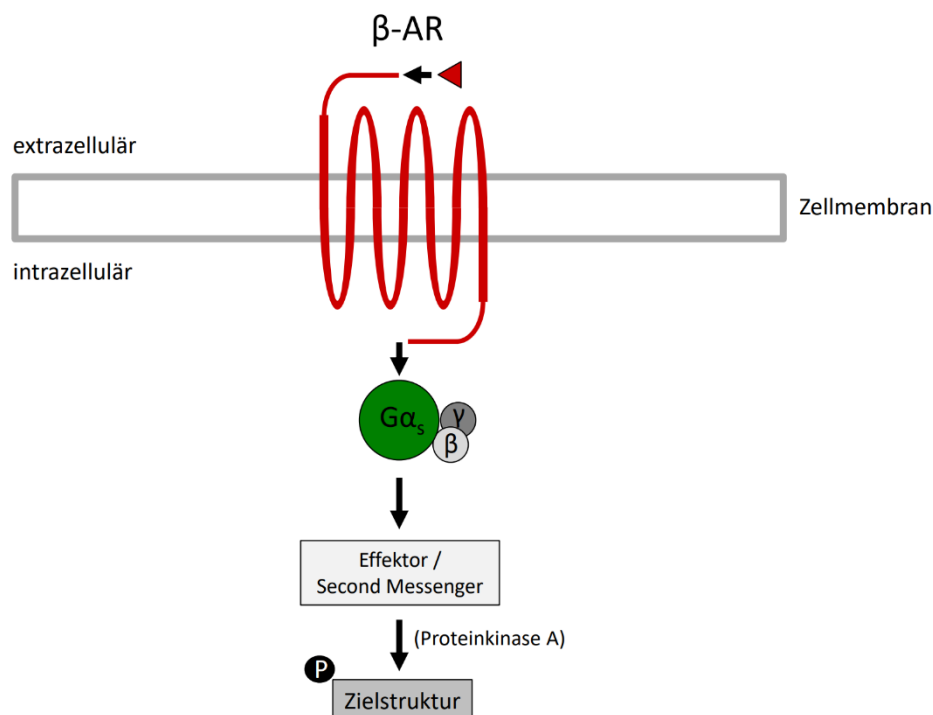
#### Fragestellung:

In einer vorausgegangenen Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  in  $\beta_1$ -transgenen ( $\beta_1$ -tg) Mäusen mit schädlichen Effekten vergesellschaftet war.<sup>43</sup> Das Überleben der  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i2}^{-/-}$  Mäuse war im Vergleich zu  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{i2}^{-/-}$  und Wildtyp- (C57BL/6J) Tieren erheblich reduziert und sie zeigten eine signifikant eingeschränkte kardiale Funktion.<sup>43</sup> Diese beobachteten Effekte traten bereits in einem Alter der Tiere von 300 Tagen auf.<sup>43</sup> Zu dem Zeitpunkt waren die o.g. Vergleichsgruppen dahingehend unauffällig.<sup>43</sup> Der kardiale Phänotyp  $\beta_1$ -tg Mäuse tritt in einem Alter

von etwa 550 Tagen auf.<sup>43,44</sup> Vor dem Hintergrund der vermeintlichen Ähnlichkeit der eng verwandten Isoformen  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_{i3}$  auf der einen Seite und den wiederum Isoform-spezifischen Funktionen auf der anderen Seite untersuchten wir nun den Einfluss eines (absoluten)  $G\alpha_{i3}$ -Mangels auf die kardiale Funktion von  $\beta_1$ -tg Mäusen.<sup>91</sup> Insbesondere fragten wir uns hierbei, ob das Fehlen von  $G\alpha_{i3}$  in  $\beta_1$ -tg Mäusen mit

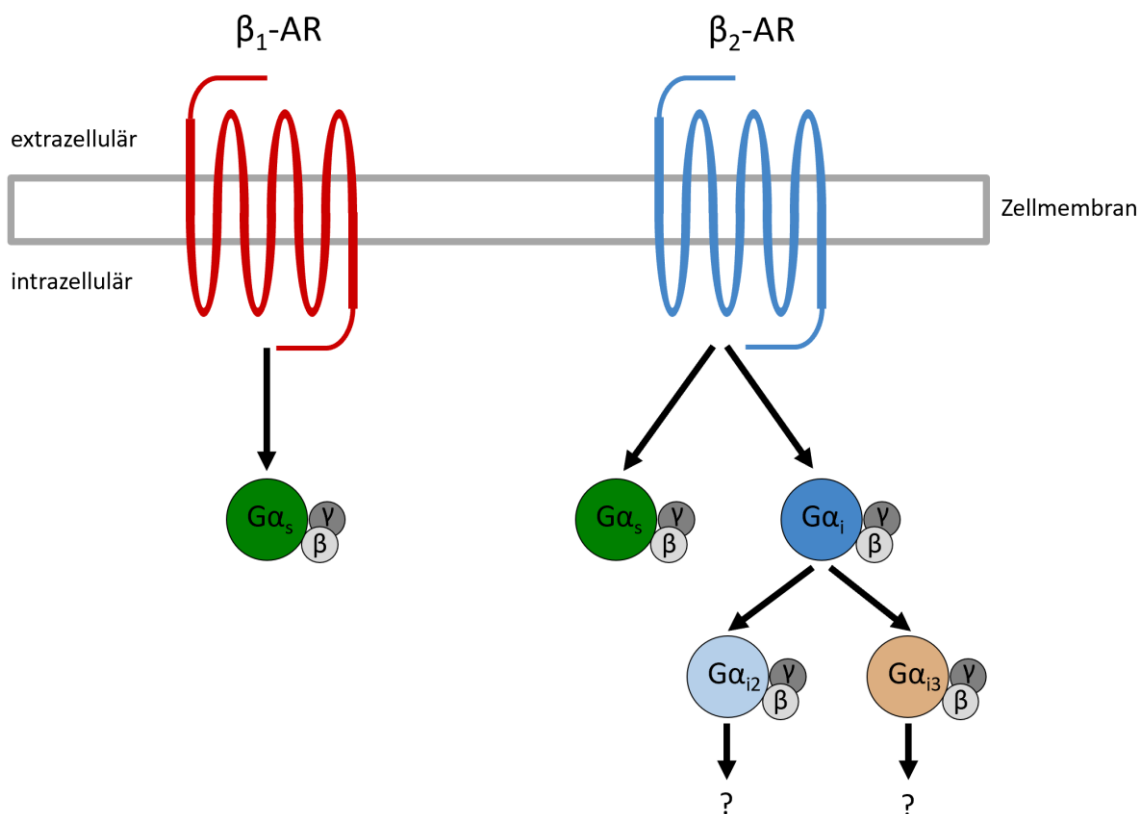
- einer darüber hinaus zunehmenden kardialen Einschränkung,
- keinem spezifischen Effekt oder
- sogar mit einem kardialen Benefit im Rahmen des Herzinsuffizienzmodells assoziiert sein und damit als mögliches therapeutisches Target zu betrachten sein könnte.<sup>91</sup>

Zusätzlich sollten explorative Untersuchungen Hinweise auf die dem  $G_i$ -Protein vermittelten Signalling zugrundeliegenden molekularen Mechanismen liefern.<sup>91</sup>



**Abbildung 1. Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des Beta-Adrenozeptors.** Beta-Adrenozeptoren ( $\beta$ -AR) gehören zu der Gruppe transmembraner G-Protein gekoppelter Rezeptoren, die Signale von extrazellulär via G-Proteinen in das Zellinnere weiterleiten.<sup>67</sup> Auslöser der Signalkaskade sind im Fall der  $\beta$ -AR neuroendokrine Botenstoffe, die sogenannten Katecholamine.<sup>67</sup> Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -

Untereinheit).<sup>68,69</sup> Die teils von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziierte  $\alpha$ -Untereinheit bindet GDT/GTP mit GTPase-Aktivität und leitet als aktive Einheit die Signalübertragung über Effektormoleküle und Second Messenger weiter.<sup>68,69</sup> Auch eine Signalregulation über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit ist möglich.<sup>68,69</sup> Über G-Proteine erfolgt eine Signalweiterleitung, die in einer Phosphorylierung unterschiedlicher intrazellulärer molekularer Interaktionspartner/ Zielstrukturen mündet.<sup>68,69</sup>



**Abbildung 2. Bindungen der  $\beta$ -Adrenozeptoren an G-Proteine sowie kardial relevante  $G\alpha_i$ -Isoformen.**

$\beta_1$ -Adrenozeptoren binden an stimulierende G-Proteine ( $G\alpha_s$ ), wohingegen  $\beta_2$ -Adrenozeptoren sowohl an stimulierende ( $G\alpha_s$ ), als auch inhibitorische G-Proteine ( $G\alpha_i$ ) binden.<sup>14</sup> Die im kardiovaskulären System wesentlich exprimierten  $G\alpha_i$ -Proteine sind die Isoformen  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_{i3}$ .<sup>29-39</sup> Trotz struktureller Ähnlichkeit dieser Isoformen gibt es vermehrt Hinweise hinsichtlich Subtyp-spezifischer Funktionen.<sup>29-</sup>

<sup>39</sup> Die exakten molekularen Mechanismen und Effekte sind bislang nicht gänzlich verstanden.





# Protective effects of $G\alpha_{i3}$ deficiency in a murine heart-failure model of $\beta_1$ -adrenoceptor overexpression

Tobias Schröper<sup>1,2</sup> · Dennis Mehrkens<sup>2,3</sup> · Veronika Leiss<sup>4</sup> · Frederik Tellkamp<sup>5</sup> · Stefan Engelhardt<sup>6</sup> · Stefan Herzig<sup>1,7</sup> · Lutz Birnbaumer<sup>8,9</sup> · Bernd Nürnberg<sup>4</sup> · Jan Matthes<sup>1</sup>

Received: 8 August 2023 / Accepted: 26 September 2023  
© The Author(s) 2023

## Abstract

We have shown that in murine cardiomyopathy caused by overexpression of the  $\beta_1$ -adrenoceptor,  $G\alpha_{i2}$ -deficiency is detrimental. Given the growing evidence for isoform-specific  $G\alpha_i$ -functions, we now examined the consequences of  $G\alpha_{i3}$  deficiency in the same heart-failure model. Mice overexpressing cardiac  $\beta_1$ -adrenoceptors with ( $\beta_1$ -tg) or without  $G\alpha_{i3}$ -expression ( $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ) were compared to C57BL/6 wildtypes and global  $G\alpha_{i3}$ -knockouts ( $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ). The life span of  $\beta_1$ -tg mice was significantly shortened but improved when  $G\alpha_{i3}$  was lacking (95% CI: 592–655 vs. 644–747 days). At 300 days of age, left-ventricular function and survival rate were similar in all groups. At 550 days of age,  $\beta_1$ -tg but not  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice displayed impaired ejection fraction ( $35 \pm 18\%$  vs.  $52 \pm 16\%$ ) compared to wildtype ( $59 \pm 4\%$ ) and  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice ( $60 \pm 5\%$ ). Diastolic dysfunction of  $\beta_1$ -tg mice was prevented by  $G\alpha_{i3}$  deficiency, too. The increase of ANP mRNA levels and ventricular fibrosis observed in  $\beta_1$ -tg hearts was significantly attenuated in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice. Transcript levels of phospholamban, ryanodine receptor 2, and cardiac troponin I were similar in all groups. However, Western blots and phospho-proteomic analyses showed that in  $\beta_1$ -tg, but not  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  ventricles, phospholamban protein was reduced while its phosphorylation increased. Here, we show that in mice overexpressing the cardiac  $\beta_1$ -adrenoceptor,  $G\alpha_{i3}$  deficiency slows or even prevents cardiomyopathy and increases shortened life span. Previously, we found  $G\alpha_{i2}$  deficiency to aggravate cardiac dysfunction and mortality in the same heart-failure model. Our findings indicate isoform-specific interventions into  $G_i$ -dependent signaling to be promising cardio-protective strategies.

**Keywords** Adrenergic receptor ·  $G_i$  protein · Cardiomyopathy · Heart failure · Cardioprotection

Tobias Schröper, Dennis Mehrkens, and Veronika Leiss contributed equally to this work.

✉ Jan Matthes  
jan.matthes@uni-koeln.de

<sup>1</sup> Center of Pharmacology, Department II, University of Cologne and University Hospital Cologne, Cologne, Germany

<sup>2</sup> Department of Internal Medicine III, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany and Centre for Molecular Medicine Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>3</sup> Centre for Molecular Medicine Cologne, CMMC, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>4</sup> Department of Pharmacology, Experimental Therapy and Toxicology, Institute for Experimental and Clinical Pharmacology and Pharmacogenomics, and Interfaculty Centre for Pharmacogenomics and Drug Research, Eberhard Karls Universität, Tübingen, Germany

<sup>5</sup> CECAD Research Centre Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>6</sup> Institute of Pharmacology and Toxicology, Technische Universität München, Munich, Germany

<sup>7</sup> TH Köln-University of Applied Sciences, Cologne, Germany

<sup>8</sup> Laboratory of Signal Transduction, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, Durham, North Carolina, USA

<sup>9</sup> Institute of Biomedical Research, School of Medical Sciences, Catholic University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

## Introduction

Heart failure is a major cause of cardiovascular diseases affecting at least 26 million people worldwide (Savarese and Lund 2017).  $\beta$ -Adrenoceptor antagonists are a cornerstone in the therapy of chronic heart failure because some have been proven to reduce mortality independent of age and gender of the patients (Kotecha et al. 2016, 2017). Guarding the heart from (excessive)  $\beta$ -adrenergic stimulation seems to be cardio-protective mainly by preventing  $G_s$ -protein mediated signalling (Baker 2014).  $G_s$ -proteins are the cognate interaction partners of  $\beta_1$ -adrenoceptors (Xiao et al. 1999; Seyedabadi et al. 2019). Overexpression of  $\beta_1$ -adrenoceptors ( $\beta_1$ -AR) in murine hearts has been shown to cause dilative cardiomyopathy leading to severe heart failure (Engelhardt et al. 1999, 2001a). Although cardiac overexpression of  $\beta_2$ -adrenoceptors ( $\beta_2$ -AR) also leads to cardiac failure, a significantly higher level of overexpression is required (Liggett et al. 2000).  $\beta_2$ -Adrenoceptors couple to both  $G_s$  and  $G_i$  proteins (Xiao et al. 1999).  $G_i$  proteins are thought to be involved in the protection against excessive  $\beta$ -adrenergic stimulation in heart failure (Brown and Harding 1992; El-Armouche et al. 2003), and  $G_i$ -protein-mediated signaling downstream from  $\beta_2$ -AR has been shown to be anti-apoptotic (Chesley et al. 2000). Despite the differences between  $\beta$ -adrenoceptor isoforms regarding G-protein coupling, it should be considered that  $G_i$  proteins seem to modulate both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic signalling (Li et al. 2004; Martin et al. 2004; Melsom et al. 2014). It has to be mentioned that not all studies support the idea of  $G_i$  proteins mediating the cardio-protective effects of  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation (Xiao et al. 2003; Ahmet et al. 2005) or of  $G_i$ -protein signaling being cardio-protective in general (Hussain et al. 2013). At least two  $G\alpha$ -isoforms,  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_{i3}$ , are expressed in the cardiovascular system, which have been shown to interplay (Thompson et al. 2007) and to exhibit redundant but also distinct functions (Gohla et al. 2007; Dizayee et al. 2011; Plummer et al. 2012; Wiege et al. 2012, 2013; Köhler et al. 2014; Wang et al. 2014; Devanathan et al. 2015; Mauriac et al. 2017; Beer-Hammer et al. 2018). Of particular interest, in a murine ischemia–reperfusion model, Köhler et al. showed lack of  $G\alpha_{i2}$  to worsen cardiac damage while lack of  $G\alpha_{i3}$  was beneficial (Köhler et al. 2014). Thus, the increased  $G\alpha_{i2}$ -expression observed in failing myocardium might be interpreted as compensatory, while the role of  $G\alpha_{i3}$  remains unclear (Eschenhagen et al. 1992b; Kompa et al. 1999).

In a previous study, we reported that lack of  $G\alpha_{i2}$  ( $G\alpha_{i2}^{-/-}$ ) had detrimental effects in  $\beta_1$ -transgenic ( $\beta_1$ -tg) mice (Keller et al. 2015): survival of  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i2}^{-/-}$  mice was drastically shortened, and these animals showed a

significantly impaired cardiac function. This occurred already at an age of about 300 days, i.e., when  $\beta_1$ -tg or  $G\alpha_{i2}^{-/-}$  mice were unaffected in this regard. Considering the unknown consequences of functional isoform redundancy between the closely related  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_{i3}$  proteins on the one hand and isoform-specific, distinct functions on the other hand, we now examined the impact of  $G\alpha_{i3}$  deficiency on cardiac function of  $\beta_1$ -tg mice. In particular, we asked whether the lack of  $G\alpha_{i3}$  impairs heart function of  $\beta_1$ -tg mice, is not detrimental, or may even rescue from  $\beta_1$ -AR-induced cardiomyopathy.

We find  $G\alpha_{i3}$  deficiency to be cardio-protective in terms of slowing down or even preventing the development of  $\beta_1$ -AR-induced cardiomyopathy. Together with previous findings, our study indicates isoform-specific targeting of  $G\alpha$ -protein-mediated signaling to be a promising novel strategy to treat cardiovascular diseases. Parts of the data have already been published as a conference abstract (Schröper et al. 2020).

## Methods

### Mouse models

Mice with cardiac overexpression of the human  $\beta_1$ -AR ( $\beta_1$ -tg) have been described earlier (Engelhardt et al. 1999). We had backcrossed these FVB/N-based transgenic mice to a C57BL/6 J background (Keller et al. 2015). In the current study,  $\beta_1$ -tg mice were crossbred with mice globally lacking  $G\alpha_{i3}$  (Gohla et al. 2007), to produce  $\beta_1$ -tg  $G\alpha_{i3}$ -deficient mice ( $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ). Age-matched wildtype and  $G\alpha_{i3}$ -deficient ( $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ) littermates served as controls. Animals of both sexes were used for our study (sex distribution given in table S1). We kept mice in individually ventilated cages with a 12 h/12 h dark/light cycle and food and water ad libitum. For genotyping, tail or ear clips from 3-week-old mice were processed. Genomic DNA was prepared and genotyping PCR for  $G\alpha_{i3}$  and the  $\beta_1$ -AR was performed as described previously (Dizayee et al. 2011; Keller et al. 2015). Animals were killed by cervical dislocation. Since, in a previous study, cardiac  $\beta_1$ -AR overexpression on a C57BL/6 J background by itself had no effect on cardiac function or survival at the age of 300 days (Keller et al. 2015), we chose a second target age to address putative effects of  $G\alpha_{i3}$  deficiency in  $\beta_1$ -tg mice. Based on our own data and the report of another group, we thus additionally analyzed animals at the age of 550 days (Lee et al. 2015; Keller et al. 2015). The responsible federal state authority approved animal breeding, maintenance and experiments (Landesamt fuer Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen; references: 84–02.05.20.12.294, 84–02.05.20.13.060, and 84–02.04.2016.A422). All animal experiments complied

with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

### Ventricle-to-body-weight ratio

Non-fasting mice were weighed directly before being killed. Immediately after cervical dislocation, we removed the heart, cut the atria and eliminated remaining intraventricular blood. We analyzed mice at an age of  $304 \pm 7$  days and at the second target age of  $553 \pm 6$  days, including mice just examined by echocardiography.

### Histology and histomorphometrical analysis of fibrotic area

Only mice at the advanced age ( $553 \pm 3$  days) were used for this analysis. Cryo-Sects ( $6 \mu\text{m}$  thickness) were obtained from excised hearts frozen in liquid nitrogen, fixed in ice-cold acetone, subsequently immersed in Roti®-Histol for 10 min at room temperature, and transferred to water through descending concentrations of ethanol (100%, 96%, 75%). Staining was performed using a 0.1% solution of Sirius Red F3BA in saturated aqueous solution of picric acid for 45 min at  $25^\circ\text{C}$ . Subsequently, slices were rinsed in 1% acetic acid for 2 min. Sections were dehydrated in ascending concentrations of ethanol (75%, 96%, and 100%, each 1 min) and cleared in two stages in Roti®-Histol, 10 min each. Sections were covered with Roti®-Histokitt mounting medium (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and a glass cover slip. After scanning the Picro Sirius Red sections with the Keyence BZ-9000E microscope, images were taken at mid-ventricular level ( $\times 20$  magnification), and interstitial fibrosis was quantified as percentage of total tissue area in the field of view. Planimetry was performed using a Keyence BZ2-Analyser software using hybrid cell count algorithm (Keyence, Osaka, Japan).

### Echocardiography

Echocardiography was performed using the high-frequency VisualSonics Vevo® 3100 Imaging System (Fujifilm) with a MX550D transducer (22–55 MHz; axial resolution:  $40 \mu\text{m}$ ). Mice were prepared and examined under light inhalation anesthesia with oxygen and 1.5% isoflurane through a nose cap. Chest and upper abdominal hair was shaved, and the mice were placed on a warmed platform to maintain physiological conditions. We monitored ECG, heart rate, core temperature, and respiratory frequency. Systolic parameters were obtained by using the B- and M-Mode in parasternal long and short axis views of the left ventricle. Doppler flow profiles were acquired to estimate the isovolumic relaxation time (IVRT), an indicator of diastolic ventricular function.

We evaluated the ultrasound imaging data by working with the software Vevo LAB (Fujifilm). Strain analyses via Speckle Tracking were performed by using the Vevo Strain Software (Fujifilm). Younger mice used for echocardiographic investigation were  $303 \pm 4$ , older  $551 \pm 13$  days of age.

### Survival analysis

Survival was analyzed by Kaplan–Meier estimation and log-rank test. We defined a priori “spontaneous” death as the event of interest, while being killed for any reason (e.g., organ removal) and survival at the end of the study were considered censored events. Mice used for breeding were not included into the survival analysis. Total numbers of mice included in our analysis were 408, 262, 157, and 82 for wildtype,  $\beta_1\text{-tg}$ ,  $\text{G}\alpha_{13}^{-/-}$ , and  $\beta_1\text{-tg}/\text{G}\alpha_{13}^{-/-}$ , respectively. Numbers of events of interest during the period of observation were 17, 52, 11, and 13, respectively.

### Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to reveal the relative ventricular mRNA-expression levels of the  $\text{G}_i$  isoforms  $\text{G}\alpha_{12}$  (*Gnai2*) and  $\text{G}\alpha_{13}$  (*Gnai3*), the cardiomyopathy markers atrial natriuretic peptide ANP (*Nppa*) and brain natriuretic peptide BNP (*Nppb*), and the phosphorylation targets of protein kinase A (PKA) ryanodine receptor 2 (*Ryr2*), phospholamban (*Pln*), and troponin I (*Tnni3*). Ventricles were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until mRNA-isolation. All procedures were performed according to the manufacturer’s protocol (QIAGEN, Hilden, Germany). The RNeasy® Fibrous Tissue Kit (QIAGEN) was used to isolate the mRNA. Quality and quantity of the purified mRNA were controlled by NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Reverse transcription was done by using the QuantiTect® Reverse Transcription Kit (QIAGEN). All qPCRs were run in triplicates with the ORA™ qPCR Green ROX L Mix, 2X Kit (highQu). Primer pairs for *Gnai2*, *Gnai3*, *Nppa*, *Nppb*, *Ryr2*, *Pln*, and *Tnni3* have been reported before (Dizayee et al. 2011; Wiese et al. 2012; Bai et al. 2013; Keller et al. 2015) and are listed in Table S2. The gene encoding 40S ribosomal protein S29 (*Rps29*) served as a housekeeping gene (Figure S1). The qPCR was initiated with incubation at  $95^\circ\text{C}$  for 15 min. Next, 45 cycles of denaturation were conducted at  $95^\circ\text{C}$  for 15 s. Subsequently, annealing at  $60^\circ\text{C}$  for 25 s, and elongation at  $72^\circ\text{C}$  for 10 s were applied with a transition rate of  $20^\circ\text{C}$  per second. A melting curve analysis was performed at the end to control the product purity at  $64^\circ\text{C}$  for 1 min with a transition rate of  $0.1^\circ\text{C}$  per second. Younger mice used for mRNA-analyses were  $301 \pm 4$ , older  $554 \pm 5$  days of age.

## Western blot analysis

Liquid-frozen ventricles were homogenized in 500  $\mu$ l protein lysis buffer (20 mmol/l Tris, pH 8.3; 0.67% SDS; 238 mmol/l 2-mercaptoethanol; 0.2 mmol/l PMSF). Electrophoretic separation of  $G\alpha_i$  isoforms was performed in gels containing 6 M urea (Gohla et al. 2007). The proteins were visualized by immunodetection using the following primary antibodies described elsewhere (Beer-Hammer et al. 2018): rabbit anti- $G\alpha_{i1/2}$  (7.2 ng/ml) (Leiss et al. 2020), rabbit anti- $G\alpha_{i3}$  (50 ng/ml) (Vega et al. 2020). The protein levels of  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_{i3}$  were quantified using densitometric analysis software (Image Lab; Bio-Rad, Gräfelfing, Germany) and were normalized to the levels of GAPDH (#2118; Cell Signalling Technology, Frankfurt, Germany) of the same samples. Twenty micrograms protein per lane were loaded. The membranes were first stained with the  $G\alpha_{i2}$  or  $G\alpha_{i3}$  antibody, respectively. Membranes were then stripped and stained with the Akt antibody, stripped again, and subsequently stained with the GAPDH antibody to control for equal loading. Ventricles from three animals per genotype were analyzed in three independent experiments. For size orientation, protein standards were loaded (BioRad Precision Plus Protein Standard Dual Colour, and Nippon Genetics BlueStar PLUS Prestained Protein Standard). For the analysis of Akt phosphorylation, we used rabbit antibodies recognizing either total Akt or pAkt only when phosphorylated at Ser473 (#9272 and #9271; Cell Signalling Technology). Phospholamban expression was determined using a mouse monoclonal antibody provided by Badrilla Ltd. (#A010-14). Younger mice used for Western blot analyses were  $307 \pm 8$ , older mice  $552 \pm 8$  days of age.

## Myocyte preparation for proteomics analyses

We isolated ventricular myocytes from wildtype,  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice ( $n=3$  each; age:  $200 \pm 56$  days). Isolation followed a modified procedure according to Ackers-Johnson et al. (Ackers-Johnson et al. 2016). The chest of anesthetized mice was opened to expose the heart. Descending aorta was cut, and the heart was immediately flushed by injection of 7 ml EDTA buffer into the right ventricle. The heart was removed, and ascending aorta was retrogradely cannulated. Digestion was achieved by sequential injection of 10 ml EDTA buffer, 3 ml perfusion buffer, and 20 ml Liberase buffer (Roche, Liberase TM 0.05 mg/ml) via coronary circulation. Ventricles were then gently pulled into 1-mm pieces using forceps. Cellular dissociation was completed by gentle trituration, followed by addition of 5 ml stop buffer (perfusion buffer containing 5% FBS). Cell suspension was passed through a 100- $\mu$ m filter, and cells underwent 4 sequential rounds of gravity settling, using perfusion buffer. The supernatant was discarded. The

cell pellet in each round was enriched with myocytes and ultimately formed a highly pure myocyte fraction. Cardiomyocyte yields and percentage of viable rod-shaped cells were controlled under an inverse microscope. The final pellet was lysed in buffer (4% SDS in 100 mM Tris/HCl, pH 7.6). Lysates were homogenized, heated at 70 °C for 10 min, and clarified by centrifugation and protein concentrations were determined using the Bio-Rad DC assay. Proteins (1 mg) were precipitated with acetone for 1 h at  $-20$  °C. The pellet was washed with 80% acetone once and resuspended in 8 M urea buffer (6 M thiourea, 2 M urea in 10 mM HEPES pH 7.5). Proteins were reduced with DTT (10 mM), alkylated with IAA (55 mM) and digested for 3 h with LysC (1:50 enzyme:substrate ratio, Wako chemicals). For further digestion with Trypsin (1:100 enzyme:substrate ratio, Promega), samples were diluted with ammonium bicarbonate buffer (50 mM). For whole proteomics analysis, aliquots of 50  $\mu$ g were taken and desalted on stage tips. For phospho-proteomic analysis, the remaining 950  $\mu$ g peptide solution was desalted using SepPak C18 cartridges and dried, and phospho-peptides were enriched using the High-Select TiO<sub>2</sub> Phosphopeptide Enrichment Kit (Thermo scientific) following the manufacturer's instruction.

## Proteomics analyses: sample measurement and data processing

Samples were measured on a Q Exactive Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap mass spectrometer (MS) coupled to an EASY-nLC 1000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific) and analyzed with a 240 min gradient using Top 10 DDA method. Phospho-proteomic samples were analyzed with a 90 min gradient using Top 10 DDA method. Raw MS data files were analyzed using MaxQuant software (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany) (Cox and Mann 2008). We used the Uniprot Mouse database (release November 2019) extended by the human  $\beta_1$ -AR (hADRB1) sequence for spectral matching. Default settings were used, and peptides and proteins were identified using a false discovery rate (FDR) of 1%. As variable modification, p(STY) was enabled. To appreciate the biological significance of the differentially phosphorylated proteins, the ingenuity pathway analysis (IPA, QIAGEN, Germany) was used to predict regulated ontology lists, "tox lists" and networks related to cardiovascular function and disease.

## Parameters analyzed

With respect to our previous study (Keller et al. 2015), we defined ventricle- to body-weight ratio, conventional echocardiographic parameters of systolic left-ventricular (LV) function (ejection fraction, LV end-systolic volume, LV end-diastolic volume, LV end-systolic length), survival time,

mRNA-expression levels of *Gnai2*, *Gnai3*, *Nppa*, *Nppb*, *Ryr2*, *Pln*, and *Tnni3*, as well as protein expression levels of  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_{i3}$  as primary parameters. We furthermore included left-ventricular global longitudinal strain (GLS), isovolumic relaxation time (IVRT), and the ratio of E' and A' (early and late ventricular relaxation velocity) as additional echocardiographic parameters. GLS, derived from speckle tracking-based echocardiography, is a sensitive parameter for early detection of LV systolic and diastolic dysfunction and has been shown to be an independent predictor of all-cause mortality in (human) heart failure with reduced ejection fraction (Sengeløv et al. 2015; de Lucia et al. 2019). IVRT and the E' to A' ratio are sensitive indicators of diastolic function (Alex et al. 2018; Schnelle et al. 2018). Furthermore, fibrotic alterations were quantified as percentage of tissue area in ventricular slices. Western blots were performed to reveal the level of phospholamban expression and the ratio of phosphorylated to total Akt. Levels of protein expression and phosphorylation were furthermore obtained by mass spectrometry done with cardiomyocyte homogenates. Non-primary parameters were obtained and analyzed with an exploratory intention.

### Performance of experiments and data analysis

Animals have not explicitly been chosen for a specific experiment or a specific date in a prospective manner. Thus, sequence of investigation was by chance due to availability of an animal at an appropriate age. Sequence of analysis was by chance, too. We did not apply specific methods for randomization of the sequence of experiments or analyses or for blinding of the experimenters. Thus, the analyses were neither specifically blinded nor actively unblinded. Knowledge of the genotype to the investigator may therefore have occurred by chance in individual cases.

### Data presentation and statistical analysis

Data are depicted as scatter plots and reported as mean  $\pm$  standard deviation (SD) in the text. Scatter plots were created using GraphPad Prism and show median and interquartile range or mean  $\pm$  SD. We performed ANOVAs that (if significant) were followed by Bonferroni-corrected post-tests comparing all groups with respect to most primary parameters (“Performance of experiments and data analysis” section). For mRNA as well as PLN protein expression, we applied Holm-Šídák post-tests referring to age-matched wildtype littermates. In addition,  $\beta_1$ -tg and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice were compared here. In case of *Gnai3* mRNA, wildtype and  $\beta_1$ -tg mice were compared by non-parametric Mann-Whitney test. Due to data distribution, log<sub>10</sub> values of  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  were analyzed with respect to ANP and BNP mRNA expression. Due to the small number of samples, we

applied the pair wise fixed reallocation randomization test<sup>®</sup> using the REST-2009<sup>®</sup> software for mRNA expression in mice at 300 days of age (Pfaffl 2002). The distribution of EF and IVRT values within two groups was compared using a two-sided Fisher’s exact test. Sample size estimation for echocardiography was performed a priori using G\*Power 3.1.9.2 software (Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Germany). In general, sample sizes were not increased after reviewing the corresponding data, except for qPCR, where the sample size was increased from  $n=4$  to  $n=6-12$  per group during a process of manuscript revision. Survival times are reported as mean and 95% confidence interval (CI). Survival analysis was performed by Kaplan–Meier estimation followed by the log-rank test. Throughout, we considered  $p$  values  $<0.05$  as indicating statistically significant differences in confirmatory analyses, i.e., analyses of the primary parameters according to our main scientific questions (see “Parameters analyzed” and “Introduction”). In figures, asterisks then indicate  $p$  values below 0.05 (\*) and 0.01 (\*\*), respectively. If statistical tests were applied with an exploratory intent (see “Parameters analyzed”),  $p$  values are given as numbers down to 0.001, but not indicated by asterisks. Statistical approaches have been specified a priori, except for the analysis of distribution of EF and IVRT values (“ $G\alpha_{i3}$  deficiency reduces risk of ventricular dysfunction in  $\beta_1$ -tg mice” section) that was applied due to the apparent partial overlap of data from  $\beta_1$ -tg and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice, respectively, and the calculation of Cohen’s  $d$  affects sizes that was done using the Psychometrica online effect size calculators (Table S3) (Lenhard and Lenhard 2016). From some animals/tissue probes, we obtained more than one parameter. No particular statistical approach was taken to account for this.

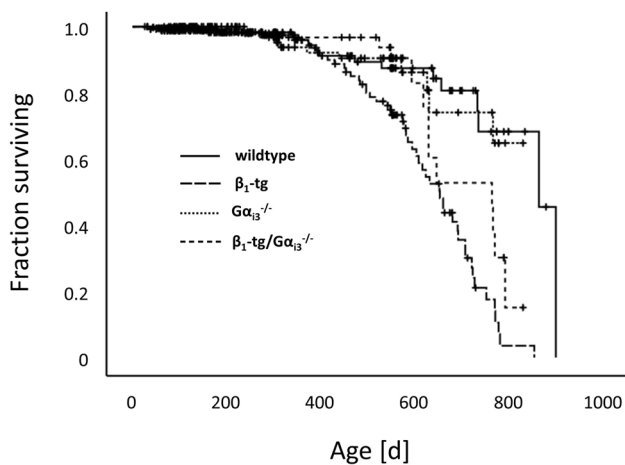
## Results

### $G\alpha_{i3}$ deficiency prolongs survival time in $\beta_1$ -tg animals

In order to get insights into the individual role of the  $G\alpha_{i3}$  protein in murine cardiomyopathy, mice overexpressing the cardiac  $\beta_1$ -adrenoceptor but globally lacking the  $G\alpha_{i3}$  protein ( $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ) were compared to  $\beta_1$ -adrenoceptor overexpressing ( $\beta_1$ -tg),  $G\alpha_{i3}$ -deficient ( $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ), and wildtype mice. In all mouse lines used, the distribution of genotypes followed Mendel’s rule and that of sex was almost equal (48% male and 52% female). Mice showed no obvious physical phenotype and normal behavior. Deaths occurred suddenly in all groups, at best preceded sporadically by (unspecific) symptoms, e.g., reduced ingestion, striking behavior, or impaired movement.

Survival is a major outcome parameter of heart-failure studies, and in our previous study, we found that  $G\alpha_{i2}$  deficiency caused a significantly shortened lifetime of  $\beta_1$ -tg mice (Keller et al. 2015). In the current study, we followed the survival of the mice up to a maximum age of 880 days. Kaplan-Meier estimation and log-rank tests revealed that the mean survival time of  $\beta_1$ -tg mice was 624 days (95% CI: 592–655), significantly shorter than that of all other genotypes (Fig. 1). Importantly, the concomitant absence of  $G\alpha_{i3}$  increased the mean life span of  $\beta_1$ -tg mice to 696 days (644–747), which was no longer statistically different from the survival time of 789 days for wildtype (739–840) and 742 days for  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice (693–790), respectively.

In summary, the life span of  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice was significantly longer than that of  $\beta_1$ -tg mice and was not



**Fig. 1** Life span of  $\beta_1$ -tg mice is significantly shortened compared to wildtype,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , as well as  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice. Total numbers of mice included in our analysis were 408, 262, 154, and 82 for wildtype,  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , respectively. Numbers of spontaneous deaths during the period of observation were 17, 52, 11, and 13, respectively. Kaplan-Meier estimation and log-rank test were applied. Vertical ticks indicate censored events

statistically different from that of wildtype littermates, whereas in a previous study, the absence of  $G\alpha_{i2}$  shortened the life expectancy of  $\beta_1$ -tg mice.

### Study of animals at an age of 300 days

Given that  $G\alpha_{i2}$  deficiency already showed adverse effects in 300-day-old  $\beta_1$ -tg mice (Keller et al. 2015), we first focused on effects of  $G\alpha_{i3}$  deficiency at this age.

### No cardiac hypertrophy or dysfunction at an age of 300 days

Survival rates of wildtype,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ,  $\beta_1$ -tg, and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  were similar at an age of 300 days (see Fig. 1). Ventricle-to-body-weight ratio and echocardiographic parameters of ventricular function were comparable in all groups (Table 1). Only the heart rate was significantly increased in  $\beta_1$ -tg mice, which was even more pronounced in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  animals. ANP (*Nppa*) and especially BNP (*Nppb*) are useful markers of cardiac hypertrophy and heart failure. Neither *Nppa* nor *Nppb* mRNA levels showed statistically significant alterations in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  or  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  ventricles compared to wildtypes (Table 2). However, similar to our previous findings (Keller et al. 2015), *Nppb* mRNA levels were significantly increased in ventricles of  $\beta_1$ -tg mice already at this younger age ( $304 \pm 145\%$  of wildtype levels,  $p < 0.05$ ; Table 2). Expression levels of ryanodine receptor type 2 (*Ryr2*), phospholamban (*Pln*), and Troponin I (*Tnni3*) mRNA were similar in the ventricles of all genotypes (Table 2).

*Gnai2* mRNA expression levels were dominant over *Gnai3* in wildtype ventricles (data not shown) and similar to wildtype mice in ventricular tissue from  $\beta_1$ -tg,  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  or  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice (Table 2). As expected, *Gnai3* mRNA expression was not detectable in ventricles of

**Table 1** Ventricle- to body-weight ratios and echocardiographic data at an age of 300 days (mean  $\pm$  SD, number of animals in brackets)

Genotype	Wildtype	$\beta_1$ -tg	$G\alpha_{i3}^{-/-}$	$\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$
Ventricle to body-weight ratio (%)	0.44 $\pm$ 0.09 (19)	0.43 $\pm$ 0.08 (16)	0.45 $\pm$ 0.07 (16)	0.42 $\pm$ 0.04 (18)
Ejection fraction (%) <sup>*</sup>	60 $\pm$ 6 (8)	52 $\pm$ 3 (10)	52 $\pm$ 8 (8)	58 $\pm$ 6 (9)
Left-ventricular end-systolic volume [ $\mu$ L]	28 $\pm$ 9 (8)	34 $\pm$ 11 (10)	35 $\pm$ 13 (8)	24 $\pm$ 6 (9)
Left-ventricular end-diastolic volume [ $\mu$ L]	70 $\pm$ 18 (8)	71 $\pm$ 19 (10)	71 $\pm$ 18 (8)	56 $\pm$ 7 (9)
Left-ventricular end-systolic length [mm]	7.2 $\pm$ 0.5 (8)	7.8 $\pm$ 0.6 (10)	7.1 $\pm$ 0.6 (8)	7.2 $\pm$ 0.8 (9)
Myocardial performance index	0.72 $\pm$ 0.11 (8)	0.91 $\pm$ 0.32 (10)	0.74 $\pm$ 0.14 (8)	0.71 $\pm$ 0.18 (9)
Global longitudinal strain (%)	-21.5 $\pm$ 2.4 (4)	-18.5 $\pm$ 5.9 (8)	-25.9 $\pm$ 5.1 (4)	-22.1 $\pm$ 8.7 (7)
<i>E</i> / <i>A</i> <sup>*</sup>	1.4 $\pm$ 0.6 (5)	1.4 $\pm$ 0.7 (8)	1.6 $\pm$ 0.6 (5)	2.4 $\pm$ 1.4 (8)
Heart rate [ $\text{min}^{-1}$ ] <sup>*</sup>	448 $\pm$ 53 (8)	521 $\pm$ 52 <sup>#</sup> (10)	492 $\pm$ 69 (8)	588 $\pm$ 39 <sup>#,§</sup> (9)

For each parameter, a one-way ANOVA was performed (<sup>\*</sup> $p < 0.05$ ). <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. wildtype and <sup>§</sup> $p < 0.05$  vs.  $\beta_1$ -tg in Bonferroni-corrected post-tests between all groups

**Table 2** qPCR data on ventricular mRNA expression at an age of 300 days (% of wildtype; mean  $\pm$  SD)

Genotype (N)	$\beta_1$ -tg (3)	$G\alpha_{i3}^{-/-}$ (3)	$\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$ (3)
<i>Gnai2</i>	96 $\pm$ 23	85 $\pm$ 28	70 $\pm$ 45
<i>Gnai3</i>	179 $\pm$ 81	0 $\pm$ 0*	0 $\pm$ 0*
<i>Nppa</i> (ANP)	351 $\pm$ 264	162 $\pm$ 16	137 $\pm$ 160
<i>Nppb</i> (BNP)	304 $\pm$ 145*	117 $\pm$ 73	104 $\pm$ 40
<i>Ryr2</i>	115 $\pm$ 36	98 $\pm$ 21	98 $\pm$ 31
<i>Pln</i>	115 $\pm$ 21	116 $\pm$ 12	98 $\pm$ 21
<i>Tnmi3</i>	94 $\pm$ 18	115 $\pm$ 14	87 $\pm$ 15

\*  $p < 0.05$  vs. wildtype in a pair wise fixed reallocation randomization test<sup>®</sup> using the REST-2009<sup>®</sup> software

$G\alpha_{i3}^{-/-}$  and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice. Western blot analysis confirmed these findings on the protein level (not shown).

In summary, neither ventricular hypertrophy nor dysfunction was observed in any of the investigated groups at the age of 300 days. In contrast to lack of  $G\alpha_{i2}$  (Keller et al. 2015), a detrimental effect of  $G\alpha_{i3}$  deficiency in  $\beta_1$ -tg mice at this age is unlikely.

### Study of animals at an age of 550 days

In line with increased mortality of  $\beta_1$ -tg mice at more advanced ages, we next examined animals at 550 days of age. Effect sizes obtained by comparing wildtype with  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  and  $\beta_1$ -tg with  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice at this age can be taken from supplemental Table 3 (Table S3).

### Examination of ventricular hypertrophy and fibrosis

At an age of 550 days,  $\beta_1$ -tg mice showed ventricular hypertrophy indicated by a statistically significant increase in the mean ventricle-to-body weight ratio compared to wildtype mice (Fig. 2A). No such effect was seen if  $\beta_1$ -tg mice were lacking  $G\alpha_{i3}$ . Mice overexpressing the  $\beta_1$ -AR developed ventricular fibrosis, which was significantly less pronounced in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice (Fig. 2B, C). Fitting to this, mRNA levels of the hypertrophy markers ANP (*Nppa*) and BNP (*Nppb*) were significantly increased in  $\beta_1$ -tg ventricles, but to a lesser extent when  $G\alpha_{i3}$  was absent (*Nppa*: 2578  $\pm$  2323% vs. 705  $\pm$  688%; *Nppb*: 744  $\pm$  688% vs. 363  $\pm$  260%) (Fig. 2D, E).

These findings of hypertrophy and fibrosis may be related to ventricular dysfunction in  $\beta_1$ -tg mice on the one hand and to protective effects of  $G\alpha_{i3}$  deficiency on the other. Therefore, we describe below our findings on left ventricular function obtained by echocardiography.

### $G\alpha_{i3}$ deficiency reduces risk of ventricular dysfunction in $\beta_1$ -tg mice

$\beta_1$ -tg mice showed ventricular dysfunction indicated by a statistically significant decrease of the ejection fraction (EF: 35  $\pm$  18%,  $n = 13$ ) and an increase of the mean LV end-systolic volume, the end-diastolic volume, and the end-systolic length (Fig. 3). In contrast, the EF of  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice (52  $\pm$  16%,  $n = 10$ ) was significantly higher than that of  $\beta_1$ -tg mice and similar to wildtype (59  $\pm$  4%,  $n = 8$ ) and  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  (60  $\pm$  5%,  $n = 8$ ). Reduced EF levels were also found in a few  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice, but significantly less frequently than in  $\beta_1$ -tg mice, relative to the 95% CI of age-matched wildtypes (3 out of 10 vs. 12 out of 13,  $p = 0.003$ ).

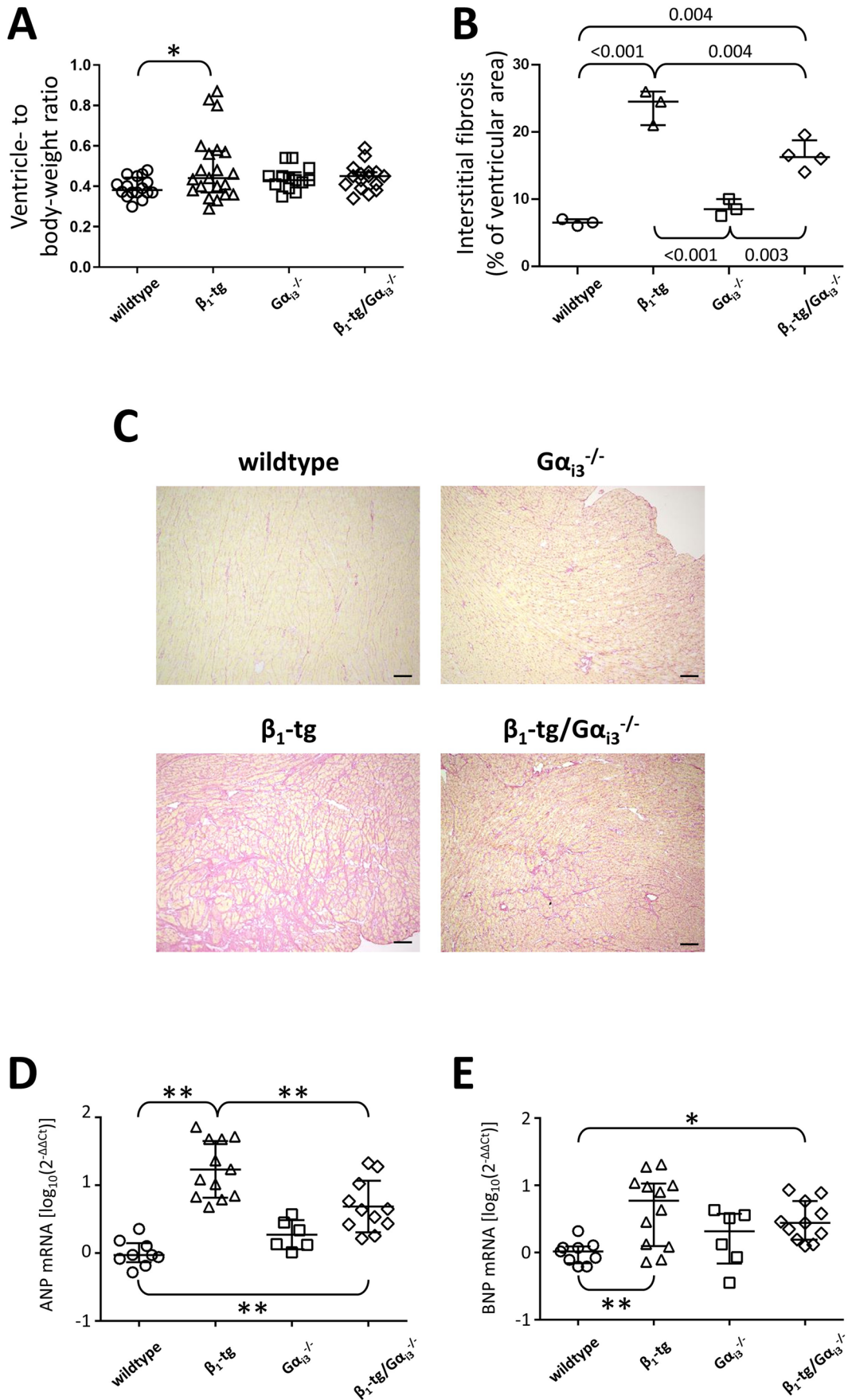
LV global longitudinal strain (GLS), an independent predictor of all-cause mortality in (human) heart failure with reduced ejection fraction (Sengeløv et al. 2015), was significantly impaired in  $\beta_1$ -tg mice in an exploratory analysis (Fig. 4A). In contrast,  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice did not differ from wildtype and  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice. Regarding diastolic LV function, we analyzed the isovolumic relaxation time (IVRT). We observed a statistically significant impairment of IVRT in  $\beta_1$ -tg mice (Fig. 4B), while the absence of  $G\alpha_{i3}$  normalized this parameter to wildtype and  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  values. Furthermore, the impairment of the  $E'$  to  $A'$  ratio in  $\beta_1$ -AR overexpressing mice was no longer observed in  $\beta_1$ -tg mice lacking  $G\alpha_{i3}$  (Fig. 4C).

Taken together,  $G\alpha_{i3}$  deficiency reduced the risk of both systolic and diastolic LV dysfunction in  $\beta_1$ -tg mice.

### Ventricular expression of $G_i$ proteins and Akt

In wildtypes at an age of 550 days, ventricular mRNA levels of *Gnai2* transcripts were confirmed to be still dominant over *Gnai3* (data not shown). As expected, *Gnai3* mRNA was not detectable in ventricles of  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice (Fig. 5A). Compared to wildtype mice, there was a statistically significant increase of *Gnai* mRNA in  $\beta_1$ -tg ventricles (*Gnai2*: 397  $\pm$  265%, *Gnai3*: 196  $\pm$  88%; Fig. 5A, B). There was no statistically significant alteration of *Gnai2*-mRNA expression in ventricular tissue from  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  or  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice compared to wildtype mice (Fig. 5B). We determined protein expression to corroborate our mRNA data. Except for the absence of  $G\alpha_{i3}$  in the ventricles of  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice (Fig. 5C, E), no difference in  $G\alpha_{i3}$  or  $G\alpha_{i2}$  expression was found between groups at the protein level (Fig. 5C–F; for uncropped Western blots, see Figure S2).

Akt activation has been linked to cardiomyopathy, and studies from other tissues indicated isoform-specific modulation by  $G_i$  proteins. We thus analyzed expression of phosphorylated Akt protein. Western blots, however, revealed no obvious differences when comparing pAkt/





**Fig. 2** Ventricular hypertrophy, fibrosis, and vastly increased hypertrophy markers in  $\beta_1$ -tg mice at an age of 550 days. **A** Ventricle- to body-weight ratios were calculated for 16 wildtype, 21  $\beta_1$ -tg, 13  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , and 16  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice. **B, C** Sirius Red staining was applied to ventricular cryo-Sects. (3 ventricles from wildtype,  $\beta_1$ -tg, and  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , each, and 4 ventricles from  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice), and interstitial fibrosis was quantified as percentage of total tissue area. Ventricles of  $\beta_1$ -tg mice demonstrated an increase in fibrotic area that was significantly attenuated by lack of  $G\alpha_{i3}$ . **A, B** All groups were compared with each other. **C** Representative mid-ventricular cardiac sections from wildtype,  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice after Sirius Red staining. Scale bars: 100  $\mu$ m. **D, E** mRNA expression of ANP (*Nppa*, **D**) and BNP (*Nppb*, **E**) corresponds to the extent of fibrosis observed in mice overexpressing  $\beta_1$ -adrenoceptors. Data from 9 wildtype, 12  $\beta_1$ -tg, 6  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , and 11  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice were obtained in triplicate each. Groups were compared with age-matched wildtypes. In addition,  $\beta_1$ -tg and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice were compared. Due to data distribution, log10 values of  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  were analyzed. Scatter plots with median and interquartile range are depicted (**A, B, D, and E**). \* and \*\*:  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  in post-tests following ANOVA (**A, D, and E**). Fibrotic areas were compared with an exploratory intention, and thus, exact  $p$  values are given if  $< 0.05$  (**B**)

Akt ratios in ventricles of wildtype,  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$  and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice (Fig. 6). Consistent with this, quantitative proteomics analyses demonstrated no changes in Akt expression or Akt phosphorylation (see the “**Proteomics and pathway analyses**” section).

In summary, both *Gnai2* and *Gnai3* mRNA levels were increased in 550-day-old  $\beta_1$ -tg mice while we found no change at the protein level. Akt phosphorylation was not obviously affected by either  $\beta_1$ -AR overexpression or  $G\alpha_{i3}$  deficiency.

### **Ventricular expression of the PKA targets ryanodine receptor 2, phospholamban, and cardiac troponin I**

mRNA levels of the PKA phosphorylation targets ryanodine receptor 2 (*Ryr2*), phospholamban (*Pln*), and cardiac troponin I (*Tnni3*) did not differ between the four genotypes (Figure S3). We furthermore analyzed phospholamban expression by Western blotting (Fig. 7). An ANOVA indicated significant differences ( $p = 0.036$ ), mainly due to decreased PLN levels in ventricles of  $\beta_1$ -tg mice ( $32 \pm 9\%$ ) compared to wildtype ( $100 \pm 31\%$ ;  $p = 0.061$ ) and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice ( $107 \pm 47\%$ ;  $p = 0.051$ ). Of interest, proteomics analysis furthermore revealed statistically significant alterations of PLN phosphorylation in  $\beta_1$ -tg ventricular myocytes, which were not seen in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice (see the “**Proteomics and pathway analyses**” section and Fig. 8C, D).

In summary, Western blots indicated reduced PLN expression in ventricles of  $\beta_1$ -tg, but not  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice at the age of 550 days. *Ryr2*, *Pln*, and *Tnni3* mRNA levels appeared to be unaffected.

## **Proteomics and pathway analyses**

Protein and protein phosphorylation levels in ventricular myocytes from wildtype,  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice ( $n = 3$  animals each, age:  $200 \pm 56$  days) were determined by mass spectrometry. We did not detect any change in Akt expression or phosphorylation in agreement with the data from Western blot analysis (cp. Fig. 6). For phospholamban, however, we found a statistically significant increase in phosphorylation at Ser16 ( $p = 0.007$ ) and Ser17 ( $p = 0.013$ ) in  $\beta_1$ -tg compared to wildtype ventricular myocytes that was not seen in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  myocytes.

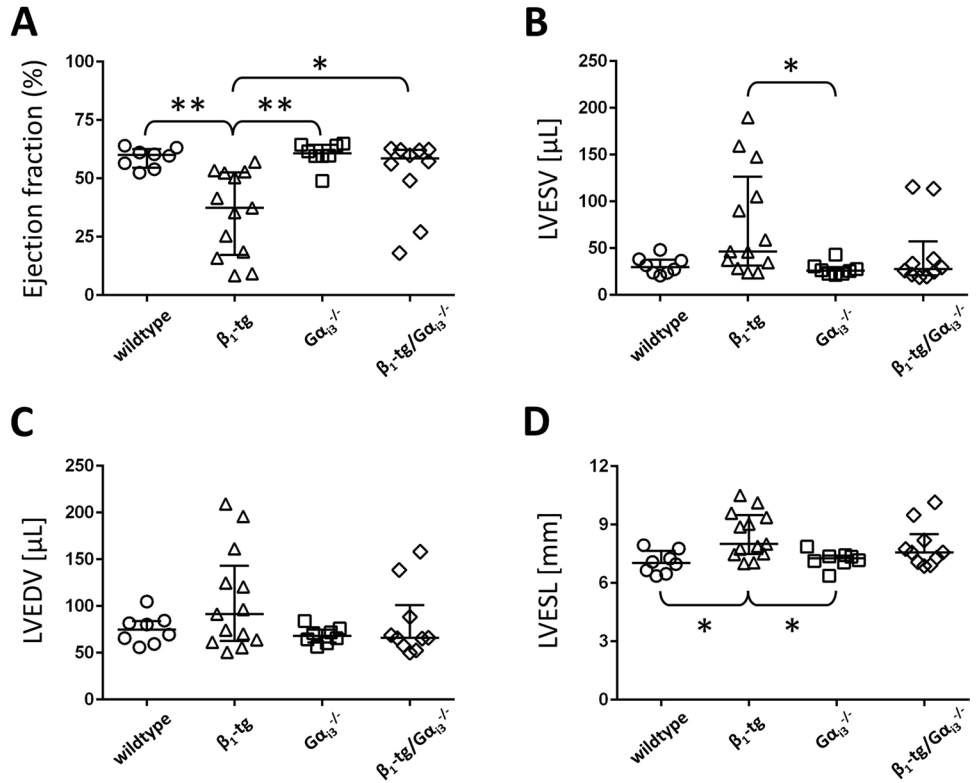
For further analysis, we fed the protein phosphorylation data into a so-called ingenuity pathway analysis (IPA). IPA is an algorithm-based analysis that uses the QIAGEN knowledge base to identify differences in signaling pathways. When comparing our  $\beta_1$ -tg and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  target genotypes, analyses revealed statistically significant differences associated with multiple cardiac disorders and diseases (Fig. 8A). IPA suggested activation of the predefined protein ontology list “cardiac fibrosis” in  $\beta_1$ -tg compared to wildtype ventricles, while activity was reduced in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  compared with data from  $\beta_1$ -tg mice (Fig. 8B). To provide further evidence for possible mechanisms, the proteins detected in our probes were mapped to the networks available in the underlying QIAGEN database and then scored using a network score based on  $p$  values obtained in Fisher’s exact test. For the sample-specific network that achieved the highest score,  $\beta_1$ -tg and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  myocytes showed some differences in phosphorylation of interacting proteins linked to “tox lists” such as “cardiac fibrosis” and “cardiac hypertrophy” (Fig. 8C, D). For example, PLN, RYR2, and calmodulin kinase II (CaMK II) phosphorylation is seen to be increased in  $\beta_1$ -tg compared to wildtype myocytes (color-coded red in Fig. 8C), whereas it is lower in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  compared with  $\beta_1$ -tg mice (color-coded green in Fig. 8D).

Taken together, proteomics analyses showed that in  $\beta_1$ -tg ventricular myocyte phospholamban phosphorylation levels were significantly increased. Pathway and network analyses based upon protein phosphorylation indicated opposite patterns in  $\beta_1$ -tg compared to  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice with respect to cardiac dysfunction and disease. These results are in good agreement with our in vivo data of ventricular dysfunction and our in vitro data such as ventricular fibrosis or increased expression of hypertrophy markers.

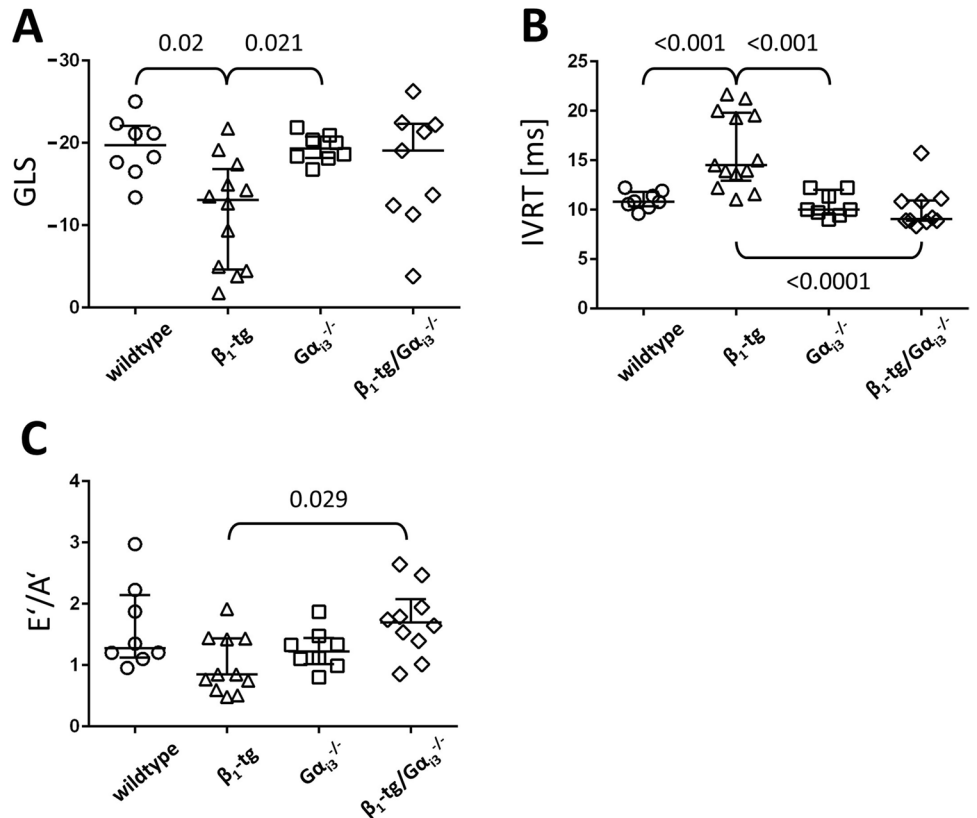
## **Discussion**

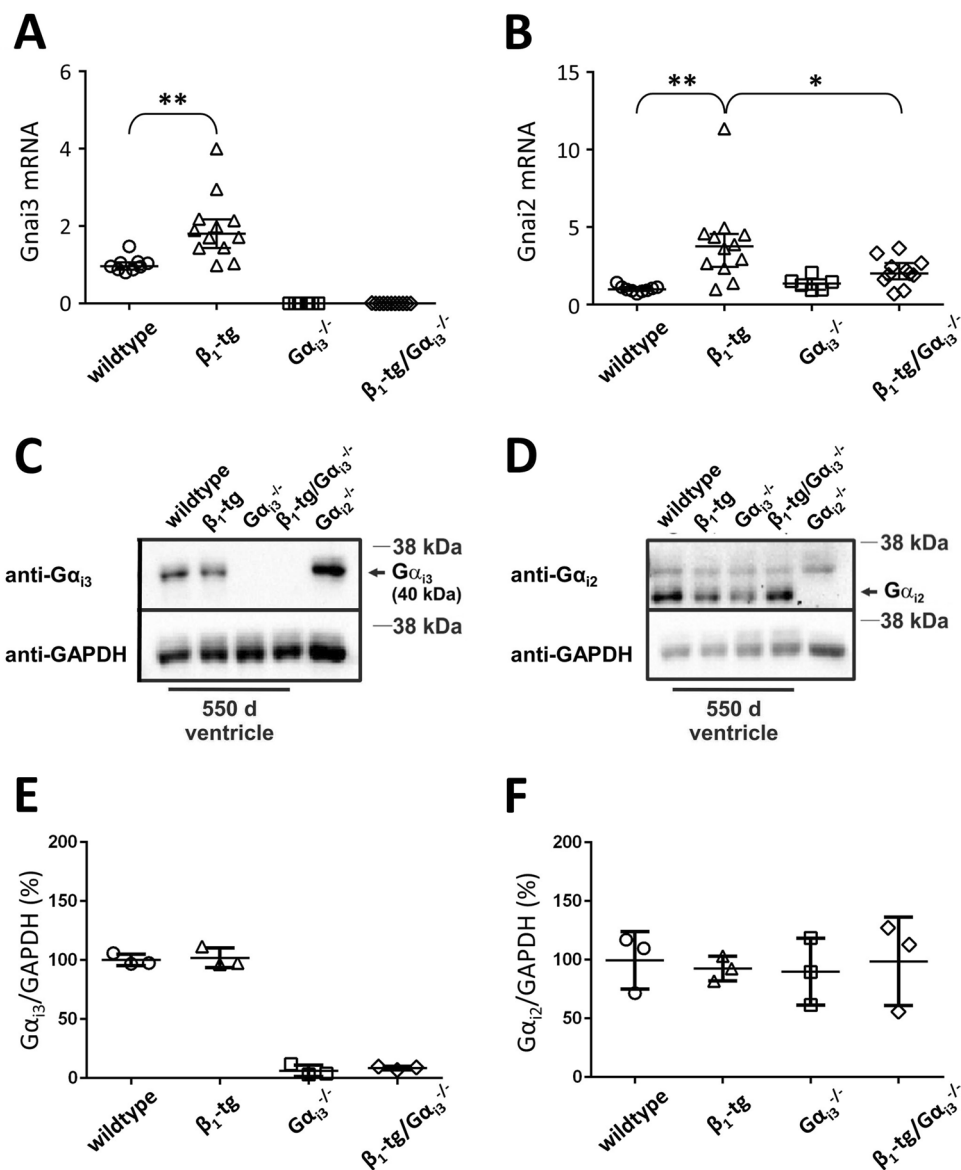
Given the previously shown detrimental effects of a  $G\alpha_{i2}$  deficiency in mice with a cardiac overexpression of  $\beta_1$ -AR (Keller et al. 2015), we now asked for the role of the

**Fig. 3** Ventricular dysfunction in  $\beta_1$ -tg mice at an age of 550 days. As echocardiographic parameters representing systolic function, ejection fraction (A), left-ventricular (LV) end-systolic volume (B), LV end-diastolic volume (C), and LV end-systolic length (D) are shown. Echocardiographic data were obtained from 8 wildtype, 13  $\beta_1$ -tg, 8  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , and 10  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice. Scatter plots with median and interquartile range are depicted. If the ANOVA indicated statistically significant differences, it was followed by Bonferroni-corrected post-tests between all groups. \* and \*\*:  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$



**Fig. 4** Exploratory echocardiographic analyses reveal impaired diastolic ventricular function of  $\beta_1$ -tg mice at an age of about 550 days. Global longitudinal strain (GLS) (A), isovolumic relaxation time (IVRT) (B), and  $E'$  to  $A'$  ratio ( $E'/A'$ ) (C) were analyzed as parameters of global (GLS), or diastolic function (IVRT,  $E'/A'$ ), respectively. Group sizes were 8 for wildtype and  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , 12 (GLS), 11 ( $E'/A'$ ) and 13 (IVRT) for  $\beta_1$ -tg, and 9 (GLS) and 10 ( $E'/A'$  and IVRT) for  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice, respectively. Scatter plots with median and interquartile range are shown. If the ANOVA indicated statistically significant differences, it was followed by Bonferroni-corrected post-tests between all groups. Analysis was done with an exploratory intention, and thus, exact  $p$  values are given if  $< 0.05$





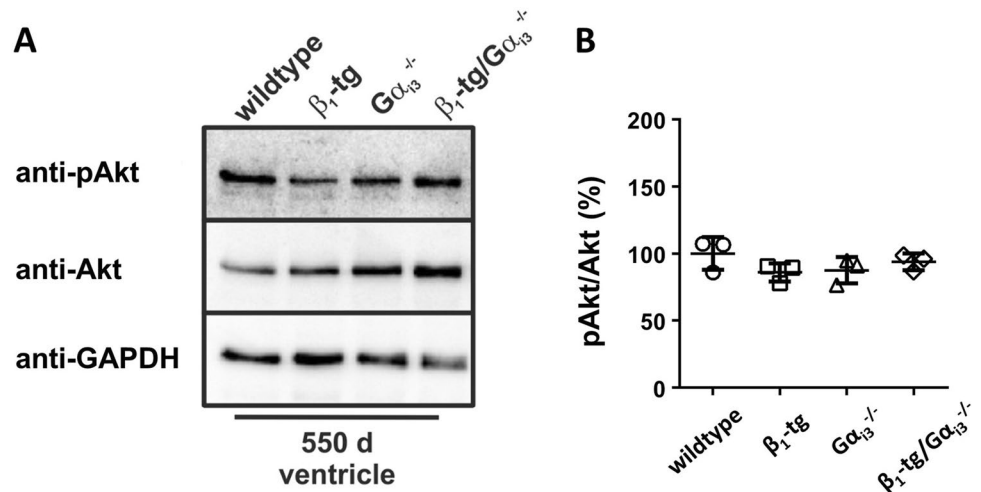
**Fig. 5**  $G_1$  expression at the mRNA and the protein level. Relative expression of **A**  $G\alpha_{13}$  (*Gnai3*) and **B**  $G\alpha_{12}$  mRNA (*Gnai2*) is depicted as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  referring to wildtype controls. qPCR data from 550-day-old wildtype ( $n=9$ ),  $\beta_1$ -tg ( $n=12$ ),  $G\alpha_{13}^{-/-}$  ( $n=6$ ), and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{13}^{-/-}$  ( $n=11$ ) mice were obtained in triplicate each. **C**, **D** Representative Western blots of ventricle homogenates isolated from 550-day-old wildtype,  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{13}^{-/-}$ , and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{13}^{-/-}$  mice. To verify antibody specificity, ventricle homogenates from  $G\alpha_{12}$ -deficient mice were loaded.  $G\alpha_{13}$ -protein expression (**C**) is completely absent in  $G\alpha_{13}^{-/-}$  and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{13}^{-/-}$  ventricles, while not obviously altered in  $\beta_1$ -tg

ventricles.  $G\alpha_{12}$  protein (**D**) is detectable in ventricles isolated from any genotype. For exemplary full Western blots, see supplemental Figure S2. **E**, **F** Statistical analysis of  $G\alpha_{13}$  and  $G\alpha_{12}$  protein expression patterns using GAPDH as loading control. For Western blot analysis, ventricles from three animals per genotype were analyzed in three independent experiments. Scatter plots with median and interquartile range (**A**, **B**) or mean values  $\pm$ SD are shown (**E**, **F**). \* and \*\*:  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  in a Mann–Whitney test (**A**, **E**) or in post-tests performed if an ANOVA indicated significant differences (**B**). ANOVA of data on protein expression indicated no difference (**F**)

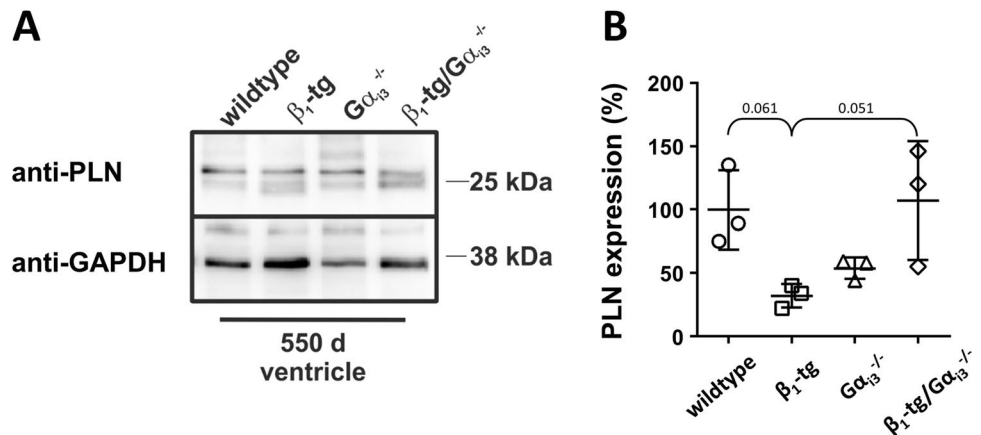
closely related  $G\alpha_{13}$  isoform in this murine heart-failure model. Since  $\beta_1$ -transgenic ( $\beta_1$ -tg) mice develop progressively impaired cardiac functions accompanied by a significantly shortened life span, this heart-failure model is

suitable to test for effects of an additional  $G\alpha_{13}$  deficiency. We wondered how  $G\alpha_{13}$  deficiency affects cardiac function and outcome of  $\beta_1$ -tg mice, i.e., whether it is detrimental, protective, or has no effect.

**Fig. 6** **A** Akt and phosphorylated Akt (pAkt) were detected using specific antibodies in Western blots of ventricle homogenates obtained from 550-day-old wildtype,  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice ( $n=3$  each). **B** ANOVA did not reveal statistically significant differences of pAkt/Akt ratios (mean values  $\pm$  SD)



**Fig. 7** **A** Phospholamban (PLN) was detected using a specific antibody in Western blots of ventricle homogenates obtained from 550-day-old wildtype,  $\beta_1$ -tg,  $G\alpha_{i3}^{-/-}$ , and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice ( $n=3$  each). **B** ANOVA indicated statistically significant differences in PLN expression levels normalized to GAPDH ( $p=0.036$ ), mainly due to a decrease in  $\beta_1$ -tg mice ( $p=0.061$  vs. wildtype and  $p=0.051$  vs.  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$ ). Mean values  $\pm$  SD are depicted



## G<sub>i</sub> proteins in $\beta$ -AR-mediated heart failure

Our current study revealed that the absence of  $G\alpha_{i3}$  in  $\beta_1$ -AR-overexpressing mice was protective, slowing or even preventing the development of heart failure. In contrast, we previously found that the absence of  $G\alpha_{i2}$  in  $\beta_1$ -tg mice resulted in a distinct heart-failure phenotype even before it was evident in mice overexpressing only the  $\beta_1$ -AR (Keller et al. 2015). Thus, the possibility that  $G\alpha_{i3}$  deficiency mimics the  $G\alpha_{i2}$ -knockout phenotype in the  $\beta_1$ -tg model of dilative cardiomyopathy can be excluded. One may hypothesize that the remaining  $G\alpha_i$  isoform functionally replaces the missing isoform. Indeed, the absence of one  $G\alpha_i$  isoform is often accompanied by upregulation of the remaining one (Wiege et al. 2012; Köhler et al. 2014; Devanathan et al. 2015; Beer-Hammer et al. 2018), although Western blot analyses have been inconsistent regarding an increase of cardiac  $G\alpha_{i2}$  expression in

$G\alpha_{i3}$ -deficient mice at the protein level (Gohla et al. 2007; Dizayee et al. 2011; Hippe et al. 2013; Köhler et al. 2014). In the current study, we did not see an upregulation of  $G\alpha_{i2}$  in  $G\alpha_{i3}$ -deficient hearts. However, one should keep in mind that cardiac  $G\alpha_{i2}$  expression exceeds that of  $G\alpha_{i3}$  per se. Therefore, we cannot exclude the possibility that  $G\alpha_{i2}$  contributes by functional substitution even in the presence of unchanged (i.e., “normal”) expression levels. On the other hand, (cardiac)  $G\alpha_{i3}$  levels might be generally too low to compensate for  $G\alpha_{i2}$  deficiency. This could explain why we observed adverse effects of  $G\alpha_{i2}$  deficiency in the previous study, although there was a statistically significant increase in  $G\alpha_{i3}$ -protein expression (Keller et al. 2015). Unfortunately, due to its embryonic lethality, the  $G\alpha_{i2/i3}$  double knockout mouse model cannot be used to test the assumption that the  $G\alpha_i$  isoforms can substitute for each other in the  $\beta_1$ -tg mouse model (Gohla et al. 2007). At the mRNA level, expression of both  $G\alpha_{i2}$  (*Gnai2*) and

$G\alpha_{i3}$  (*Gnai3*) transcripts appeared to be increased in  $\beta_1$ -tg ventricles while there was no obvious change at the protein level. In rats treated with isoproterenol, the increase in *Gnai* mRNA transcript levels was significantly more pronounced than the increase in  $G\alpha_i$  protein expression (Mende et al. 1992; Eschenhagen et al. 1992a). Thus, we cannot exclude that we have missed an only slight increase of  $G\alpha_i$  expression at the protein level.

Although survival is reduced by cardiac overexpression of  $\beta_1$ -adrenoceptors alone, it has been even worse in  $\beta_1$ -tg mice lacking  $G\alpha_{i2}$  (Keller et al. 2015). In contrast, we now find that the life span of  $\beta_1$ -tg mice is significantly increased if they lack  $G\alpha_{i3}$ . Although 550-day-old  $\beta_1$ -tg mice lacking  $G\alpha_{i3}$  showed increased cardiac ANP and BNP mRNA levels compared to wildtype littermates, the ANP increase was significantly lower compared to mice only overexpressing the  $\beta_1$ -AR. In addition, it appeared to be clearly lower than in  $G\alpha_{i2}$ -deficient  $\beta_1$ -tg mice at an age of 300 days as analyzed in our previous study (Keller et al. 2015). Cardiac overexpression of  $\beta_2$ -adrenoceptors also leads to cardiac failure, although a significantly higher level of overexpression is required (Liggett et al. 2000). Similar to our recent findings with  $\beta_1$ -tg mice, lack of  $G\alpha_{i2}$  drastically shortened the lifespan of mice with a cardiac overexpression of the  $\beta_2$ -AR subtype in another study (Foerster et al. 2003; Keller et al. 2015). Of note,  $\beta_2$ -tg mice with a homozygous  $G\alpha_{i2}$  knockout were virtually non-viable and already heterozygous  $G\alpha_{i2}$  deficiency reduced life span to a similar extent as did the complete absence of  $G\alpha_{i2}$  on a background of cardiac  $\beta_1$ -AR overexpression. These findings may reflect the role of G-proteins for either  $\beta_1$ -AR- or  $\beta_2$ -AR-mediated signaling: while  $G_s$  proteins are the cognate interaction partners of  $\beta_1$ -AR (Xiao et al. 1999; Seyedabadi et al. 2019), it is widely accepted that  $\beta_2$ -AR couple to both  $G_s$  and  $G_i$  proteins (Xiao et al. 1999, 2003). With respect to putative isoform-specific effects of  $G_i$  proteins, it should be noted that in a mouse model of ischemia–reperfusion-induced cardiac damage, Köhler et al. also found detrimental effects of  $G\alpha_{i2}$  deficiency on the one hand while  $G\alpha_{i3}$  deficiency appeared to be cardioprotective on the other hand (Köhler et al. 2014).

In conclusion, we show that in a mouse model of dilative cardiomyopathy,  $G\alpha_{i3}$  deficiency is beneficial. In contrast, lack of  $G\alpha_{i2}$  was clearly detrimental in previous studies, either in the same heart-failure model of  $\beta_1$ -AR overexpression, a model of  $\beta_2$ -AR overexpression or with ischemia–reperfusion as pathophysiological stimulus (Foerster et al. 2003; Köhler et al. 2014; Keller et al. 2015).

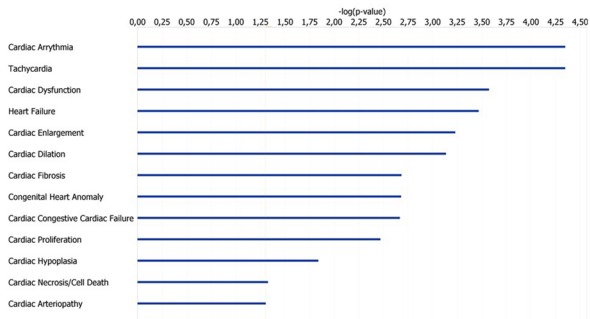
### Differences of $G\alpha_{i2}$ - and $G\alpha_{i3}$ -dependent effects at the cellular and subcellular level

Data from neutrophils suggest an interesting difference in  $G\alpha_{i2}$ - versus  $G\alpha_{i3}$ -mediated signaling: in a study of Kuwano

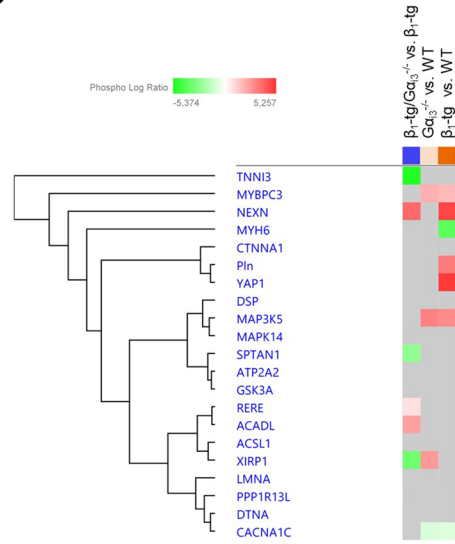
et al.,  $G\alpha_{i2}$  deficiency led to an increase, but  $G\alpha_{i3}$  deficiency to a decrease of Akt phosphorylation (Kuwano et al. 2016). Akt has been described to be involved in cardio-protective signaling, while on the other hand, chronic activation of the PI3K/Akt cascade is related to cardiac hypertrophy, and Akt activity was increased in human failing hearts (Haq et al. 2001; Nagoshi et al. 2005). In a previous study, we found no difference between Akt phosphorylation in  $G\alpha_{i2}$ - or  $G\alpha_{i3}$ -deficient mice, neither under basal conditions nor after treating mice with carbachol (Dizayee et al. 2011). The opposing results of our previous study and that of Kuwano et al. may be explained not only by the various tissues analyzed but the different genetic backgrounds (C57/BL6 and 129/Sv, respectively) which have been associated with phenotypic differences in  $G_i$ -knockout models (Offermanns 1999; Kuwano et al. 2016). Regarding our previous findings on Akt in mice lacking  $G\alpha_{i2}$  or  $G\alpha_{i3}$  (Dizayee et al. 2011), one should bear in mind that carbachol is rather considered a non-pathologic stimulus, and stimulation of muscarinic receptors might be beneficial under pathological conditions, e.g., heart failure (Communal et al. 1999; Olshansky et al. 2008; Lorenz et al. 2009). Although we cannot eventually rule out a change, no obvious differences in ventricular pAkt expression were found in the current study. Given the otherwise pronounced effects on Akt phosphorylation in human heart failure and in heart failure models (Haq et al. 2001; Baba et al. 2003; Miyamoto et al. 2004), it seems at least unlikely that the marked differences in cardiac function and survival in our study can be explained by changes in Akt phosphorylation.

Western blots suggested a reduced PLN expression in  $\beta_1$ -tg compared to both wildtype and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice. We furthermore used protein expression and phosphorylation data obtained from ventricular myocytes for ingenuity pathway analysis (IPA). IPA has the advantage of a lower risk of bias than manual analysis of the results would have. Our data indicate significant differences between  $\beta_1$ -tg and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice with respect to intracellular signaling relevant to several cardiac diseases including arrhythmia, heart failure or cardiac fibrosis. Of note, data obtained with ventricular myocytes from  $G\alpha_{i2}$ -deficient mice indicate significant differences to mice lacking  $G\alpha_{i3}$  in signaling related to cardiac diseases, too (not shown). Proteomics analyses indicated increased phosphorylation of PLN in ventricular myocytes of  $\beta_1$ -tg but not  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice. Our findings on PLN expression and phosphorylation suggest reduced SERCA inhibition in  $\beta_1$ -tg hearts. This may be considered compensatory, as SERCA expression and activity are reduced in the setting of heart failure (del Monte and Hajjar 2008). In agreement with this, Engelhardt et al. found that genetic PLN ablation rescued  $\beta_1$ -tg mice from heart failure (Engelhardt et al. 2004). It is tempting to speculate that the absence of compensatory PLN changes in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice is indicative of cardioprotection by  $G\alpha_{i3}$  deficiency, as

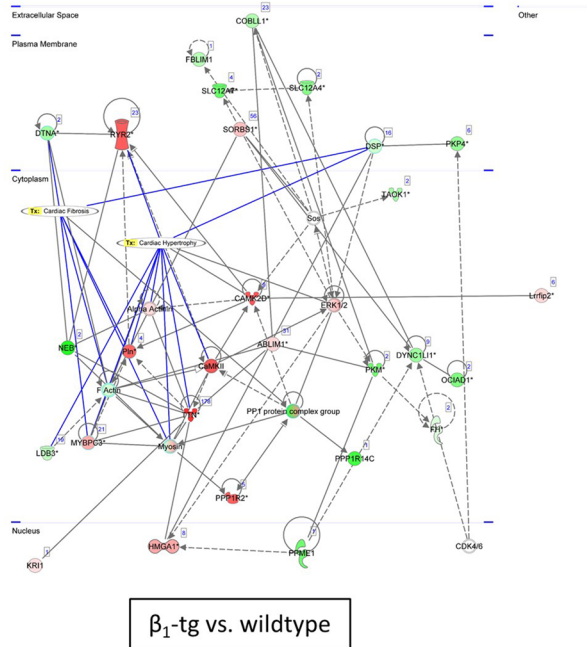
**A**



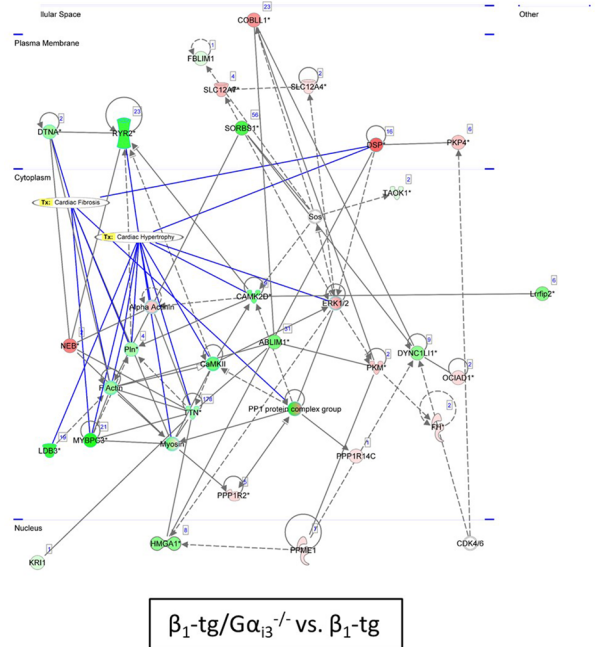
**B**



**C**



**D**



more ● or less ○ increased intensity      — direct interaction      Tx; ingenuity tox list  
 more ● or less ○ decreased intensity      - - - indirect interaction

reduced PLN activity is not needed here. In  $G\alpha_{12}$ -deficient ventricles, our proteomics analysis revealed an increase of PLN phosphorylation similar to that in  $\beta_1$ -tg specimens (not shown). This is interesting because in our previous study,

$G\alpha_{12}$  deficiency alone already led to reduced life expectancy, but this effect was dramatically more pronounced when these animals also overexpressed the cardiac  $\beta_1$ -AR (Keller et al. 2015).

**Fig. 8** Protein phosphorylation levels in ventricular myocytes (three per genotype) were obtained by mass spectrometry and fed into a so-called ingenuity pathway analysis (IPA), an algorithm-based analysis that uses the QIAGEN knowledge base to identify differences in signaling pathways. **A** As indicated by  $-\log p$  values, IPA revealed significant differences between  $\beta_1$ -tg and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  mice in activation of disease-associated pathways. **B** Heatmap representing differential phosphorylation of proteins assigned to the “cardiac fibrosis pathway.” Activation Z-scores referring to the respective genotypes compared are color-coded (top row) from blue (“lower activity”) to orange (“higher activity”). An increase in the phosphorylation of a particular protein is shown in red, a decrease in green (lower rows). Gray color indicates comparisons that did not reveal statistical significance ( $p > 0.05$ ). When comparing  $\beta_1$ -tg with wildtype (**C**), and  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  with  $\beta_1$ -tg mice (**D**), the top scoring IPA network indicated differences related to cardiac dysfunction and cardiovascular disease. Red indicates that in the genotype mentioned first, a protein is more phosphorylated relative to the comparator; green stands for reduced phosphorylation. For example, phospholamban (PLN) phosphorylation is increased in  $\beta_1$ -tg compared to wildtype myocytes, while it is reduced in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  compared to  $\beta_1$ -tg mice. Relationships between proteins (nodes) and heart diseases (cardiac fibrosis, cardiac hypertrophy) are indicated (*Tx*, toxicity-related (“tox”) lists)

Previously, we found a decreased density of ventricular L-type calcium currents (LTCC) in ventricular cardiomyocytes from  $G\alpha_{i2}$ -deficient mice, while it was increased in  $G\alpha_{i3}$ -deficient cardiomyocytes (Dizayee et al. 2011). Though in other models an increase of ventricular calcium currents led to cardiac damage and dysfunction in the long run (Muth et al. 1999; Nakayama et al. 2007; Beetz et al. 2009),  $G\alpha_{i3}$  deficiency does not impair cardiac function ((Jain et al. 2001) and this study).  $\beta_2$ -Adrenoceptors couple to both  $G_s$  and  $G_i$  proteins, while  $G_s$  proteins are considered the cognate interaction partners of  $\beta_1$ -adrenoceptors (Xiao et al. 1999; Seyedabadi et al. 2019). However,  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic signaling seems to be modulated by  $G_i$  proteins including mechanisms independent of direct receptor coupling (Li et al. 2004; Martin et al. 2004; Melsom et al. 2014). Thus, it cannot be excluded that the above-mentioned differences between ventricular calcium currents in either  $G\alpha_{i2}$ - or  $G\alpha_{i3}$ -deficient mice also have a role in the development of cardiomyopathy in the  $\beta_1$ -tg mouse model.

The data discussed so far do not explain our findings regarding the opposing effects of  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_{i3}$ , but PLN expression and activity as well as ventricular L-type calcium currents should be the subject of further investigations into possible molecular mechanisms underlying the differential effects of  $G\alpha_i$  isoforms in cardiomyopathy. Figure 9 and Table 3 summarize results on mechanisms that might contribute to isoform-specific signaling via inhibitory G-proteins in the heart.

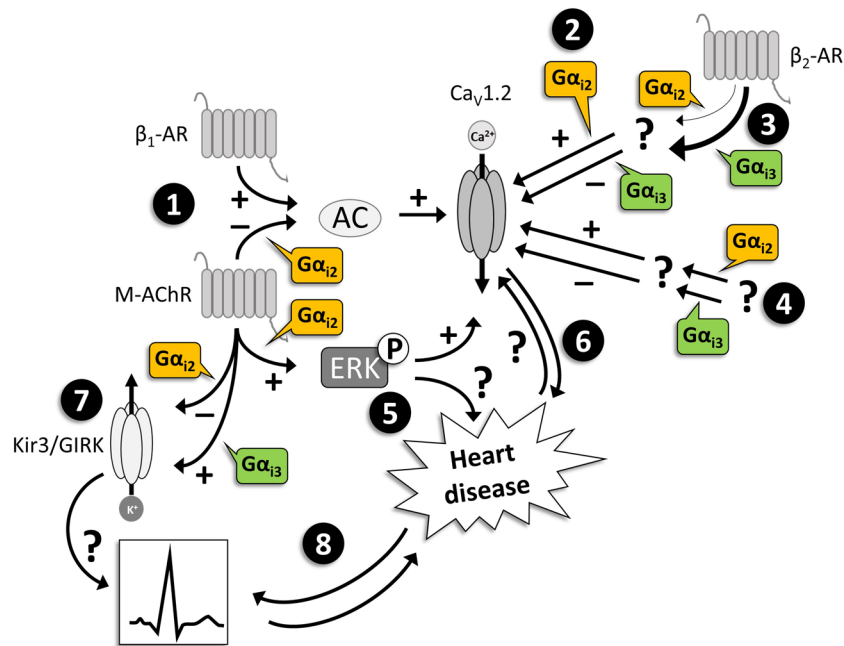
## Limitations of the study

The focus of our study centered on the hypothesis that  $G\alpha_{i3}$  and  $G\alpha_{i2}$  have different isoform-specific effects in a mouse model of dilated cardiomyopathy, despite sharing very high amino acid identity. In fact, we found significant functional differences between the two  $G\alpha_i$  isoforms. When evaluating these results, however, some methodological peculiarities must be considered that have an impact on the interpretation of the results.

Firstly, the data on qualitatively distinct differences in the effects of  $G\alpha_{i2}$  (Keller et al. 2015) and  $G\alpha_{i3}$  deficiency are based on two separate studies in which the gene-deficient mice were each tested against wildtype controls, but not directly against each other. Not least for animal welfare reasons, we were not able to retest a  $G\alpha_{i2}$ -deficient cohort in our current study.

Furthermore, we used global  $G\alpha_i$  knockouts in the current and our previous study (Keller et al. 2015). Thus, we cannot exclude the possibility that extra-cardiac effects had an impact on the cardiac phenotype. However, previous studies comparing  $G\alpha_{i2}$ - and  $G\alpha_{i3}$ -deficient mice with their respective wildtype controls showed that, for example, basal heart rate or blood pressure was unchanged (Jain et al. 2001; Albarrán-Juárez et al. 2009). Furthermore, unaltered hypotensive effects following systemic  $\alpha_2$ -AR stimulation indicated normal circulatory regulation in  $G\alpha_{i2}$ - and  $G\alpha_{i3}$ -deficient mice, respectively (Albarrán-Juárez et al. 2009). We did not obtain catecholamine levels in our study. In a previous study, however, norepinephrine release from atria or brain cortex slices was not altered in  $G\alpha_{i2}$ - or  $G\alpha_{i3}$ -deficient mice (Albarrán-Juárez et al. 2009). Furthermore, given the unchanged basal values of heart rate and blood pressure in the absence of  $G\alpha_{i2}$  or  $G\alpha_{i3}$ , significant changes in catecholamine levels seem rather unlikely (Jain et al. 2001; Albarrán-Juárez et al. 2009; Keller et al. 2015). Another study revealed the contribution of endogenous catecholamines to the phenotype of  $\beta_1$ -tg mice to be negligible, thus arguing against a significant increase in catecholamine levels in this model, too (Engelhardt et al. 2001b).

The mouse model of  $\beta_1$ -AR overexpression is a well-established and thoroughly characterized murine heart-failure model, but differs in some features from human heart failure. For example, there is up—instead of down—regulation of  $\beta_1$ -AR (Bristow et al. 1986; Engelhardt et al. 1999). However,  $\beta_1$ -AR overexpression can be considered as mimicking the chronically increased sympathetic stimulation observed in human heart failure (Engelhardt et al. 1999; Baker 2014). Although the transgenic approach displays a “non-physiologically” high  $\beta_1$ -AR expression level,



**Fig. 9** Isoform-specific  $G\alpha_i$  functions possibly involved in heart disease. 1:  $G\alpha_{i2}$ , but not  $G\alpha_{i3}$ , mediates signal transduction upon M-AChR stimulation and thereby may protect against  $\beta_1$ -AR-mediated overstimulation, e.g., with respect to  $Ca^{2+}$  influx via L-type  $Ca^{2+}$  channels ( $Ca_v1.2$ ) (Nagata et al. 2000). 2: With increased signal transduction via  $\beta_2$ -AR,  $G\alpha_{i2}$  increases the activity of individual  $Ca_v1.2$ , while  $G\alpha_{i3}$  inhibits channel activity (Foerster et al. 2003; Klein 2009). 3: The coupling of  $\beta_2$ -AR to  $G\alpha_{i3}$  may be stronger than to  $G\alpha_{i2}$ , e.g., depending on the local membrane charge (Strohman et al. 2019). 4: Under basal conditions,  $G\alpha_{i2}$  appears to increase  $Ca_v1.2$ -mediated  $I_{CaL}$  or to compensate for presumed inhibitory effects of  $G\alpha_{i3}$  and vice versa (Dizayee et al. 2011), but: (Nagata et al. 2000)). 5:  $G\alpha_{i2}$ , but not  $G\alpha_{i3}$ , mediates phosphorylation of ERK and may thereby be involved in the stimulation of  $Ca_v1.2$  (Dizayee et al. 2011). The effect of ERK phosphorylation on heart disease has been described to be either harmful or protective, probably depending on the stimulus (Lorenz et al. 2009; Ruppert et al. 2013). Overall,  $G_i$  proteins differentially modu-

late  $Ca_v1.2$  and thus  $I_{CaL}$  via several isoform-specific mechanisms that depend among other things on the (level of) activity of  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR, and/or M-AChR. Alterations in  $Ca_v1.2$  activity and/or  $I_{CaL}$  have been associated with cardiomyopathy and heart failure (6). 7:  $G\alpha_{i2}$  deficiency led to an increase,  $G\alpha_{i3}$  deficiency to a decrease of Kir3/GIRK mediated currents (Nobles et al. 2018). Lack of  $G\alpha_{i2}$  thus might be pro-arrhythmic. Arrhythmia is a major reason of death in heart failure, and rhythm disturbances might cause or aggravate cardiomyopathy (8). “+” means stimulation/increase, “-” inhibition/decrease. “?” indicates that an interaction, a contribution or a consequence is not clear or fully understood. AC: adenylyl cyclase;  $\beta_1$ -AR:  $\beta_1$ -adrenoceptor;  $\beta_2$ -AR:  $\beta_2$ -adrenoceptor; ERK: extracellular signal-regulated kinase; Kir3/GIRK: inward-rectifier potassium channel/G protein-coupled inward-rectifier potassium channel; M-AChR: muscarinic acetylcholine receptor

the (over-)expression levels in the C57BL/6-based mice we used here are significantly lower than on the FVB/N background on which the model was originally generated (Keller et al. 2015).

Here, we analyzed cardiac function only under basal conditions. A future study using stressors (e.g., dobutamine), could potentially reveal further differences between  $G\alpha_i$  isoforms, e.g., a possibly increased functional reserve in  $\beta_1$ -tg mice lacking  $G\alpha_{i3}$ .

Some of our results were supported by proteomics analysis (e.g., with respect to PLN, fibrosis, or hypertrophy). However, it should be noted that this was mainly a screening approach. Nevertheless, the results obtained may point to future studies on the role and molecular mechanisms of  $G\alpha_{i2}$ - and  $G\alpha_{i3}$ -mediated signaling in heart failure.

## Conclusion

$G\alpha_{i3}$  deficiency has no detrimental effects in a mouse model of dilative cardiomyopathy and even appears to be cardio-protective. Our current and previous results indicate a  $\beta_1$ -AR-mediated impairment whose development is oppositely associated with the expression of either  $G\alpha_{i2}$  or  $G\alpha_{i3}$ . Although the underlying molecular mechanisms remain to be elucidated in further studies, our findings indicate isoform-specific interventions into  $G_i$ -dependent signaling pathways (e.g., inhibiting  $G\alpha_{i3}$ ) to be promising novel strategies for cardio-protective therapies.



**Table 3** Possible isoform-specific effects of  $G\alpha_{i2}$  or  $G\alpha_{i3}$  in cardiac signaling observed in *Gnai*-deficient mice (italics: conclusions on the role of the respective  $G\alpha_x$  protein)

$G\alpha_i$ isoform	Effector	Role of $G\alpha_i$ deficiency	Role of $G\alpha_x$	Remark	Reference
$G\alpha_{i2}$	$I_{CaL}$	Blunted carbachol-mediated reversal of isoproterenol-induced $I_{CaL}$ increase	<i>Mediates M-ACh-R signaling counteracting <math>\beta</math>-adrenergic <math>I_{CaL}</math> stimulation</i>	Isolated ventricular myocytes from global $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ knockout mice	(Nagata et al. 2000)
$G\alpha_{i3}$		Intact carbachol-mediated reversal of isoproterenol-induced $I_{CaL}$ increase	<i>Not involved in M-ACh-R-mediated counter-regulation against <math>\beta</math>-adrenergic <math>I_{CaL}</math> stimulation</i>		
$G\alpha_{i2}$	$I_{CaL}$	Decreased basal $I_{CaL}$	<i>Increase of basal <math>I_{CaL}</math> and/or counter-regulation of <math>G\alpha_{i3}</math> effects</i>	Isolated ventricular myocytes from global $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ knockout mice	(Dizayee et al. 2011)
$G\alpha_{i3}$		Increased basal $I_{CaL}$	<i>Decrease of basal <math>I_{CaL}</math> and/or counter-regulation of <math>G\alpha_{i2}</math> effects</i>		
$G\alpha_{i2}$	LTCC	Enhancement of the decrease in LTCC activity in $\beta_2$ -AR-overexpressing mice	<i>Stimulation of LTCC and/or counter-regulation of <math>G\alpha_{i3}</math> effects</i>	Isolated ventricular myocytes; cardiac-specific $\beta_2$ -AR-overexpression; global, heterozygous $G\alpha_{i2}$ knockout	(Foerster et al. 2003)
$G\alpha_{i3}$	LTCC	Increased LTCC activity in $\beta_2$ -AR-overexpressing mice	<i>Inhibition of LTCC and/or counter-regulation of <math>G\alpha_{i2}</math> effects</i>	Isolated ventricular myocytes; cardiac-specific $\beta_2$ -AR-overexpression; global, homozygous $G\alpha_{i3}$ knockout	(Klein 2009)
$G\alpha_{i2}$	Kir3/GIRK	Increased $I_{Kir}$	<i>Inhibition of Kir3/GIRK channels and/or counter-regulation of <math>G\alpha_{i3}</math> effects</i>	Isolated atrial myocytes; global $G\alpha_{i2}$ knockouts	(Nobles et al. 2018)
$G\alpha_{i3}$		Decreased $I_{Kir}$	<i>Stimulation of Kir3/GIRK channels and/or counter-regulation of <math>G\alpha_{i2}</math> effects</i>		
$G\alpha_{i2}$	ERK	Blunted carbachol-induced phosphorylation of ERK	<i>Mediates M-AChR-induced ERK phosphorylation</i>	Ventricular homogenates; global $G\alpha_{i2}$ knockouts; pre-treatment with carbachol in vivo	(Dizayee et al. 2011)
$G\alpha_{i3}$		Unaffected carbachol-induced phosphorylation of ERK	<i>Not involved in M-AChR-mediated ERK phosphorylation</i>		

$\beta_2$ -AR,  $\beta_2$  adrenoreceptor; ERK, extracellular signal-regulated kinase;  $I_{CaL}$ , L-type  $Ca^{2+}$  currents;  $I_{Kir}$ , Kir3/GIRK-mediated inward rectifying  $K^+$  current; Kir3/GIRK, inward-rectifier potassium channel/G protein-coupled inward-rectifier potassium channel; LTCC, L-type  $Ca^{2+}$  channel; M-AChR, muscarinic acetylcholine receptor

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02751-8>.

**Acknowledgements** We appreciate the excellent technical support by Cora Fried, Sigrid Kirchmann-Hecht, Mourad Ben Said, Carsten Korte, and Simon Grimm. The authors thank Petra Schiller (Institute of Medical Statistics and Bioinformatics, University of Cologne, Germany) for excellent statistical advice.

**Author contributions** All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection, and analysis were performed by TS, DM, VL, and JM. The first draft of the manuscript was written by JM, and all authors contributed to the successive versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. The authors declare that all data were generated in-house and that no paper mill was used.

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by the graduate program in Pharmacology and Experimental Therapeutics of the University of Cologne and Bayer Schering Pharma [C25 to T.S. and J.M.] and the Intramural Research Program of the NIH [Z01-ES-101643 to L.B.]. The work of B.N. and V.L. was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (NU 53/9–2 & NU 53/13–1). The work of D.M. was supported by DFG grants GRK 2407 (360043781) and TRR 259 (397484323).

**Data availability** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

**Ethical approval** The manuscript does not contain clinical studies or patient data. The responsible federal state authority approved animal breeding, maintenance, and experiments (Landesamt fuer Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen; references: 84–02.05.20.12.294, 84–02.05.20.13.060, and 84–02.04.2016.A422). All animal experiments complied with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

**Competing interests** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Ackers-Johnson M, Li PY, Holmes AP et al (2016) A simplified, Langendorff-free method for concomitant isolation of viable cardiac myocytes and nonmyocytes from the adult mouse heart. *Circ Res* 119:909–920. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309202>
- Ahmet I, Lakatta EG, Talan MI (2005) Pharmacological stimulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors ( $\beta_2$ AR) enhances therapeutic effectiveness of  $\beta_1$ AR blockade in rodent dilated ischemic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev* 10:289–296. <https://doi.org/10.1007/s10741-005-7543-3>
- Albarrán-Juárez J, Gilsbach R, Piekorz RP et al (2009) Modulation of  $\alpha_2$ -adrenoceptor functions by heterotrimeric G $\alpha$ i protein isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 331:35–44. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.157230>
- Alex L, Russo I, Holoborodko V, Frangogiannis NG (2018) Characterization of a mouse model of obesity-related fibrotic cardiomyopathy that recapitulates features of human heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315:H934–H949. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00238.2018>
- Baba HA, Stypmann J, Grabellus F et al (2003) Dynamic regulation of MEK/Erks and Akt/GSK-3 $\beta$  in human end-stage heart failure after left ventricular mechanical support: myocardial mechanotransduction-sensitivity as a possible molecular mechanism. *Cardiovasc Res* 59:390–399. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00393-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00393-6)
- Bai Y, Morgan EE, Giovannucci DR et al (2013) Different roles of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger in ouabain-induced inotropy, cell signaling, and hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 304:H427–H435. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00462.2012>
- Baker AJ (2014) Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflugers Arch* 466:1139–1150. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1491-5>
- Beer-Hammer S, Lee SC, Mauriac SA et al (2018) G $\alpha$ i proteins are indispensable for hearing. *Cell Physiol Biochem* 47:1509–1532. <https://doi.org/10.1159/000490867>
- Beetz N, Hein L, Meszaros J et al (2009) Transgenic simulation of human heart failure-like L-type Ca<sup>2+</sup>-channels: implications for fibrosis and heart rate in mice. *Cardiovasc Res* 84:396–406. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp251>
- Bristow MR, Ginsburg R, Umans V et al (1986)  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective  $\beta_1$ -receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 59:297–309. <https://doi.org/10.1161/01.RES.59.3.297>
- Brown LA, Harding SE (1992) The effect of pertussis toxin on  $\beta$ -adrenoceptor responses in isolated cardiac myocytes from noradrenaline-treated guinea-pigs and patients with cardiac failure. *Br J Pharmacol* 106:115–122. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb14302.x>
- Chesley A, Lundberg MS, Asai T et al (2000) The  $\beta_2$ -adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* 87:1172–1179. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.12.1172>
- Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS (1999) Opposing effects of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 100:2210–2212. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.22.2210>
- Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26:1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- del Monte F, Hajjar RJ (2008) Intracellular devastation in heart failure. *Heart Fail Rev* 13:151–162. <https://doi.org/10.1007/s10741-007-9071-9>
- de Lucia C, Wallner M, Eaton DM et al (2019) Echocardiographic strain analysis for the early detection of left ventricular systolic/diastolic dysfunction and dyssynchrony in a mouse model of physiological aging. *The Journals of Gerontology: Series A* 74:455–461. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly139>

- Devanathan V, Hagedorn I, Köhler D et al (2015) Platelet Gi protein G $\alpha$ i2 is an essential mediator of thrombo-inflammatory organ damage in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:6491–6496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505887112>
- Dizayee S, Kaestner S, Kuck F et al (2011) G $\alpha$ i2- and G $\alpha$ i3-specific regulation of voltage-dependent L-type calcium channels in cardiomyocytes. *PLoS ONE* 6:e24979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024979>
- El-Armouche A, Zolk O, Rau T, Eschenhagen T (2003) Inhibitory G-Proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure. *Cardiovasc Res* 60:478–487. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.09.014>
- Engelhardt S, Boknik P, Keller U et al (2001a) Early impairment of calcium handling and altered expression of junctin in hearts of mice overexpressing the  $\beta$ 1-adrenergic receptor. *FASEB J* 15:1–18. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0107fe>
- Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, Lohse MJ (2001b) Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol* 60:712–7
- Engelhardt S, Hein L, Dyachenkov V et al (2004) Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Circulation* 109:1154–1160. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000117254.68497.39>
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7059–7064. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.7059>
- Eschenhagen T, Mende U, Diederich M et al (1992a) Long term beta-adrenoceptor-mediated up-regulation of Gi alpha and G(o) alpha mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. *Mol Pharmacol* 42:773–783
- Eschenhagen T, Mende U, Nose M et al (1992b) Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein  $\alpha$  subunit G $\alpha$ i-2 in human end-stage heart failure. *Circ Res* 70:688–696. <https://doi.org/10.1161/01.res.70.4.688>
- Foerster K, Groner F, Matthes J et al (2003) Cardioprotection specific for the G protein Gi2 in chronic adrenergic signaling through 2-adrenoceptors. *Proc Natl Acad Sci* 100:14475–14480. <https://doi.org/10.1073/pnas.1936026100>
- Gohla A, Klement K, Piekorz RP et al (2007) An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G $\alpha$ i3 in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proc Natl Acad Sci* 104:3003–3008
- Haq S, Choukroun G, Lim H et al (2001) Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103:670–677. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.5.670>
- Hippe H, Lüdde M, Schnoes K et al (2013) Competition for G  $\beta$  dimers mediates a specific cross-talk between stimulatory and inhibitory G protein  $\alpha$  subunits of the adenylyl cyclase in cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 386:459–469. <https://doi.org/10.1007/s00210-013-0876-x>
- Hussain RI, Aronsen JM, Afzal F et al (2013) The functional activity of inhibitory G protein (Gi) is not increased in failing heart ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 56:129–138. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.015>
- Jain M, Lim CC, Nagata K et al (2001) Targeted inactivation of G $\alpha$ i does not alter cardiac function or  $\beta$ -adrenergic sensitivity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 280:H569–H575. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.2.H569>
- Keller K, Maass M, Dizayee S et al (2015) Lack of G $\alpha$ i2 leads to dilative cardiomyopathy and increased mortality in  $\beta$ 1-adrenoceptor overexpressing mice. *Cardiovasc Res* 108:348–356. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv235>
- Klein C (2009) Die Bedeutung des G-proteins G $\alpha$ i3 für das Schaltverhalten kardialer L-Typ-Calciumkanäle in Kardiomyozyten sowie für die Entwicklung von kardialer Hypertrophie und Insuffizienz von Mäusen bei Überexpression des  $\beta$ 2-Adrenorezeptors (Dissertation). Thesis, University of Cologne
- Köhler D, Devanathan V, De Franz CBO et al (2014) G $\alpha$ i2- and G $\alpha$ i3-deficient mice display opposite severity of myocardial ischemia reperfusion injury. *PLoS ONE* 9:3–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098325>
- Kompa AR, Gu XH, Evans BA, Summers RJ (1999) Desensitization of cardiac  $\beta$ -adrenoceptor signaling with heart failure produced by myocardial infarction in the rat. Evidence for the role of Gi but not Gs or phosphorylating proteins. *J Mol Cell Cardiol* 31:1185–1201. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1999.0951>
- Kotecha D, Flather MD, Altman DG et al (2017) Heart rate and rhythm and the benefit of beta-blockers in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 69:2885–2896. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.001>
- Kotecha D, Manzano L, Krum H et al (2016) Effect of age and sex on efficacy and tolerability of  $\beta$  blockers in patients with heart failure with reduced ejection fraction: Individual patient data meta-analysis. *BMJ* 353:i1855. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1855>
- Kuwano Y, Adler M, Zhang H et al (2016) G $\alpha$ i2 and G $\alpha$ i3 differentially regulate arrest from flow and chemotaxis in mouse neutrophils. *J Immunol* 196:3828–3833. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500532>
- Lee GJ, Yan L, Vatner DE, Vatner SF (2015) Mst1 inhibition rescues  $\beta$ 1-adrenergic cardiomyopathy by reducing myocyte necrosis and non-myocyte apoptosis rather than myocyte apoptosis. *Basic Res Cardiol* 110:7. <https://doi.org/10.1007/s00395-015-0461-1>
- Leiss V, Schönsiegel A, Gnad T et al (2020) Lack of G $\alpha$ i2 proteins in adipocytes attenuates diet-induced obesity. *Mol Metab* 40:101029. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101029>
- Lenhard W, Lenhard A (2016) Computation of effect sizes. Retrieved from: [https://www.psychometrica.de/effect\\_size.html](https://www.psychometrica.de/effect_size.html). *Psychometrica*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17823.92329>. Accessed 05 Oct 2023
- Li F, De Godoy M, Rattan S (2004) Role of adenylate and guanylate cyclases in beta1-, beta2-, and beta3-adrenoceptor-mediated relaxation of internal anal sphincter smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1111–1120. <https://doi.org/10.1124/JPET.103.060145>
- Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN et al (2000) Early and delayed consequences of  $\beta$ 2-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* 101:1707–1714. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.14.1707>
- Lorenz K, Schmitt JP, Vidal M, Lohse MJ (2009) Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2351–2355. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.08.002>
- Martin NP, Whalen EJ, Zamah MA et al (2004) PKA-mediated phosphorylation of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cell Signal* 16:1397–1403. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2004.05.002>
- Mauriac SA, Hien YE, Bird JE, et al. (2017) Defective Gpsm2/G $\alpha$ i3 signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough syndrome. *Nat Commun* 8:14907. <https://doi.org/10.1038/ncomms14907>
- Melsom CB, Hussain RI, Ørstavik Ø et al (2014) Non-classical regulation of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptor-mediated inotropic responses in rat heart ventricle by the G protein Gi. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 387:1177–1186. <https://doi.org/10.1007/s00210-014-1036-7>
- Mende U, Eschenhagen T, Geertz B et al (1992) Isoprenaline-induced increase in the 40/41 kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345:44–50. <https://doi.org/10.1007/BF00175468>
- Miyamoto T, Takeishi Y, Takahashi H et al (2004) Activation of distinct signal transduction pathways in hypertrophied hearts by

- pressure and volume overload. *Basic Res Cardiol* 99:328–337. <https://doi.org/10.1007/s00395-004-0482-7>
- Muth JN, Yamaguchi H, Mikala G et al (1999) Cardiac-specific overexpression of the alpha(1) subunit of the L-type voltage-dependent Ca(2+) channel in transgenic mice. Loss of isoproterenol-induced contraction. *J Biol Chem* 274:21503–21506
- Nagata K, Ye C, Jain M et al (2000) G $\alpha$ 2 but not G $\alpha$ 3 is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circ Res* 87:903–909. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.10.903>
- Nagoshi T, Matsui T, Aoyama T et al (2005) PI3K rescues the detrimental effects of chronic Akt activation in the heart during ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 115:2128–2138. <https://doi.org/10.1172/JCI23073>
- Nakayama H, Chen X, Baines CP et al (2007) Ca<sup>2+</sup>- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest* 117:2431–2444. <https://doi.org/10.1172/JCI31060>
- Nobles M, Montaigne D, Sebastian S et al (2018) Differential effects of inhibitory G protein isoforms on G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in adult murine atria. *Am J Physiol Cell Physiol* 314:C616–C626. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00271.2016>
- Offermanns S (1999) New insights into the in vivo function of heterotrimeric G-proteins through gene deletion studies. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360:5–13. <https://doi.org/10.1007/s002109900030>
- Olshansky B, Sabbah HN, Hauptman PJ et al (2008) Parasympathetic nervous system and heart failure pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation* 118:863–871. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.760405>
- Pfaffl MW (2002) Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:36e–336. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Plummer NW, Spicher K, Malphurs J et al (2012) Development of the mammalian axial skeleton requires signaling through the G $\alpha$ i subfamily of heterotrimeric G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:21366–21371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219810110>
- Ruppert C, Deiss K, Herrmann S et al (2013) Interference with ERK-Thr188 phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:7440–7445. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221999110>
- Savarese G, Lund LH (2017) Global public health burden of heart failure. *Card Fail Rev* 3:7–11. <https://doi.org/10.15420/cfr.2016:25:2>
- Schnelle M, Catibog N, Zhang M et al (2018) Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 114:20–28. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.10.006>
- Schröper T, Mehrkens D, Leiss V et al (2020) Protective effects of G $\alpha$ i3-deficiency in a mouse model of  $\beta$ 1-adrenoceptor mediated cardiomyopathy. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393:13–13
- Sengeløv M, Jørgensen PG, Jensen JS et al (2015) Global longitudinal strain is a superior predictor of all-cause mortality in heart failure with reduced ejection fraction. *JACC Cardiovasc Imaging* 8:1351–1359. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2015.07.013>
- Seyedabadi M, Hossein M, Albert PR (2019) Pharmacology & Therapeutics Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): molecular determinants of GPCR / transducer selectivity and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.006>
- Strohman MJ, Maeda S, Hilger D et al (2019) Local membrane charge regulates  $\beta$ 2 adrenergic receptor coupling to G $\alpha$ 3. *Nat Commun* 10:2234. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-10108-0>
- Thompson BD, Jin Y, Wu KH et al (2007) Inhibition of G $\alpha$ i2 activation by G $\alpha$ i3 in CXCR3-mediated signaling. *J Biol Chem* 282:9547–9555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610931200>
- Vega SC, Leiss V, Piekorz R et al (2020) Selective protection of murine cerebral Gi/o-proteins from inactivation by parenterally injected pertussis toxin. *J Mol Med* 98:97–110. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01854-1>
- Wang Z, Dela Cruz R, Ji F et al (2014) G $\alpha$ i proteins exhibit functional differences in the activation of ERK1/2, Akt and mTORC1 by growth factors in normal and breast cancer cells. *Cell Commun Signal* 12:10. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-10>
- Wiege K, Le DD, Syed SN et al (2012) Defective macrophage migration in G $\alpha$ i2 - but not G $\alpha$ i3 -deficient mice. *J Immunol* 189:980–987. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200891>
- Wiege K, Ali SR, Gewecke B et al (2013) G $\alpha$ i2 is the essential G $\alpha$ i protein in immune complex - induced lung disease. *J Immunol* 190:324–333. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201398>
- Xiao RP, Cheng H, Zhou YY et al (1999) Recent advances in cardiac  $\beta$ 2-adrenergic signal transduction. *Circ Res* 85:1092–1100. <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.11.1092>
- Xiao RP, Zhang SJ, Chakir K et al (2003) Enhanced Gi signaling selectively negates  $\beta$ 2-adrenergic receptor (AR)- but not  $\beta$ 1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation* 108:1633–1639. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000087595.17277.73>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 4. Diskussion

### 4.1 Therapeutische Überlegungen bei der Herzinsuffizienz

In der Entwicklung einer (chronischen) Herzinsuffizienz führt initial ein pathologischer Stimulus (z.B. ein Myokardinfarkt) zu einer Verringerung des Herzzeitvolumens (HZV).<sup>7,9,70</sup> Durch Kompensationsmechanismen mittels vermehrter ADH-Ausschüttung, Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des Sympathikus kommt es zu einer vorübergehenden Steigerung des HZV und der Organperfusion.<sup>7,10</sup> Die akute kardiale Verbesserung wird im Wesentlichen erreicht durch eine Erhöhung der Herzfrequenz und Kontraktilität sowie eine vermehrte Natrium- und Wasserretention mit Vorlasterrhöhung.<sup>7,10</sup> Eine dabei begleitende Vasokonstriktion mit Blutdruckanstieg erhöht wiederum die Nachlast und verringert folglich das HZV.<sup>7,10</sup> Bedingt durch ein vermindertes HZV sowie durch Zunahme der Retention führt die Vorlasterrhöhung zu einer gesteigerten Freisetzung von natriuretischen Peptiden, die der Vasokonstriktion und erhöhten Natrium-/ Wasserretention entgegenwirken.<sup>7,10</sup> Langfristig können die genannten, zunächst hilfreichen Kompensationsmechanismen im Rahmen von Umbauprozessen im kardialen Remodeling resultieren, wodurch die Herzleistung zunehmend abnimmt und sich die hämodynamische Situation sowie kardiale Prognose verschlechtern.<sup>7,10</sup> Diesen Circulus vitiosus gilt es therapeutisch zu unterbrechen (Abb. 3a).

Im Rahmen einer nicht-invasiven Therapie stehen bei einer (chronischen) Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) medikamentös neben einer meist begleitenden (symptomatischen) Diuretika-Behandlung in erster Linie vier prognoseverbessernde Substanzklassen zur Verfügung.<sup>9,10</sup> Hierzu zählen ACE-Hemmer/ AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten (insbesondere Candesartan, Valsartan und Losartan; nachrangige Alternative zu ACE-Hemmern im Falle einer Unverträglichkeit gegenüber ACE-Hemmern)/ Angiotensin-Rezeptor-Nepilysin-Inhibitoren (ARNI), Betablocker ( $\beta$ -Blocker), Mineralocorticoidrezeptor-Antagonisten und SGLT2-Inhibitoren.<sup>7,9,10</sup> ACE-Hemmer/ AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten/ ARNI und Mineralocorticoidrezeptor-Antagonisten beeinflussen im Wesentlichen das RAAS-System mittels verminderter Wirkung durch Angiotensin II, bzw. Aldosteron und bewirken damit eine Senkung der Vor- und Nachlast und sie steuern dem kardialen Remodeling entgegen.<sup>7,10</sup> In der Niere synthetisiertes Renin spaltet das in der Leber produzierte Angiotensinogen in Angiotensin I, welches durch vor allem in Endothelzellen der Lunge gebildetes Angiotensin converting enzyme (ACE) in Angiotensin II umgewandelt wird.<sup>103,104</sup> Durch Hemmung der zuletzt genannten Reaktion entfalten ACE-Hemmer ihre Wirkung.<sup>7,10</sup> Angiotensin II bewirkt eine Vasokonstriktion, eine Freisetzung von ADH und eine vermehrte Ausschüttung von Aldosteron, das zu einer zunehmenden Natrium- und Wasserretention führt.<sup>7,103,104</sup> Angiotensin II wirkt über verschiedene Rezeptoren, aus kardiovaskulärer Perspektive ist primär der AT<sub>1</sub>-Rezeptor von

Bedeutung.<sup>103,104</sup> Durch eine Blockade hier üben AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten ihre Wirkung aus.<sup>7,10</sup> Mineralocorticoidrezeptor-Antagonisten binden kompetitiv und blockieren damit den Aldosteronrezeptor im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere, wodurch die Synthese von Natrium- und Kaliumkanälen gehemmt wird und folglich weniger Natrium und Wasser resorbiert und vermindert Kalium ausgeschieden werden.<sup>7,10,103,104</sup> ARNI hemmen das Enzym Nephilysin, wodurch der Abbau natriuretischer Peptide inhibiert wird.<sup>9,10</sup> Da Nephilysin zudem Angiotensin II abbaut, erfolgt eine Kombination mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Valsartan, um die Effekte erhöhter Angiotensin II-Spiegel aufzuheben.<sup>10,105</sup> Die gleichzeitige Anwendung eines Nephilysin-Inhibitors und ACE-Hemmers ist nicht möglich, da bereits die alleinige Nephilysin-Hemmung mit einem relevanten Risiko für ein Angioödem verbunden ist.<sup>105</sup> Die Kombination von Nephilysin-Hemmer und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten ist somit als ein Kompromiss zu verstehen.<sup>105</sup> SGLT2-Inhibitoren wirken am proximalen Tubulus der Niere, indem sie spezifisch den renalen, natriumabhängigen Glukosetransporter SGLT2 hemmen und folglich die Glukoseausscheidung über den Urin gesteigert wird mit vermehrter osmotischer Diurese sowie damit einhergehend reduziertem Plasmavolumen und konsekutiver Vor- und Nachlastsenkung.<sup>71</sup> Ursprünglich wurden SGLT2-Inhibitoren zur Therapie des Diabetes mellitus entwickelt und verwendet.<sup>71</sup> Im Rahmen der Zulassungsstudien zeigten sich unerwartete, unabhängig der antidiabetischen Wirkung, positive Nebeneffekte. Der detaillierte, a.e. multifaktorielle Wirkmechanismus eines darüber hinaus bestehenden kardio- und nephroprotektiven Effekts ist aktuell unklar.<sup>71</sup> Das Einsatzgebiet der Substanzklasse wurde entsprechend erweitert und beinhaltet derzeit die Behandlung des Diabetes mellitus Typ II, der Herzinsuffizienz und der chronischen Nierenerkrankung.<sup>71</sup>

Betablocker wirken zwar auch innerhalb des RAAS-Systems durch eine Inhibierung der Reninfreisetzung in der Niere, primär entfalten sie ihre Wirkung jedoch durch Blockade von  $\beta_1$ -Rezeptoren am Herzen, den dort dominanten  $\beta$ -Adrenozeptoren ( $\beta$ -AR), mittels kompetitiver Hemmung.<sup>7,72-74</sup> Betablocker bewirken durch Verdrängung der Katecholamine eine Verminderung der sympathikoadrenergen Stimulation des Herzens mit negativer Chrono- (Absenkung der Herzfrequenz), Dromo- (Verlangsamung der Erregungsleitung), Ino- (Abnahme der Kontraktilität) und Bathmotropie (Verringerung der Erregbarkeit/ Reizschwellerhöhung).<sup>72-74</sup> Durch eine potentiell zusätzliche Wirkung auf  $\beta_2$ -Rezeptoren in Bronchien und Blutgefäßen kann es zu einer Broncho- und Vasokonstriktion kommen.<sup>72,73</sup> Auch (unerwünschte) metabolische Effekte sind grundsätzlich möglich.<sup>72,73</sup> Entsprechend werden in der Therapie der Herzinsuffizienz kardioselektive Betablocker mit relativer Bevorzugung der  $\beta_1$ -Rezeptoren präferiert (z.B. Bisoprolol oder Metoprolol) neben Carvedilol und Nebivolol.<sup>9,72-74</sup> Betablocker mit intrinsischer sympathomimetischer Aktivität (ISA) haben in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen praktisch keinen Stellenwert.<sup>72-74</sup> Einige Betablocker haben darüber hinaus eine vasodilatierende Wirkung, dies entweder durch zusätzliche

$\alpha_1$ -Rezeptorblockade (z.B. Carvedilol),  $\beta_2$ -Rezeptorstimulation (z.B. Celiprolol) oder Stimulation der NO-Synthese im Gefäßendothel (z.B. Nebivolol [auch  $\beta_1$ -selektiv]).<sup>72,73</sup> Gemeinsam ist den klinisch relevanten Betablockern die Bindung und damit antagonistische Wirkung am  $\beta_1$ -Adrenozeptor.<sup>72-74</sup> Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor leitet extrazelluläre Signale nach Binden von Katecholaminen via G-Proteinen in das Zellinnere weiter.<sup>67</sup> Die aktivierte Untereinheit eines stimulierenden G-Proteins ( $G\alpha_s$ ) setzt die Signaltransduktion fort und aktiviert die Adenylatcyclase (AC) mit konsekutiv höheren Konzentrationen des Second Messengers cAMP und folglich erhöhter Aktivität der Proteinkinase A (PKA).<sup>68,69</sup> Es kommt zu einer Phosphorylierung unterschiedlicher (intrazellulärer) molekularer Zielstrukturen, darunter sarkolemmale L-Typ-Calciumkanäle (LTCC), sarkoplasmatische Ryanodinrezeptoren (RyR2), Phospholamban und Myofilamente mit u.a. daraus resultierender Erhöhung der kardialen Inotropie.<sup>70</sup> (Abb. 3b) Diese dargestellte klassische  $\beta$ -AR vermittelte Signalkaskade wird durch weitere komplexe Mechanismen und Interaktionspartner beeinflusst.<sup>67-70</sup> Eine dauerhafte  $\beta$ -adrenerge Stimulation kann zum o.g. kardialen Remodeling führen.<sup>7,10</sup> In diesem Zusammenhang ist eine PKA-unabhängige gesteigerte Aktivität der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKII) beschrieben, die zur Apoptose der Kardiomyozyten führt (Abb. 3b).<sup>83</sup> Neben Umbauprozessen wie Dilatation, Fibrose und Hypertrophie wird dabei auch eine Desensibilisierung des Myokards gegenüber adrenerger Stimulation mit einer Runterregulation und funktioneller Rezeptorkopplung der  $\beta_1$ -AR beobachtet.<sup>75-77</sup> Dies ist die Folge einer PKA- und  $\beta$ -AR Kinase ( $\beta$ ARK)-induzierten Phosphorylierung des Rezeptors mit anschließender Bindung des Rezeptorhemmers  $\beta$ -Arrestin, die verminderte Expression das Resultat einer Rezeptorinternalisierung und verminderten Rezeptor-(mRNA-)Synthese.<sup>76,77</sup> Demgegenüber bleibt die Anzahl der  $\beta_2$ -AR erhalten, wobei auch hier eine stimulierende adrenerge, PKA-vermittelte Antwort verringert ist.<sup>22,78</sup>  $\beta_2$ -AR binden sowohl stimulierende ( $G_s$ ), als auch inhibitorische ( $G_i$ ) G-Proteine.<sup>14</sup> Unter anhaltender adrenerger Stimulation kommt es zu einer Änderung der  $\beta_2$ -vermittelten Signaltransduktion mit Wechsel von  $G_s$ -vermittelter zu  $G_i$ -vermittelter Signalkaskade als Folge einer PKA-induzierten Rezeptorphosphorylierung und Hochregulation mit potentiell funktioneller Relevanz der  $G_i$ -Proteine.<sup>14,22,79-81</sup> Im kardiovaskulären System werden im Wesentlichen die zwei  $G\alpha_i$ -Isoformen  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_{i3}$ , unterschieden mit zunehmender Evidenz für Subtyp-spezifische Effekte.<sup>29-39</sup>

Dabei wird  $G\alpha_{i2}$  mit Kardioprotektion in Zusammenhang gebracht, wohingegen  $G\alpha_{i3}$  mit schädlichen Effekten assoziiert ist.<sup>35,43,91</sup> Der exakte molekulare Mechanismus ist dabei aktuell nicht geklärt. Hinsichtlich potentieller Isoform-spezifischer, kardialer Effekte scheint u.a.  $G\alpha_{i2}$  im Gegensatz zu  $G\alpha_{i3}$  Signale des muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors (mAChR) zu vermitteln und einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation von L-Typ-Calcium-Strömen ( $I_{cal}$ ) entgegenzuwirken.<sup>82</sup>  $G\alpha_{i2}$  hemmt mittels PI3K/ Akt die  $\beta_1$ -induzierte Apoptose, verringert über Phosphodiesterase 4 (PDE4) die PKA-Aktivität und vermindert damit letztlich die klassische  $\beta_1$ -vermittelte Phosphorylierungskaskade (Abb. 3b).<sup>53, 83</sup> Des Weiteren

zeigten Daten von Knockout Mäusen, dass ein Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  zu einer Abnahme der basalen  $I_{CaL}$ , wohingegen ein (absoluter)  $G\alpha_{i3}$ -Mangel zu einem Anstieg der basalen  $I_{CaL}$  führt.<sup>31</sup> Isoform-spezifisch aktiviert  $G\alpha_{i2}$  LTCC, während  $G\alpha_{i3}$  diese inhibiert.<sup>48,84</sup> Außerdem scheint  $G\alpha_{i3}$  entgegengesetzt zu  $G\alpha_{i2}$  die Aktivität von Kir3/GIRK-Kanälen zu stimulieren.<sup>85</sup> Darüber hinaus ist bei  $G\alpha_{i2}$  im Gegensatz zu  $G\alpha_{i3}$  eine Vermittlung innerhalb der mAChR-induzierten ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Phosphorylierung beschrieben.<sup>31</sup>

Bei allen Überlegungen hinsichtlich der (sympathoadrenergen) Signaltransduktion bei Herzinsuffizienz beruht die Wirkung der Betablocker in erster Linie auf einem Antagonismus am Anfang der genannten  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade.<sup>72-74</sup> Eine zentrale Frage ist, ob eine selektive Therapie unterhalb der  $\beta$ -AR nicht von Vorteil wäre, ohne das gesamte  $\beta$ -AR-/ cAMP-/ PKA-System zu beeinflussen. Hinsichtlich Subtyp-spezifischer Funktionen der  $G_i$ -Proteine erscheint es pathophysiologisch sinnvoll, protektive Effekte von  $G\alpha_{i2}$  zu stärken und schädliche Auswirkungen von  $G\alpha_{i3}$  zu limitieren.

Als potentielle Akteure unterhalb der Ebene G-Protein gekoppelter Rezeptoren werden Phosphodiesterase-Hemmer (PDE-Hemmer) nach ihrer spezifischen Enzymhemmung unterschieden und finden diverse therapeutische Anwendungen.<sup>86-88</sup> Während PDE5-Hemmer (z.B. Tadalafil oder Sildenafil) durch verminderten Abbau von cGMP und daraus resultierender Vasodilatation und Muskelrelaxation in der Therapie der pulmonalen Hypertonie und erektilen Dysfunktion eingesetzt werden, finden PDE3-Hemmer (wie Milrinon) als Reservemedikament Einsatz in der Kurzzeit-Behandlung einer schweren/ dekompenzierten, akuten Herzinsuffizienz, wenn andere positiv inotrop wirkende Substanzen, wie beispielsweise das Katecholamin Dobutamin oder der Calcium-Sensitizer Levosimendan, keine ausreichende Wirkung erzielen.<sup>86-89</sup> Durch Hemmung des abbauenden Enzyms von cAMP mit folglich erhöhter Konzentration des Second Messengers wird am Myokard durch erhöhte Calciumkonzentrationen eine positive Inotropie erzielt, wohingegen in peripheren Gefäßen es zu einer Vasodilatation kommt.<sup>86,89</sup> Aufgrund eines ausgeprägten unerwünschten Nebenwirkungsprofils (u.a. pro-arrhythmogen und Risiko für Hypotonie) ist die Anwendung zeitlich sehr begrenzt.<sup>86,89,90</sup> PDE4-Hemmer (z.B. Roflumilast) bewirken einen Anstieg von cAMP und sind in der Behandlung der (schweren) COPD zugelassen.<sup>86,92</sup> Bei Patienten mit Herzinsuffizienz werden sie ausdrücklich nicht empfohlen.<sup>92</sup> Die Expression von PDE4 ist bei Herzinsuffizienz herunterreguliert.<sup>93</sup> Daten von Mäusen zeigen, dass ein PDE4-Mangel eine Herzinsuffizienz begünstigt.<sup>93</sup> Da  $G\alpha_{i2}$  mögliche protektive Effekte über PDE4 ausübt als Gegenregulation der klassischen  $\beta_1$ -vermittelten Phosphorylierungskaskade, könnte die Wirkung von PDE4-Hemmern hier als antagonistisch interpretiert werden.<sup>53, 83</sup>

Ein  $G\alpha_{i3}$ -Mangel mittels genetischen Knockouts hat sich im Ischämie-Reperfusion-Modell sowie im aktuellen Mausmodell der Herzinsuffizienz, das dieser Arbeit zugrunde liegt, als vorteilhaft



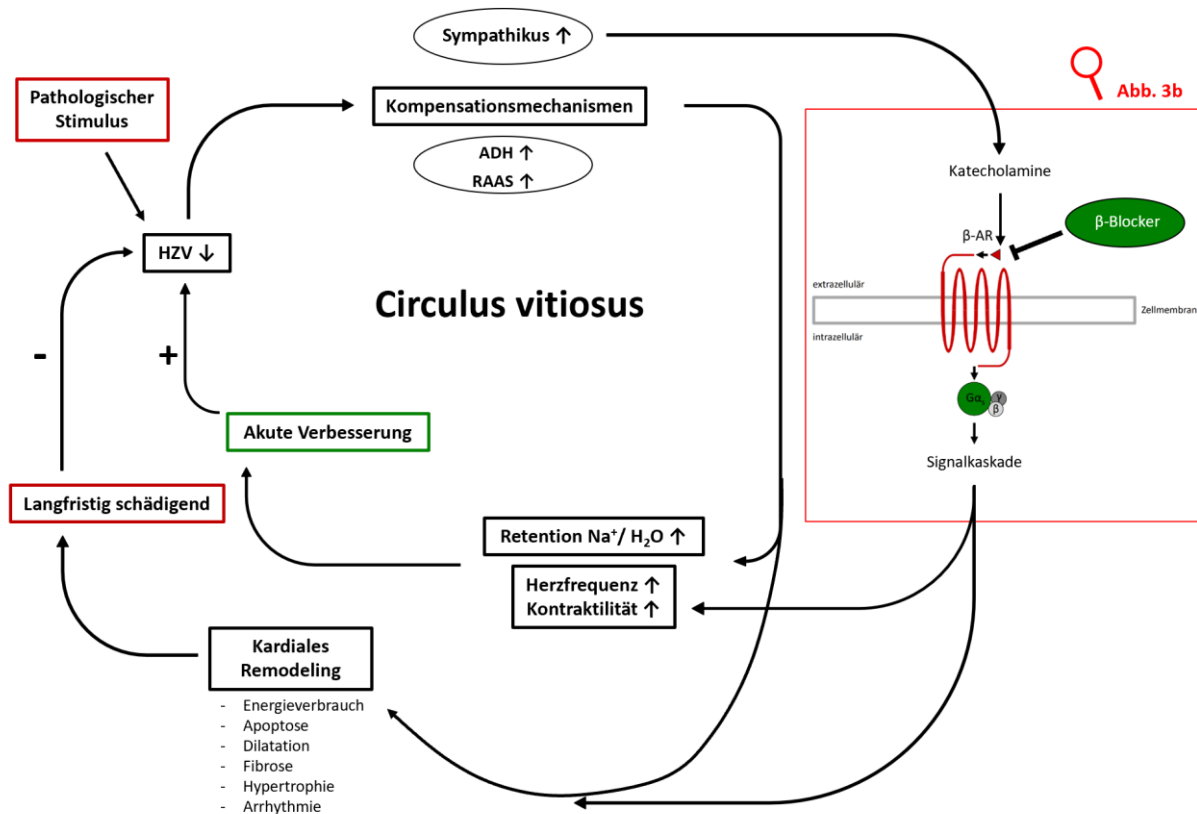
erwiesen.<sup>35,91</sup> Entsprechend wäre eine gezielte Hemmung, bzw. Runterregulation des Proteins eine denkbare therapeutische Option.

Monoklonale Antikörper, wie sie u.a. in der Krebstherapie verwendet werden, können spezifisch bestimmte Moleküle (Epitope) binden und diese blockieren, weshalb sie großes Potential als Arzneimittel besitzen.<sup>94,95</sup> Eine überlegenswerte therapeutische Möglichkeit wäre die spezifische Bindung und Inaktivierung von  $G\alpha_{i3}$  durch monoklonale Antikörper. Sie sind allerdings in erster Linie auf extrazelluläre Ziele ausgerichtet, sodass ihr Einsatz bei therapeutisch wichtigen intrazellulären Zielstrukturen begrenzt ist aufgrund der Unfähigkeit der Antikörper, die Zellmembran zu überwinden.<sup>96</sup> Folglich wurden Verfahren, wie z.B. die Microinjektion oder die Elektroporation, entwickelt zur Einbringung von Antikörpern in die Zelle und Entfaltung ihrer Wirkung dort.<sup>96</sup> In-vivo haben sich diese Methoden jedoch bislang als nicht praktikabel erwiesen.<sup>96</sup>

Seit einigen Jahren sind sogenannte small interfering RNA (siRNA) zunehmend Gegenstand der Forschung und werden therapeutisch genutzt zur gezielten Blockade spezifischer Gen-Sequenzen mittels RNA-Interferenz (RNAi).<sup>97-102</sup> Von außen in die Zelle eingebrachte siRNAs/ RNAi-Therapeutika binden an komplementäre mRNAs und führen zu deren Abbau, sodass die Genexpression gehemmt wird (sog. „Gen-Silencing“).<sup>97-102</sup> Auf diese Weise ist es möglich, bestimmte Proteine in ihrer Synthese zu hemmen.<sup>97-102</sup> Eine Isoform-spezifische Anwendung innerhalb von  $G_i$ -Proteinen im Sinne einer zielgerichteten Therapie durch Hemmung von  $G\alpha_{i3}$  könnte eine vielversprechende neue Strategie in der Herzinsuffizienz-Behandlung darstellen (Abb. 3b).

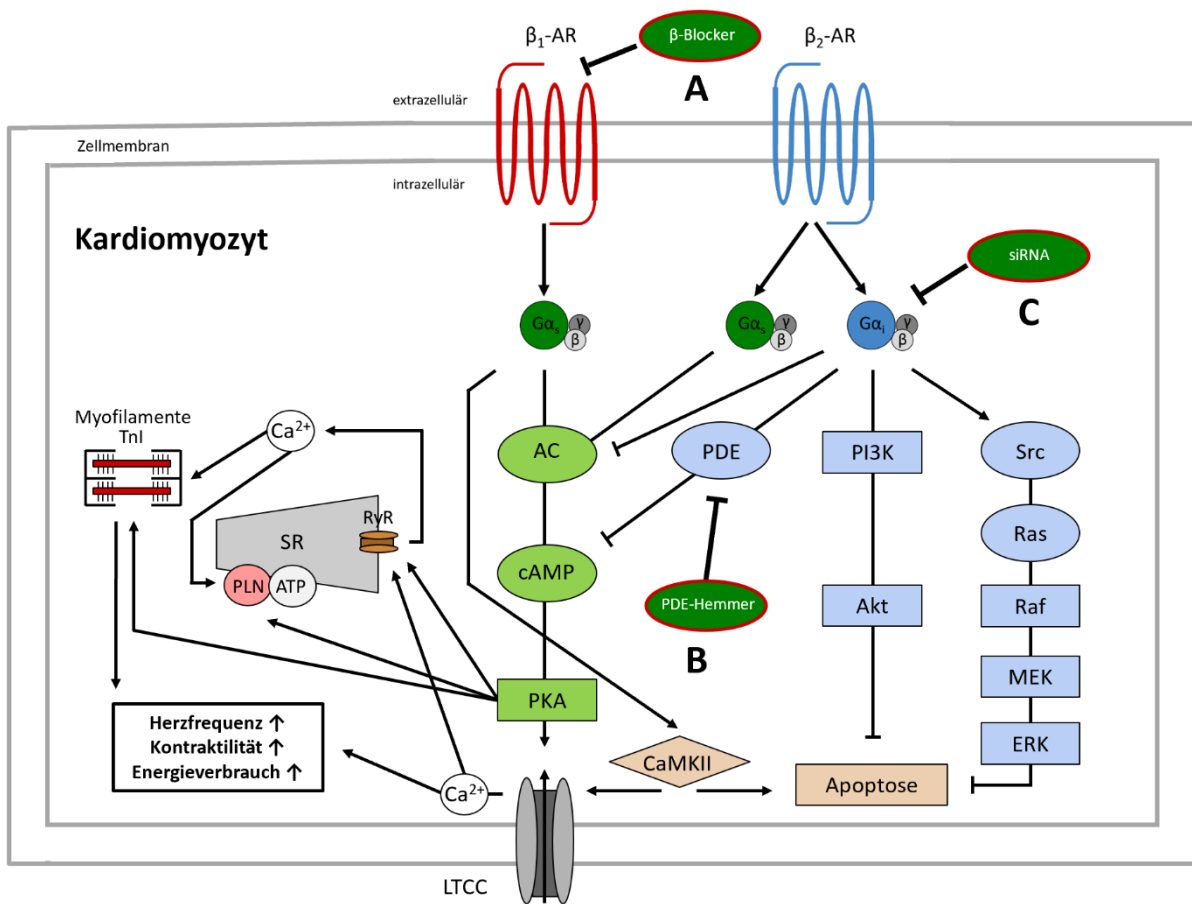
Hier stehen wir aktuell am Anfang und zunächst sind tierexperimentelle Versuche notwendig, um Effekte und Mechanismen der  $G_i$ -Proteine bei Herzinsuffizienz noch besser zu verstehen.

In der aktuellen Studie untersuchten wir daher die Rolle und Auswirkungen eines  $G\alpha_{i3}$ -Mangels in einem durch  $\beta_1$ -Adrenozeptor Überexpression vermittelten Mausmodell der Herzinsuffizienz mit dem Ziel, inhibitorische G-Proteine als potentiell therapeutisches Target zu identifizieren.<sup>91</sup>



**Abbildung 3a. Circulus vitiosus in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz mit Fokus auf die  $\beta$ -adrenerge Signalvermittlung.**

Initial führt ein pathologischer Stimulus mit kardialen Schaden zu einer Verringerung des Herzzeitvolumens (HZV).<sup>7,9,70</sup> Mittels Kompensationsmechanismen (vermehrte ADH-Ausschüttung, Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des Sympathikus) wird eine vorübergehende Steigerung des HZV und der Organperfusion gewährleistet.<sup>7,10</sup> Langfristig können diese Mechanismen durch Umbauprozesse zum schädlichen kardialen Remodeling mit progredienter Verschlechterung der Hämodynamik führen.<sup>7,10</sup> Dieser Circulus vitiosus kann hinsichtlich der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion beispielsweise durch  $\beta$ -Blocker, wie sie in der Herzinsuffizienz-Therapie üblich sind, unterbrochen werden (näheres hierzu s. Abbildung 3b).<sup>9,10</sup> Weitere Abkürzungen: ADH: Antidiuretisches Hormon; H<sub>2</sub>O: Wasser; Na<sup>+</sup>: Natrium; (Abb. in Anlehnung an El-Armouche et al. (2009).)<sup>70</sup>



**Abbildung 3b. Signaltransduktion der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren (AR) via G-Proteine im Herzen sowie potentielle therapeutische Zielstrukturen in der  $\beta$ -adrenergen und G-Protein vermittelten Signalkaskade.**

Die „klassische“  $\beta_1$ -AR vermittelte Signalvermittlung erfolgt über ein stimulierendes G-Protein ( $G_{\alpha_s}$ ) mit Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), konsekutiv höheren Konzentrationen des Second Messengers cAMP und folglich erhöhter Aktivität der Proteinkinase A (PKA).<sup>68,69</sup> Es folgt die Phosphorylierung unterschiedlicher molekularer Zielstrukturen mit u.a. hieraus resultierender Erhöhung der Herzfrequenz und Inotropie.<sup>70</sup> Eine dauerhafte  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation führt durch eine Änderung des Signalwegs mit Abnahme der PKA-Phosphorylierungskaskade und gesteigerten Aktivität der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKII) zur Apoptose der Kardiomyozyten und zum kardialen Remodeling.<sup>83</sup>  $\beta_2$ -Adrenozeptoren binden sowohl an stimulierende, als auch hemmende G-Proteine.<sup>14</sup> Inhibitorische G-Proteine ( $G_{\alpha_i}$ ) können die  $G_{\alpha_s}$ -vermittelte Signalweiterleitung über Phosphodiesterase (PDE) inhibieren.<sup>53, 83</sup> Zudem sind anti-apoptotische Effekte beschrieben, hier dargestellt über den Akt- und ERK-Signalweg.<sup>53, 83</sup> A:  $\beta$ -Blocker wirken am Anfang der genannten  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade mittels kompetitiver Hemmung am  $\beta$ -AR.<sup>72-74</sup>

B: Phosphodiesterase-Hemmer (PDE-Hemmer) wie z.B. PDE3-/4-Hemmer inhibieren innerhalb der  $G\alpha_i$ -vermittelten Signaltransduktion und führen durch Hemmung des abbauenden Enzyms zu einer erhöhten Konzentration des Second Messengers cAMP.<sup>86-92</sup> C: Durch small interfering RNA (siRNA) ist mittels RNA-Interferenz (RNAi) grundsätzlich eine (Subtyp-spezifische) Hemmung von  $G\alpha_i$ -Proteinen im Sinne von „Gen-Silencing“ denkbar.<sup>97-102</sup> Weitere Abkürzungen: Akt: Proteinkinase B; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: Cyclisches Adenosinmonophosphat;  $Ca^{2+}$ : Calcium; ERK: extracellular signal-regulated kinases; LTCC: L-Typ-Calciumkanal; MEK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase; PLN: Phospholamban; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; Raf: rapidly accelerated fibrosarcoma/ rat fibrosarcoma - eine Familie von Proteinkinasen; Ras: Akronym für rat sarcoma - Proto-Onkogen, das für ein kleines G-Protein kodiert; RyR: Ryanodin-Rezeptor; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum; Src: Akronym für sarcoma – eine Tyrosinkinase; Tnl: Troponin I; (Abb. in Anlehnung an Xiao et al. (2006).)<sup>83</sup>

#### **4.2 Rolle der $G_i$ -Proteine in einem durch $\beta_1$ -Adrenozeptor Überexpression vermittelten Mausmodell der Herzinsuffizienz**

$\beta_1$ -transgene ( $\beta_1$ -tg) Mäuse präsentieren sich mit einer progredient eingeschränkten kardialen Funktion, vergesellschaftet mit einem verringerten Überleben, sodass diese genetisch veränderten Tiere ein geeignetes Herzinsuffizienzmodell darstellen, um das zusätzliche Fehlen von  $G\alpha_i$  zu untersuchen.<sup>16,17,43,44</sup> Der in der Vorgängerstudie im Fokus stehende (absolute)  $G\alpha_{i2}$ -Mangel hatte in einem durch  $\beta_1$ -Adrenozeptor ( $\beta_1$ -AR) Überexpression vermittelten Mausmodell der Herzinsuffizienz schädliche, kardiale Effekte gezeigt.<sup>43</sup> Im Zentrum der aktuellen Studie stand die Analyse der eng verwandten  $G\alpha_{i3}$ -Isoform mit der Frage, welche Rolle diese einnimmt im gleichen Modell der Herzinsuffizienz.<sup>91</sup> Zentrale Punkte waren hierbei, ob ein kompletter  $G\alpha_{i3}$ -Mangel die kardiale Funktion und die Prognose der  $\beta_1$ -tg Mäuse beeinflusst und wenn ja, auf welche Weise. Präzise sollte dabei evaluiert werden, ob ein möglicher Effekt schädlich ist, ob keine Auswirkungen beobachtet werden können oder ob sogar protektive Eigenschaften nachzuweisen sind.<sup>91</sup>

Die Ergebnisse der aktuellen Studie zeigten, dass das Fehlen von  $G\alpha_{i3}$  in  $\beta_1$ -AR überexprimierenden Mäusen vorteilhaft, bzw. protektiv war durch das Verlangsamen oder sogar Verhindern der Entwicklung einer Herzinsuffizienz.<sup>91</sup> Demgegenüber konnte durch unsere Arbeitsgruppe im Vorhinein demonstriert werden, dass ein  $G\alpha_{i2}$ -Mangel in  $\beta_1$ -tg Mäusen die Herzinsuffizienz aggravierte.<sup>43</sup> Dabei konnten relevante Auswirkungen der Herzinsuffizienz bereits zu einem Zeitpunkt nachgewiesen werden, noch bevor eine Herzinsuffizienz in den  $\beta_1$ -AR überexprimierenden Tieren apparent wurde.<sup>43</sup> Dies trat in einem Alter von ca. 300 ( $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i2}^{-/-}$ ), bzw. 550 ( $\beta_1$ -tg) Tagen auf.<sup>43,44</sup> Somit kann der gleiche Effekt eines  $G\alpha_{i3}$ -Mangels im Vergleich zum  $G\alpha_{i2}$ -Knockout in dem durch  $\beta_1$ -AR Überexpression

vermittelten Mausmodell der Herzinsuffizienz ausgeschlossen werden. Diskutabel ist die Annahme, ob die verbleibende  $G\alpha_i$ -Isoform funktionell die Fehlende durch eine mögliche Hochregulation ersetzt, wie zuvor durch einige Autoren beschrieben.<sup>33,35,37,39</sup> Allerdings ist die Literatur uneinheitlich bei den Ergebnissen von Western-Blot-Analysen bezüglich der gesteigerten kardialen  $G\alpha_{i2}$ -Expression bei  $G\alpha_{i3}$ -Knockout Mäusen auf Proteinebene.<sup>30,31,35,45</sup> In der aktuellen Studie haben wir keine Hochregulation von  $G\alpha_{i2}$  auf Proteinebene beobachtet.<sup>91</sup> Interessanterweise kam auf mRNA-Ebene einzig eine signifikant höhere  $G\alpha_{i2}$ - (*Gnai2 mRNA*) (und  $G\alpha_{i3}$ - (*Gnai3 mRNA*)) Expression in den  $\beta_1$ -tg Mäusen zur Darstellung im Vergleich zum Wildtyp, den  $G\alpha_{i3}$ -Knockout Mäusen und  $\beta_1$ -tg Tieren mit  $G\alpha_{i3}$ -Knockout.<sup>91</sup> Ein pathologischer Stimulus, hier eine voranschreitende Herzinsuffizienz, scheint dabei eine Überexpression mit potentiell funktioneller Relevanz der  $G\alpha_i$ -Proteine zu begünstigen, ähnlich wie bereits in der Literatur beschrieben.<sup>14,22,79-81</sup> Das Expressionsniveau von  $G\alpha_{i2}$  unterschied sich auf mRNA-Ebene nicht zwischen Wildtyp,  $G\alpha_{i3}$ -Knockout Mäusen und  $\beta_1$ -tg Mäusen mit  $G\alpha_{i3}$ -Knockout.<sup>91</sup> Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis sein, dass die kardiale Auswirkung, bzw. der Schutz vor der Entwicklung einer Kardiomyopathie weniger wahrscheinlich ist durch ein kompensatorisch „günstiges“ Wirken des vermeintlich protektiven  $G\alpha_{i2}$  als tatsächlich der Effekt eher durch das Wegfallen des mutmaßlich "schädlichen"  $G\alpha_{i3}$  bedingt sein könnte. Auf Proteinebene haben wir keine signifikanten Unterschiede festgestellt.<sup>91</sup> In mit Isoprenalin behandelten Ratten war die gesteigerte Konzentration von  $G\alpha_i$ -kodierender RNA (*Gnai mRNA*) deutlich ausgeprägter gegenüber der  $G\alpha_i$ -Konzentration auf Proteinebene.<sup>46,47</sup> Dementsprechend kann ein lediglich diskreter Anstieg der  $G\alpha_i$ -Proteinexpression in der aktuellen Studie nicht sicher widerlegt werden.

Wie zuvor erwähnt, gilt es allgemein jedoch zu beachten, dass die kardiale Expression von  $G\alpha_{i2}$  generell die von  $G\alpha_{i3}$  übersteigt.<sup>35,40</sup> Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass  $G\alpha_{i2}$  bereits auf unverändertem, bzw. gewöhnlichem Expressionsniveau funktionell  $G\alpha_{i3}$  kompensiert. Demgegenüber könnten kardiale  $G\alpha_{i3}$ -Spiegel grundsätzlich zu niedrig sein, um im Falle eines  $G\alpha_{i2}$ -Mangels diesen zu kompensieren. Dies könnte erklären, warum wir im Rahmen der Vorgängerstudie schädliche Effekte beim Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  beobachteten, obwohl statistisch ein signifikanter Expressionsanstieg von  $G\alpha_{i3}$  auf Proteinebene zu verzeichnen war.<sup>43</sup> Auch ein oben bereits erwähnter subtypespezifischer Effekt ist statt eines reinen Kompensationsmechanismus potentiell denkbar. Aufgrund einer embryonalen Sterblichkeit von  $G\alpha_{i2/i3}$ -Doppel-Knockout Mäusen sind diese Tiere ungeeignet in der Hypothesentestung, ob  $G\alpha_i$ -Isoformen sich gegenseitig ersetzen können in  $\beta_1$ -tg Mäusen.<sup>30</sup>

Das mittlere Überleben der  $\beta_1$ -tg Mäuse (Herzinsuffizienzmodell der aktuellen und vorausgegangen Studie) zeigte sich erheblich reduziert.<sup>91</sup> Bei zusätzlichem Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  war das Überleben nochmals deutlicher verkürzt.<sup>43</sup> Im Gegensatz dazu war in der jetzigen Studie das Überleben der  $\beta_1$ -tg Mäuse mit  $G\alpha_{i3}$ -Knockout signifikant länger als bei den Mäusen, die nur den kardialen  $\beta_1$ -AR überexprimierten.<sup>91</sup> Zwar kamen in den 550 Tage alten  $\beta_1$ -tg Mäusen, denen  $G\alpha_{i3}$  fehlte, eine gesteigerte ventrikuläre

Fibrose und erhöhte natriuretische Peptide auf mRNA-Ebene verglichen mit dem Wildtyp zur Darstellung, jedoch waren das Fibrose-Ausmaß und das ANP-Expressionslevel signifikant niedriger als bei den  $\beta_1$ -tg Mäusen.<sup>91</sup> Außerdem war Letzteres erheblich geringer als jenes der 300 Tage alten  $\beta_1$ -tg Mäuse mit  $G\alpha_{i2}$ -Mangel in der Vorgängerstudie.<sup>43, 91</sup>

Eine kardiale Überexpression der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren ( $\beta_2$ -AR) führt ebenfalls zu einer Herzinsuffizienz, jedoch ist hier ein signifikant höheres Ausmaß an Überexpression erforderlich.<sup>18</sup> Ähnlich zu den Ergebnissen hinsichtlich der  $\beta_1$ -tg Mäuse, verkürzte in einer anderen Studie das Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  drastisch das Überleben der Mäuse mit Überexpression des kardialen  $\beta_2$ -AR.<sup>43,48</sup> Bemerkenswerterweise sind dabei  $\beta_2$ -tg Mäuse mit einem homozygoten  $G\alpha_{i2}$ -Knockout praktisch nicht überlebensfähig, während hier Tiere mit einem heterozygoten  $G\alpha_{i2}$ -Knockout eine reduzierte Lebensspanne aufwiesen, vergleichbar mit der jener  $\beta_1$ -tg Mäuse, denen das gesamte  $G\alpha_{i2}$  fehlte.<sup>48</sup> Zur Erinnerung, in der dieser Arbeit vorausgegangen sowie in der aktuellen Studie wurden jeweils homozygote  $G\alpha_i$ -Knockout-Mäuse untersucht.<sup>43</sup> Diese Daten verdeutlichen möglicherweise die Rolle der G-Proteine für die  $\beta_1$ -AR- oder die  $\beta_2$ -AR-vermittelte Signalkaskade. Während  $G_s$ -Proteine die unmittelbaren Interaktionspartner von  $\beta_1$ -AR sind, ist es allgemein anerkannt, dass  $\beta_2$ -AR sowohl an  $G_s$ -, als auch an  $G_i$ -Proteine koppeln.<sup>14,15,26</sup>

In Anbetracht der mutmaßlich Isoform-spezifischen Wirkungen von hemmenden G-Proteinen sollte nicht unerwähnt bleiben, dass bei einem im Mausmodell induzierten myokardialen Ischämie-Reperfusion-Schaden nachteilige Auswirkungen eines  $G\alpha_{i2}$ -Mangels im Sinne einer Zunahme der Infarktgröße auf der einen Seite festgestellt wurden, während auf der anderen Seite ein Fehlen von  $G\alpha_{i3}$  kardioprotektiv durch Verringerung des Infarktausmaßes zu sein schien.<sup>35</sup>

Insgesamt war in vorangegangenen Studien das Fehlen von  $G\alpha_{i2}$  mit nachteiligen Effekten assoziiert und das sowohl im gleichen Herzinsuffizienzmodell via  $\beta_1$ -AR Überexpression, als auch bei  $\beta_2$ -tg Mäusen sowie im Modell mit Ischämie-Reperfusion-induziertem kardialen Schaden als pathologischem Stimulus.<sup>35,43,48</sup> Im Gegensatz hierzu konnten wir erstmalig zeigen, dass im durch  $\beta_1$ -AR Überexpression vermittelten Mausmodell der Herzinsuffizienz ein  $G\alpha_{i3}$ -Mangel vorteilhaft war.<sup>91</sup>

Nachdem zuvor subtypspezifische Auswirkungen von inhibitorischen G-Proteinen allgemein thematisiert wurden, sollen im Folgenden mögliche Interaktionspartner und Zielstrukturen von  $G_i$ -Proteinen diskutiert werden. Hinsichtlich relevanter Unterschiede  $G\alpha_{i2}$ - und  $G\alpha_{i3}$ -abhängiger Effekte auf zellulärer und subzellulärer Ebene ist Akt als potentieller Kandidat in der Isoform-spezifischen  $G_i$ -Protein-Signalvermittlung zu betrachten. Vorherige Beobachtungen suggerieren dabei einen interessanten Unterschied zwischen  $G\alpha_{i2}$ - und  $G\alpha_{i3}$ -vermittelter Signalkaskade. In neutrophilen Granulozyten führte ein  $G\alpha_{i2}$ -Mangel zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Akt, wohingegen ein Fehlen von  $G\alpha_{i3}$  in einer entsprechend verminderten Phosphorylierung resultierte.<sup>49</sup> Zuvor wurde

beschrieben, dass Akt auf der einen Seite in der kardio-protectiven Signalvermittlung involviert zu sein scheint, während andererseits eine chronische Aktivierung der PI3K/Akt-Kaskade mit kardialer Hypertrophie in Zusammenhang gebracht wird und darüber hinaus eine erhöhte Akt-Aktivierung bei humaner Herzinsuffizienz beobachtet wurde.<sup>50,51</sup> Daten einer unserer Vorgängerstudien ergaben keine Hinweise auf relevante Unterschiede hinsichtlich der Phosphorylierung von Akt bei  $G\alpha_{i2}$ - und  $G\alpha_{i3}$ -Knockout Mäusen, dies weder unter basalen Bedingungen, noch nach erfolgter Behandlung mittels Carbachol.<sup>31</sup> Die gegensätzlichen Ergebnisse unserer früheren Studie und der Versuche zu den Neutrophilen könnten sowohl durch verschiedene Gewebe, als auch durch unterschiedliche genetische Hintergründe (C57BL/6 gegenüber 129/Sv), die mit phänotypischen Unterschieden in  $G_i$ -Knockout-Modellen assoziiert sind, zu erklären sein.<sup>49,52</sup> Bezüglich unserer vorausgegangen Resultate im Zusammenhang mit Akt in  $G\alpha_{i2}$ - oder  $G\alpha_{i3}$ -Knockout Mäusen sollte bedacht werden, dass Carbachol eher als nicht-pathologischer Stimulus zu werten ist und dass eine Stimulation muskarinerger Rezeptoren tendenziell von Vorteil sein könnte unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei Herzinsuffizienz.<sup>31,53-55</sup> In der aktuellen Studie sahen wir keine offensichtlichen Unterschiede in der ventrikulären Phosphorylierung von Akt, auch wenn wir etwaige Veränderungen nicht sicher ausschließen können.<sup>91</sup> Im Hinblick der sonst ausgeprägten Effekte hinsichtlich der Akt-Phosphorylierung bei menschlicher Herzinsuffizienz sowie in tierischen Herzinsuffizienzmodellen erscheint es unwahrscheinlich, dass die deutlich ausgeprägten Unterschiede in der Herzfunktion und im Überleben der Tiere in unserer Studie durch Veränderungen der Akt-Phosphorylierung zu erklären sind.<sup>50,56,57</sup>

Auch die Rolle von Phospholamban (PLN) bei Herzinsuffizienz und Kardioprotektion ist erwähnenswert und wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.<sup>91</sup> Western-Blot-Daten deuteten auf eine reduzierte PLN-Expression in  $\beta_1$ -tg Mäusen im Vergleich zum Wildtyp und  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}$ <sup>-/-</sup> Tieren hin. Darüber hinaus verwendeten wir Daten der Proteinexpression und -phosphorylierung, welche wir aus ventrikulären Kardiomyozyten gewonnen hatten, für eine "ingenuity pathway analysis" (IPA). Ein Benefit der IPA im Vergleich zur manuellen Ergebnisanalyse ist eine geringere Fehler-/ („Bias“-) Anfälligkeit. Unsere Daten weisen auf signifikante Unterschiede zwischen  $\beta_1$ -tg und  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}$ <sup>-/-</sup> Mäusen bezüglich intrazellulärer Signalvermittlung hin, die für verschiedene Herzerkrankungen wie Arrhythmie, Herzinsuffizienz oder kardiale Fibrose von Bedeutung ist. Die aus ventrikulären Kardiomyozyten gewonnenen Daten legen zwischen  $G\alpha_{i2}$ - und  $G\alpha_{i3}$ -Knockout Tieren ebenfalls relevante Unterschiede in der Signalübertragung, welche mit kardialen Erkrankungen vergesellschaftet ist, nahe. Proteomanalysen deuten in  $\beta_1$ -tg Mäusen auf eine gesteigerte Phosphorylierung des ventrikulären PLN im Vergleich zu  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}$ <sup>-/-</sup> Tieren hin.<sup>91</sup> Im Hinblick unserer Ergebnisse zur PLN-Expression- sowie -Phosphorylierung erscheint insgesamt eine reduzierte Inhibierung der SERCA bei  $\beta_1$ -tg Tieren im Sinne eines potentiellen

Kompensationsmechanismus plausibel, da Expression und Aktivität der SERCA bei Herzinsuffizienz erniedrigt sind.<sup>58</sup> Hierzu passend führte in einer Vorgängerstudie eine genetische PLN-Ablation zu einer relevanten Reduktion der Herzinsuffizienz bei  $\beta_1$ -tg Tieren.<sup>59</sup> Entsprechend könnte das Fehlen kompensatorischer PLN-Veränderungen in  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  Mäusen auf eine Kardioprotektion via  $G\alpha_{i3}$ -Mangel hindeuten, da eine reduzierte PLN-Aktivität hier nicht notwendig ist.

Zuvor konnte durch unsere Arbeitsgruppe eine verringerte Dichte der ventrikulären L-Typ  $Ca^{2+}$ -Ströme ( $I_{CaL}$ ) in ventrikulären Kardiomyozyten von  $G\alpha_{i2}$ -Knockout Mäusen gezeigt werden, wohingegen die Dichte von  $I_{CaL}$  in  $G\alpha_{i3}$ -defizienten Kardiomyozyten erhöht war.<sup>31</sup> Obwohl in anderen Modellen ein Anstieg der ventrikulären Kalziumströme langfristig mit einer myokardialen Schädigung assoziiert war, führt ein  $G\alpha_{i3}$ -Mangel nicht zu einer kardialen Dysfunktion.<sup>41,64-66</sup> Eine  $I_{CaL}$ -Abnahme aufgrund genetisch bedingter Expressionsminderung des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals führte ebenfalls zu einer kardialen Hypertrophie und Insuffizienz.<sup>60</sup>  $\beta_2$ -AR binden sowohl an  $G_s$ -, als auch an  $G_i$ -Proteine, während  $G_s$ -Proteine die unmittelbaren Interaktionspartner von  $\beta_1$ -AR sind.<sup>14,15,26</sup> In diesem Zusammenhang sollte bedacht werden, dass sowohl die  $\beta_1$ -, als auch die  $\beta_2$ -adrenerge Signalgebung durch  $G\alpha_i$ -Proteine moduliert zu werden scheinen, einschließlich Mechanismen, die von der direkten Rezeptorbindung unabhängig sind.<sup>23,24,25</sup> Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die oben erwähnten Unterschiede zwischen den ventrikulären Kalziumströmen in  $G\alpha_{i2}$ - oder  $G\alpha_{i3}$ -Knockout Mäusen auch eine Rolle bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz im  $\beta_1$ -tg-Mausmodell spielen.

Nachfolgend und auf den Ergebnissen der hier vorgestellten aktuellen Arbeit aufbauend beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe derzeit im Rahmen einer laufenden Studie mit der Analyse von „whole-cell“-Messungen ventrikulärer L-Typ  $Ca^{2+}$ -Ströme ( $I_{CaL}$ ) aus Kardiomyozyten von  $\beta_1$ -tg,  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i2}^{-/-}$ ,  $\beta_1$ -tg/ $G\alpha_{i3}^{-/-}$  und C57BL/6 Mäusen. Bereits im Alter von 300 Tagen zeigen sich hier augenscheinlich interessante Unterschiede bei sowohl den basalen  $I_{CaL}$ , als auch den  $I_{CaL}$  nach Stimulation mit Isoprenalin zwischen Wildtypen und  $\beta_1$ -tg Mäusen sowie bei  $\beta_1$ -AR überexprimierenden Tieren mit zusätzlichem  $G\alpha_{i2}$ -, bzw.  $G\alpha_{i3}$ -Mangel im Sinne von subtypspezifischen Auswirkungen. Die Resultate hierzu werden perspektivisch in naher Zukunft publiziert (Katnahji und Matthes, persönliche Mitteilung).

Die bislang diskutierten Punkte erklären nicht unsere Ergebnisse hinsichtlich der entgegengesetzten Effekte von  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_{i3}$ . Jedoch stellen die Regulierung von L-Typ-Calciumkanälen und die Expression und/oder Aktivität von PLN vielversprechende Anknüpfungspunkte für kommende Studien dar zur Identifizierung mutmaßlicher molekularer Mechanismen, die den unterschiedlichen Wirkungen der  $G\alpha_i$ -Isoformen bei Herzinsuffizienz zugrunde liegen.



### 4.3 Limitationen

Im Fokus der aktuellen Studie stand die Hypothesentestung, dass zwischen den strukturell eng verwandten Proteinen  $\text{G}\alpha_{i2}$  und  $\text{G}\alpha_{i3}$  unterschiedliche, Isoform-spezifische Effekte in einem Mausmodell der Herzinsuffizienz bestehen. Tatsächlich konnten wir signifikante Unterschiede innerhalb der genannten  $\text{G}\alpha_i$ -Isoformen nachweisen.<sup>91</sup>

Die von uns erhobenen Daten hinsichtlich eines  $\text{G}\alpha_{i2}$ - (Keller et al., 2015) und  $\text{G}\alpha_{i3}$ - (aktuelle Studie) Mangels entspringen zwei unabhängigen Studien.<sup>43,91</sup> Nicht zuletzt aus Gründen des Tierschutzes war es uns folglich nicht möglich, erneut eine gesamte  $\text{G}\alpha_{i2}$ -defiziente Kohorte in der aktuellen Studie zu untersuchen.

Sowohl in der Vorgänger-, als auch in der aktuellen Studie haben wir jeweils ein globales  $\text{G}\alpha_i$ -Protein-Knockout-Mausmodell verwendet mit absolutem  $\text{G}\alpha_i$ -Mangel.<sup>43,91</sup> Daher sind partielle extra-kardiale Einflüsse auf den kardialen Phänotyp nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen. Allerdings haben wir in der aktuellen Studie keine wegweisenden Unterschiede zwischen Wildtypen und  $\text{G}\alpha_{i3}$ -Knockout Tieren festgestellt.<sup>91</sup> Auch in Vorgängerstudien, die Wildtypen mit globalen  $\text{G}\alpha_{i2}$ - und  $\text{G}\alpha_{i3}$ -Knockout Mäusen verglichen, zeigten sich keine relevanten Unterschiede hinsichtlich bspw. basaler Herzfrequenz oder Blutdruck.<sup>41,61</sup> Darüber hinaus wiesen unveränderte hypotensive Effekte nach systemischer  $\alpha_2$ -AR-Stimulation auf eine normale Kreislaufregulation in  $\text{G}\alpha_{i2}$ - bzw.  $\text{G}\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen hin.<sup>61</sup> Aktuell haben wir keine Katecholamin-Spiegel erhoben. In einer weiteren Studie war jedoch die Noradrenalin-Freisetzung in Atrien und cerebralen Cortices nicht verändert in  $\text{G}\alpha_{i2}$ - und  $\text{G}\alpha_{i3}$ -Knockout Mäusen.<sup>61</sup> Zudem sind relevante Katecholaminwertveränderungen in Anbetracht der indifferenten basalen Herzfrequenzen und Blutdruckwerte bei Fehlen von  $\text{G}\alpha_{i2}$  oder  $\text{G}\alpha_{i3}$  unwahrscheinlich.<sup>41,43,61</sup> Gemäß vorheriger Ergebnisse scheint der Einfluss endogener Katecholamine hinsichtlich des Phänotyps  $\beta_1$ -tg Mäuse vernachlässigbar, das ebenfalls gegen einen signifikanten Anstieg der Katecholaminspiegel in diesem Modell spricht.<sup>62</sup> Perspektivisch wäre ein selektiver kardialer  $\text{G}\alpha_i$ -Protein-Knockout, bzw. eine selektive Inhibition im Tiermodell für folgende Studien sicherlich interessant.

Das durch  $\beta_1$ -AR Überexpression vermittelte Mausmodell der Herzinsuffizienz ist gut charakterisiert und etabliert, es unterscheidet sich jedoch punktuell im Vergleich zur Herzinsuffizienz beim Menschen. Im Modell kommt es u.a. zu einer Hoch- statt einer Runterregulation der  $\beta_1$ -AR.<sup>16,63</sup> Dies kann wiederum als Imitieren der chronischen, sympathischen Überstimulation gewertet werden, die bei humaner Herzinsuffizienz beobachtet wird.<sup>13,16</sup> Obwohl der  $\beta_1$ -transgene Ansatz unphysiologisch hohe  $\beta_1$ -Adrenozeptor-Expressionswerte aufweist, sind diese bei den hier verwendeten C57BL/6-Mäusen im Vergleich zum FVB/N-Hintergrund, auf dem das Modell ursprünglich beruht, deutlich niedriger.<sup>43</sup>

Wir analysierten die Herzfunktion lediglich unter basalen Bedingungen ohne Verwendung von zusätzlichen Stressoren (z.B. Dobutamin), die möglicherweise zur Aufdeckung weiterer

(subtypspezifischer) Unterschiede hätten beitragen können wie z.B. einer potentiell erhöhten funktionellen Reserve.

Insgesamt konnten unsere Daten die Eignung der von uns verwendeten Mausmodelle bestätigen.

Der exakte molekulare Mechanismus sollte in kommenden Studien näher untersucht werden.

Einige Daten wurden explorativ erhoben. Eine Reihe unserer Resultate konnten wir mittels weiterführender Untersuchungen wie Proteomanalysen bestätigen und untermauern (z.B. bezüglich PLN und Fibrose), diese sind jedoch primär als Screening-Ansatz zu interpretieren.<sup>91</sup> Dennoch könnten die gewonnen Erkenntnisse den Weg für nahende, zukünftige Studien über zugrundeliegende Mechanismen bei Herzinsuffizienz und/ oder der Rolle von  $G\alpha_{i2}$ - oder  $G\alpha_{i3}$ -vermittelter Signalübermittlung ebnen.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Ein (absoluter)  $G\alpha_{i3}$ -Mangel ist nicht mit schädlichen Effekten im Mausmodell der Herzinsuffizienz assoziiert. Vielmehr verlangsamt oder verhindert er hier sogar die Entwicklung dieser und zeigt sich vorteilhaft, bzw. kardio-protectiv.<sup>91</sup> Unsere vorausgegangenen und aktuellen Ergebnisse deuten auf eine  $\beta_1$ -AR vermittelte Beeinträchtigung bei Herzinsuffizienz hin, deren weitere Entwicklung letztlich gegensätzlich durch einen  $G\alpha_{i2}$ - oder  $G\alpha_{i3}$ -Mangel beeinflusst wird.<sup>43,91</sup> Wenn auch der spezifische zugrundeliegende molekulare Mechanismus noch in nachfolgenden Studien zu untersuchen ist, zeigen unsere Ergebnisse, dass Isoform-spezifische Interventionen innerhalb  $G_i$ -Protein abhängiger Signalwege (z. B. die Hemmung von  $G\alpha_{i3}$ ) vielversprechende neue Strategien im Rahmen kardioprotektiver Therapien, insbesondere bei Herzinsuffizienz, darstellen könnten.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung Nr. 441 vom 15. November 2023;  
[https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2023/11/PD23\\_441\\_23211.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2023/11/PD23_441_23211.html)  
(Zugriff am 27.12.2023)
2. Holstiege J, Akmatov MK, Steffen A, Bätzing J. (2018). Prävalenz der Herzinsuffizienz – bundesweite Trends, regionale Variationen und häufige Komorbiditäten. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (ZI). Versorgungsatlas-Bericht Nr. 18/09. Berlin; URL: <https://doi.org/10.20364/VA-18.09>
3. Savarese G, Becher P, Lund L et al. (2023). Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. *Cardiovasc Res.* 118(17):3272-3287. doi: 10.1093/cvr/cvac013.
4. Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Statistisches Bundesamt. Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10; [https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg\\_olap\\_tables.prc\\_set\\_hierlevel?p\\_uid=gastd&p\\_aid=71530018&p\\_sprache=D&p\\_help=2&p\\_indnr=516&p\\_ansnr=80865181&p\\_version=3&p\\_dim=D.100&p\\_dw=10101&p\\_direction=drill](https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_olap_tables.prc_set_hierlevel?p_uid=gastd&p_aid=71530018&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=516&p_ansnr=80865181&p_version=3&p_dim=D.100&p_dw=10101&p_direction=drill) (Zugriff am 27.12.2023)
5. Christ M, Störk S, Dörr M et al. (2016). Heart failure epidemiology 2000–2013: insights from the German Federal Health Monitoring System. *Eur J Heart Fail.* 18(8): 1009–18. doi: 10.1002/ejhf.567
6. Deutsche Herzstiftung e. V. Deutscher Herzbericht 2017. Sektorübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie, Herzchirurgie und Kinderherzmedizin in Deutschland. Frankfurt am Main 2017. ISBN 978-3-9817032-7-6; URL: <https://www.herzstiftung.de/herzbericht> (Zugriff am 14.12.2018)
7. Herold G et al. (2013). Innere Medizin. Herzinsuffizienz (HI) S. 208 ff; ISBN 978-3.9814660-2-7
8. American Heart Association. Heart Attack and Stroke Symptoms. Health Topics/ Heart Failure/ What is Heart Failure? <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/what-is-heart-failure> (Zugriff am 27.12.2023)
9. McDonagh T, Metra M, Adamo M et al. (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 42(36):3599-3726. doi: 10.1093/eurheartj/ehab368
10. Salimi M, Salimi N, Hochkirchen B. AMBOSS GmbH.  
<https://next.amboss.com/de/article/rS0faf?q=herzinsuffizienz> (Zugriff am 13.01.2024)

11. Kotecha D, Manzano L, Krum H et al. (2016). Effect of age and sex on efficacy and tolerability of  $\beta$  blockers in patients with heart failure with reduced ejection fraction: Individual patient data meta-analysis. *BMJ*. 353:i1855. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1855>
12. Kotecha D, Flather MD, Altman DG et al. (2017). Heart Rate and Rhythm and the Benefit of Beta-Blockers in Patients With Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 69:2885–2896. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.001>
13. Baker AJ. (2014). Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflugers Arch*. 466(6):1139-50. doi: 10.1007/s00424-014-1491-5
14. Xiao RP, Cheng H, Zhou YY et al. (1999). Recent advances in cardiac  $\beta$ 2-adrenergic signal transduction. *Circ Res*. 85(11):1092-100. doi: 10.1161/01.res.85.11.1092
15. Seyedabadi M, Hossein M, Albert PR. (2019). Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): Molecular determinants of GPCR/transducer selectivity and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 200:148-178. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.006
16. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F et al. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(12):7059-64. doi: 10.1073/pnas.96.12.7059
17. Engelhardt S, Boknik P, Keller U et al. (2001). Early impairment of calcium handling and altered expression of junctin in hearts of mice overexpressing the beta1-adrenergic receptor. *FASEB J*. 15(14):2718-20. doi: 10.1096/fj.01-0107fje
18. Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN et al. (2000). Early and delayed consequences of  $\beta$ 2-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation*. 101(14):1707-14. doi: 10.1161/01.cir.101.14.1707
19. Brown LA, Harding SE. (1992). The effect of pertussis toxin on beta-adrenoceptor responses in isolated cardiac myocytes from noradrenaline-treated guinea-pigs and patients with cardiac failure. *Br J Pharmacol*. 106(1):115-22. doi: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14302.x
20. El-Armouche A, Zolk O, Rau T et al. (2003). Inhibitory G-proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure. *Cardiovasc Res*. 60(3):478-87. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.014
21. Chesley A, Lundberg MS, Asai T et al. (2000). The  $\beta$ 2-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res*. 87(12):1172-9. doi: 10.1161/01.res.87.12.1172
22. Eschenhagen T. (1993). G proteins and the heart. *Cell Biol Int*. <https://doi.org/10.1006/cbir.1993.1135>

23. Li F, De Godoy M, Rattan S. (2004). Role of adenylate and guanylate cyclases in beta1-, beta2-, and beta3-adrenoceptor-mediated relaxation of internal anal sphincter smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 308(3):1111-20. doi: 10.1124/jpet.103.060145
24. Martin NP, Whalen EJ, Zamah MA et al. (2004). PKA-mediated phosphorylation of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cell Signal.* 16(12):1397-403. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.05.002
25. Melsom CB, Hussain RI, Ørstavik Ø et al. (2014). Non-classical regulation of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptor-mediated inotropic responses in rat heart ventricle by the G protein Gi. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 387(12):1177-86. doi: 10.1007/s00210-014-1036-7
26. Xiao RP, Zhang SJ, Chakir K et al. (2003). Enhanced Gi signaling selectively negates  $\beta$ 2-adrenergic receptor (AR)- but not  $\beta$ 1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation.* 108(13):1633-9. doi: 10.1161/01.CIR.0000087595.17277.73
27. Ahmet I, Lakatta EG, Talan MI. (2005). Pharmacological stimulation of  $\beta$ 2-adrenergic receptors ( $\beta$ 2AR) enhances therapeutic effectiveness of  $\beta$ 1AR blockade in rodent dilated ischemic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev.* 10(4):289-96. doi: 10.1007/s10741-005-7543-3
28. Hussain RI, Aronsen JM, Afzal F et al. (2013). The functional activity of inhibitory G protein (Gi) is not increased in failing heart ventricle. *J Mol Cell Cardiol.* 56:129-38. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.11.015
29. Thompson BD, Jin Y, Wu KH et al. (2007). Inhibition of Gai2 activation by Gai3 in CXCR3-mediated signaling. *J Biol Chem.* 282(13):9547-9555. doi: 10.1074/jbc.M610931200
30. Gohla A, Klement K, Piekorz RP et al. (2007). An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein Gi3 in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(8):3003-8. doi: 10.1073/pnas.0611434104
31. Dizayee S, Kaestner S, Kuck F et al. (2011). Gai2- and Gai3-specific regulation of voltage-dependent L-type calcium channels in cardiomyocytes. *PLoS ONE.* 6(9):e24979. doi: 10.1371/journal.pone.0024979
32. Plummer NW, Spicher K, Malphurs J et al. (2012). Development of the mammalian axial skeleton requires signaling through the Gai subfamily of heterotrimeric G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(52):21366-71. doi: 10.1073/pnas.1219810110
33. Wiege K, Le DD, Syed SN et al. (2012). Defective macrophage migration in Gai2 - but not Gai3-deficient mice. *J Immunol.* 189(2):980-7. doi: 10.4049/jimmunol.1200891
34. Wiege K, Ali SR, Gewecke B et al. (2013). Gai2 is the essential Gai protein in immune complex - induced lung disease. *J Immunol.* 190(1):324-33. doi: 10.4049/jimmunol.1201398

35. Köhler D, Devanathan V, De Franz CBO et al. (2014). Gai2 - and Gai3- deficient mice display opposite severity of myocardial ischemia reperfusion injury. *PLoS ONE*. 9(5):e98325. doi: 10.1371/journal.pone.0098325
36. Wang Z, Dela Cruz R, Ji F et al. (2014). Gi $\alpha$  proteins exhibit functional differences in the activation of ERK1/2, Akt and mTORC1 by growth factors in normal and breast cancer cells. *Cell Commun Signal*. 3:12:10. doi: 10.1186/1478-811X-12-10
37. Devanathan V, Hagedorn I, Köhler D et al. (2015). Platelet Gi protein Gai2 is an essential mediator of thrombo-inflammatory organ damage in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(20):6491-6. doi: 10.1073/pnas.1505887112
38. Mauriac SA, Hien YE, Bird JE, et al. (2017). Defective Gpsm2/Gai3 signalling disrupts stereocilia development and growth cone actin dynamics in Chudley-McCullough syndrome. *Nat Commun*. 7:8:14907. doi: 10.1038/ncomms14907
39. Beer-Hammer S, Lee SC, Mauriac SA et al. (2018). Gai Proteins are Indispensable for Hearing. *Cell Physiol Biochem*. 47(4):1509-1532. doi: 10.1159/000490867
40. Eschenhagen T, Mende U, Nose M et al. (1992). Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein  $\alpha$  subunit Gi $\alpha$ -2 in human end-stage heart failure. *Circ Res*. 70(4):688-96. doi: 10.1161/01.res.70.4.688
41. Jain M, Lim CC, Nagata K et al. (2001). Targeted inactivation of Galpha(i) does not alter cardiac function or beta-adrenergic sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280(2):H569-75. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.2.H569
42. Kompa AR, Gu XH, Evans BA, Summers RJ. (1999). Desensitization of cardiac  $\beta$ -adrenoceptor signaling with heart failure produced by myocardial infarction in the rat. Evidence for the role of Gi but not Gs or phosphorylating proteins. *J Mol Cell Cardiol*. 31(6):1185-201. doi: 10.1006/jmcc.1999.0951
43. Keller K, Maass M, Dizayee S et al. (2015). Lack of Gai2 leads to dilative cardiomyopathy and increased mortality in  $\beta$ 1-adrenoceptor overexpressing mice. *Cardiovasc Res*. 108(3):348-56. doi: 10.1093/cvr/cvv235
44. Lee GJ, Yan L, Vatner DE, Vatner SF. (2015). Mst1 inhibition rescues  $\beta$ 1-adrenergic cardiomyopathy by reducing myocyte necrosis and non-myocyte apoptosis rather than myocyte apoptosis. *Basic Res Cardiol*. 110(2):7. doi: 10.1007/s00395-015-0461-1
45. Hippe H, Lüdde M, Schnoes K et al. (2013). Competition for G $\beta\gamma$  dimers mediates a specific cross-talk between stimulatory and inhibitory G protein  $\alpha$  subunits of the adenylyl cyclase in cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 386(6):459-69. doi: 10.1007/s00210-013-0876-x

46. Mende U, Eschenhagen T, Geertz B et al. (1992). Isoprenaline-induced increase in the 40/41 kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 345(1):44-50. doi: 10.1007/BF00175468
47. Eschenhagen T, Mende U, Diederich M et al. (1992). Long term beta-adrenoceptor-mediated up-regulation of Gi alpha and G(o) alpha mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. *Mol Pharmacol.* 42(5):773-83
48. Foerster K, Groner F, Matthes J et al. (2003). Cardioprotection specific for the G protein Gi2 in chronic adrenergic signaling through beta 2-adrenoceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(24):14475-80. doi: 10.1073/pnas.1936026100
49. Kuwano Y, Adler M, Zhang H et al. (2016). Gai2 and Gai3 Differentially Regulate Arrest from Flow and Chemotaxis in Mouse Neutrophils. *J Immunol.* 196(9):3828-33. doi: 10.4049/jimmunol.1500532
50. Haq S, Choukroun G, Lim H et al. (2001). Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation.* 103(5):670-7. doi: 10.1161/01.cir.103.5.670
51. Nagoshi T, Matsui T, Aoyama T et al. (2005). PI3K rescues the detrimental effects of chronic Akt activation in the heart during ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 115(8):2128-38. doi: 10.1172/JCI23073
52. Offermanns S. (1999). New insights into the in vivo function of heterotrimeric G-proteins through gene deletion studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 360(1):5-13. doi: 10.1007/s002109900030
53. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. (1999). Opposing effects of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation.* 100(22):2210-2. doi: 10.1161/01.cir.100.22.2210
54. Olshansky B, Sabbah HN, Hauptman PJ et al. (2008). Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation.* 118(8):863-71. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.760405
55. Lorenz K, Schmitt JP, Vidal M, Lohse MJ. (2009). Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(12):2351-5. doi: 10.1016/j.biocel.2009.08.002
56. Baba HA, Stypmann J, Grabellus F et al. (2003). Dynamic regulation of MEK/Erks and Akt/GSK-3 $\beta$  in human end-stage heart failure after left ventricular mechanical support: myocardial mechanotransduction-sensitivity as a possible molecular mechanism. *Cardiovasc Res.* 59(2):390-9. doi: 10.1016/s0008-6363(03)00393-6

57. Miyamoto T, Takeishi Y, Takahashi H et al. (2004). Activation of distinct signal transduction pathways in hypertrophied hearts by pressure and volume overload. *Basic Res Cardiol.* 99(5):328-37. doi: 10.1007/s00395-004-0482-7
58. Del Monte F, Hajjar RJ. (2008). Intracellular devastation in heart failure. *Heart Fail Rev.* 13(2):151-62. doi: 10.1007/s10741-007-9071-9
59. Engelhardt S, Hein L, Dyachenkow V et al. (2004). Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Circulation.* 109(9):1154-60. doi: 10.1161/01.CIR.0000117254.68497.39
60. Goonasekera SA, Hammer K, Auger-Messier M et al. (2012). Decreased cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity induces hypertrophy and heart failure in mice. *J Clin Invest.* 122(1):280-90. doi: 10.1172/JCI58227
61. Albarrán-Juárez J, Gilsbach R, Piekorz RP et al. (2009). Modulation of  $\alpha$ 2-adrenoceptor functions by heterotrimeric  $\text{G}\alpha$ i protein isoforms. *J Pharmacol Exp Ther.* 331(1):35-44. doi: 10.1124/jpet.109.157230
62. Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, Lohse MJ. (2001). Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol.* 60(4):712-7
63. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V et al. (1986).  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergicreceptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective  $\beta$ 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res.* 59(3):297-309. doi: 10.1161/01.res.59.3.297
64. Muth JN, Yamaguchi H, Mikala G et al. (1999). Cardiac-specific overexpression of the alpha(1) subunit of the L-type voltage-dependent  $\text{Ca}(2+)$  channel in transgenic mice. Loss of isoproterenol-induced contraction. *J Biol Chem.* 274(31):21503-6. doi: 10.1074/jbc.274.31.21503
65. Nakayama H, Chen X, Baines CP et al. (2007).  $\text{Ca}^{2+}$ - and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest.* 117(9):2431-44. doi: 10.1172/JCI31060
66. Beetz N, Hein L, Meszaros J et al. (2009). Transgenic simulation of human heart failure-like L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channels: implications for fibrosis and heart rate in mice. *Cardiovasc Res.* 84(3):396-406. doi: 10.1093/cvr/cvp251
67. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP et al. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 46(2):121-36
68. Salimi M, Salimi N, Hochkirchen B. AMBOSS GmbH.  
<https://next.amboss.com/de/article/Qp0u6S?q=g+protein> (Zugriff am 16.03.2024)



69. Zhang P, Mende U. (2011). Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets. *Circ Res.* 109(3):320-33. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.231423
70. El-Armouche A, Eschenhagen T. (2009). Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev.* doi: 10.1007/s10741-008-9132-8
71. Salimi M, Salimi N, Hochkirchen B. AMBOSS GmbH.  
<https://next.amboss.com/de/article/SD0ydR?q=sglt2-inhibitoren> (Zugriff am 16.03.2024)
72. Herold G et al. (2013). *Innere Medizin. Antiarrhythmika* S. 267 ff; ISBN 978-3.9814660-2-7
73. Salimi M, Salimi N, Hochkirchen B. AMBOSS GmbH.  
<https://next.amboss.com/de/article/uN0p1g?q=betablocker> (Zugriff am 16.03.2024)
74. Ladage D, Schwinger RHG, Brixius K. (2013). Cardio-selective beta-blocker: pharmacological evidence and their influence on exercise capacity. *Cardiovasc Ther.* doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00306.x
75. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W et al. (1982). Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* doi: 10.1056/NEJM198207223070401
76. Ungerer M, Böhm M, Elce JS et al. (1993). Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation.* 87:454–463
77. Lohse MJ, Engelhardt S, Danner S et al. (1996). Mechanisms of  $\beta$ -adrenergic receptor desensitization: from molecular biology to heart failure. *Basic Res Cardiol.* doi: 10.1007/BF00795359
78. Keller K. (2018). Dilatative Kardiomyopathie und erhöhte Mortalität in Mäusen mit  $\beta$ 1-Adrenorezeptorüberexpression und G $\alpha$ 2-Knockout; Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln.
79. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature.* doi: 10.1038/36362
80. Feldman AM, Cates AE, Veazey WB, et al. (1988). Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. *J Clin Invest.* doi: 10.1172/JCI113569
81. Sigmund M, Jakob H, Becker H et al. (1996). Effects of metoprolol on myocardial beta-adrenoceptors and Gi alpha-proteins in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol.* doi: 10.1007/s002280050172
82. Nagata K, Ye C, Jain M et al. (2000). G $\alpha$ (i2) but not G $\alpha$ (i3) is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circ Res.* doi: 10.1161/01.res.87.10.903
83. Xiao RP, Zhu W, Zheng M et al. (2006). Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci.* doi: 10.1016/j.tips.2006.04.009

84. Klein C. (2009). Die Bedeutung des G-proteins  $G\alpha_{i3}$  für das Schaltverhalten kardialer L-Typ-Calciumkanäle in Kardiomyozyten sowie für die Entwicklung von kardialer Hypertrophie und Insuffizienz von Mäusen bei Überexpression des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors. Dissertation an der Universität zu Köln.
85. Nobles M, Montaigne D, Sebastian S et al. (2018). Differential effects of inhibitory G protein isoforms on G protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  currents in adult murine atria. *Am J Physiol Cell Physiol*. doi: 10.1152/ajpcell.00271.2016
86. Salimi M, Salimi N, Hochkirchen B. AMBOSS GmbH.  
<https://next.amboss.com/de/article/em0xeg?q=phosphodiesterase> (Zugriff am 16.03.2024)
87. Herold G et al. (2013). Innere Medizin. Pulmonale Hypertonie (PH) und Cor pulmonale chronicum (CPC) S. 407-410; ISBN 978-3.9814660-2-7
88. Antwerpes F, Kroll J, Meyer-Woters L. DocCheck Community GmbH.  
<https://flexikon.doccheck.com/de/Phosphodiesterase-Hemmstoff> (Zugriff am 16.03.2024)
89. Antwerpes F, Kroll J, Meyer-Woters L. DocCheck Community GmbH.  
<https://flexikon.doccheck.com/de/PDE-3-Hemmer#:~:text=7%20Wirkstoffe-,Definition,den%20positiv%20inotrop%20wirkenden%20Substanzen.> (Zugriff am 16.03.2024)
90. Carinopharm GmbH. (2021). MILRINON Carinopharm 1 mg/ml Injektions-/Infusionslösung. Fachinformation.  
<https://fachinformation.srz.de/pdf/carinopharm/milrinoncarinopharm1mgmlinjektions-infusions%C3%B6sung.pdf> (Zugriff am 16.03.2024)
91. Schröper T, Mehrkens D, Leiss V et al. (2023). Protective effects of  $G\alpha_{i3}$  deficiency in a murine heart-failure model of  $\beta_1$ -adrenoceptor overexpression. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. doi: 10.1007/s00210-023-02751-8
92. Accord Healthcare B.V. (2021). Roflumilast Accord 500 Mikrogramm Filmtabletten. Fachinformation.  
[https://www.accord-healthcare.de/sites/default/files/2022-09/accord\\_fachinformation\\_roflumilast.pdf](https://www.accord-healthcare.de/sites/default/files/2022-09/accord_fachinformation_roflumilast.pdf) (Zugriff am 16.03.2024)
93. Yan J., Zhu H-B. (2007). Cyclic nucleotide phosphodiesterase IV expression, activity and targeting in cells of cardiovascular system. *Yao Xue Xue Bao*. 42(6):571-5
94. Antwerpes F, Kroll J, Meyer-Woters L. DocCheck Community GmbH.  
[https://flexikon.doccheck.com/de/Monoklonaler\\_Antik%C3%B6rper](https://flexikon.doccheck.com/de/Monoklonaler_Antik%C3%B6rper) (Zugriff am 24.04.2024)
95. Paul-Ehrlich-Institut. Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel. Arzneimittel. Antikörper. Monoklonale Antikörper.  
<https://www.pei.de/DE/arzneimittel/antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html> (Zugriff am 27.04.2024)

96. Singh K, Ejaz W, Dutta K et al. (2019). Antibody Delivery for Intracellular Targets – Emergent Therapeutic Potential. *Bioconjug Chem.* doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00025
97. Salimi M, Salimi N, Hochkirchen B. AMBOSS GmbH.  
<https://next.amboss.com/de/article/RK0ITS?q=small+interfering+rna#Zae3dc82c28ea9b694678578514eb6148> (Zugriff am 16.03.2024)
98. Antwerpes F, Kroll J, Meyer-Woters L. DocCheck Community GmbH.  
<https://flexikon.doccheck.com/de/RNA-Interferenz> (Zugriff am 16.03.2024)
99. Max-Planck-Innovation GmbH. RNA-Interferenz: Therapie per Genschalter.  
<https://www.max-planck-innovation.de/max-planck-innovation/innovationen/innovation/rna-interferenz-therapie-per-genschalter.html> (Zugriff am 27.04.2024)
100. Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.. Steuerung der Proteinproduktion durch kleine RNA-Moleküle. Small RNA-guided gene silencing. Forschungsbericht 2009 - Max-Planck-Institut für Biochemie.  
<https://www.mpg.de/403661/forschungsSchwerpunkt> (Zugriff am 27.04.2024)
101. Kim DH, Rossi JJ. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet.* 8(3):173-84. doi: 10.1038/nrg2006
102. Carthew RW, Sontheimer EJ. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 136(4):642-55. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035
103. Salimi M, Salimi N, Hochkirchen B. AMBOSS GmbH.  
<https://next.amboss.com/de/article/1m02eg?q=raas%20system> (Zugriff am 16.03.2024)
104. Antwerpes F, Kroll J, Meyer-Woters L. DocCheck Community GmbH.  
<https://flexikon.doccheck.com/de/Renin-Angiotensin-Aldosteron-System> (Zugriff am 16.03.2024)
105. Matthes J. (2021). Both Effects and Side Effects Must Be Taken Into Account. *Dtsch Arztebl Int.* 118(1-2):11. doi: 10.3238/arztebl.m2021.0044

## 6. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

### Publikation:

1. Schröper T, Mehrkens D, Leiss V et al. (2023). Protective effects of  $G\alpha_{i3}$  deficiency in a murine heart-failure model of  $\beta_1$ -adrenoceptor overexpression. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. doi: 10.1007/s00210-023-02751-8

### Kongressbeiträge mit Abstract-Veröffentlichung:

1. Schröper, Mehrkens, Baldus, Nürnberg, Herzig, Seemann, Matthes. (2017). Effects of  $G\alpha_{i3}$  deficiency in a mouse model of  $\beta_1$ -adrenoceptor mediated cardiomyopathy. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 390, S28 (Poster beim 83rd Annual Meeting of the German-Society-for-Experimental-and-Clinical-Pharmacology-and-Toxicology (DGPT) / 19th Annual Meeting of the Association-of-the-Clinical-Pharmacology-Germany (VKliPha))
2. Schröper, Mehrkens, Leiss, Engelhardt, Herzig, Birnbaumer, Nürnberg, Matthes. (2020). Protective effects of  $G\alpha_{i3}$ -deficiency in a mouse model of  $\beta_1$ -adrenoceptor mediated cardiomyopathy. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 393 (Suppl 1), 13 (Vortrag beim 86th Annual Meeting of the German-Society-for-Experimental-and-Clinical-Pharmacology-and-Toxicology (DGPT))

### Kongressbeiträge ohne Abstract-Veröffentlichung:

1. Schröper, Mehrkens, Baldus, Matthes. (2017). Einfluss eines  $G\alpha_{i3}$ -Knockouts auf die kardiale Situation in einem durch  $\beta_1$ -Adrenozeptor-Überexpression vermittelten Mausmodell der Herzinsuffizienz. Postervortrag bei der 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK)