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

**Die Bedeutung der δ -Isoform
der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII)
für die Azidose bei isolierten Kardiomyozyten**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Henrik Bäumer

aus

Bremen

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L. S. Maier

II. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. L. Klinge

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs-, Tabellen-, Formel- und Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Herzmuskelzelle	2
1.1.1 Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle.....	2
1.1.2 Der kontraktile Apparat	3
1.1.3 Der Kalziumstoffwechsel.....	4
1.2 Die elektromechanische Kopplung.....	8
1.2.1 Die elektrische Erregung.....	8
1.2.2 Die mechanische Kontraktion.....	9
1.3 Die Regulation des Kalziumstoffwechsels	11
1.3.1 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II	12
1.3.2 Einfluss der CaMKII auf physiologische Herzfunktionen	14
1.3.3 Bedeutung der CaMKII bei kardialen Dysfunktionen	18
1.4 Inhibition der CaMKII und die CaMKII δ -Knockout-Maus.....	19
1.5 Das Verhalten von Kardiomyozyten unter Azidose	21
1.5.1 Die Bedeutung der CaMKII für die Azidose.....	24
1.6 Überleitung zu den Versuchen.....	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Isolation von murinen Kardiomyozyten und Vorbereitung zur Messung	29
2.2 Epifluoreszenzmikroskopie und Myozytenkamera	32
2.2.1 Messung der Myozytenverkürzung.....	35
2.2.2 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration	35
2.3 Untersuchung der Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten der CaMKII δ - Knockout-Maus unter Azidose.....	41
2.4 Messung des Kalziumgehalts des Sarkoplasmatischen Retikulums und der Aktivität des Natrium/Kalzium-Austauschers (NCX) in der Azidose	43
2.5 CaMKII-Inhibition	44
2.6 Datenauswertung.....	45
3. Ergebnisse	50
3.1 Effekt eines CaMKII δ -KO auf das Verhalten von isolierten Kardiomyozyten unter Azidose. 50	
3.1.1 Bedeutung der δ -Isoform der CaMKII für die Aufrechterhaltung der fraktionellen Myozytenverkürzung in der Spätphase der Azidose	50

3.1.2	Veränderung der Kalziumtransienten-Amplitude im Verlauf der Azidose bei CaMKII δ -KO	53
3.1.3	Effekt von CaMKII δ -KO auf die Veränderung der Relaxationszeiten im Verlauf der Azidose	56
3.2	Effekt von CaMKII δ -KO auf die diastolische Kalziumfluoreszenz und den SR-Kalziumgehalt im Verlauf der Azidose	58
3.2.1	Auswirkungen von CaMKII δ -KO auf die diastolische Kalziumfluoreszenz im Verlauf der Azidose bei isolierten Kardiomyozyten	59
3.2.2	Auswirkungen von CaMKII δ -KO auf den SR-Kalziumgehalt während der Azidose bei isolierten Kardiomyozyten	61
3.3	Effekt von CaMKII δ -KO auf den Natrium/Kalzium-Austauscher im Verlauf der Azidose bei isolierten Kardiomyozyten	63
3.4	Einfluss der δ -Isoform der CaMKII auf die spätazidotische Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten bei isolierten Kardiomyozyten	65
3.4.1	Einfluss der δ -Isoform der CaMKII auf die Inzidenz der spätphasigen Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten während der Azidose	65
3.4.2	CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten mit Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten.....	67
3.5	Das Verhalten von CaMKII δ -KO- und Flox-Kardiomyozyten nach pharmakologischer Inhibition aller Isoformen der CaMKII durch KN-93 im Verlauf der Azidose.....	69
3.5.1	Überprüfung der CaMKII-Abhängigkeit der spätazidotischen Erhaltungsvorgänge in isolierten Flox-Kardiomyozyten mittels des CaMKII-Inhibitors KN-93 bzw. seines inaktiven Analogons KN-92	70
3.5.2	Auswirkungen einer zusätzlichen, pharmakologischen Inhibition aller CaMKII-Isoformen durch KN-93 auf isolierte CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten im Verlauf der Azidose	72
3.5.3	Effekt einer KN-93-vermittelten vollständigen CaMKII-Inhibition auf CaMKII δ -KO- vs. Kontrollkardiomyozyten (Flox) im Verlauf der Azidose.....	75
4.	Diskussion	77
4.1	Das Verhalten von CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen.....	77
4.1.1	Erhaltene systolische Funktion unter Kontrollbedingungen	77
4.1.2	Beeinträchtigte diastolische Funktion unter Kontrollbedingungen	80
4.1.3	Erhöhtes diastolisches Kalzium unter Kontrollbedingungen.....	81
4.2	Das Verhalten der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten im Verlauf der Azidose.....	82
4.2.1	Abnahme von Kontraktilität und Kalziumtransienten in der frühen Azidose bei CaMKII δ -Knockout- und Flox-Kardiomyozyten	83
4.2.2	Aufrechterhaltung von Kontraktilität und Kalziumtransienten in Kontrollzellen in der späten Azidose.....	85
4.2.3	Deutliche Beeinträchtigung der spätazidotischen Erhaltungsvorgänge bei CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten	88
4.2.4	CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten vs. Flox-Kardiomyozyten in der postazidotischen Phase	91

Inhaltsverzeichnis

4.3	Die Bedeutung anderer CaMKII-abhängiger Prozesse für die spätazidotische Wiedererholung einiger CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten	92
4.4	„Ying und Yang“ einer therapeutischen CaMKII δ -Inhibition	93
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literaturverzeichnis	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.....	2
Abbildung 1.2.....	9
Abbildung 1.3.....	10
Abbildung 1.4.....	13
Abbildung 1.5.....	16
Abbildung 1.6.....	17
Abbildung 1.7.....	22
Abbildung 1.8.....	26
Abbildung 2.1.....	30
Abbildung 2.2.....	33
Abbildung 2.3.....	36
Abbildung 2.4.....	37
Abbildung 2.5.....	39
Abbildung 2.6.....	40
Abbildung 2.7.....	44
Abbildung 2.8.....	46
Abbildung 2.9.....	47
Abbildung 2.10.....	48
Abbildung 3.1.....	51
Abbildung 3.2.....	52
Abbildung 3.3.....	53
Abbildung 3.4.....	54
Abbildung 3.5.....	55
Abbildung 3.6.....	57
Abbildung 3.7.....	59
Abbildung 3.8.....	60
Abbildung 3.9.....	61
Abbildung 3.10.....	63
Abbildung 3.11.....	65
Abbildung 3.12.....	66

Abbildung 3.13.....	67
Abbildung 3.14.....	69
Abbildung 3.15.....	71
Abbildung 3.16.....	72
Abbildung 3.17.....	74
Abbildung 3.18.....	75
Abbildung 3.19.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.....	32
Tabelle 2.2.....	38
Tabelle 2.3.....	41
Tabelle 2.4.....	42
Tabelle 2.5.....	43
Tabelle 2.6.....	45

Formelverzeichnis

Formel 2.1.....	46
Formel 2.2.....	46
Formel 2.3.....	47
Formel 2.4.....	47
Formel 2.5.....	48

Abkürzungsverzeichnis

AC3-I	Autocamtide-3-inhibitorisches Protein
ADP	Adenosindiphosphat
AIP	Autocamtide-2-verwandtes Inhibitorisches Protein
AM	Azetoxy-methylester
ANOVA	analysis of variance (engl.; statistisches Verfahren)
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.F.	arbitrary unit of fluorescence = Einheit der mit Fluo-3 AM gemessenen Fluoreszenz
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CaM	Calmodulin
CaMK	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
Cre	Cyclization recombination
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
engl.	englisch
ETC	Excitation-transcription-coupling
F	Systolische Kalziumfluoreszenz
F ₀	Diastolische Kalziumfluoreszenz
FDAR	frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation (engl. frequency dependent acceleration of relaxation)
Flox	Kontrollmäuse zum CaMKII δ -KO (engl. flanked by loxP)
H ⁺	Proton / Wasserstoffion
HDAC4	Histondeacetylase 4
Hz	Hertz

K ⁺	Kalium
KO	Knockout
lat.	lateinisch
LTCC	L-Typ-Kalziumkanal
min	Minuten / minütiger
μM	mikro mol/l
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
Na ⁺	Natrium
NCX	Natrium/Kalzium-Austauscher
NHE	Natrium/Protonen-Austauscher
nM	nano mol/l
n.s.	nicht signifikant
N-Terminus	Aminoterminus
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PKA	Protein-Kinase A
PKC	Protein-Kinase C
PLB / PLM	Phospholamban
PMCA	Plasma-Membran-Kalzium-ATPase
PO ₄	Phosphat
PP1	Protein-Phosphatase 1
RT ₉₀	Relaxationszeit, nach der 90 % der diastolischen Sarkomerlänge wieder erreicht wird
RyR	Ryanodinrezeptoren
RZ	Relaxationszeit
RZL	Ruhezelllänge
s	Sekunden
S.	Seite
Ser	Serin
SERCA	Sarkoplasmatisches-Retikulum-Kalzium-ATPase
sog.	sogenannte

SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	transversale Aortenkonstriktion
τ_{Ca}	Relaxationsgeschwindigkeit der Kalziumtransienten
Thr	Threonin
TierSchG	Tierschutzgesetz
Tn	Troponin
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
vs.	versus (<i>lat.</i>) = im Gegensatz zu
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Jährlich sterben in Deutschland mehr als 125.000 Menschen an den Folgen einer Minderdurchblutung des Herzmuskels (Myokardischämie). Damit steht diese Erkrankung mit 15 % an erster Stelle in der Todesursachenstatistik (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010). Betroffen sind v.a. ältere Menschen mit multiplen kardiovaskulären Risikofaktoren (u.a. arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen; HAFHEY 2009). Ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus, der einer Myokardischämie zugrunde liegt, ist eine Übersäuerung (Azidose) des betroffenen Myokards. Die Folgen einer Azidose auf Kardiomyozyten und deren Kalziumstoffwechsel werden seit Jahrzehnten intensiv erforscht (POOLE-WILSON 1989). Mittlerweile wird der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), einem wichtigen Regulator des Kalziumstoffwechsels, eine herausragende Bedeutung für die Vorgänge bei einer Azidose zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die CaMKII essentiell für die Erhaltung bzw. Wiedererholung von Kalziumtransienten und Kontraktilität im Verlauf einer Azidose ist und somit deren negative Folgen z.T. kompensieren kann (SAG et al. 2007, MATTIAZZI et al. 2007).

Da aber die CaMKII bei anderen pathophysiologischen Situationen, insbesondere einer Herzinsuffizienz, deren Entstehung bzw. Fortschreiten begünstigt (KOHLHAAS et al. 2006; ZHANG T et al. 2003), wurde in den vergangenen Jahren intensiv über eine therapeutische Inhibition der CaMKII diskutiert (ANDERSON ME et al. 2011). Diese Arbeit soll nun mögliche negative Folgen einer CaMKII-Inhibition auf die Azidose untersuchen. Dazu wurde ein innovatives Modell einer CaMKII δ -Knockout-Maus verwendet (BACKS et al. 2009). Isolierte Kardiomyozyten aus diesen Mäusen wurden mithilfe der Epifluoreszenz-Mikroskopie hinsichtlich verschiedener Parameter des Kalziumstoffwechsels (u.a. Kontraktionsverhalten, Kalziumtransienten, Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums) untersucht und mit CaMKII δ -exprimierenden Kardiomyozyten verglichen.

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle sowie die für den Kalziumstoffwechsel relevanten Proteine und Signalwege beschrieben.

Daraufhin wird die elektromechanische Kopplung unter besonderer Berücksichtigung der CaMKII-abhängigen Einflüsse beleuchtet, um anschließend auf Methoden der CaMKII-Inhibition, einschließlich des in dieser Arbeit verwendeten CaMKII δ -Knockout-Mausmodells, einzugehen.

Der letzte Abschnitt der Einleitung widmet sich den pathophysiologischen Vorgängen während einer Azidose am Herzen und leitet zu den Fragestellungen dieser Doktorarbeit über.

1.1 Die Herzmuskelzelle

1.1.1 Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle

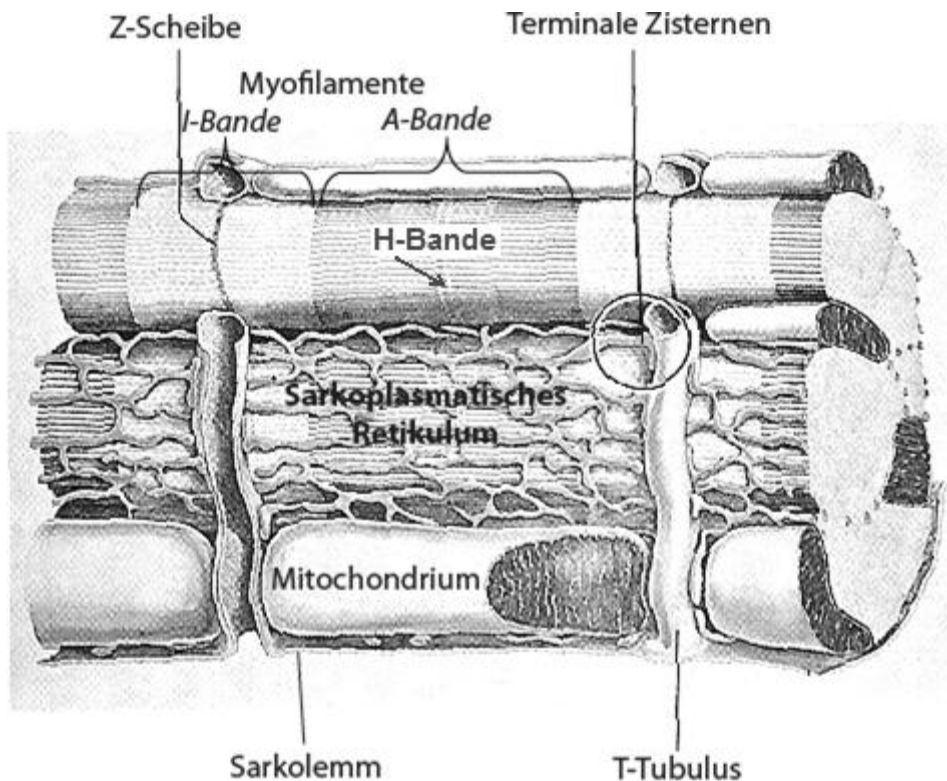


Abbildung 1.1 - Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle. Modifiziert nach Lüllmann-Rauch 2009, Seite 220

Die Herzmuskulatur besteht aus einem verzweigten, dreidimensionalen Netz von Herzmuskelzellen, die jeweils im Bereich der Glanzstreifen (*Disci intercalares*) sowohl über Haftkontakte mechanisch als auch über *gap junctions* chemisch und elektrisch miteinander verbunden sind.

Die einzelnen Herzmuskelzellen sind meist einkernig und werden von einer als Sarkolemm bezeichneten Membran umgeben, welche über Einstülpungen (sogenannte T-Tubuli) in regelmäßigen Abständen ins Zellinnere hineinragt (LÜLLMANN-RAUCH 2009).

Die intrazellulären Strukturen lassen sich nach ihren speziellen Aufgaben zwei Funktionsbereichen zuordnen, dem kontraktilem Apparat sowie dem Kalziumstoffwechsel. Diese werden in den folgenden beiden Abschnitten mit einem Schwerpunkt auf den für das Verständnis dieser Arbeit wichtigen Strukturen im Detail dargestellt.

1.1.2 Der kontraktile Apparat

Der kontraktile Apparat hat die Aufgabe, chemische Energie in eine physikalisch messbare mechanische Verkürzung der Herzmuskelzelle zu überführen. Dazu enthält die Herzmuskelzelle eine Vielzahl von Myofilamenten, die ungefähr 45-60% des Zellvolumens ausmachen. Die Myofilamente bestehen aus zwei Hauptproteinen, dem dicken Myosin (ca. 15 nm Durchmesser) und dem dünnen Aktin (ca. 10 nm Durchmesser). Diese sind in einer charakteristischen Weise angeordnet, wodurch eine im Lichtmikroskop sichtbare Querstreifung der Herzmuskelzelle entsteht (siehe Abbildung 1.1). Die dünnen Filamente sind im Bereich der Z-Scheiben unter anderem durch das Protein α -Aktinin miteinander verknüpft. Auf diese Weise wird der kontraktile Apparat anhand der Z-Scheiben in seine Grundstrukturen, die Sarkomere, unterteilt (BERS 2001).

Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens im Polarisationsmikroskop kann man ferner die I-Bande (isotrop, d.h. hell) als Bereich, an dem nur dünne Filamente vorliegen, und die A-Bande (anisotrop, d.h. dunkel) als Bereich, an dem die dicken Filamente lokalisiert sind, voneinander abgrenzen. Von großer funktioneller Bedeutung ist, dass die dünnen Filamente in einem unterschiedlichen Ausmaß in die A-Bande hineinragen, wobei der Grad der Überlappung von Aktin- und Myosinfilamenten entscheidend für die mechanische Verkürzung der Herzmuskelzelle ist. Den Bereich innerhalb der A-Bande, in dem die Myosinfilamente alleine, d.h. ohne Überlappung durch Aktinfilamente, vorliegen, bezeichnet man als H-Bande.

Indem bei der Kontraktion die Aktinfilamente beider Sarkomerhälften zwischen die Myosinfilamente gleiten, kommt es zu einer Verkürzung des Sarkomers auf maximal 70% seiner Ruhelänge von ca. 2,2 μm . Dabei bleibt die Länge der Aktin- und Myosinfilamente unverändert, die I-Bande und die H-Bande werden dagegen schmaler (LÜLLMANN-RAUCH 2009).

a) Aufbau des Myosinfilaments:

Das Myosinfilament (siehe Abbildung 1.3) entsteht durch die Zusammenlagerung und Verdrillung verschiedener Myosinmoleküle (jeweils zwei schwere und vier leichte Ketten). Hierdurch lassen sich drei Strukturen unterscheiden: der Myosinkopf, der Myosinhals und der Myosinschaft (BERS 2001).

b) Aufbau des Aktinfilaments:

Das Aktinfilament besteht aus einer Vielzahl kugelförmiger (globulärer) Aktinmoleküle, die entlang eines fadenförmigen Tropomyosin-Eiweißkörpers angeordnet sind. Dabei erstreckt sich ein Tropomyosinmolekül über 7 Aktinmoleküle. Die Aktinmoleküle haben neben ihren

Bindungsstellen für benachbarte globuläre Aktinmoleküle, das Tropomyosin und den Myosinkopf weitere Bindungsstellen für Troponin. Hierbei handelt es sich um ein für die Myozytenkontraktion sehr wichtiges regulatorisches Protein, welches seinerseits aus drei Untereinheiten besteht: Troponin (Tn) I (Bindung an Aktin), TnT (Bindung an Tropomyosin) und TnC (Bindung an Kalzium) (KLINKE und SILBERNAGEL 2005).

Das genaue Zusammenspiel der einzelnen Strukturen für die Myozytenkontraktion erklärt Abschnitt 1.2 (S. 8).

1.1.3 Der Kalziumstoffwechsel

Die Funktion des Kalziumstoffwechsels besteht darin, das für die Kontraktion notwendige Kalzium zur Verfügung zu stellen bzw. im Anschluss wieder aus dem Zytoplasma zu entfernen. Die Kenntnis der im Folgenden genannten Strukturen des Kalziumstoffwechsels ist für das weitere Verständnis dieser Arbeit von großer Bedeutung:

a) Der transsarkolemmale Kalziumeinstrom: L-Typ-Kalziumkanal

Der L-Typ-Kalziumkanal ist ein spannungsabhängiger Kalziumkanal, der die Membran der Herzmuskelzellen, das Sarkolemm, durchzieht. Wegen seiner pharmakologischen Beeinflussbarkeit durch 1,4-Dihydropyridin wird er auch als Dihydropyridin-Rezeptor bezeichnet. Er befindet sich in besonders hoher Dichte im Bereich der T-Tubuli und somit in enger räumlicher Nähe zum Sarkoplasmatischen Retikulum (WIBO et al. 1991).

Über den L-Typ-Kalziumkanal strömt ein Teil des für die Kontraktion der Herzmuskelzelle benötigten Kalziums von extrazellulär in die Zelle hinein. Die Hauptfunktion dieses Kalziums liegt allerdings in der kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung (FABIATO A 1983), auf die im Abschnitt 1.2 (S. 8) näher eingegangen wird.

Aktiviert wird der L-Typ-Kalziumkanal spannungsabhängig im Rahmen eines Aktionspotentials. Sinkt das Membranpotential durch die anschließende Repolarisation wieder ab, kommt es zu einer Inaktivierung des L-Typ-Kalziumkanals (BERS 2002). Unterstützend wirkt zudem eine negative Rückkopplung durch steigende intrazelluläre Kalziumkonzentrationen, die u.a. über das kalziumbindende Protein Calmodulin (CaM; siehe unten) vermittelt wird (PITT 2007).

b) Der intrazelluläre Kalziumspeicher: das Sarkoplasmatische Retikulum

Das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist ein membranumgebenes, intrazelluläres Hohlräumssystem, das jede einzelne Myofibrille manschettentartig umgibt. Man unterscheidet longitudinal in Richtung der Myofibrillen orientierte Schläuche (L-System) von den quer dazu stehenden terminalen Zisternen (T-System; LÜLLMANN-RAUCH 2009).

Die wichtigste Funktion des SR ist die Speicherung, Freisetzung und Wiederaufnahme von Kalzium. Indem es einen Großteil des notwendigen Kalziums zur Verfügung stellt, ist das Sarkoplasmatische Retikulum maßgeblich in die Myozytenkontraktion involviert. Verantwortlich für die Speicherung von Kalzium im Lumen des Sarkoplasmatischen Retikulums ist vor allem das Protein Calsequestrin mit einer Speicherkapazität von etwa 35-40 Kalziumionen pro Molekül (BERS 2001).

In die Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums eingebettet finden sich zwei funktionell bedeutende Proteine, die Ryanodinrezeptoren und die SR-Ca²⁺-ATPase (SERCA). Diese sind in charakteristischer Weise auf der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums verteilt, was funktionell von großer Bedeutung für den Kalziumstoffwechsel ist und an späterer Stelle erläutert wird (BERS 2001). Der Gesamtgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums an Kalzium ergibt sich aus der Differenz der Kalziumaufnahme über die SERCA und der Kalziumabgabe über die Ryanodinrezeptoren. Neben der Aktivität der SERCA bestimmt auch der diastolische Kalziumgehalt einer Zelle, wie viel Kalzium ins Sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen wird. Der SR-Kalziumgehalt wiederum steht weitgehend in einem proportionalen Verhältnis zur Höhe des systolisch ausgeschütteten Kalziums und letztendlich auch zur entwickelten Kontraktionskraft (BERS 2001).

c) Die SR-Kalziumausschüttung: Ryanodinrezeptoren

Die Kalziumfreisetzungskanäle werden als Ryanodin-Rezeptoren (RyR) bezeichnet, da sie eine hohe Affinität zum pflanzlichen Alkaloid Ryanodin aufweisen. Ihre Funktion ist die Ausschüttung von im Sarkoplasmatischen Retikulum gespeichertem Kalzium in das Zytoplasma der Herzmuskelzelle, wodurch eine Kontraktion bewirkt wird (BERS 2001). Dabei stehen die RyR im Zentrum eines großen makromolekularen Proteinkomplexes aus FK506-Bindungsprotein 12.6, Calmodulin, CaMKII, Proteinphosphatasen, Proteinkinase A und weiteren assoziierten Proteinen, die direkt oder indirekt Einfluss auf ihre Funktion nehmen können (Al et al. 2005). Des Weiteren sind die Ryanodinrezeptoren vor allem im Bereich der terminalen Zisternen lokalisiert und somit in unmittelbarer Nähe zu den T-Tubuli und L-Typ-Kalziumkanälen (siehe Abbildung 1.1). Diesen Komplex bezeichnet man als Diade, den zytosolischen Raum dazwischen nennt man entsprechend diadischen Spalt. Die funktionelle

Bedeutung dieser Strukturen wird im Abschnitt „Die elektromechanische Kopplung“ (siehe Abschnitt 1.2; S. 8) näher erläutert (BERS 2001).

Der Ryanodinrezeptor lässt sich auch pharmakologisch durch eine Koffeinlösung beeinflussen, die auch in dieser Arbeit zur Anwendung kommt. Koffein in hohen Konzentrationen bewirkt eine Ausschüttung des luminalen SR-Kalziumgehalts über die Ryanodinrezeptoren und ermöglicht dadurch, Aussagen über den Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums zu treffen. Dahinter steht ein erst kürzlich verstandener Mechanismus einer reduzierten Erregungsschwelle des RyR durch luminales Kalzium (KONG et al. 2008).

- d) Die SR-Kalziumaufnahme: Sarko(endo)plasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und Phospholamban (PLB):

Während im Bereich der terminalen Zisternen die Ryanodinrezeptoren überwiegen, findet sich in den Membranen des longitudinalen Systems des Sarkoplasmatischen Retikulums überwiegend die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Ihre Funktion ist konträr zum Ryanodinrezeptor die Wiederaufnahme von Kalzium in das Sarkoplasmatische Retikulum (BERS 2001). Dazu werden unter Verbrauch von je einem Molekül Adenosintriphosphat (ATP) zwei Kalziumionen aus dem Sarkoplasma in das Lumen des SR gepumpt (TADA et al. 1982). Da die SERCA der wichtigste Mechanismus ist, um das während der Systole ins Zytoplasma freigesetzte Kalzium wieder zu entfernen, beendet die SERCA die Kontraktion der Herzmuskelzelle und leitet die diastolische Relaxation ein (ERKASAP 2007). Die Relaxationsgeschwindigkeit (=Relaxationszeit) der Kalziumtransienten (τ_{Ca}) gilt somit annähernd als Maß für die Aktivität der SERCA (PERIASAMY et al. 2008).

Von den fünf derzeit in Muskelzellen bekannten Isoformen der SERCA (SERCA1a, 1b, 2a, 2b, 2c) ist die SERCA2a die im Herzen dominierende Form (DALLY et al. 2006).

Neben der direkten Beeinflussung der SERCA durch beispielsweise eine Azidose (FABIATO A und FABIATO F 1978) wird ihre Aktivität von Phospholamban (PLB) reguliert (PERIASAMY et al. 2008; siehe Abbildung 1.6). Aufgrund der großen Bedeutung für diese Arbeit soll nun auf PLB näher eingegangen werden.

Phospholamban nimmt eine Schlüsselfunktion in der Regulation der basalen myokardialen Kontraktilität ein. Im unphosphorylierten Zustand wirkt es hemmend auf die SR-Kalziumaufnahme und somit auch auf die myokardiale Kontraktilität. Es kann allerdings durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden, wodurch eine Enthemmung der SERCA und in der Folge ein Anstieg der Kontraktilität resultiert. Es gibt zwei wesentliche Phosphorylierungsstellen am PLB, eine Proteinkinase-A-abhängige Phosphorylierung an

Serin-16 (Ser-16) sowie eine Kalzium/Calmodulin (CaMK)-abhängige Phosphorylierung an Threonin-17 (Thr-17). Über die Phosphorylierung an Ser-16 wird u.a. die Wirkung von β -Agonisten auf die Myozytenkontraktilität und die diastolische Relaxation vermittelt (LUO et al. 1994). Zunächst ging man durch Experimente mit β -Agonisten davon aus, dass eine Phosphorylierung an Ser-16 die Voraussetzung für eine Phosphorylierung an Thr-17 ist (LUO et al. 1998). Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass unter bestimmten Bedingungen auch eine alleinige Phosphorylierung an Thr-17 möglich ist. Dies ist insbesondere der Fall, wenn die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht ist und die Phosphatasen (insbesondere PP1; als Gegenspieler zur CaMK-abhängigen Phosphorylierung) gehemmt sind, wie beispielsweise bei einer Azidose (VITTONI et al. 1998).

e) Natrium/Kalzium-Austauscher (NCX):

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher transportiert für drei Natriumionen ein Kalziumion entlang eines elektrochemischen Gradienten. Er ist nach der SERCA einer der wichtigsten Mechanismen, um das während der Systole ins Zytoplasma gelangte Kalzium wieder zu eliminieren und so die Diastole einzuleiten (BERS 2002). Bei einer erhöhten intrazellulären Na^+ -Konzentration kann der NCX allerdings auch einen Ionentransport in die umgekehrte Richtung (*reverse mode*) ermöglichen und so das intrazelluläre Kalzium erhöhen. Dies ist insbesondere für die in dieser Arbeit untersuchte Azidose von großer Bedeutung, da diese über kompensatorische Aktivierung von Natrium/Protonen-Austauschern zu einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration führt (MATTIAZZI et al. 2007).

Das Zusammenspiel des kontraktilen Apparates mit den Strukturen des Kalziumstoffwechsels wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet und im nächsten Abschnitt im Detail beschrieben.

1.2 Die elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung ist der Prozess von der elektrischen Erregung der Herzmuskelzelle bis zur mechanischen Kontraktion des Herzens. Entscheidendes Bindeglied dieser beiden Vorgänge ist Kalzium (BERS 2002), dessen Bedeutung RINGER bereits im Jahr 1883 beweisen konnte. Die genauen Mechanismen der elektromechanischen Kopplung werden allerdings erst seit dem Ende des 20. Jahrhunderts in zunehmendem Maße verstanden.

1.2.1 Die elektrische Erregung

Jeder Kontraktion der Herzmuskelzellen geht die Entstehung eines Aktionspotentials über dem Sarkolemm voraus. Ausgelöst durch einen elektrischen Reiz, der im gesunden Myokard meist vom Sinusknoten ausgeht und unter experimentellen Bedingungen durch einen kurzen externen Stromstoß generiert werden kann, kommt es zu einer Anhebung des Membranpotentials ausgehend von ca. -85 mV (Ruhepotential). Bereits bei ca. -65 mV (dem sogenannten Schwellenpotential) startet der Kardiomyozyt mit dem Ablauf eines immer gleichen und für ihn spezifischen Aktionspotentials (KLINKE und SILBERNAGEL 2005).

Das Aktionspotential am Herzen kann in fünf Phasen eingeteilt werden (siehe Box in Abbildung 1.2):

In der Phase 0 (Depolarisationsphase) kommt es durch die vorübergehende Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle zu einem raschen Einstrom von Natriumionen in das Zellinnere, gemäß dem elektrochemischen Gradienten. Dadurch steigt das Membranpotential bis weit in den positiven Bereich (ca. +30 mV).

In der Phase I (frühe Repolarisationsphase) kommt es durch die Aktivierung von auswärtsgerichteten Kaliumkanälen zu einer kurzen Erniedrigung des Aktionspotentials.

In der Phase II (Plateau-Phase) bleibt das Membranpotential annähernd konstant, da sich ein Gleichgewicht zwischen einwärtsgerichteten Strömen (hauptsächlich L-Typ-Kalziumkanäle) und auswärtsgerichteten Strömen (hauptsächlich Kaliumkanäle) einstellt.

In der Phase III (späte Repolarisationsphase) erfolgt eine erneute Repolarisation bis hin zum Ruhepotential. Dazu nimmt der einwärtsgerichtete Kalziumstrom ab, bei gleichzeitiger Zunahme auswärts gerichteter Kaliumströme (*delayed rectifier channels*).

In der Phase IV wird das Ruhemembranpotential durch sogenannte *inward rectifier* Kanäle bis zum nächsten Aktionspotential aufrechterhalten (BIRKELAND et al. 2005).

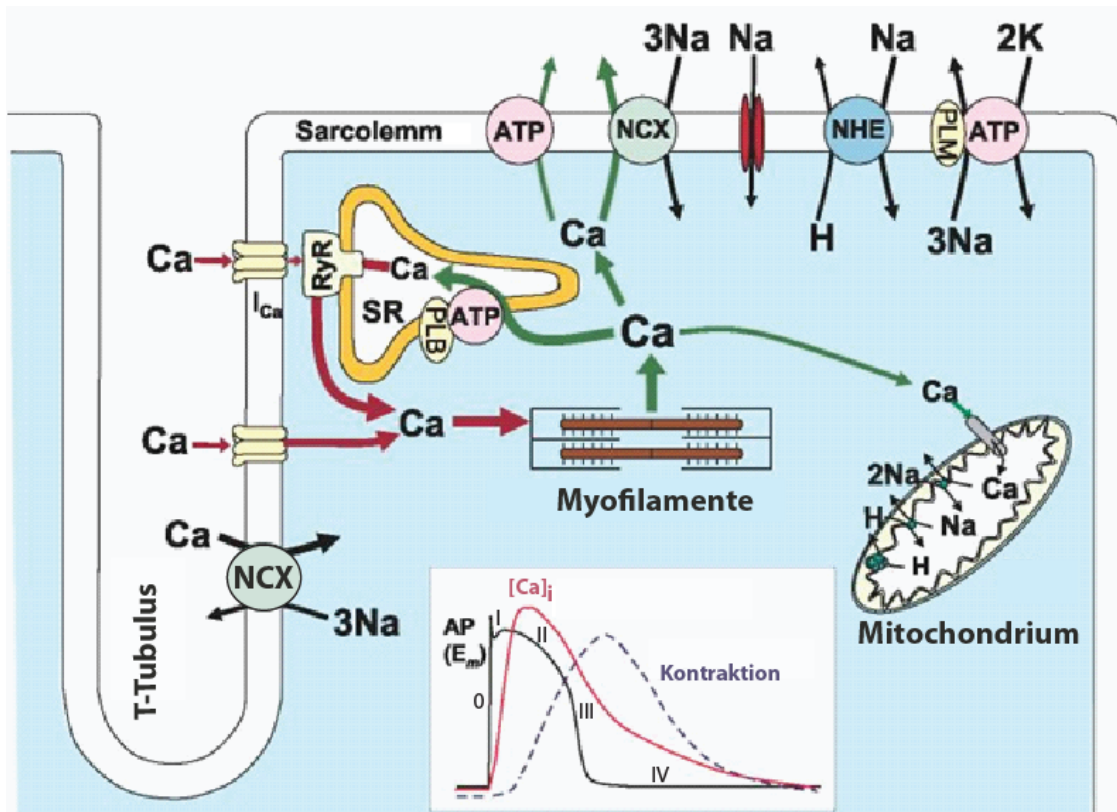


Abbildung 1.2 – Die elektromechanische Kopplung. Durch einen elektrischen Reiz entwickelt sich über dem Sarkolemm ein in verschiedenen Phasen ablaufendes Aktionspotential (AP; siehe Box), welches zu einem Einstrom von Kalziumionen (Ca) ins Sarkoplasma führt (rote Pfeile). Hierbei ist insbesondere der kalziuminduzierte Kalziumeinstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) von Bedeutung. Durch Wechselwirkung von Kalzium mit den Myofilamenten kommt es zu einer Myozytenkontraktion. Diese wird beendet, indem Kalzium über verschiedene Mechanismen wieder aus dem Sarkoplasma heraustransportiert wird (grüne Pfeile) - modifiziert nach BERS und DESPA 2006, Seite 316

1.2.2 Die mechanische Kontraktion

a) Die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung:

Wie aus der Box in Abbildung 1.2 ersichtlich ist, folgen auf den elektrischen Reiz des Aktionspotentials mit geringer Verzögerung ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und wenig später eine physikalisch messbare Kontraktion des Myokards.

Es ist dabei von entscheidender Bedeutung, dass der Anstieg des intrazellulären Kalziums nur zu einem Teil durch den L-Typ-Kalziumstrom während der Plateauphase des Aktionspotentials bedingt ist. Vielmehr hat diese lokale Erhöhung der Kalziumkonzentration im subsarkolemmalen Spalt eine Triggerwirkung auf die in enger räumlicher Nachbarschaft befindlichen Ryanodinrezeptoren. Durch die Öffnung der Ryanodinrezeptoren kommt es zu einer massiven Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum und dadurch zu einem Anstieg der freien Kalziumkonzentration im Intrazellulärraum von ca. 100 nM auf über 1 μ M (BERS 2001). Diesen Prozess bezeichneten FABIATO A und FABIATO F (1975) als „kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung“.

Des Weiteren ist auch der in Abschnitt 1.1.3 (S. 4) erwähnte sarkolemmale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) im *reverse mode* zu einem geringen Anteil an der Erhöhung der subsarkolemmalen Kalziumkonzentration beteiligt (MAIER und BERS 2002).

b) Die Kontraktion:

Entscheidend für die Kontraktion ist der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

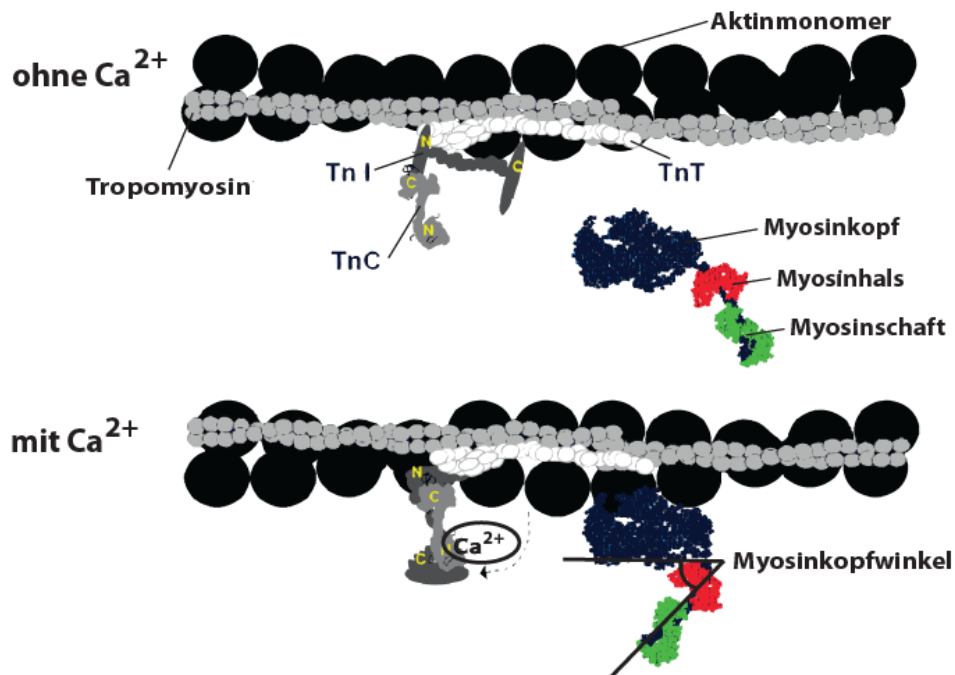


Abbildung 1.3 – Die Myozytenkontraktion. Unter einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration kommt es durch Bindung von Kalziumionen an Troponin C (TnC) zu einer Deblockade der Myosinbindungsstellen am Aktin. In der Folge lagert sich der Myosinkopf an Aktin an und verursacht durch eine zyklische Konformationsänderung die Myozytenkontraktion – modifiziert nach BERS 2001, Seite 23

Indem bis zu 4 Kalziumionen an die Troponin-Untereinheit C (TnC) binden, verlagert sich der Tropomyosinfaden mehr zur Mittelachse des Aktinfilaments. Durch diese Konformationsänderung werden am Aktinfilament Bindungsstellen für den Myosinkopf freigegeben (Deblockade). Infolgedessen beginnt eine zyklische Aktin-Myosin-Wechselwirkung, die erst dann wieder aufhört, wenn infolge absinkender intrazellulärer Kalziumspiegel die Myosinbindungsstellen erneut durch Tropomyosin blockiert werden.

Die zyklische Aktin-Myosin-Wechselwirkung lässt sich in 4 Phasen unterteilen:

- **Phase 1:** Der Myosinkopf ist fest an Aktin gebunden, sodass Aktomyosin vorliegt.
- **Phase 2:** ATP bindet an den Myosinkopf, wodurch sich dieser vom Aktinmolekül trennt.

- **Phase 3:** Durch Spaltung des ATP in ADP + Phosphat richtet sich der Myosinkopf auf, sodass der Myosinkopfwinkel 90° beträgt. Die Affinität zwischen Aktin und Myosinkopf nimmt wieder zu und es entsteht eine erneute zunächst schwache Bindung.
- **Phase 4:** Die schwache Bindung zwischen Aktin und Myosinkopf geht in eine festere Bindung über. Hierbei wird das Myosinfilament in das Aktinfilament hinein gezogen und der Myosinkopfwinkel verringert sich auf 50° . Dieser Vorgang ist die eigentliche mechanische Kraftentwicklung des Herzmuskels und resultiert in einer mechanischen Kontraktion.

Das Entfernen des ADP vom Myosinkopf beendet den Zyklus, sodass der Myosinkopfwinkel wieder 45° beträgt. Der Kreislauf wiederholt sich nun so lange, bis ein deutliches Absinken des intrazellulären Kalziumgehalts die Kontraktion beendet. Je mehr Kalzium im Rahmen des Aktionspotentials und der kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung nach intrazellulär freigesetzt wird, desto stärker ist die Myozytenkontraktion (KLINKE und SILBERNAGEL 2005).

Der beschriebene Prozess wird nach HUXLEY (1969) als Gleit-Filament-Theorie bezeichnet.

c) Die Beendigung der Kontraktion:

Die mechanische Kontraktion der Herzmuskelzelle endet, sobald das in der Systole freigesetzte Kalzium wieder aus dem Sarkoplasma entfernt wird, da es ohne Kalzium zu einer erneuten Blockade der Myosinbindestellen am Aktin kommt und so die zyklische Aktin-Myosin-Wechselwirkung sistiert (KLINKE und SILBERNAGEL 2005).

Das Absinken der intrazellulären Kalziumkonzentration leitet die diastolische Relaxation der Herzmuskelzelle ein. Hauptverantwortlich dafür ist die in Abschnitt 1.1.3 (S. 4) beschriebene SERCA, die bei einer Maus, als in dieser Arbeit verwendeten Spezies, ca. 90 % des in der Systole freigesetzten Kalziums in das Sarkoplasmatische Retikulum zurückpumpt. Zu einem kleineren Teil wird sie vom $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX, ca. 9%), den Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) und mitochondrialen Kalziumtransportern (ca. 0,5%) unterstützt (siehe Abbildung 1.2; LI et al. 1998, ERKASAP 2007). Dies gilt für basale Bedingungen und kann sich bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz deutlich ändern (PIESKE et al. 1999).

1.3 Die Regulation des Kalziumstoffwechsels

Der Kalziumstoffwechsel wird durch eine Reihe von Proteinen und Signalwegen reguliert, um ihn an wechselnde physiologische und pathophysiologische Umgebungsbedingungen anzupassen. Dabei spielt die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) eine entscheidende Rolle. Sie ist in der Lage, viele Strukturen des Kalziumstoffwechsels in ihrer Aktivität zu modulieren. Dies geschieht

sowohl kurzfristig von Herzschlag zu Herzschlag als auch langfristig über Veränderungen in der Gentranskription (MAIER 2009).

Neben der CaMKII gibt es noch weitere kalziumabhängige Signalmoleküle, wie die Kalzium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin und die Proteinkinase D, welche ebenfalls regulatorisch in den Kalziumstoffwechsel eingreifen können (FIELITZ et al. 2008, BACKS et al. 2009).

1.3.1 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

Bei den Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaMK) handelt es sich um eine Familie von 81 verschiedenen multifunktionalen Serin/Threonin-Protein-Kinasen, die eine zentrale Rolle in der Transmission von Kalziumsignalen spielen (MANNING et al. 2002). Die wichtigste ist die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Sie wurde initial im zentralen Nervensystem entdeckt (KENNEDY und GREENGARD 1981) und später auch im Herzen nachgewiesen (JETT et al. 1987). Vier verschiedene Gene (α , β , γ , δ) kodieren für die CaMKII, von denen die β - (SINGH et al. 2005), γ - und δ -Isoformen im Herzen vorkommen. Dabei überwiegt die δ -Isoform, welche zwei Splice-Varianten bildet: die dank einer elf Aminosäuren langen nukleären Lokalisationssequenz v.a. im Zellkern vorkommende CaMKII δ_b sowie die ohne nukleäre Lokalisationssequenz auf das Zytoplasma begrenzte CaMKII δ_c (HUDMON und SCHULMAN 2002). Daneben existieren im Myokard in geringer Menge noch weitere Isoformen wie δ_H und δ_I (ZHANG T und BROWN 2004).

Jeweils sechs bis zwölf CaMKII-Monomere arrangieren sich in einer charakteristischen, radartigen Struktur (siehe Abbildung 1.4). Jedes CaMKII-Monomer besteht aus 3 verschiedenen Domänen, einer katalytischen Domäne am Amino(N)-Terminus, einer regulatorischen Domäne in der Mitte sowie einer Assoziationsdomäne am Carboxy(C)-Terminus (BRAUN und SCHULMAN 1995 b). Dabei liegen die C-terminalen Bindungsdomänen im Zentrum des Rades und die N-terminal gelegenen katalytischen Domänen ragen nach außen (KANASEKI et al. 1991).

Besondere Beachtung verdient die regulatorische Domäne, die in zwei sich teilweise überlappende Bereiche unterteilt werden kann, einen autoinhibitorischen Bereich und einen Calmodulin-bindenden Bereich. Im Ruhezustand blockiert der autoinhibitorische Bereich das aktive Zentrum der katalytischen Domäne und verhindert dadurch die Enzymaktivität der CaMKII. Erst durch den Anstieg des intrazellulären Kalziums in der Systole kommt es zu einer Enthemmung des aktiven Zentrums. Dazu gehen je bis zu 4 Kalziumionen einen Komplex mit Calmodulin ein, welcher an den Calmodulin-bindenden Bereich der regulatorischen Domäne binden kann und dadurch den autoinhibitorischen Bereich aus dem aktiven Zentrum verdrängt (BRAUN und SCHULMAN 1995 b). Erst jetzt kann ATP im aktiven Zentrum binden und die Enzymaktivität eingeleitet werden (RELLOS et al. 2010).

Eine besondere Eigenschaft der CaMKII ist ihre Fähigkeit zur Autophosphorylierung an Threonin-287 im inhibitorischen Bereich. Auf diese Weise steigt nicht nur die Affinität der CaMKII für Calmodulin um ein Vielfaches (ca. 700-fach höhere Aktivität), sondern es kommt zudem zu einer Vermittlung langfristiger Effekte, da Calmodulin auch noch nach Abfall des intrazellulären Kalziums an die CaMKII gebunden bleibt (ZHANG T und BROWN 2004) und sie so ihre volle Aktivität behält (MEYER et al. 1992). Selbst wenn CaM schließlich abdissoziiert, behält die CaMKII durch die Autophosphorylierung eine partielle Aktivität von 20 - 80 % (LAI et al. 1986, LOU et al. 1986, SCHWORER et al. 1986). Die langfristigen Effekte der CaMKII-Autophosphorylierung spielen nicht nur im Herzen eine Rolle, sondern auch bei der Langzeitpotenzierung im Rahmen der neuronalen Gedächtnisbildung im Gehirn (RELLOS et al. 2010). Erst durch die Wirkung von Phosphatasen wie PP1, PP2a und PP2C kommt es schließlich zu einer kompletten Inaktivierung der CaMKII (ZHANG T und BROWN 2004).

Erst kürzlich entdeckten ERICKSON et al. (2008) einen weiteren, neuartigen Mechanismus der CaMKII-Aktivierung durch Oxidation an Methionin-281/282 durch u.a. freie Sauerstoff-Radikale.

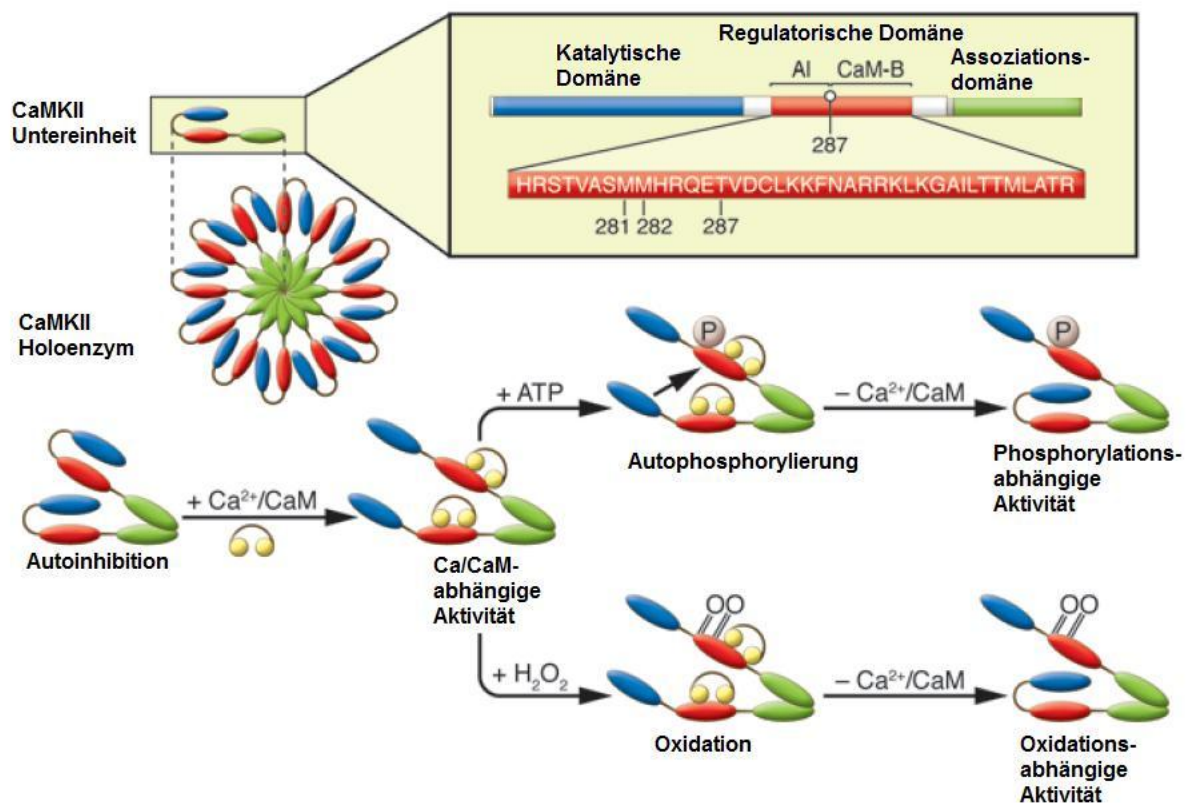


Abbildung 1.4 - Struktureller Aufbau und Aktivierung der CaMKII. Oben: Aufbau eines CaMKII-Monomers aus 3 Domänen. Jeweils 6 - 13 Monomere formen eine radartige Struktur. Unten: Ohne Ca/CaM-Bindung ist die katalytische Domäne blockiert. Erst durch Bindung von Ca/CaM an die regulatorische Domäne wird die katalytische Domäne enthemmt und kann ihrer Funktion nachgehen. Durch Autophosphorylierung an Threonin-287 oder Oxidation an Threonin-281/282 kann die CaMKII auch nach Abdissoziation von Ca/CaM weiterhin aktiviert bleiben und so unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration ihren Funktionen nachgehen - modifiziert nach ANDERSON ME 2009, Seite 1083

Neben der CaMKII kommen in deutlich geringerer Zahl auch noch weitere Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinasen im Herzen vor. Relevant sind v.a. die monomerischen Kinasen CaMKI und CaMKIV. CaMKI findet sich ubiquitär im menschlichen Körper und so auch in Kardiomyozyten. Ihre kardialen Funktionen sind noch weitgehend unklar. CaMKIV kommt v.a. im Thymus, Hoden und Gehirn vor und ist insbesondere im Zellkern lokalisiert, was auf eine mögliche Rolle für die Genexpression hinweist. Das Vorkommen von CaMKIV im Myokard ist aktuell noch umstritten (ZHANG T und BROWN 2004, COLOMER et al. 2003). So fanden KATO et al. (2000) eine vermehrte CaMKIV-Expression in durch *leukemia inhibitor factor* hypertrophierten Herzen. COLOMER et al. (2003) konnten sie dagegen bei infolge einer Aortenkonstriktion hypertrophierten Herzen nicht nachweisen. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass eine CaMKIV-Überexpression die Hypertrophiekaskade über CaMKII einleiten kann (PASSIER et al. 2000). Anders als die CaMKII benötigen CaMKI und CaMKIV zusätzlich zu Ca^{2+} /CaM eine weitere Aktivierung durch eine CaM-Kinase-Kinase-beta. Diese wird ebenfalls durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert (ANDERSON KA et al. 1998).

1.3.2 Einfluss der CaMKII auf physiologische Herzfunktionen

Die Funktionen der CaMKII stehen in direktem Zusammenhang zur im Abschnitt 1.2 (S. 8) beschriebenen elektromechanischen Kopplung, dem beim Menschen in Ruhe durchschnittlich 60 Mal pro Minute stattfindenden Prozess von der elektrischen Erregung bis zur Myozytenkontraktion. Damit dieser Ablauf koordiniert und an die aktuelle intrazelluläre Kalziumkonzentration angepasst ablaufen kann, bedarf es differenzierter Regulationsmechanismen, in deren Zentrum Calmodulin und die CaMKII stehen. Letztere ist in der Lage, eine Vielzahl der an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Ionenkanäle und Transporter auf Sarkolemm und Sarkoplasmatischem Retikulum zu phosphorylieren und in ihrer Aktivität zu beeinflussen. Dazu befindet sich die CaMKII oft in enger räumlicher Beziehung zu ihren Substraten und den Phosphatasen, ihren Antagonisten (MAIER und BERS 2007).

So zeigten WITCHER et al. (1991) erstmalig, dass die CaM-Kinase bei einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, wie sie beispielsweise im Rahmen der Systole stattfindet, die Ryanodinrezeptoren phosphorylieren kann. Auch WEHRENS et al. (2004) konnten bei Erhöhung der Herzfrequenz eine CaMKII-abhängige RyR-Phosphorylierung mit konsekutiv erhöhten systolischen Kalziumtransienten zeigen und vermuteten, dass diese mitverantwortlich für die bei höheren Herzfrequenzen beobachtete Zunahme der Kontraktilität sein könnte. Auch in der Diastole scheint die CaMKII-abhängige Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors von großer Bedeutung zu sein. So zeigten unter anderem MAIER et al. (2003), dass eine CaMKII δ -Überexpression den diastolischen Kalziumverlust über Ryanodinrezeptoren (sogenannte Ca^{2+} -sparks) erhöht und eine CaMKII-Inhibition diesen reduziert. Durch adenovirale Überexpressionsexperimente der CaMKII δ konnten die letztgenannten Autoren sowie später auch KOHLHAAS et al. (2006) zudem zeigen, dass die im Herzen

häufigste und auch in dieser Arbeit besondere Beachtung findende δ -Isoform der CaMKII an der Phosphorylierung der Ryanodinrezeptoren beteiligt ist.

Weiterhin ist bekannt, dass die CaMKII Phospholamban an Threonin-17 phosphorylieren kann, welches im unphosphorylierten Zustand ein Inhibitor der SERCA ist. Dadurch wird konsekutiv die Aktivität der SERCA erhöht und die Kalziumaufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum steigt (KOSS und KRANIAS 1996). BASSANI et al. (1995) vermuteten, dass die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an Phospholamban für die physiologisch sehr wichtige frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation (FDAR) verantwortlich sein könnte, die dem Herz ermöglicht, bei höheren Frequenzen trotz kürzerer Diastolendauer eine ausreichende diastolische Füllung zu erreichen (COUCHONNAL und ANDERSON ME 2008). So könnte eine PLB-Phosphorylierung über eine Aktivierung der SERCA zu einer beschleunigten Aufnahme von Kalzium ins Sarkoplasmatische Retikulum führen. Allerdings ist die Bedeutung sowohl der CaMKII wie auch des PLB-SERCA-Weges für die FDAR bis heute umstritten. So zeigten zwar einige Arbeitsgruppen, dass eine CaMKII-Inhibition die FDAR verringert (BASSANI et al. 1995, DESANTIAGO et al. 2002, PICT et al. 2007). Allerdings zeigten PLB-Knockout-Mäuse weiterhin eine deutliche FDAR (DESANTIAGO et al. 2002). Auch konnten HUKU und BERS (2007) zeigen, dass die CaMKII-abhängige Aktivierung des PLB-SERCA-Weges zeitlich verzögert zur deutlich schnelleren FDAR auftritt. Zusammenfassend scheint die CaMKII zwar eine Rolle bei der FDAR zu spielen, eventuell auch durch eine direkte Wirkung der CaMKII auf die SERCA. Dennoch könnten andere Ursachen wie eine reduzierte Myofilament-Sensitivität bei höheren Frequenzen von größerer Bedeutung sein (PICT et al. 2007, VARIAN und JANSSEN 2007, MAIER und BERS 2007).

Neben einer möglichen Bedeutung einer CaMKII-abhängigen PLB-Phosphorylierung an Thr-17 für die FDAR ist dieser Weg allerdings noch aus pathophysiologischen Gründen hervorzuheben, da er für die in dieser Arbeit untersuchte Azidose von großer Bedeutung ist, wie in den folgenden Abschnitten im Detail ausgeführt wird (siehe Abschnitt 1.5.1; S. 24).

Weiterhin reguliert die CaMKII auch spannungsabhängige Kalziumkanäle (ANDERSON ME et al. 1994) und beeinflusst so das wichtige Phänomen der Fazilitation maßgeblich. Hierbei handelt es sich um einen erleichterten Einstrom von Kalzium in die Zelle, wenn das intrazelluläre Kalzium bereits erhöht ist, im Sinne einer positiven Rückkopplung (HRYSHKO und BERS 1990). Auf molekularer Ebene liegt der Fazilitation eine durch die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration verstärkte CaMKII-Aktivierung zugrunde, welche dann die spannungsabhängigen Kalziumkanäle direkt phosphoryliert und so ihre Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht (DZHURA et al. 2000). Die physiologische Bedeutung der Fazilitation ist nicht gänzlich geklärt. Es wird diskutiert, dass es sich um einen partiellen Kompensationsmechanismus eines bei hohen Herzfrequenzen reduzierten Kalziumeinstroms über L-Typ-Kalziumkanäle handelt (MAIER und BERS 2007). Mittlerweile ist durch adenovirale

Überexpression weiterhin bekannt, dass auch die in dieser Doktorarbeit untersuchte δ -Isoform der CaMKII an diesem Phänomen maßgeblich beteiligt ist. Eine zusätzliche Beteiligung anderer CaMKII-Isoformen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden (MAIER et al. 2003). Abbildung 1.5 illustriert die genannten Vorgänge am spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanal und zeigt zudem seine Inaktivierung durch Calmodulin.

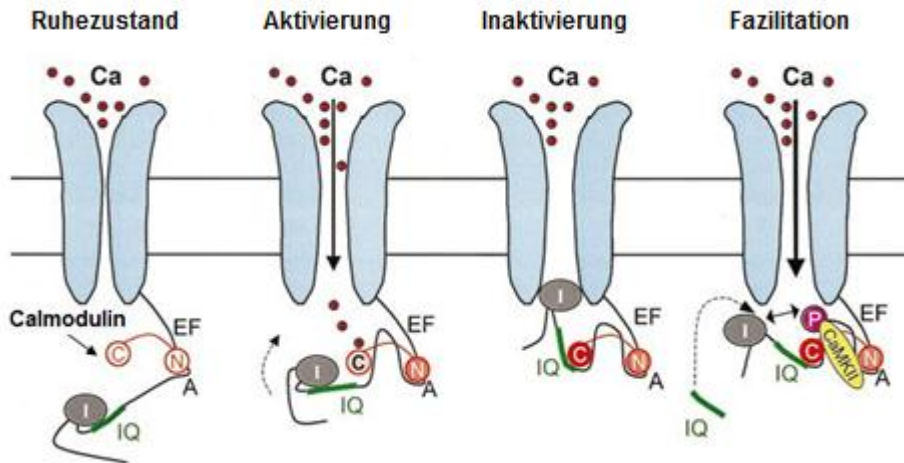


Abbildung 1.5 - Inaktivierung und Fazilitation des L-Typ-Kalziumkanals. Im Ruhezustand ist der Kanal geschlossen und bindet Calmodulin im Bereich der A-Region. Bei Depolarisation öffnet er sich und lässt Ca^{2+} in die Zelle einfließen. Das Ca^{2+} bindet an Calmodulin und führt schließlich zur Inaktivierung des L-Typ-Kalziumkanals. Auch die CaMKII reguliert die Aktivität des L-Typ-Kalziumkanals im Sinne eines erleichterten Kalziumeinstroms (Fazilitation), indem sie den L-Typ-Kalziumkanal phosphoryliert - modifiziert nach MAIER und BERS 2002, Seite 925

Auch für die Anpassung an einen hypertrophen Stimulus, wie eine transverse Aortenkonstriktion (TAC), ist die CaMKII von großer Bedeutung, indem sie den Kalziumstoffwechsel an verschiedenen Stellen modifiziert. So konnten TOISCHER et al. (2010) bei TAC-Mäusen u.a. eine erhöhte Aktivität des L-Typ-Kalziumkanals, erhöhte Kalziumtransienten und eine erhöhte fraktionale SR-Kalziumfreisetzung beobachten, die sich durch genetische Inhibition der δ -Isoform der CaMKII reduzieren ließen. Mittlerweile ist weiterhin bekannt, dass mithilfe der CaMKII die Aktivität von Natriumkanälen an die intrazelluläre Kalziumkonzentration angepasst werden kann (TAN et al. 2002, WAGNER et al. 2006a). Zudem beobachteten TESSIER et al. (1999) in Kardiomyozyten mit chronischem Vorhofflimmern, dass die CaMKII auswärtsrichtende Kaliumkanäle regulieren kann und eine CaMKII-Inhibition zu einer schnelleren Inaktivierung der Kaliumkanäle mit einer konsekutiv verkürzten Dauer des Aktionspotentials führt. SERGEANT et al. (2005) konnten anhand bestimmter Kaliumkanäle (Kv4.3) eine direkte CaMKII-Phosphorylierung an Ser-550 zeigen. Die resultierende physiologische Funktion ist je nach Kaliumkanal verschieden (WAGNER et al. 2006b).

Abbildung 1.6 fasst die genannten regulatorischen Funktionen der CaMKII auf die elektromechanische Kopplung zusammen.

Hervorzuheben ist, dass die CaMKII nicht nur kurzfristige Anpassungen der Kardiomyozyten an die intrazelluläre Kalziumkonzentration vermittelt, sondern den Kalziumstoffwechsel durch Autophosphorylierung an Thr-287 über den Zeitraum erhöhter Kalziumkonzentration hinaus im Sinne eines molekularen Gedächtnisses beeinflusst. So spielt sie über Gentranskription auch bei der langfristigen Anpassung der Herzmuskelzelle an veränderte Kalziumkonzentrationen eine entscheidende Rolle. Dies wird als *excitation-transcription-coupling* (ETC) bezeichnet und ist v.a. für die Entstehung einer Herzhypertrophie von Bedeutung (MAIER und BERS 2002, BACKS et al. 2009).

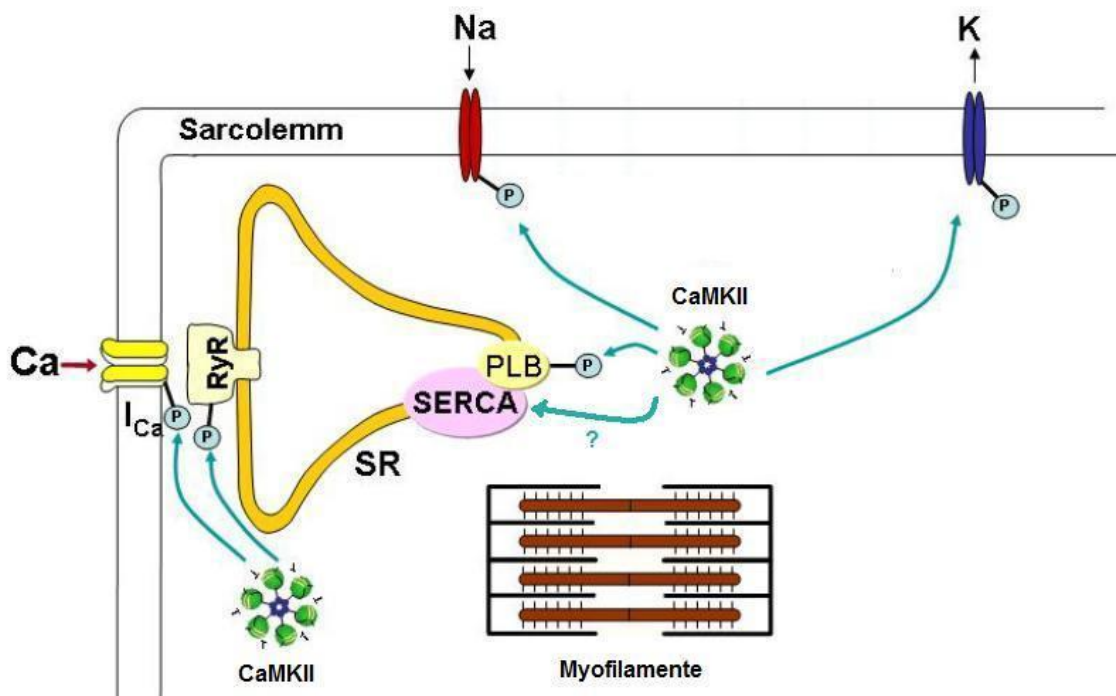


Abbildung 1.6 - Einfluss der CaMKII auf die elektromechanische Kopplung. Die CaMKII phosphoryliert u.a. Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Kanäle sowie den Ryanodinrezeptor, PLB und möglicherweise direkt die SERCA und beeinflusst dadurch deren Aktivität - Modifiziert nach MAIER 2009, S. 487

Von zunehmender Bedeutung ist die differenzierte Betrachtung der Funktion der unterschiedlichen Isoformen der CaMKII. Durch adenovirale Überexpression der δ -Isoform konnten dieser eine Wirkung auf Ryanodinrezeptoren (MAIER et al. 2003, KOHLHAAS et al. 2006) und L-Typ-Kalziumkanäle zugeordnet werden, wodurch allerdings nicht eine zusätzliche Wirkung anderer CaMKII-Isoformen, wie der γ -Isoform, auf diese Zielstrukturen ausgeschlossen werden kann (MAIER et al. 2003). Weiterhin beschrieben ZHANG T et al. 2007, dass sowohl die zytoplasmatische (CaMKII δ_c) als auch die nukleäre Isoform der CaMKII δ (CaMKII δ_b) die Genexpression beeinflussen würden. Einfluss auf die Phosphorylierung von Proteinen des Kalziumstoffwechsels (insbesondere PLB und RyR) würde allerdings nur die zytoplasmatische Isoform nehmen (ZHANG T et al. 2007). Insgesamt resümierten ZHANG T und BROWN (2004), dass aber erst die Entwicklung von Tiermodellen mit genetischer

Ablation spezifischer CaMKII-Isoformen, wie der in dieser Arbeit verwendeten CaMKII δ -Knockout-Maus, detailliertere Informationen über die Notwendigkeit einzelner Isoformen erbringen wird.

Auch über die Aufgaben der weiteren CaMKII-Isoformen in Myozyten, wie der CaMKII γ , ist bislang wenig bekannt (ZHANG T und BROWN 2004, BACKS et al. 2009). Bei der im Myokard in nur sehr geringen Mengen nachweisbaren β -Isoform der CaMKII (BAYER et al. 2002, SINGH et al. 2005) wird aufgrund der räumlichen Lokalisation in der Nähe der SERCA2a eine der CaMKII δ c ähnliche Rolle bei der PLB-Phosphorylierung vermutet (SINGH et al. 2009).

1.3.3 Bedeutung der CaMKII bei kardialen Dysfunktionen

Solange die CaMKII dem Einfluss wechselnder systolischer und diastolischer Kalziumkonzentrationen unterliegt, kann sie in sinnvoller Weise regulierend in den Kalziumstoffwechsel eingreifen. Kommt es allerdings zu einer kalziumunabhängigen, autonomen Aktivität, wie es beim Verlust der zytoplasmatischen Kalziumhomöostase oder bei erhöhtem oxidativen Stress der Fall ist, resultieren schwerwiegende Folgen. So wird die CaMKII mit der Entstehung einer Vielzahl pathophysiologischer Situationen wie Herzinsuffizienz oder Arrhythmien in Verbindung gebracht. Dennoch gibt es auch pathophysiologische Zustände, wie die in dieser Doktorarbeit näher untersuchte Azidose, bei denen die CaMKII vermutlich eine kardioprotektive Funktion ausübt (SAG et al. 2007, ANDERSON ME 2009).

Vor über zehn Jahren konnten HOCH et al. (1999) als erste Arbeitsgruppe zeigen, dass die CaMKII bei herzinsuffizienten Patienten deutlich erhöht ist. Initial wurde eine kompensatorische Funktion vermutet. So könnte sie über eine Phospholamban-Phosphorylierung - und damit einhergehend über einen erhöhten SR-Kalziumgehalt und höhere Kalziumtransienten - helfen, eine ausreichende Herzfunktion aufrecht zu erhalten. Mittlerweile stellte sich aber konträr zur initialen Hypothese heraus, dass die CaMKII-Überexpression ursächlich an der Entstehung einer Herzinsuffizienz beteiligt ist (ZHANG T et al. 2003, ZHANG T und BROWN 2004, KOHLHAAS et al. 2006) bzw. die kardiale Insuffizienz erhält (SOSSALLA et al. 2010). So zeigten Untersuchungen von ZHANG T und BROWN (2004), dass eine transgene Überexpression der zytosolischen CaMKII δ c eine Herzinsuffizienz mit reduziertem SR-Kalziumgehalt induzieren kann. Dabei vermittelt die CaMKII verschiedene Mechanismen wie Herzhypertrophie, Apoptose, Arrhythmien, Inflammation und veränderte Kalziumhomöostase, deren Zusammenwirken letztlich den Übergang in eine Herzinsuffizienz bewirken kann (ANDERSON ME 2009). Weiterhin wird die CaMKII mit der Induktion von Apoptose (VILA-PETROFF et al. 2007, ERICKSON et al. 2008, ZHU et al. 2007) und verschiedenen Formen von Arrhythmien (WU et al. 1999, KHOO et al. 2005, SAG et al. 2009) in Verbindung gebracht.

Auch im Verlauf einer Azidose, die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wird, und bei der Reperfusion eines reversibel ischämisch geschädigten Herzens kommt es zu einer CaMKII-abhängigen

Beeinflussung verschiedener Proteine des Kalziumstoffwechsels. Hierbei nimmt die CaMKII allerdings vermutlich eine kardioprotektive Funktion ein (VITTONI et al. 2002, MATTIAZZI et al. 2007). Die der Azidose zugrundeliegenden Mechanismen werden im Abschnitt 1.5 (S. 21) im Detail erläutert.

1.4 Inhibition der CaMKII und die CaMKII δ -Knockout-Maus

Physiologischerweise sind ein Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Abdissoziieren von Ca²⁺/Calmodulin sowie die anschließende Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen, wie PP1, PP2A und PP2C, verantwortlich für die Inaktivierung der CaMK (ZHANG T und BROWN 2004, HUKU und BERS 2007). Die Aktivität der Proteinphosphatasen hängt dabei stark von den Umgebungsbedingungen ab. So kommt es beispielsweise im Rahmen einer Azidose zu einer verringerten Aktivität (VITTONI et al. 1998) und bei einer Herzinsuffizienz zu einer erhöhten Aktivität (NEUMANN et al. 1997).

Neben der physiologischen Inhibition der CaMK wird eine experimentelle CaMK-Hemmung seit vielen Jahren zur differenzierten Untersuchung ihrer physiologischen und pathophysiologischen Funktionen verwendet (GAO et al. 2006). Ausgehend von den im vorherigen Abschnitt (1.3.3; S. 18) erläuterten pathophysiologischen Mechanismen, die der CaMKII zugeschrieben werden, ist in den vergangenen Jahren zunehmend auch über Möglichkeiten einer therapeutischen Inhibition der CaMKII diskutiert worden (WANG et al. 2004, ZHANG T et al. 2007, ANDERSON ME et al. 2011).

Pharmakologische Ansätze der CaMKII-Inhibition konzentrieren sich v.a. auf eine Blockierung des aktiven Zentrums (kompetitive Hemmung) oder der Autophosphorylierungsstelle der CaMKII. Ein häufig verwendeter pharmakologischer CaMK-Inhibitor, der auch in dieser Arbeit zur Anwendung kommt, ist der im Jahr 1991 von SUMI et al. beschriebene organische Inhibitor KN-93 (ein Methoxybenzonsulfonamid). Dieser blockiert kompetitiv die Bindung von CaM an die regulatorische Untereinheit der CaM-Kinasen, insbesondere der CaMKII, und verhindert dadurch deren Aktivierung (ANDERSON ME et al. 1998). Dabei beeinflusst KN-93 andere Ser/Thr-Kinasen wie z.B. Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) nicht nennenswert (NIKI et al. 1993). Allerdings übt KN-93 zusätzlich unspezifische Wirkungen aus, indem es insbesondere dosis- und inkubationszeitabhängig die L-Typ-Kalziumkanäle hemmt. Der besseren Vergleichbarkeit halber wurde daher das in Bezug auf die CaMKII inaktive Analogon KN-92 entwickelt (GAO et al. 2006), das ebenfalls in dieser Arbeit verwendet wird.

Ein weiterer bedeutender Inhibitor ist das synthetisch hergestellte Peptid AIP (Autocamtide-2-verwandtes inhibitorisches Protein). Es bindet kompetitiv an die Autophosphorylierungsstelle der

CaMKII und erreicht so eine 50 - 500x potentere Wirkung als KN-93 (ISHIDA et al. 1995). Des Weiteren beeinflusst es nicht die Kalziumkanäle (GAO et al. 2006) und scheint auch nicht auf andere CaM-Kinasen wie die CaMKIV zu wirken (ISHIDA et al. 1995).

Dem AIP verwandt ist das Autocamtide-3-inhibitorische Protein (AC3-I). Dieses Peptid, das BRAUN und SCHULMAN (1995 a) durch Modifizierung eines Abschnitts aus dem autoinhibitorischen Bereich der regulatorischen Domäne der CaMKII entwickelten, fungiert als kompetitiver Antagonist der CaMKII. Neben der akuten Inhibition durch Hinzugabe von AC3-I wurde mittlerweile auch ein Mausmodell entwickelt, welches das Autocamtide-3-inhibitorische Protein überexprimiert und so ermöglicht, die Auswirkungen einer chronischen CaMKII-Inhibition *in vivo* zu untersuchen (ZHANG R et al. 2005, KHOO et al. 2005, WU et al. 2006). Allerdings hat AC3-I den Nachteil, dass es nicht nur die CaMKII hemmt, sondern auch die ebenfalls aus der Superfamilie der CaM-Kinasen stammende Proteinkinase D (BACKS et al. 2009). Interessanterweise verhielten sich AC3-I-Mäuse unter normalen Bedingungen völlig unauffällig und zeigten auch nach mehrmonatiger Beobachtung keinerlei Anzeichen einer kardialen Dysfunktion (ZHANG R et al. 2005).

Die CaMKII δ -Knockout-Maus

Erst kürzlich wurde ein wegweisendes Mausmodell eines genetischen CaMKII δ -Knockouts vorgestellt (BACKS et al. 2009). Es handelt sich dabei um das erste kardiologisch relevante Modell einer spezifischen Ausschaltung nur einer der CaMKII-Isoformen auf genetischer Ebene. Ein ähnliches Mausmodell gab es bislang nur für die im ZNS vorkommende α -Isoform, wo es einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der molekularen Basis der Gedächtnisbildung geleistet hat (ELGERSMA et al. 2004).

Eine genetische CaMK-Inhibition hat anders als alle pharmakologischen Inhibitoren und auch die AC3-I-Maus den Vorteil, dass keine zusätzlichen unspezifischen Effekte auftreten. Zudem ist in dem genannten neuen Mausmodell nicht die gesamte CaMKII, sondern speziell die δ -Isoform als wichtigste Isoform der CaMKII im Herzen genetisch ausgeschaltet. Insofern ergeben sich neue Möglichkeiten, die Funktion der δ -Isoform unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen genauer zu untersuchen (BACKS et al. 2009). Obwohl die Untersuchung spezifischer Isoformen in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus vieler Arbeitsgruppen gerückt ist (ZHANG T et al. 2007), konnte mit den bisherigen Methoden der CaMK-Inhibition und Überexpression nur wenig über das Zusammenspiel der verschiedenen CaMKII-Isoformen bei physiologischen und pathophysiologischen Situationen herausgefunden werden. So beschrieben beispielsweise HOCH et al. (1999), dass die δ -Isoform bei Herzinsuffizienz erhöht ist. Weiterhin konnten ZHANG T et al. (2002, 2003) zeigen, dass eine Überexpression der nukleären δ -Isoform lediglich zu einer Herzhypertrophie führt, hingegen eine Überexpression der zytoplasmatischen δ -Isoform zunächst eine Hypertrophie,

letztlich aber eine Herzinsuffizienz verursacht. Allerdings ermöglichte die Überexpression einzelner Isoformen lediglich Aussagen über eine Beteiligung dieser CaMKII-Isoform an einer bestimmten Funktion. Eine Unterscheidung, ob sie dafür essentiell ist oder ob mehrere Isoformen zusammenwirken, war dagegen nicht möglich. Dies ist aber einer der großen Vorteile der CaMKII δ -Knockout-Maus (BACKS et al. 2009) und ausschlaggebend für die Verwendung im Rahmen dieser Arbeit.

Bislang konnten bereits einige Erkenntnisse mithilfe der CaMKII δ -KO-Maus gewonnen werden. So publizierten BACKS et al. (2009), dass sich die Mäuse unter physiologischen Bedingungen bis ins Erwachsenenalter völlig normal entwickeln und keine Auffälligkeiten in Bezug auf Herzstruktur und Funktion zeigen. Überraschenderweise war die Phosphorylierung an Thr-17 des PLB, einer der am besten untersuchten Phosphorylierungsstellen der CaMKII, nur geringfügig reduziert. Dies könnte auf eine zum Teil kompensatorische Phosphorylierung durch andere Kinasen hinweisen, möglicherweise im Sinne von redundanten Funktionen anderer CaMKII-Isoformen. Allerdings konnten die Autoren keine Veränderung der Proteinexpression der γ -Isoform der CaMKII feststellen. Dennoch ist eine kompensatorische Wirkung durch δ -unabhängige CaMKII-Isoformen nicht ausgeschlossen.

Erst bei pathophysiologischen Situationen fielen Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf. So zeigten die chronisch CaMKII δ -defizienten Mäuse unter einer erhöhten Druckbelastung infolge einer Verengung der thorakalen Aorta einen geringeren hypertrophen Umbau der Herzstruktur und eine Reduktion der in die Hypertrophiekaskade involvierten HDAC4 (Histondeacetylase 4) im Vergleich zum Wildtyp. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die δ -Isoform der CaMKII eine Schlüsselfunktion für den strukturellen Umbau des Herzens bei Druckbelastung einnimmt (BACKS et al. 2009).

Aufgrund der genannten Ergebnisse diskutierten diese, dass eine selektive Inhibition der CaMKII δ eine therapeutisch sinnvolle Option bei Herzhypertrophie sein könnte, empfahlen allerdings vorher weitere Untersuchungen der CaMKII δ -KO-Maus hinsichtlich negativer Konsequenzen für andere pathophysiologische Situationen durchzuführen (BACKS et al. 2009). An dieser Stelle setzt die vorliegende Arbeit an, indem die CaMKII δ -Knockout-Maus unter dem pathophysiologischen Zustand der Azidose untersucht wird.

1.5 Das Verhalten von Kardiomyozyten unter Azidose

Gerade einmal 15 s nach dem Verschluss einer Koronararterie entwickelt sich beim menschlichen Myokard eine Azidose, die mit einem Abfall der myokardialen Kontraktilität einhergeht (POOLE-WILSON 1989). Ursächlich für die Azidose im Rahmen einer Myokardischämie ist ein Anstieg des

Laktats aufgrund anaerober Glykolyse der betroffenen Herzmuskelzellen bei verminderter Sauerstoffzufuhr (metabolische Azidose). Aber auch ein CO₂-Anstieg im Ischämiegebiet trägt zur Azidose bei (respiratorische Azidose; MATTIAZZI et al. 2007). Obwohl die Beziehung zwischen intrazellulärer Azidose und Abfall der myokardialen Kontraktilität schon seit über 130 Jahren bekannt ist (GASKELL 1880), gelang es erst in den vergangenen Jahrzehnten, die physiologischen Vorgänge im Detail zu verstehen. Viele Autoren unterscheiden nunmehr zwei Phasen im Verlauf einer Azidose (siehe Abbildung 1.7):

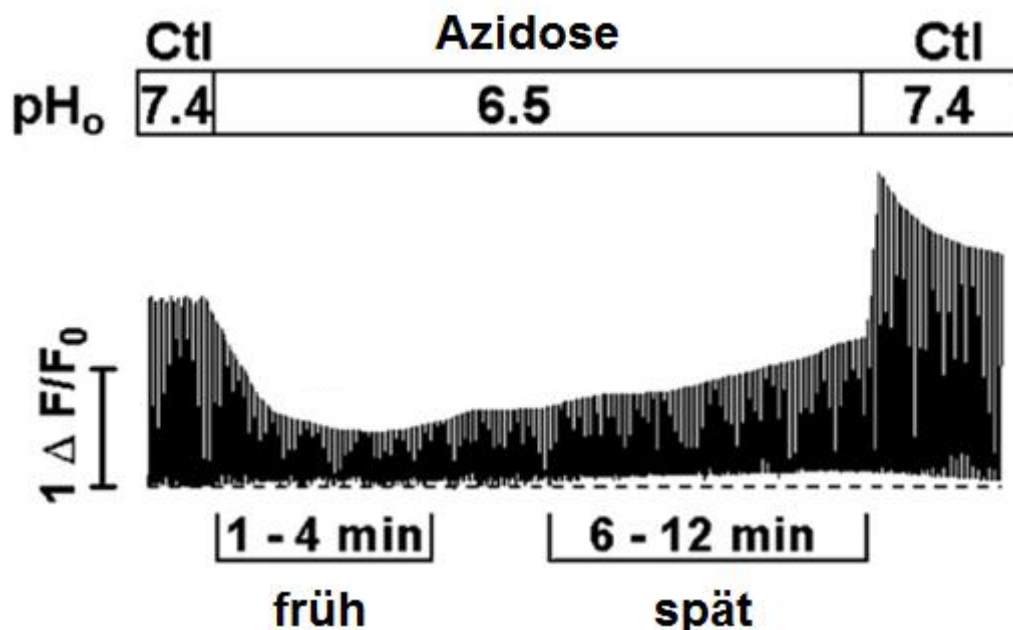


Abbildung 1.7 - Die Veränderung der Kalziumtransienten im Verlauf einer Azidose. An eine initiale Phase der Transientenabnahme (frühe Azidose) schließt sich eine zunehmende Wiedererholung bzw. Aufrechterhaltung der Kalziumtransienten über die restliche Zeit der Azidose an (späte Azidose) - Modifiziert nach MATTIAZZI et al. 2007, S. 649

Frühe Azidose:

Die Azidose interferiert mit verschiedenen an der Regulation des Kalziumstoffwechsels beteiligten Systemen. Dadurch kommt es zunächst zu einer Abnahme der Kontraktionskraft und Verlangsamung der Relaxationsgeschwindigkeit. Die verringerte Kontraktionskraft beruht insbesondere auf einer erniedrigten Sensitivität der Myofilamente gegenüber Kalzium durch die Azidose (FABIATO A und FABIATO F 1978). Konkret handelt es sich dabei um eine kompetitive Verdrängung der Kalziumionen von ihren Myofilament-Bindungsstellen (v.a. am Troponin) durch die erhöhte H⁺-Konzentration (BLANCHARD und SOLARO 1984). Zusätzlich kommt es auch zu einer Beeinflussung der Kalziumhomöostase. Indem die Azidose die Ryanodinrezeptoren hemmt, sinkt deren Sensitivität auf Trigger-Kalzium (XU L et al. 1996, KENTISH und XIANG 1997) und somit die Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (ORCHARD 1987). Weiterhin hemmt die Azidose die SERCA2a,

was eine reduzierte SR-Kalziumaufnahme (FABIATO A und FABIATO F 1978) und eine Verlangsamung der Relaxationsgeschwindigkeit (MANDEL et al. 1982) zur Folge hat. Die Aktivität des L-Typ-Kalziumkanals kann unter Azidose reduziert (IRISAWA und SATO 1986) oder unverändert (HULME und ORCHARD 1998) sein. Die aus dem Zusammenwirken der genannten Faktoren resultierenden systolischen Kalziumtransienten können in der frühen Azidose sowohl ansteigen (NOMURA et al. 2002), abfallen (CHOI et al. 2000, DESANTIAGO et al. 2004, SAG et al. 2007) als auch unverändert bleiben (HULME und ORCHARD 1998). Auch die Na^+/K^+ -ATPase wird durch eine Azidose gehemmt und kann über einen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration und die daraus resultierende Beeinflussung des NCX den Kalziumhaushalt beeinflussen (SATO et al. 1995).

Das Ausmaß der Kontraktionskraftabnahme bei einer Azidose hängt vor allem von der Abnahme des *intrazellulären* pH-Werts ab. Dies stützt sich auf Beobachtungen, dass eine respiratorische Azidose zu einer deutlich rascheren Abnahme von intrazellulärem pH-Wert und Kontraktibilität führt als eine metabolische Azidose, wie sie in dieser Arbeit verwendet wird (FRY und POOLE-WILSON 1981).

Obwohl die Myokardischämie die häufigste Ursache einer Azidose ist, ist es wichtig, Azidose und Ischämie voneinander abzugrenzen. So ist das Ausmaß der Kontraktibilitätsabnahme bei einer Ischämie größer als bei einer reinen Azidose. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine Ischämie neben einer intrazellulären Azidose weitere metabolische Veränderungen, wie eine Abnahme von Energieäquivalenten (Kreatinphosphat und ATP) sowie eine Zunahme von Phosphat, verursacht (KENTISH 1986).

Späte Azidose:

Trotz weiter bestehender Azidose kommt es nach wenigen Minuten zu einer Stabilisierung bzw. einem Wiederanstieg der Kalziumtransienten und der Kontraktionskraft (sog. Kalziumtransienten- bzw. Kontraktitätserhalt). Der Aufrechterhaltung ausreichender systolischer Kalziumtransienten bzw. deren Wiedezunahme beruht auf einem Anstieg des SR-Kalziumgehalts (HULME und ORCHARD 1998), wofür es mehrere Ursachen gibt. In Experimenten an Rattenmyozyten mit inhibiertem Na^+/H^+ -Austauscher konnten CHOI et al. (2000) zeigen, dass den Ryanodinrezeptoren eine entscheidende Bedeutung zukommt. Sie postulierten, dass infolge der durch die Azidose gehemmt Ryanodinrezeptoren die Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum sinkt, sodass der SR-Kalziumgehalt nach einigen Minuten der Azidose ansteigt. Dadurch komme es in der Folge zu einem Wiederanstieg der systolischen Kalziumtransienten.

Dass auch dem Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) eine wichtige Bedeutung zukommt, konnten u.a. BOUNTRA und VAUGHAN-JONES (1989) nachweisen. Sie beobachteten einen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration im Verlauf einer Azidose, den sie auf eine erhöhte Aktivität des NHE infolge der durch die Azidose erhöhten H^+ -Konzentration zurückführten. Der Anstieg der

intrazellulären Natriumkonzentration wiederum resultiert in einer veränderten Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX), mit der Folge, dass das intrazelluläre (= diastolische) Kalzium ansteigt. Dadurch gelangt mehr Kalzium ins Sarkoplasmatische Retikulum mit konsekutiv höheren systolischen Kalziumtransienten und Kontraktilität im Verlauf der Azidose. In den Experimenten von BOUNTRA und VAUGHAN-JONES (1989) konnte eine Inhibition des Na^+/H^+ -Austauschers mit Amilorid sogar den Kontraktilitätserhalt verhindern und verursachte eine weitere Abnahme der Kontraktionskraft, was die Bedeutung dieses Transporters für die Azidose unterstreicht.

Einige weitere Mechanismen führen ebenfalls zu einem Anstieg des diastolischen Kalziums und so über eine Erhöhung des SR-Kalziumgehalts zu stabilen bzw. steigenden Kalziumtransienten und Kontraktilität. Zu nennen sind insbesondere intrazelluläre Puffersysteme, bei denen Ca^{2+} - und H^+ -Ionen miteinander konkurrieren. Durch den Anstieg von H^+ -Ionen in der Azidose dissoziieren daher freie Kalziumionen ins Zytoplasma (ORCHARD und KENTISH 1990). Auch führt die bereits erwähnte direkte Hemmung der SERCA durch die Azidose zu einem Anstieg des diastolischen Kalziums (MANDEL et al. 1982). Ein ergänzender Mechanismus ist zudem die azidosebedingte Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase. In der Folge steigt die intrazelluläre Natriumkonzentration und damit über den NCX auch der Kalziumeinfluss in die Zelle (SPERELAKIS und LEE 1971).

Von den genannten Vorgängen kommt nach einem aktuellen Review von MATTIAZZI et al. (2007) dem NHE/NCX-Weg die wichtigste Bedeutung für die Erhöhung des diastolischen Kalziums zu. Die relative Bedeutung der anderen Vorgänge ist aber noch nicht abschließend geklärt.

Auch der Erholung der Kalziumsensitivität der Myofilamente durch eine zunehmende Normalisierung des intrazellulären pH-Werts bedingt durch den Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symporter kommt eine bislang unterschätzte Bedeutung für die Aufrechterhaltung einer adäquaten Kontraktilität in der späten Azidose zu (LEEM et al. 1999, VILA-PETROFF et al. 2010). Auch ORCHARD vermutete bereits 1987, dass diese für einen kleinen Teil der Kontraktilitätswiedererholung am Ende der Azidose zuständig sein könnte, bei dem die Amplitude der Kalziumtransienten nicht mehr weiter zunimmt. Auf neue Erkenntnisse zum NHE wird im Abschnitt 4.3 (S. 92) näher eingegangen.

1.5.1 Die Bedeutung der CaMKII für die Azidose

In den vergangenen Jahren ist ein weiterer bedeutender Mechanismus für die Wiedererholung während der Azidose in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. MUNDINA-WEILENMANN et al. (1996) fanden heraus, dass sich der Phosphorylierungszustand an Phospholamban, dem wichtigsten Regulator der SERCA, im Verlauf einer Azidose ändert. Letztgenannte Autoren sowie VITTONI et al. (1998) untersuchten das Zusammenspiel PKA- und

CaMKII-abhängiger PLB-Phosphorylierung auf der einen Seite und Dephosphorylierung durch Phosphatasen auf der anderen Seite genauer. Dabei mehrten sich die Hinweise auf eine Beteiligung der CaMKII an der PLB-Phosphorylierung im Verlauf einer Azidose. Aber erst KOMUKAI et al. (2001) konnten die essentielle Bedeutung der CaMKII für die Azidose nachweisen. In Inhibitionsversuchen an Rattenmyozyten konnten sie zeigen, dass eine CaMKII-Inhibition mit KN-93 den Anstieg des SR-Kalziumgehalts und der Kalziumtransienten im Verlauf einer Azidose verhindern kann.

Mittlerweile ist allgemein anerkannt, dass die CaMKII eine Schlüsselfunktion für die Aufrechterhaltung von Kalziumtransienten und Kontraktilität im Verlauf der Azidose einnimmt, indem sie verschiedene Strukturen des Kalziumstoffwechsels phosphoryliert und so in ihrer Aktivität beeinflusst. Aktiviert wird die CaMKII durch die azidosebedingte Hemmung von Phosphatasen, v.a. aber durch den Anstieg der diastolischen Kalziumkonzentration im Verlauf der Azidose, weshalb diese auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit besonders untersucht wird (MATTIAZZI et al. 2007).

Im Zentrum der CaMKII-Wirkung auf die Azidose scheint eine Phosphorylierung von PLB an Thr-17 zu stehen. MUNDINA-WEILENMANN et al. (2005) untersuchten als erste Arbeitsgruppe den zeitlichen Verlauf der PLB-Thr-17-Phosphorylierung während einer respiratorischen Azidose und beobachteten, dass diese zwischen 30 s und 3 min nach Beginn der Azidose erhöht ist. In zeitlichem Zusammenhang dazu beobachteten sie eine Wiederbeschleunigung der durch die Azidose verlangsamten SR-Kalziumaufnahme im Sinne einer schnelleren Relaxationsgeschwindigkeit. Diese führten sie auf eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung von PLB und die damit einhergehende Aktivierung der SERCA zurück. Weiterhin kam es zu einer raschen Wiedererholung von Kalziumtransienten und Kontraktilität. Wurde nun der CaMKII-Inhibitor KN-93 hinzugegeben, konnte die PLB-Phosphorylierung an Thr-17 bereits in niedriger Dosierung auf das Basalniveau reduziert werden, einhergehend mit einer ca. 50 % Reduktion der SERCA-Wiederbeschleunigung. Ein Effekt von KN-93 auf die Wiedererholung der Kontraktilität blieb allerdings zunächst aus. Erst eine höhere Dosierung von KN-93 konnte diese verhindern. Die Autoren schlossen daraus, dass neben PLB weitere CaMKII-abhängig regulierte Proteine, wie beispielsweise die Ryanodinrezeptoren, für die Wiedererholung der Kontraktilität verantwortlich sein könnten. Dass Phospholamban dennoch ein Schlüsselprotein für die azidotische Wiedererholung ist, konnten DESANTIAGO et al. (2004) eindrucksvoll an PLB-Knockout-Mäusen zeigen, bei denen eine Kontraktilitätswiedererholung vollständig ausblieb.

Neben PLB hat die CaMKII auch direkte Phosphorylierungsstellen am L-Typ-Kalziumkanal und den bereits angesprochenen Ryanodinrezeptoren (MATTIAZZI et al. 2007). Obwohl XU A und NARAYANAN (2000) eine direkte Wirkung der CaMKII auf die SERCA vermuteten, widerlegten einige andere Arbeitsgruppen (REDDY et al. 1996, VALVERDE et al. 2005) dies deutlich.

Zusammenfassend (siehe Abbildung 1.8) scheint die CaMKII-Aktivierung demnach unverzichtbar für die Aufrechterhaltung der Kontraktilität in der Azidose zu sein. Dabei kommt der CaMKII-abhängigen PLB-Thr-17-Phosphorylierung mit konsekutiv erhöhter SERCA-Aktivität eine zentrale Bedeutung zu. Da die SERCA der wichtigste Mechanismus der diastolischen Kalziumwiederaufnahme und Relaxation ist (siehe Abschnitt 1.1.3 d), resultieren zudem schnellere Relaxationsgeschwindigkeiten von Kalziumtransienten und Myozytenkontraktilität. Dieser Prozess wird im Folgenden als Wiedererholung der Relaxationszeiten bezeichnet. Für die Wiedererholung der Kontraktilität scheinen jedoch neben der SERCA noch weitere Mechanismen eine Rolle zu spielen (MATTIAZZI et al. 2007).

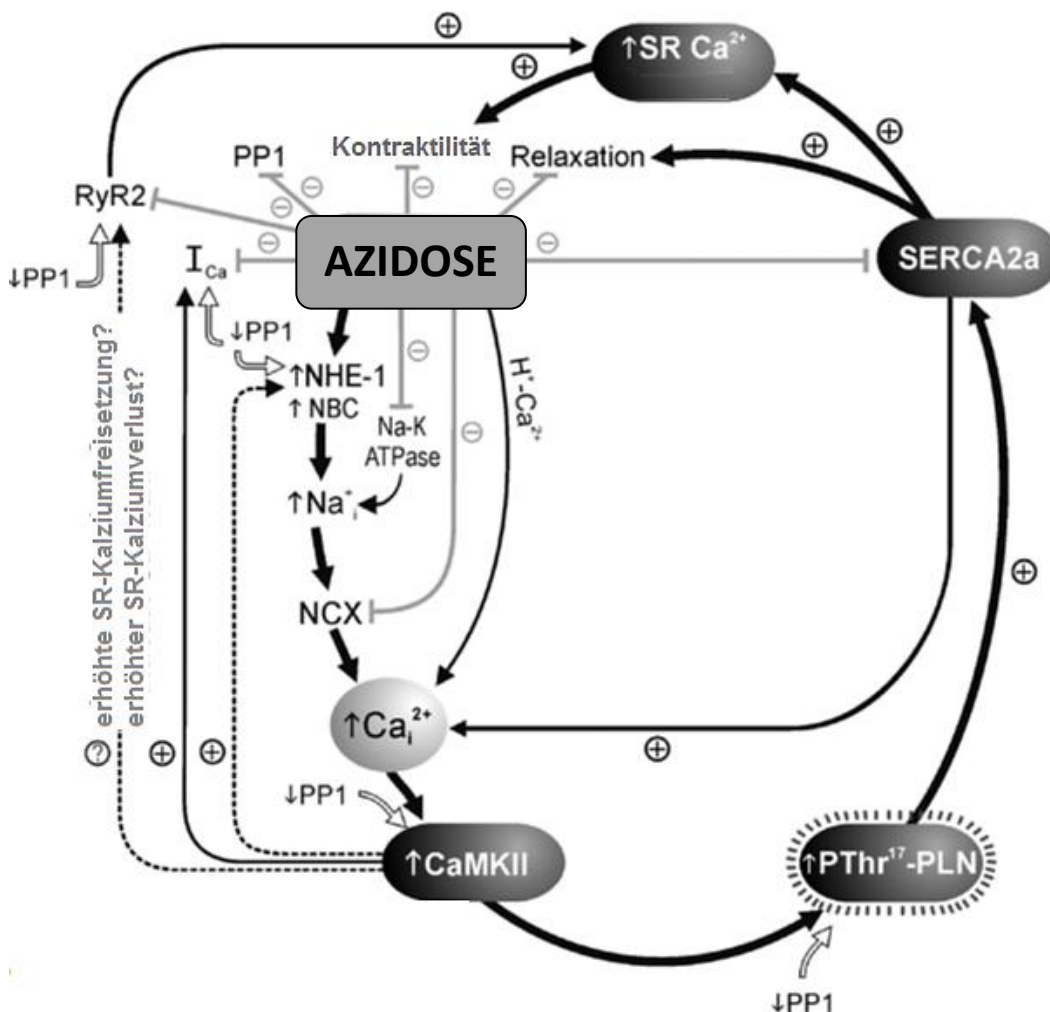


Abbildung 1.8 - Die Bedeutung der CaMKII für die spätazidotische Wiedererholung der Kontraktilität. Infolge einer Azidose kommt es zu weitreichenden Veränderungen im Kalziumstoffwechsel mit Abnahme der Kontraktilität, Inhibition der SERCA (mit konsekutiv verlangsamten Relaxationsgeschwindigkeiten von Kalziumtransienten und Myozytenverkürzung), RyR, Kalziumkanäle (I_{Ca}) und Na⁺/K⁺-ATPase. Gegenregulatorisch folgt eine vermehrte Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE-1). Die dadurch erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration führt über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) auch zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration, wodurch die CaMKII aktiviert wird. Zusammen mit der azidosebedingt reduzierten Aktivität der Phosphatase 1 (PP1) resultiert eine verstärkte Phosphorylierung des SERCA-Regulators Phospholamban an Thr-17 (PThr¹⁷-PLN). Dadurch kommt es zu einer verstärkten SERCA-Aktivität mit Wiederrücknahme des SR-Kalziumgehalts und somit der Kontraktilität. Zudem zeigen sich schnellere Relaxationsgeschwindigkeiten von Kalziumtransienten und Myozytenverkürzung. Schwarze Linien stellen stimulatorische, graue Linien inhibitorische Effekte dar; gestrichelte Linien sind noch nicht allgemein wissenschaftlich akzeptiert - modifiziert nach MATTIAZZI et al. 2007, S. 653

1.6 Überleitung zu den Versuchen

In den vergangenen Jahren wurde vielfach über eine therapeutische CaMKII-Inhibition zur Behandlung von kardialen Erkrankungen wie Hypertrophie oder Arrhythmien diskutiert (ANDERSON ME et al. 2011, CURRIE et al. 2011, SAG et al. 2009). Die möglichen negativen Folgen einer solchen Inhibition für andere pathophysiologische Vorgänge sind allerdings noch nicht hinreichend erforscht. So gibt es Hinweise darauf, dass die CaMKII bei einer Azidose, wie sie beispielsweise im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung auftritt, sogar eine bedeutende kardioprotektive Funktion einnimmt (SAG et al. 2007), indem sie die Kardiomyozyten bei der Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten unterstützt. Daher ist es von großer Bedeutung, die Rolle der CaMKII - und dabei insbesondere die Funktion der verschiedenen Isoformen - während einer Azidose näher zu untersuchen, wozu diese Doktorarbeit beitragen soll.

Hierzu wurde ein von BACKS et al. (2009) erstmalig beschriebenes, innovatives Mausmodell verwendet, bei dem die im Herzen am häufigsten exprimierte δ -Isoform der CaMKII auf genetischer Ebene inhibiert wurde (CaMKII δ -Knockout-Maus). Auf diese Weise lassen sich völlig neue Informationen über die Funktion der δ -Isoform der CaMKII bei einer Azidose gewinnen.

Die Fragestellungen lauten daher:

1. Wie verhalten sich CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen?
2. Kommt es bei Kardiomyozyten der CaMKII δ -Knockout-Maus zu einer veränderten Inzidenz der Wiedererholung von fraktioneller Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten in der späten Azidose im Vergleich zu Kontrollzellen?
3. Messung der Kontraktilität:
 - a) Zeigen CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten eine veränderte Aufrechterhaltung der Kontraktilität in der späten Azidose?
 - b) Finden sich bei CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten veränderte Relaxationszeiten der Myozytenverkürzung in der späten Azidose?
4. Messung der Kalziumtransienten mittels Fluo-3-AM:
 - a) Gelingt den CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten die Aufrechterhaltung der Kalziumtransienten in der Spätphase der Azidose?
 - b) Zeigt sich bei CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten in der späten Azidose eine veränderte Abfallskinetik der Kalziumtransienten als Hinweis auf eine veränderte SERCA-Aktivität?

5. Zeigt sich zwischen CaMKII δ -Knockout- und Kontrollzellen eine veränderte Kalziumbeladung des Sarkoplasmatischen Retikulums während der Azidose?
6. Gibt es Unterschiede im diastolischen Kalziumgehalt zwischen Kontrollzellen und Kardiomyozyten der CaMKII δ -KO-Maus unter der Azidose?
7. Wie verhalten sich Kardiomyozyten der CaMKII δ -KO- und der Kontrollmäuse im Verlauf der Azidose nach zusätzlicher pharmakologischer Inhibition aller CaMKII-Isoformen durch KN-93 im Vergleich zu Kardiomyozyten unter KN-92?

Um diese Fragestellungen zu beantworten, kamen die im folgenden Abschnitt erläuterten Methoden zur Anwendung.

2. Material und Methoden

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung der δ -Isoform der CaMKII für die Wiedererholung von Kalziumtransienten, Kontraktilität und Relaxationskinetik in der späten Azidose zu untersuchen. Dazu wurde ein von Johannes BACKS et al. (2009) nach dem Cre-LoxP-System entwickeltes, neuartiges Mausmodell eines herzspezifischen CaMKII δ -Knockouts verwendet. Bei diesem wurden zunächst die Exone 1 und 2, welche u.a. die für die katalytische Funktion der CaMKII δ essentielle ATP-Bindestelle enthalten, durch LoxP-Stellen beidseits flankiert. Durch Kreuzen mit CAG-Cre-transgenen Mäusen wurden diese DNA-Abschnitte nun mithilfe der Cre-Rekombinase aus dem Genom herausgeschnitten. In der Folge blieb die Transkription der Exone 1-4 aus, wie sich durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zeigen ließ, sodass funktionsunfähige CaMKII δ -Fragmente entstanden.

Die aus CaMKII δ -Knockout-Herzen isolierten Kardiomyozyten wurden einer metabolischen Azidose ausgesetzt und dabei simultan Kalziumtransienten und Myozytenverkürzung gemessen. Um das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) zu untersuchen, dem für die azidotische Wiedererholung eine bedeutende Rolle zukommen soll (HULME und ORCHARD 1998), wurde der SR-Kalziumgehalt im Verlauf der Azidose mithilfe von Koffein untersucht (KONG et al. 2008). Weiterhin wurden Messungen mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 und dem inaktiven Analogon KN-92 durchgeführt (SUMI et al. 1991, GAO et al. 2006), um die CaMKII-Abhängigkeit der Beobachtungen zu bestätigen. Sämtliche Messungen wurden mit Kontrollzellen aus in Bezug auf die CaMKII δ -Funktion intakten „Flox“-Mäusen verglichen, bei denen zwar die LoxP-Stellen ins Genom eingefügt worden waren, aber keine anschließende Deletion durch die Cre-Rekombinase erfolgte (BACKS et al. 2009). Zur optimalen Vergleichbarkeit wurden Geschwistertiere verwendet.

2.1 Isolation von murinen Kardiomyozyten und Vorbereitung zur Messung

Alle Tierexperimente wurden von der örtlichen Tierschutzkommission genehmigt (Tierversuchsanzeige „Funktionelle Untersuchungen an Herzmuskelzellen von Mäusen“ gemäß §4 TierSchG, Aktenzeichen T15.06, Laufzeit 29.08.2006 – 31.08.2008, Bezirksregierung Braunschweig, Prof. Dr. L. Maier) und gemäß dem „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ (1996) durchgeführt.

Die Mäuse wurden vor der Isolation mit einem Code versehen, der eine bezüglich des Genotyps verblindete Durchführung und Auswertung aller erhobenen Daten ermöglichte.

Die Isolation erfolgte sowohl bei CaMKII δ -Knockout- als auch bei Kontrollmäusen (Flox) im Alter von 14 ± 2 Wochen mithilfe einer modifizierten Perfusionsanlage nach LANGENDORFF (siehe Abbildung

2.1); die ursprüngliche Publikation von 1895 beschrieb die damals bahnbrechende Beobachtung, dass explantierte Herzen nach Reperfusion der Koronararterien erneut zu schlagen begannen. Für die Isolation ist aber vor allem die Tatsache von Bedeutung, dass das Herz retrograd durch die Aorta perfundiert werden und so mithilfe von Enzymen in einzelne Kardiomyozyten zersetzt werden kann.

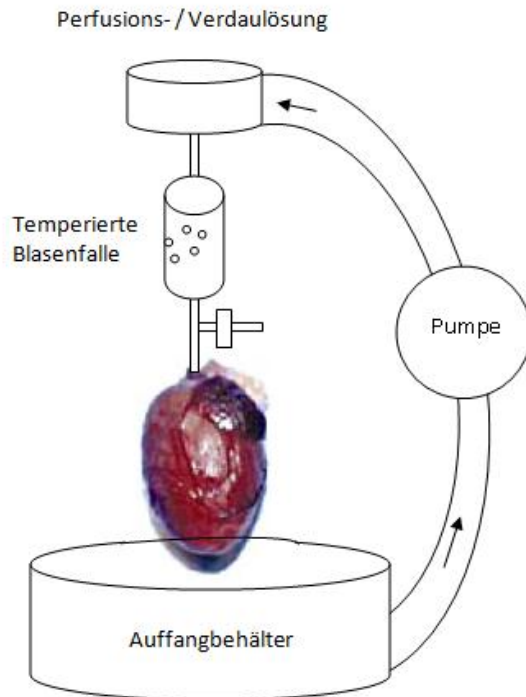


Abbildung 2.1 - Schematische Darstellung der Isolationsanlage nach LANGENDORFF (1895). Über eine Blasenfalle wird die Perfusions- bzw. Verdaulösung angewärmt und perfundiert dann retrograd durch die abgesetzte Aorta das Herz

Zunächst wurden die Mäuse in einer Gaskammer mit Halothan (800 μ l, Eurime-Pharm Arzneimittel GmbH) betäubt. Das regungs- und reflexlose Tier wurde nun mit einem Genickbruch schmerzfrei getötet und der Thorax mit einer Präparierschere eröffnet. Anschließend wurde das Herz an Aorta und Vena cava abgesetzt und nach Ausdrücken des restlichen Blutes in eine eisgekühlte Petrischale überführt. Hier wurde die Aorta unter einem Binokular retrograd kanüliert. Zur Befestigung der Aorta an der Kanüle dienten ein Polyesterfaden sowie eine Klemme. Der korrekte Sitz der Kanüle wurde mittels Durchspülung mit 37 °C warmer Perfusionslösung (siehe Tabelle 2.1) überprüft. Als Zeichen für eine korrekte Kanülierung galt eine milchglasartige Verfärbung der Koronararterien. Nun wurde das Herz an die Langendorff-Anlage angeschlossen und 4 min retrograd mit der warmen Perfusionslösung durchspült. Anschließend erfolgte die Perfusion mit Liberase I enthaltender Verdaulösung (siehe Tabelle 2.1). Einen suffizienten Verdau erkannte man an einer milchglasartigen Verfärbung der gesamten Herzstruktur durch Auflösung der die Kardiomyozyten umgebenden Bindegewebsstrukturen. Nach ca. 5 min Verdau wurden die Vorhöfe des Herzens abgetrennt und die

Ventrikel in ein vorgewärmtes und weiterhin Verdaulösung (siehe Tabelle 2.1) enthaltendes Becherglas gegeben. Hier wurden sie erst grob, später gründlich mit einer Schere zerkleinert und anschließend gefiltert (Nylongaze, Porendurchmesser von 200 µm) in ein Falconröhrchen überführt. Die Hinzugabe von Stopplösung 1 (siehe Tabelle 2.1) beendete den Verdau.

Lösung	Substanz	Konzentration / Menge	Durchführung
Perfusionslösung	NaCl	113 mmol/l	- gelöst in doppelt destilliertem H ₂ O bei pH 7,46 (37 °C) - bei + 4 °C aufbewahren
	KCl	4,7 mmol/l	
	KH ₂ PO ₄	0,6 mmol/l	
	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	0,6 mmol/l	
	MgSO ₄ •7H ₂ O	1,2 mmol/l	
	Phenolrot	0,032 mmol/l	
	NaHCO ₃	12 mmol/l	
	KHCO ₃	10 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
	Taurin	30 mmol/l	
	BDM (2,3-butandion- monoxim)	10 mmol/l	
	Glucose	5,5 mmol/l	

Verdaulösung	Perfusionslösung	20 ml	- auf 37 °C erwärmen
	Liberase Blendzyme 1	5 mg	
	Trypsin	111,2 µl	
	10 mM CaCl ₂	25 µl	

Stopplösung 1	Perfusionslösung	2,25 ml	- auf 37 °C erwärmen
	Bovines Kälberserum (BCS, 5%)	0,25 ml	
	10 mM CaCl ₂	3,125 µl	

Stopplösung 2 (für den Kalziumaufbau)	Perfusionslösung	28,5 ml	
	Bovines Kälberserum (BCS, 5%)	1,5 ml	

Kalziumaufbau	0,1 mM Ca ²⁺	5 µl CaCl ₂ (100 mM) in 5 ml Stopplösung 2
	0,2 mM Ca ²⁺	10 µl CaCl ₂ (100 mM) in 5 ml Stopplösung 2
	0,4 mM Ca ²⁺	40 µl CaCl ₂ (100 mM) in 10 ml Stopplösung 2
	0,8 mM Ca ²⁺	80 µl CaCl ₂ (100 mM) in 10 ml Stopplösung 2

Tabelle 2.1 - verwendete Lösungen für die Kardiomyozytenisolation und den Kalziumaufbau (nach SAG et al. 2009)

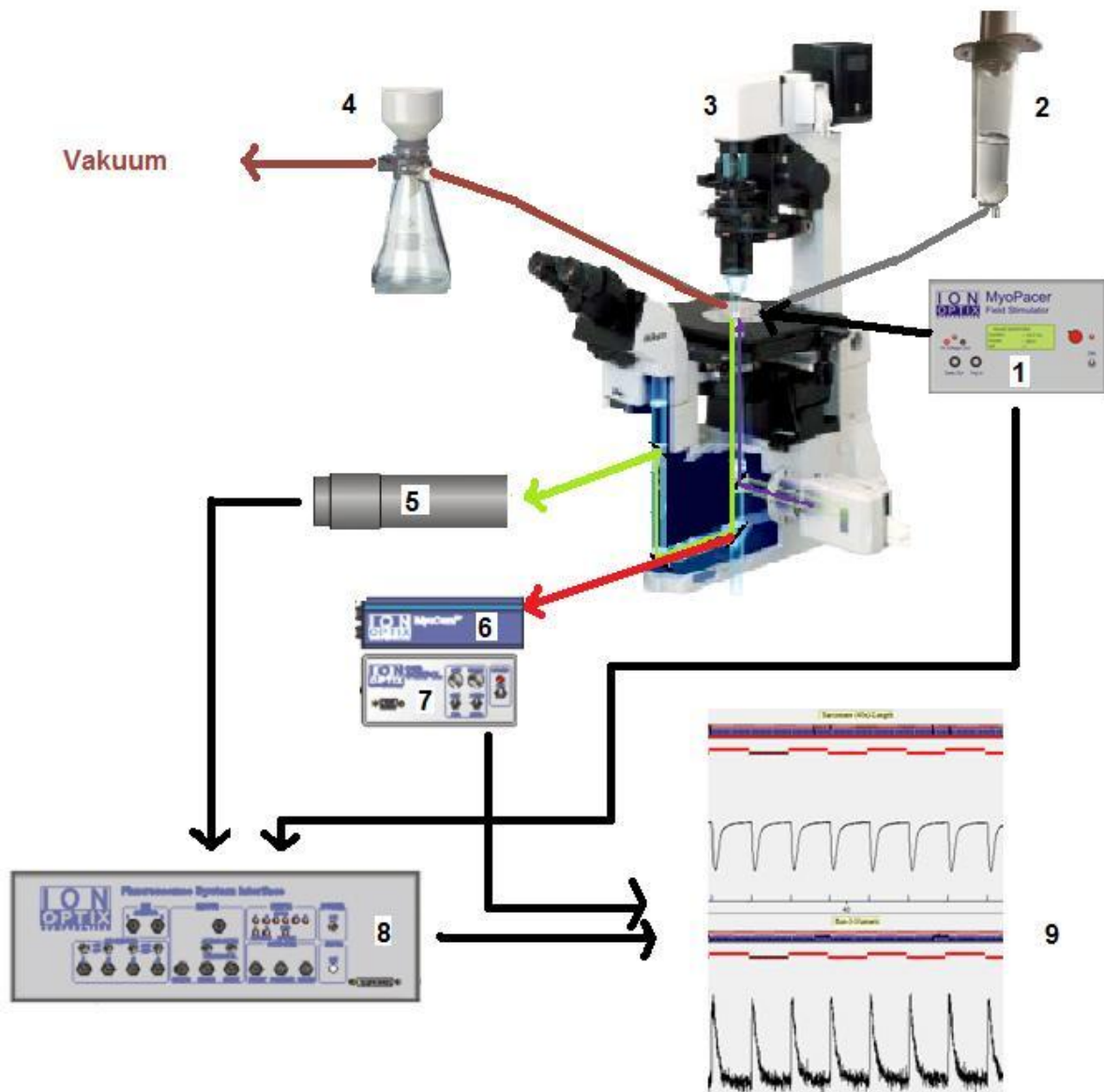
Vorbereitung der Messungen:

Um die Zellen langsam an die Messbedingungen mit 1 mM Kalziumkonzentration zu gewöhnen, wurde ein Kalziumaufbau durchgeführt. Nach jeweils 7 min Ruhezeit wurde der Überstand entfernt und das Zellsediment mit Lösungen eines ansteigenden Kalziumgehalts (0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM) versetzt, die zusätzlich zunächst 5 ml, später 10 ml Stopplösung 2 enthielten (siehe Tabelle 2.1).

Nun wurden je nach Zelldichte ca. 400 µl der kardiomyozytenhaltigen Lösung auf zuvor mit 1,4 µl Laminin bestrichene Messkammern gegeben. Das Laminin (Gibco, Grand Island, New York, USA) ermöglichte eine bessere Anhaftung der Kardiomyozyten an der Messkammeroberfläche.

2.2 Epifluoreszenzmikroskopie und Myozytenkamera

Um simultan die Veränderungen der Myozytenverkürzung und der Kalziumkonzentration darzustellen und im zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Myozytenkamera in Kombination mit der Epifluoreszenzmikroskopie verwendet. Abbildung 2.2 zeigt schematisch den Versuchsaufbau.



1)	Myozytenstimulator (MyoPacer, IonOptix)	6)	Myozytenkamera (MyoCam, IonOptix)
2)	Zulauf + Heizung	7)	MyoCam Controller
3)	Invertiertes Mikroskop (Nikon Eclipse TE 2000-U)	8)	Fluoreszenz-System Interface
4)	Absaugung mithilfe einer Vakuumsaugflasche	9)	Computer mit Aufzeichnungssoftware (IonWizard Acquire) und Auswertungssoftware (IonWizard Analyse)
5)	Photomultiplier		

Abbildung 2.2 - schematische Darstellung des Epifluoreszenz-Setups. Auf dem Objektträger des Mikroskops (Nikon Eclipse TE 2000-U) wurden Zellkammern mit zuvor eingefärbten Kardiomyozyten eingespannt und mithilfe eines Myozytenstimulators (1 Hz) stimuliert. Währenddessen wurden sie von einer vorgeheizten Superfusionslösung (37 °C) durchspült, die auf der anderen Seite durch eine Vakuumsaugflasche abgesaugt wurde. Gemäß dem Versuchsprotokoll wurden die Zellen nach Erreichen von konstanten Bedingungen unter normazider Lösung für ca. 10 min mit einer Azidoselösung perfundiert. Anschließend wurde diese mit normazider Lösung wieder ausgewaschen. Während des Versuchs wurde die Myozytenverkürzung kontinuierlich mithilfe einer an einen Controller angeschlossenen Myozytenkamera aufgezeichnet und auf einen mit Aufzeichnungssoftware (IonWizard Acquire) ausgestatteten Computer übertragen. Die Kalziumtransienten wurden mithilfe von je nach verwendetem Farbstoff unterschiedlich konfigurierten Fluoreszenz-Setups gemessen (Fluo-3-AM / Fura-2-AM: siehe Abbildung 2.4 / Abbildung 2.6). Die entstehende Fluoreszenzstrahlung wurde nach Verstärkung durch die Photomultiplier durch ein Fluoreszenz-System Interface in maschinenlesbare Daten umgewandelt und durch die Aufzeichnungssoftware graphisch dargestellt - Abbildung erstellt mithilfe von www.ionoptix.com, www.nikon-instruments.jp, www.phywe.de, IonWizard 5.0

Im Zentrum des Versuchsaufbaus stand ein invertiertes Lichtmikroskop (Nikon Eclipse TE 2000-U), welches die untersuchten Kardiomyozyten und deren Myofilamentstruktur für das menschliche Auge sichtbar machte.

Um gleichzeitig die Kalziumkonzentrationsänderungen messen zu können, wurde der Versuchsaufbau um das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie erweitert. Dieses beruht auf der Tatsache, dass einige Moleküle Lichtenergie absorbieren können und dadurch in einen angeregten Zustand gebracht werden. Wenn sie anschließend wieder in den Ruhezustand zurückkehren, wird ein Teil der zuvor absorbierten Energie als Fluoreszenzstrahlung frei. Dabei ist die Energie der emittierten Photonen immer geringer als die der zuvor anregenden Photonen, sodass die Fluoreszenzstrahlung langwelliger wird. Diese Verschiebung der Wellenlänge bezeichnet man als Stokes-Verschiebung (ROST 1992). Jeder Farbstoff hat ein charakteristisches Spektrum von Anregungs- und Emissionsfrequenzen. Die Erkenntnis, dass diese Spektren in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen variieren, ist dafür verantwortlich, dass Fluoreszenzfarbstoffe als Sensor für die Konzentration bestimmter Ionen in einer Lösung verwendet werden können. Man unterscheidet zwei Arten von Farbstoffen, die beide im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden: nicht-ratiometrische und ratiometrische Farbstoffe. Nicht-ratiometrische Farbstoffe emittieren in Abhängigkeit von der Konzentration ihres Substrats eine unterschiedliche Menge an Fluoreszenzstrahlung. Bei ratiometrischen Farbstoffen ändert sich nicht die Emissionsstärke, sondern die Wellenlänge des emittierten und / oder absorbierten Lichts in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (ISLAM 2012).

Weiterhin lassen sich Farbstoffe danach unterscheiden, in welchem Konzentrationsbereich sie zum Messen eines bestimmten Ions geeignet sind. Ausschlaggebend ist die sogenannte Dissoziationskonstante K_d eines Farbstoffs. Sie ist ein Maß für die Gleichgewichtsreaktion zwischen dem Farbstoff und dem von ihm messbaren Ion. Der messbare Konzentrationsbereich liegt in etwa zwischen $0,1 \times K_d$ und $10 \times K_d$, sodass man in Abhängigkeit von den erwarteten Konzentrationsänderungen einen geeigneten Farbstoff auswählen muss. Für die im Rahmen der Herzaktion zu erwartenden Kalziumkonzentrationsänderungen eigneten sich insbesondere die Farbstoffe Fluo-3-AM und Fura-2-AM, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen. So hat Fura-2-AM eine K_d von $0,135 - 0,258 \mu\text{M}$ (ISLAM 2012) und Fluo-3-AM von $0,39 \mu\text{M}$ (JOHNSON und SPENCE 2010).

2.2.1 Messung der Myozytenverkürzung

Mithilfe einer Myozytenkamera (Myocam, IonOptix), die an das Epifluoreszenzmikroskop angeschlossen wurde (siehe Abbildung 2.2), sowie der dazugehörigen Software (IonWizard Acquire Version 4.4, IonOptix) konnte die Myozytenverkürzung am Computer-Monitor sichtbar gemacht und aufgezeichnet werden. Dazu ermittelte das Computerprogramm die über viele Myofilamente gemittelte, durchschnittliche Sarkomerlänge im Zeitverlauf. Da das volle Lichtspektrum einer weißen Lampe den Fluoreszenzfarbstoff angeregt hätte, diente Rotlicht mit einer Wellenlänge von > 650 nm zur Durchleuchtung der Zellen.

Nach Abschluss der Aufzeichnungen wurden diese an einem separaten Computer mithilfe der Auswertesoftware IonWizard Analyse (Version 5.0) bezüglich der fraktionellen Myozytenverkürzung (in Prozent der Ruhezelllänge = % RZL) und des Relaxationsverhaltens (Relaxationszeit, nach der 90 % der diastolischen Sarkomerlänge wieder erreicht wird = RT_{90}) ausgewertet.

2.2.2 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

a) Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mit dem Fluoreszenzindikator Fluo-3-AM

Der 1989 von MINTA und TSIEN et al. entwickelte Farbstoff Fluo-3 eignet sich hervorragend zur Messung von Kalziumkonzentrationen. Fluo-3 kann durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt werden und emittiert bei der Rückkehr auf sein Ursprungsniveau energieärmeres Licht mit Wellenlängen von 535 ± 20 nm. Durch Bindung von Kalzium an den Farbstoff ändert dieser seine chemischen Eigenschaften und kann vermehrt Photonen absorbieren und anschließend Fluoreszenzstrahlung emittieren. Die Menge an emittierten Photonen kann so auf mehr als das Hundertfache ansteigen (MINTA et al. 1989). Diese Eigenschaft kann dazu genutzt werden, um mit Hilfe von Fluoreszenzkurven (siehe Abbildung 2.3) Aussagen über die Kalziumkonzentration zu treffen.

Da Fluo-3 ein sehr gutes Verhältnis von Signal- zu Hintergrundrauschen aufweist, eignet es sich sehr gut für niedrige Kalziumtransienten, wie sie bei der in dieser Arbeit untersuchten Azidose auftreten. Zudem ändert sich die Dissoziationskonstante unter einer Azidose nur gering, sodass valide Ergebnisse gemessen werden können (KENTISH und XIANG 1997).

Da Fluo-3 normalerweise nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu perfundieren, in dieser Arbeit allerdings die intrazelluläre Kalziumkonzentration gemessen werden soll, wurde Fluo-3-AM (Molecular Probes) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Veresterung des Farbstoffs mit Azetoxymethanol. Dadurch wird das Molekül lipophil genug, um die Zellmembran zu perfundieren.

Im Zytoplasma wird es dann durch intrazelluläre Esterasen wieder in den aktiven Farbstoff und einen Azetoxymethanol-Rest gespalten und verbleibt im Zytoplasma als nicht-permeabler Farbstoff.

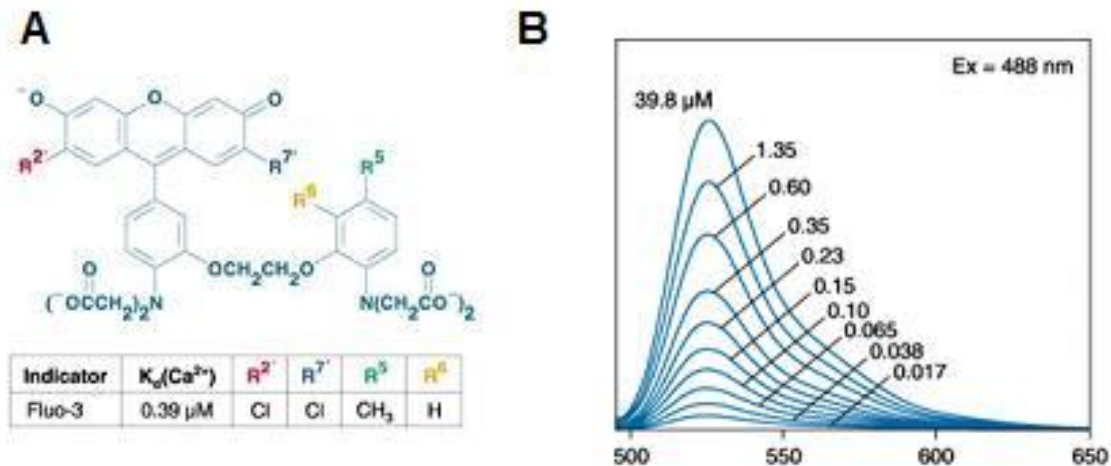


Abbildung 2.3 - (A) Strukturformel von Fluo-3; (B) Darstellung des Emissionsspektrums in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration. Auf der Abszisse ist die Wellenlänge, auf der Ordinate die Intensität der Emission dargestellt; die Anregungsfrequenz liegt unabhängig von der Kalziumkonzentration bei 488 nm – nach JOHNSON und SPENCE (2010), Abschnitt 19.3

Das Fluo-3-Setup:

Um die Kalziumkonzentration mithilfe von Fluo-3-AM bestimmen zu können, musste das in Abbildung 2.2 gezeigte Epifluoreszenz-Setup mithilfe von Filtern und Spiegeln so modifiziert werden, dass der im Folgenden beschriebene Strahlengang (siehe Abbildung 2.4) entstand: Mittels einer UV-Lampe (Xenon Short Arc Lamp, Typ UXL-75XE, Ushio Inc., Japan) und einem vorgeschalteten Filter ($D480 \pm 15 \text{ nm}$) wurde Licht im Anregungsbereich von Fluo-3 erzeugt und mit einem dichroitischen Spiegel ($D505\text{DC long pass}$) zur Messkammer reflektiert. Dieser Spiegel hat die Eigenschaft, dass er Licht mit einer Wellenlänge unter 505 nm reflektiert, Licht mit einer höheren Wellenlänge dagegen passieren lässt. Auf diese Weise wurde das durch die Fluo-3-Anregung kalziumkonzentrationsabhängig emittierte Licht der Wellenlänge $535 \pm 20 \text{ nm}$ ungehindert durchgelassen und mittels weiterer Spiegel und einem dichroitischen Spiegel für 685 nm zu den Photomultipliern geleitet. Diesen war ein Filter für $535 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ vorgeschaltet, um sicherzustellen, dass nur das Fluo-3-Emissionslicht zu den Photomultipliern gelangte. Die Photomultiplier verstärkten die Fluoreszenzstrahlung, um sie messbar zu machen und ermöglichten so eine Darstellung der Kalziumtransienten am Computerbildschirm.

Das zur Messung der Myozytenverkürzung verwendete Rotlicht mit einer Wellenlänge $> 650 \text{ nm}$ konnte Fluo-3 nicht anregen und wurde dank seiner anderen Welleneigenschaften von den dichroitischen Spiegeln und konventionellen Spiegeln zur Myozytenkamera geleitet.

Fluo-3-Setup

1. UV-Lampe
2. Filter D480±15 nm
3. Dichroitischer Spiegel
D505DC long pass
4. Kardiomyozyten in
Messkammer
5. Rotlichtlampe mit Filter
595 nm long pass
6. Spiegel
7. Dichroitischer Spiegel
D685DC long pass
8. Spiegel
9. Filter D535±20 nm
10. Photomultiplier
11. Myozytenkamera

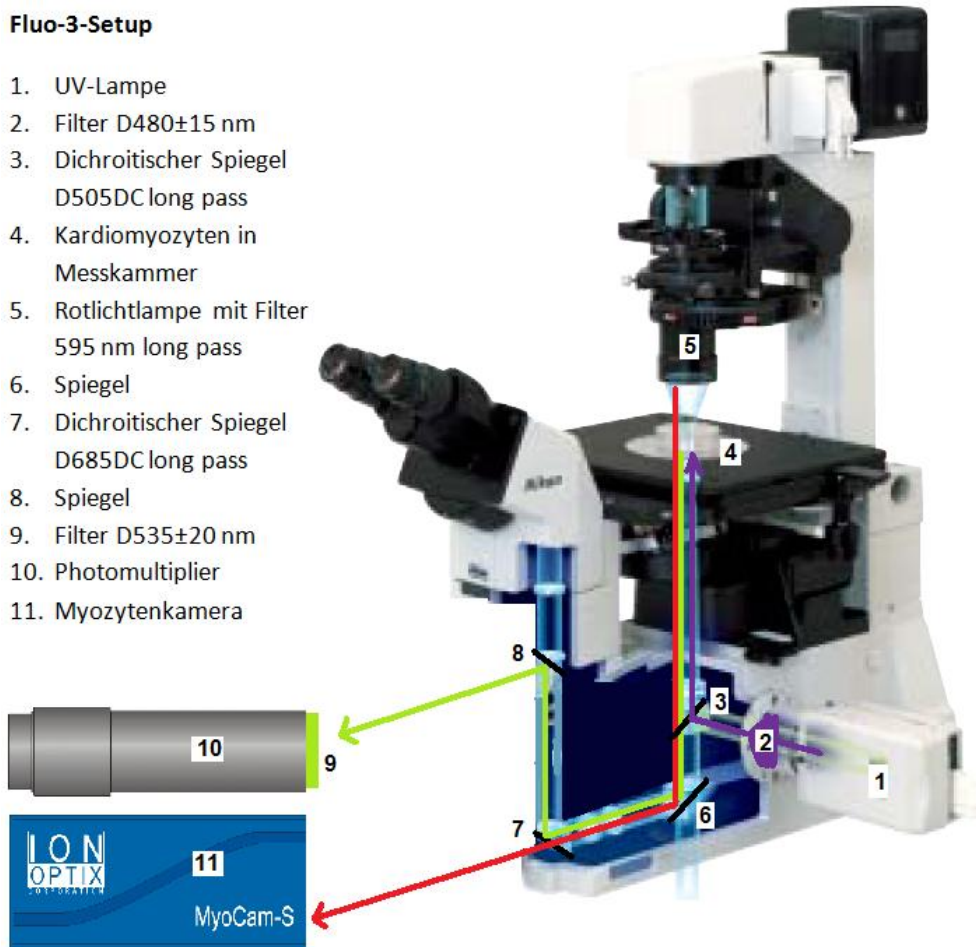


Abbildung 2.4 - Fluo-3-Setup. Eine UV-Lampe mit vorgeschaltetem Filter erzeugt Licht im Bereich der Anregungsfrequenz von Fluo-3. Dieses wird über einen dichroitischen Spiegel zu den Kardiomyozyten geleitet. Das in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration entstehende längerwellige Licht passiert den genannten dichroitischen Spiegel und wird mittels eines weiteren dichroitischen Spiegels vom Durchleuchtungslicht der Myozytenkamera getrennt. Nach Zwischenschaltung eines Filters wird die Fluoreszenzintensität durch die Photomultiplier gemessen - Abbildung erstellt mithilfe von www.ionoptix.com, www.nikon-instruments.jp

Herstellung der Fluo-3-AM-Farbstofflösung:

Der Farbstoff wurde gemäß Tabelle 2.2 zur Messung vorbereitet. Dazu wurde zunächst eine 1 mM Vorratslösung angelegt, die aus Fluo-3-AM und dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) bestand. Die Vorratslösung wurde lichtgeschützt verpackt und bei -20 °C eingefroren. Die eigentliche Farbstofflösung wurde erst vor Versuchsbeginn hergestellt, indem der gelöste Farbstoff mit Messtyrode (zur Herstellung siehe Tabelle 2.4) und Pluronsäure auf eine Konzentration von 10 µmol / l verdünnt wurde. Pluronsäure diente zudem der gleichmäßigeren Verteilung des Farbstoffs in der Lösung und somit der besseren Aufnahme in die Zellen. Bis zur Verwendung wurde die Farbstofflösung bei -20 °C gelagert.

Lösung	Substanz	Durchführung
Fluo-3-AM Vorratslösung (1 mM)	Fluo-3-AM	1 mg Fluo-3-AM (1129,86 g/mol) in 885 µl DMSO lösen und bei -20°C lagern
	DMSO (Fluka 41640)	
Fluo-3-AM Farbstofflösung (10 µM)	Fluo-3-AM Vorratslösung (1 mM)	100 µl der Fluo-3-AM Lösung und 10 µl Pluronsäure in 10 ml Messtyrode lösen und bei -20°C lagern
	Pluronsäure (200 mg/ml)	
	Messtyrode	

Tabelle 2.2 - Herstellung der Fluo-3-AM-Vorrats- und -Messfarbstofflösung. DMSO = Dimethylsulfoxid. Zur Herstellung der Messtyrode siehe Tabelle 2.4 – Konzentrationen gemäß SAG et al. 2007

b) Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2-AM

Wie Fluo-3 wurde auch Fura-2 zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration verwendet. Als ratiometrischer Farbstoff weist er allerdings einige Unterschiede im Vergleich zu Fluo-3 auf. So liegt das Maximum seiner Emissionsstrahlung immer im Bereich von 510 nm, das Maximum der Anregungsfrequenz verschiebt sich dagegen in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration. Während sich Fura-2 in Abwesenheit von Kalzium am besten durch Licht der Wellenlänge 360 nm anregen lässt, verschiebt eine hohe Kalziumkonzentration das Immissionsmaximum in Richtung 340 nm. Diese Eigenschaft wird als Spektralverschiebung bezeichnet und ist charakteristisch für ratiometrische Farbstoffe. Um die Kalziumkonzentration mithilfe von Fura-2 zu bestimmen, regt man den Farbstoff abwechselnd mit 340 nm und 380 nm an und ermittelt dann das Verhältnis der jeweiligen Emissionen zueinander (ISLAM 2012). Der Vorteil von Fura-2 gegenüber Fluo-2 liegt darin, dass es aufgrund des

Verhältnismäßig deutlich unempfindlicher gegenüber Ausbleichen, ungleichmäßiger Farbstoffbeladung und ungleichen Zelldicken ist. So kann man mit Fura-2 im Idealfall länger als 1 h ohne nennenswertes Ausbleichen messen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde Fura-2 in den Experimenten mit KN92/93 (siehe Abschnitt 2.5; S. 44) verwendet, da in diesen Experimenten längere Fluoreszenzmessungen (alle 2 min für ca. 1 min) durchgeführt wurden. Fluo-3 hätte bei diesem Protokoll eine stärkere Ausbleichung und deshalb weniger valide Werte ermittelt. Der Nachteil sind allerdings niedrigere und deshalb schlechter auswertbare Kalziumtransienten unter Fura-2.

Auch Fura-2 ist normalerweise impermeabel für die Zellmembran, sodass das mit Azetoxymethanol veresterte Fura-2-AM verwendet wurde.

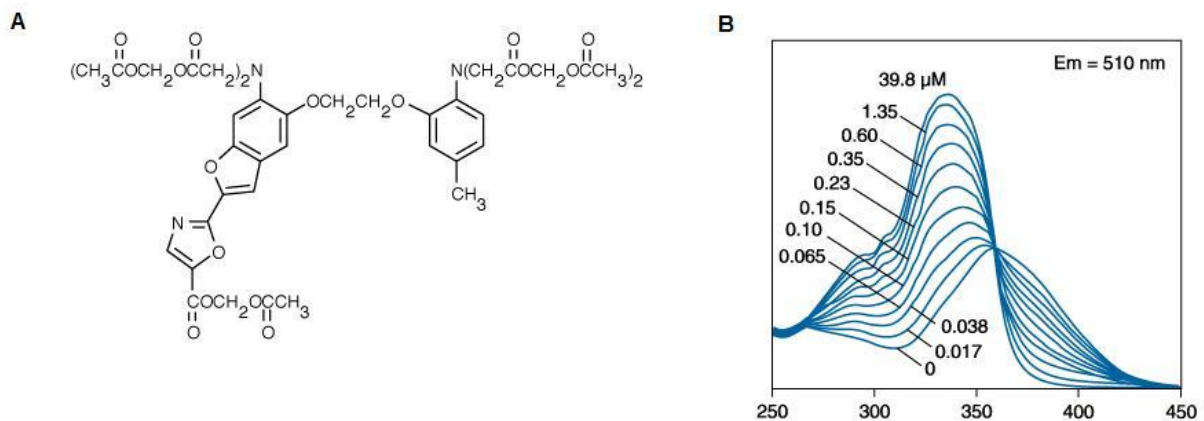


Abbildung 2.5 - (A) Strukturformel von Fura-2-AM; (B) Darstellung des Immissionspektrums von Fura-3 in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration (in µM). Auf der Abszisse ist die Anregungswellenlänge in nm dargestellt, auf der Ordinate die Fluoreszenzintensität; die Emissionsfrequenz liegt unabhängig von der Kalziumkonzentration bei 510 nm - nach JOHNSON und SPENCE (2010), Abschnitt 19.2

Das Fura-2-Setup:

Aufgrund des unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsspektrums wurde für die Messungen mit Fura-2 ein anderes Epifluoreszenz-Setup verwendet als bei Fluo-3. Rotierende Spiegel in Kombination mit Filtern (siehe Abbildung 2.6) dienten dazu, abwechselnd Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm aus dem Spektrum einer konventionellen UV-Lampe (Xenon Short Arc Lamp, Typ UXL-75XE, Ushio Inc., Japan) herauszufiltern. Dieses Licht wurde mithilfe eines dichroitischen Spiegels für 400 nm zum Objektträger reflektiert, um dort die Fura-2-Moleküle anzuregen, Fluoreszenzlicht im Bereich von 510 nm zu emittieren. Dieses konnte aufgrund der höheren Wellenlänge den genannten dichroitischen Spiegel ungehindert passieren und wurde dann über herkömmliche Spiegel und einen weiteren dichroitischen Spiegel für 685 nm zu den Photomultipliern geleitet. In Abhängigkeit von der

Kalziumkonzentration entstanden so zwei voneinander unabhängige Transienten (für 340 nm bzw. 380 nm), aus deren Verhältnis sich Aussagen über die Kalziumkonzentration treffen ließen.

Das zur Messung der Myozytenverkürzung verwendete Rotlicht mit einer Wellenlänge > 650 nm wurde durch die dichroitischen Spiegel und herkömmlichen Spiegel zur Myozytenkamera geleitet, ohne die Kardiomyozyten hinsichtlich der Fluoreszenzstrahlung zu beeinflussen.

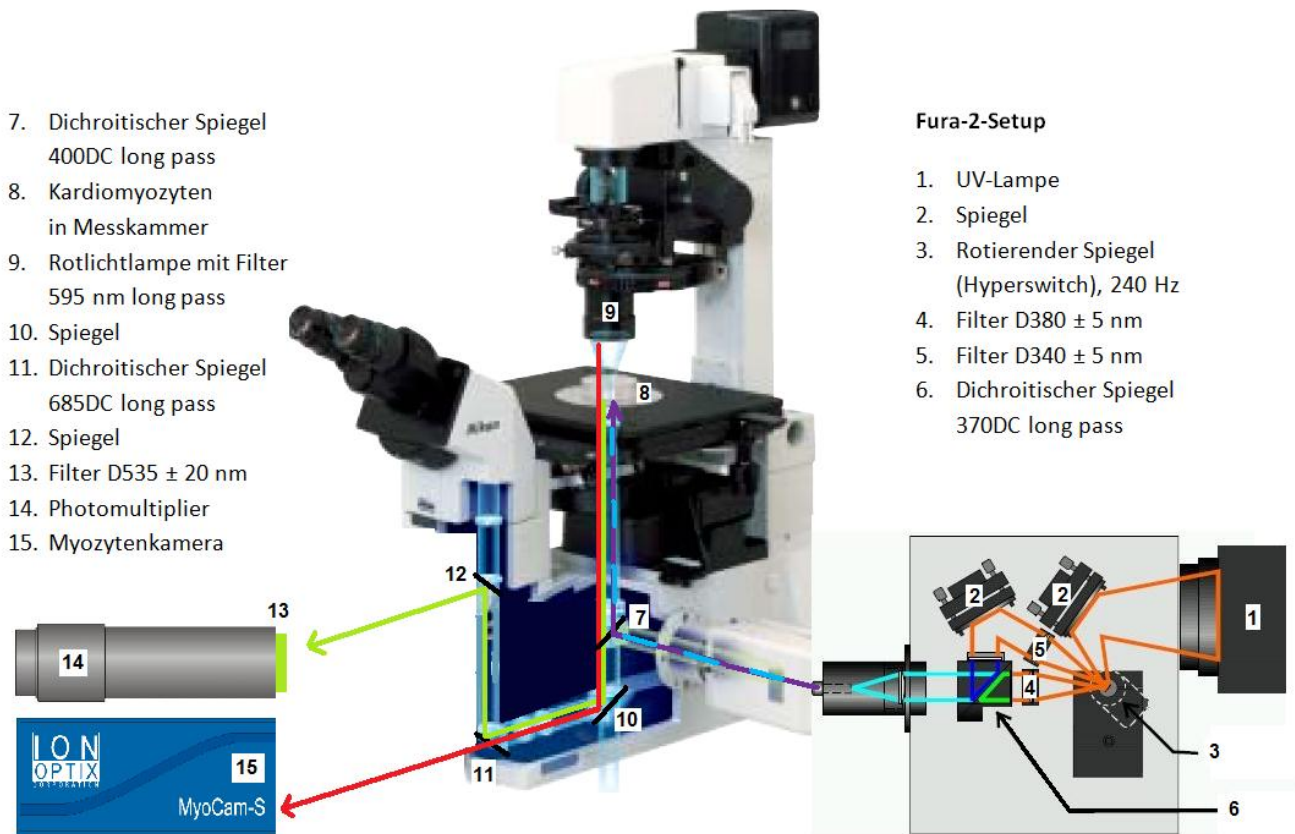


Abbildung 2.6 - Fura-2-Setup - eine UV-Lampe erzeugt mithilfe eines rotierenden Spiegels und Filtern Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm. Bei niedriger Kalziumkonzentration kommt es vor allem bei Anregung durch 380 nm zu einer Fluoreszenzemission im Bereich von 510 nm, bei hoher Kalziumkonzentration dagegen vermehrt bei Anregung durch UV-Licht der Wellenlänge 340 nm. Das Emissionslicht wird über dichroitische Spiegel und konventionelle Spiegel zum Photomultiplier geleitet und dort verstärkt. Am Ende können aus dem Verhältnis der beiden Transienten die Kalziumkonzentrationen im Zeitverlauf bestimmt werden - modifiziert nach www.ionoptix.com, www.nikon-instruments.jp

Herstellung der Fura-2-AM-Farbstofflösung:

Die Herstellung von Fura-2-AM-Farbstofflösung erfolgte analog zu der von Fluo-3-AM. Zunächst wurde eine 0,5 mM Vorratslösung angelegt, die aus Fura-2-AM und Dimethylsulfoxid (DMSO) besteht. Die Vorratslösung wurde lichtgeschützt verpackt und bei -20 °C eingefroren. Zur Herstellung der eigentlichen Farbstofflösung wurde der gelöste Farbstoff vor Versuchsbeginn mit Messtyrode (zur Herstellung siehe Tabelle 2.4) und Pluronsäure auf eine Konzentration von 5 µmol / l verdünnt. Auch bei Fura-2-AM unterstützte Pluronsäure die Aufnahme des Farbstoffs in die Zellen. Bis zur Verwendung wurde die Farbstofflösung bei -20 °C gelagert.

Lösung	Substanz	Durchführung
Fura-2-AM Vorratslösung (0,5 mM)	Fura-2-AM	1 mg Fura-2-AM (1001,86 g/mol) in 1996,29 µl DMSO lösen und bei -20°C lagern
	DMSO (Fluka 41640)	
Fura-2-AM Farbstofflösung (5 µM)	Fura-2-AM Vorratslösung (1 mM)	100 µl der Fura-2-AM Lösung und 10 µl Pluronsäure in 10 ml Messtyrode lösen und bei -20°C lagern
	Pluronsäure (200 mg/ml)	
	Messtyrode	

Tabelle 2.3 - Herstellung der Fura-2-AM-Vorrats- und -Messfarbstofflösung. DMSO = Dimethylsulfoxid. Zur Herstellung der Messtyrode siehe Tabelle 2.4. Konzentrationen nach HULME und ORCHARD (1998)

2.3 Untersuchung der Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten der CaMKII δ -Knockout-Maus unter Azidose

Um die Bedeutung der δ -Isoform der CaMKII für die Azidose und dabei insbesondere für das Verhalten von Kalziumtransienten, Kontraktilität und Relaxationskinetik zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten von 12 CaMKII δ -Knockout-Mäusen während einer 10-minütigen metabolischen Azidose mit Kardiomyozyten aus 13 Flox-Kontrollmäusen (siehe Abschnitt 2; S. 29) verglichen.

Dazu wurden die isolierten und auf Zellkammern fixierten Kardiomyozyten (siehe Abschnitt 2.1; S. 29) zunächst mit raumtemperierter Fluo-3-AM-Lösung angefärbt. Der nicht fixierte Zellüberstand wurde hierzu mit einer Pipette abgenommen und die am Boden der Messkammer fixierten Kardiomyozyten mit 200 µl Farbstoff (zur Herstellung siehe Abschnitt 2.2.2; S. 35) beladen. Nach 15 min Inkubationszeit in einem abgedunkelten Raum wurde die Messkammer in eine speziell konstruierte Halterung auf dem Objektträger des Epifluoreszenzmikroskops eingesetzt (siehe Abbildung 2.2) und mit einer normaziden Lösung (Normaltyrode, siehe Tabelle 2.4) superfundiert. Dadurch wurden nicht in die Zellen aufgenommene Farbstoffpartikel sowie Zelldetritus ausgewaschen. Um den Zellen realitätsnahe Umgebungsbedingungen zu liefern, wurde die Superfusionslösung so aufgeheizt, dass die Temperatur in der Mitte der Zellkammer $35 \pm 2^\circ\text{C}$ entsprach. Auf diese Temperatur wurden auch die Superfusionslösungen hinsichtlich ihres pH-Werts eingestellt.

Anschließend wurden die Zellen mit einer Frequenz von 1 Hz und einer elektrischen Spannung ca. 25 % über der Reizschwelle (20 ± 4 V) stimuliert (MyoPacer, IonOptix) und eine vitale Zelle zur Messung

ausgewählt. Kriterien für Vitalität waren eine normale Zellform, deutlich sichtbare, homogene Sarkomerstrukturen und gleichmäßige Kontraktilität. Die Zelle wurde solange unter Stimulation mit Normaltyrode superfundiert, bis sich Kontraktilität und Kalziumtransienten nicht mehr nennenswert veränderten (sogenannter *steady state*). Dies galt als Hinweis darauf, dass sich die Zelle ausreichend an die Umgebungsbedingungen angepasst hatte.

Nun wurde die normazide Tyrode gegen eine ansonsten gleich zusammengesetzte Superfusionslösung mit einem pH-Wert von 6,75 (siehe Tabelle 2.4) ausgetauscht. Während die Myozytenkontraktilität kontinuierlich erfasst wurde, wurden die Kalziumtransienten in unregelmäßigen Abständen, aber mindestens je 1x in der frühen Azidose (1 – 4 min) und in der späten Azidose (5 - 10 min), gemessen. So sollte das Ausbleichen des Farbstoffs (siehe Abschnitt 2.2.2; S. 35) reduziert werden.

Nach ca. 10 min Azidose wurde erneut auf die Normaltyrode umgeschaltet und überprüft, ob die Zellen noch vital genug waren, um sich von der Azidose zu erholen. Nur Zellen, die diesen Schritt überlebten, wurden am Ende ausgewertet.

Nach Abschluss der Messung wurde die Hintergrundfluoreszenz im direkten Umfeld der gemessenen Zelle bestimmt. Bei Fura-2-AM musste diese anders als bei Fluo-2-AM für beide Anregungsfrequenzen (340 nm und 380 nm) separat ermittelt werden.

Messlösungen:

Lösung	Substanz	Konzentration	
Messtyrode mit pH 7,4 (Normaltyrode) bzw. pH 6,75 (Azidoselösung)	NaCl	140 mmol/l	gelöst in doppelt destilliertem Wasser; pH 7,4 bzw. pH 6,5 mit NaOH bei 37°C
	KCl	4 mmol/l	
	MgCl ₂	1 mmol/l	
	HEPES	5 mmol/l	
	Glukose	10 mmol/l	
	CaCl ₂	1 mmol/l	

Tabelle 2.4 - Zusammensetzung der beiden Messlösungen (Normaltyrode und Azidoselösung). Kalzium wurde unmittelbar vor Beginn der Messung hinzugegeben. Nach SAG et al. (2009)

2.4 Messung des Kalziumgehalts des Sarkoplasmatischen Retikulums und der Aktivität des Natrium/Kalzium-Austauschers (NCX) in der Azidose

Zur Messung des SR-Kalziumgehalts in der Azidose wurde Koffein (10 mM) verwendet (KONG et al. 2008). Dieses führt zu einer Öffnung der Kalziumfreisetzungskanäle (Ryanodinrezeptoren) des Sarkoplasmatischen Retikulums mit konsekutiver Entleerung der Kalziumspeicher ins Zytoplasma. Die währenddessen mit Fluo-3-AM gemessenen intrazellulären Kalziumtransienten wurden als qualitatives Maß für den SR-Kalziumgehalt verwendet. Weiterhin konnte aus der Abfallskinetik der Koffeintransienten (τ_{koffein}) die Aktivität bestimmter Kalziumextrusionsmechanismen geschätzt werden. Aufgrund der durch Koffein wirkungslosen Kalziumaufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum gilt τ_{koffein} v.a. als Maß für die Aktivität des NCX, wobei zu einem geringeren Ausmaß auch andere langsame Mechanismen wie mitochondriale Kalziumtransporter und die sarkolemmale Kalzium-ATPase eine Rolle spielen (LI et al. 1998).

Tyrode mit Koffein	Koffein	10	mmol/l	1,942 g Koffein gelöst in 1 l Messtyrode mit pH 7,4
---------------------------	---------	----	--------	---

Tabelle 2.5 - Herstellung von Koffeintyrode. Dazu wurde Koffein in einer normaziden Tyrode (Herstellung siehe Tabelle 2.4) gelöst, sodass sich eine Konzentration von 10 mmol/l ergab. Gemäß HULME und ORCHARD (1998)

Durchführung:

Das Versuchsprotokoll zur Messung des SR-Kalziumgehalts während der Azidose wurde in Anlehnung an das im Abschnitt 2.3 (S. 41) beschriebene Messprotokoll durchgeführt. Die isolierten und mit Laminin an der Messkammer fixierten Kardiomyozyten wurden analog mit Fluo-3-AM angefärbt. Nach einer kurzen Einschlagzeit (1 Hz) unter Normaltyrode wurde für 10 min auf die Azidoselösung umgeschaltet und anschließend mit Normaltyrode ausgewaschen. Währenddessen wurde in 2-minütigen Abständen (mindestens 1x in der Einschlagzeit, genau 5x während der Azidose und mindestens 1x während des Auswaschens) der SR-Kalziumgehalt bestimmt. Dazu wurde jeweils 10 mmol/l Koffeinlösung (siehe Tabelle 2.5) direkt neben die Zelle auf die Messkammer gegeben. Unmittelbar davor wurde die elektrische Stimulation unterbrochen und erst nach Abfall des Koffeintransienten auf das Basalniveau wieder eingeschaltet. Nur Zellen, die sich bis zur nächsten Messung in Bezug auf Kalziumtransienten und Myozytenverkürzung ausreichend vom Koffeinstoß wiedererholten, wurden in die Auswertung einbezogen. Zellen, die Hyperkontraktionen oder andere Hinweise auf nicht ausreichende Vitalität zeigten, wurden ausgeschlossen. Insgesamt wurden Kardiomyozyten aus 7 Flox-Kontrollmäusen und 6 CaMKII δ -KO-Mäusen gemessen. Abbildung 2.7 zeigt beispielhaft einen von NAKAMURA et al. (2008) auf die beschriebene Weise erzeugten Koffeintransienten.

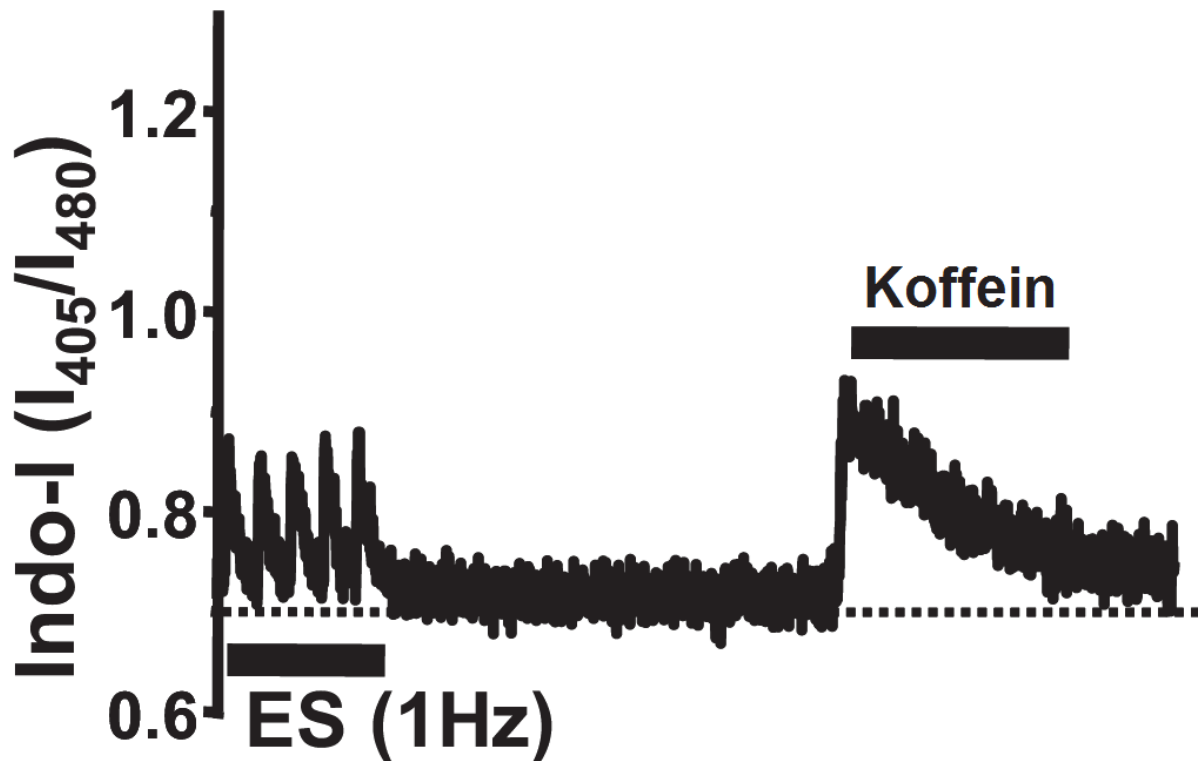


Abbildung 2.7 – Beispielhafter Koffeintransient – nach Pausieren der elektrischen Stimulation (ES, 1 Hz) wird direkt neben die zu untersuchende Zelle ein Tropfen Koffeinlösung appliziert. In der Folge entsteht durch Entleerung der Kalziumspeicher des Sarkoplasmatischen Retikulums der oben dargestellte Koffeintransient. Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1. Modifiziert nach NAKAMURA et al. (2008), Seite 894

2.5 CaMKII-Inhibition

Um zu untersuchen, ob es während einer Azidose Unterschiede zwischen einer vollständigen CaMKII-Inhibition und der isolierten Ausschaltung der δ -Isoform gibt, wurden weitere Messreihen mit dem in der Einleitung beschriebenen CaMKII-Inhibitor KN-93 durchgeführt (siehe Abschnitt 1.4; S. 19). Da dieser neben der CaMKII-Inhibition weitere unspezifische Effekte hat, erfolgte ein Vergleich mit KN-92, dem inaktiven Analogon.

Zur Messung der Kalziumtransienten diente der ratiometrische Farbstoff Fura-2-AM. Dieser wurde ausgewählt, weil er gegenüber dem nicht-ratiometrischen Fluo-3-AM geringere Auswascheffekte zeigt und in dieser Messserie häufigere Fluoreszenzmessungen (alle 2 min jeweils ca. 30 s) durchgeführt werden sollten.

Konkret wurden nach Absetzen des Überstandes 200 μ l der Fura-2-AM-Farbstofflösung (zur Herstellung siehe Abschnitt 2.2.2; S. 35) auf die mit Laminin an der Messkammer fixierten Kardiomyozyten pipettiert. Nach 15 min Anfärbezeit in einem abgedunkelten Raum wurde die Messkammer auf dem Objektträger des Epifluoreszenz-Mikroskops (zum Versuchsaufbau siehe Abbildung 2.2) befestigt und für 15 min ohne elektrische Stimulation mit KN-93- bzw. KN-92-haltiger

normazider Messtyrode (jeweils 1 μM) superfundiert. Auf diese Weise wurde schon vor Beginn der eigentlichen Messung eine suffiziente CaMKII-Inhibition sichergestellt. Nach Einschaltung der Myozytenstimulation (1 Hz) begann die eigentliche Messung mit regelmäßiger Bestimmung der Kalziumtransienten. Nach einer kurzen Einschlagzeit wurde auf eine azide Lösung, die ebenfalls KN-93 bzw. KN-92 enthielt, umgeschaltet und diese nach 10-minütiger Azidose wieder mit der normaziden Lösung ausgewaschen. Tabelle 2.6 zeigt die Herstellung der verwendeten Lösungen.

Normaltyrode mit KN-93	KN-93	1 $\mu\text{mol/l}$	0,599 mg KN-93 gelöst in 1 l Messtyrode mit pH 7,4
Normaltyrode mit KN-92	KN-92	1 $\mu\text{mol/l}$	0,555 mg KN-92 gelöst in 1 l Messtyrode mit pH 7,4
Azidosetyrode mit KN-93	KN-93	1 $\mu\text{mol/l}$	0,599 mg KN-93 gelöst in 1 l Messtyrode mit pH 6,75
Azidosetyrode mit KN-92	KN-92	1 $\mu\text{mol/l}$	0,555 mg KN-92 gelöst in 1 l Messtyrode mit pH 7,4

Tabelle 2.6 - Messlösungen mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 bzw. seinem inaktiven Analogon KN-92 – Konzentrationen gemäß VILA-PETROFF et al. 2010

Neben den Messungen mit CaMKII δ -Knockout-Mäusen wurden weiterhin analoge Messreihen mit Kontrollmäusen (Flox) durchgeführt. Sollte es wie in der Literatur (MATTIAZZI et al. 2007) beschrieben bei diesen Mäusen ohne CaMKII-Inhibition (d.h. mit KN-92) im Verlauf der Azidose zu einer Wiedererholung von Kalziumtransienten und Kontraktilität kommen, könnte mithilfe von KN-93 überprüft werden, ob diese Wiedererholung einen CaMKII-abhängigen Prozess darstellt. Insgesamt wurde der CaMKII-Inhibitor KN-93 an 8 Flox- und 11 CaMKII δ -KO-Mäusen getestet, während das inaktive CaMKII-Kontrollagens KN-92 bei 6 Flox- und 7 CaMKII δ -KO-Mäusen zur Anwendung kam.

2.6 Datenauswertung

Nach Erhebung der Daten mithilfe des Epifluoreszenz-Setups, wurden diese mit der Auswertungssoftware IonWizard Analyse (Version 5.0, IonOptix) hinsichtlich der Kalziumtransienten-Amplitude, fraktionellen Myozytenverkürzung und Relaxationsgeschwindigkeiten (=Relaxationszeiten) analysiert. Zur Berechnung der Kalziumtransienten-Amplitude wurde bei Fluo-3-AM zunächst die Hintergrundfluoreszenz abgezogen, die im Anschluss an jede Messung in direkter Umgebung der

gemessenen Zelle ermittelt wurde. Nach Auswahl eines geeigneten Analysebereichs gemäß den beschriebenen Versuchsprotokollen (siehe Abschnitte 2.3 und 2.4; ab S. 41), wurde mithilfe der Auswertungssoftware ein aus mehreren Transienten gemittelter Kalziumtransient berechnet. Abbildung 2.8 zeigt beispielhaft einen solchen Kalziumtransienten. Die von der Software ermittelten Werte für die systolische und die diastolische Kalziumfluoreszenz (F bzw. F_0) wurden in eine Excel-Tabelle (Excel, Office 2010, Microsoft, USA) übertragen und die Kalziumtransienten-Amplitude ($\Delta F/F_0$) mithilfe folgender Formel errechnet:

$$\Delta (F / F_0) = \frac{F}{F_0} - \frac{F_0}{F_0}$$

Formel 2.1

(F = systolische Kalziumfluoreszenz; F_0 = diastolische Kalziumfluoreszenz)

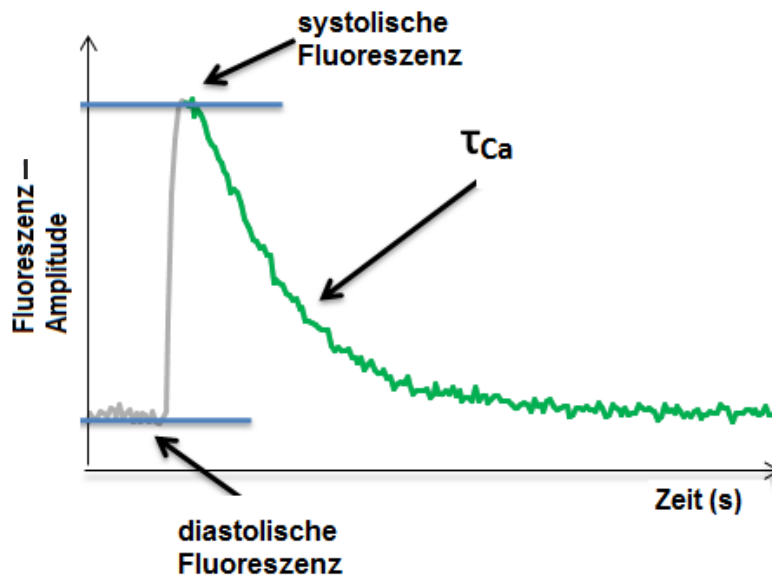


Abbildung 2.8 - Beispielhafter Kalziumtransient für Fluo-3-AM. Dieser ermöglicht die Berechnung der Kalziumtransienten-Amplitude und der Abfallkinetik der Kalziumtransienten (τ_{Ca})

Bei Fura-2-AM hingegen wurde die emittierte Fluoreszenz bei zwei verschiedenen Anregungsfrequenzen (340 nm und 380 nm) gemessen, da dieser ein ratiometrischer Farbstoff ist. Die resultierenden Kalziumtransienten ergaben sich aus dem Verhältnis beider gemessener Fluoreszenzen gemäß folgender Formel:

$$\frac{F_{340}}{F_{380}} = \frac{\text{emittierte Fluoreszenz bei Anregung mit 340 nm}}{\text{emittierte Fluoreszenz bei Anregung mit 380 nm}}$$

Formel 2.2

Zuvor musste jeweils die für beide Anregungsfrequenzen getrennt ermittelte Hintergrundfluoreszenz abgezogen werden. Abbildung 2.9 zeigt beispielhaft einen gemittelten Fura-2-AM-Transienten.

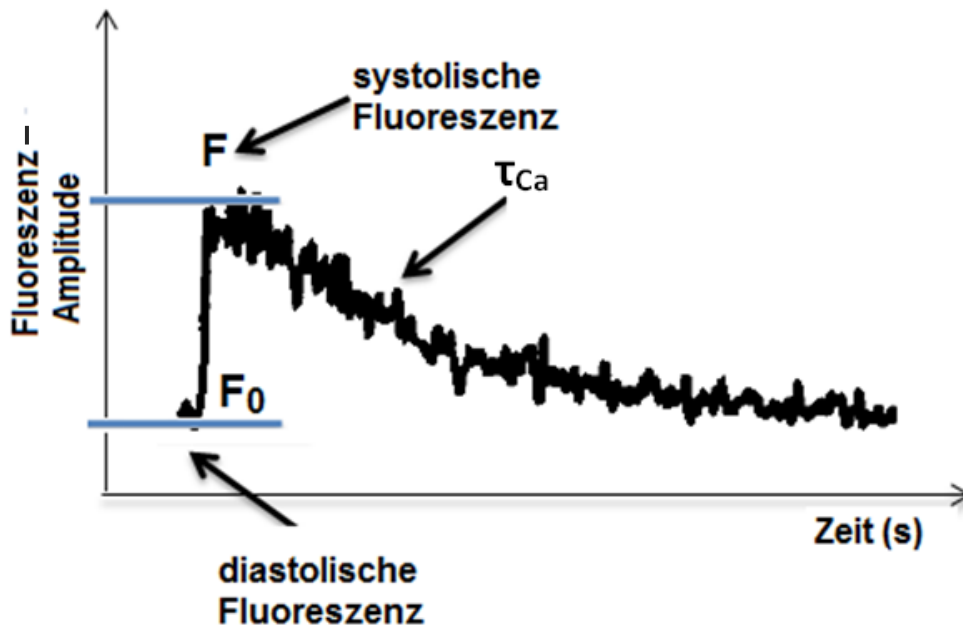


Abbildung 2.9 - Beispielhafter Kalziumtransient für Fura-2-AM. Dieser ermöglicht die Berechnung der Kalziumtransienten-Amplitude und der Abfallskinetik der Kalziumtransienten (τ_{Ca})

Die Kalziumtransienten-Amplitude errechnete sich bei Fura-2-AM gemäß folgender Formel:

$$\begin{aligned} & \text{Kalziumtransienten - Amplitude} \\ & = \text{systolische Fluoreszenz} - \text{diastolische Fluoreszenz} \end{aligned}$$

Formel 2.3

Weiterhin errechnete die Auswertungssoftware aus dem gemittelten Kalziumtransienten dessen Abfallskinetik (τ_{Ca}). τ_{Ca} gilt als Maß für die Aktivität der Transportsysteme, die das intrazelluläre Kalzium nach Ende der Systole wieder auf das Ruheniveau (diastolisches Kalzium) absenken und somit insbesondere als Maß für die SERCA-Funktion. Mathematisch handelt es sich bei τ_{Ca} um eine gefittete monoexponentielle Funktion, die wie folgt definiert ist:

$$\tau_{Ca} = A \times e^{\frac{-t}{\tau}}$$

Formel 2.4

(A = Amplitude; t = Zeit)

Eine entsprechende monoexponentielle Funktion gilt auch für die Abfallskinetik der Koffeintransienten (τ_{koffein}), die, wie in Abschnitt 2.4 (S. 43) beschrieben, v.a. als Maß für die Aktivität des Natrium/Kalzium-Austauschers (NCX) gilt.

Anschließend wurden die Ergebnisse mithilfe von SigmaPlot (Version 10.0) auf statistische Signifikanzen untersucht.

Analog wurde mit der Myozytenverkürzung vorgegangen. IonWizard Analyse lieferte nach Auswahl eines geeigneten Auswertebereichs eine gemittelte Kurve der Myozytenverkürzung, die in Abbildung 2.10 beispielhaft dargestellt ist.

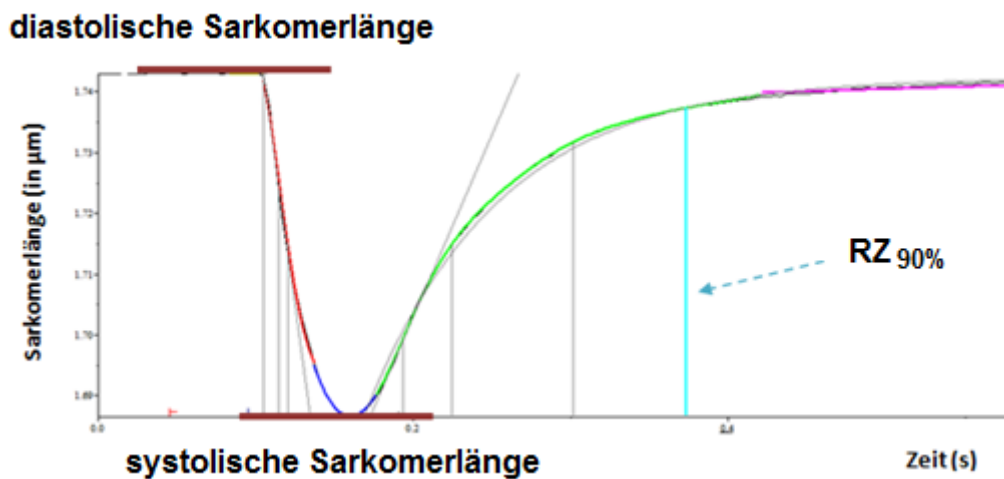


Abbildung 2.10 - Beispielhafte Myozytenverkürzungskurve – hieraus können die diastolische bzw. systolische Sarkomerlänge und die Relaxationszeiten (u.a. RZ_{90%}) bestimmt werden

Aus dieser Kurve ließen sich die diastolische und die systolische Sarkomerlänge ablesen und mithilfe der folgenden Formel in Excel die fraktionelle Myozytenverkürzung (in Prozent der Ruhezelllänge, % RZL) berechnen:

$$\text{Fraktionelle Myozytenverkürzung} = \frac{\text{diastolische Sarkomerlänge} - \text{systolische Sarkomerlänge}}{\text{diastolische Sarkomerlänge}} \times 100$$

Formel 2.5

Weiterhin wurden die Relaxationszeiten, nach denen die Zelle beispielsweise 90 % der ursprünglichen diastolischen Länge wiedererreicht hat ($RZ_{90\%}$), aus der Myozytenverkürzungskurve abgelesen und anschließend mithilfe von SigmaPlot (Version 10.0) auf statistische Signifikanzen untersucht.

Statistische Auswertung:

Alle Ergebnisse wurden angegeben als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts. Die Bestimmung von statistischen Signifikanzen erfolgte mittels Fisher's Exact Test, Student's T-Test und der Zwei-Wege-Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) kombiniert mit dem Fisher-LSD post-hoc Test. Als statistisch signifikant galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt eines CaMKII δ -KO auf das Verhalten von isolierten Kardiomyozyten unter Azidose

Gemäß dem im vorherigen Abschnitt dieser Arbeit beschriebenen Versuchsprotokoll wurden isolierte Kardiomyozyten aus Kalzium/Calmodulin-Kinase-II δ -defizienten Mäusen (CaMKII δ -KO) einer 10-minütigen Azidose unterzogen und mit in Bezug auf die CaMKII δ intakten Kardiomyozyten (Flox) verglichen (siehe Abschnitt 2.3; S. 41). Dabei zeigten sich besonders in der Spätphase der Azidose (ca. 5 - 10 min) wichtige Unterschiede zwischen beiden Genotypen bezüglich fraktioneller Myozytenverkürzung, Kalziumtransienten-Amplitude und Relaxationszeiten. Aber auch unter normaziden Kontrollbedingungen fanden sich bereits Hinweise auf einen unterschiedlich regulierten Kalziumstoffwechsel.

3.1.1 Bedeutung der δ -Isoform der CaMKII für die Aufrechterhaltung der fraktionellen Myozytenverkürzung in der Spätphase der Azidose

Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch charakteristische Originalaufzeichnungen der Myozytenverkürzung im Verlauf des gesamten Azidoseprotokolls. Aufgrund der Aufzeichnungsgeschwindigkeit der insgesamt ca. 15-minütigen Messungen lassen sich einzelne systolisch-diastolische Kontraktionen nicht mehr voneinander differenzieren. Nach Erreichen einer im Zeitverlauf nahezu konstanten Kontraktilität unter normazider Kontrolllösung (*steady state*), führte der Wechsel auf eine azide Superfusionslösung (pH 6,75) bei Flox- und CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten zu einer raschen Kontraktilitätsabnahme. Während die Kontraktilität bei der Flox-Zelle nach ca. 4 min ein Minimum erreichte, dann aber trotz weiter bestehender Azidose kontinuierlich wieder anstieg, blieb der Wiederanstieg bei Kardiomyozyten mit genetischer Deletion der δ -Isoform der CaMKII typischerweise aus. Stattdessen kam es auch in der Spätphase der Azidose zu einer weiteren kontinuierlichen Kontraktilitätsabnahme.

Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen, wurde nach ca. 10 min erneut auf die normazide Kontrolllösung umgeschaltet. Eine Wiedezunahme der Kontraktilität galt als Zeichen anhaltender Vitalität und war Voraussetzung für die spätere Auswertung der Zellen.

Die Aufrechterhaltung einer adäquaten Kontraktilität in der späten Azidose bei in Bezug auf die CaMKII intakten Kardiomyozyten ist ein seit langem bekanntes Charakteristikum einer Azidose und wird insbesondere auf CaMKII-abhängige Mechanismen zurückgeführt (siehe Abschnitt 1.5; S. 21).

Diese Arbeit konnte zeigen, dass der typische Kontraktilitätserhalt bei CaMKII δ -defizienten Mäusen in der Regel ausbleibt.

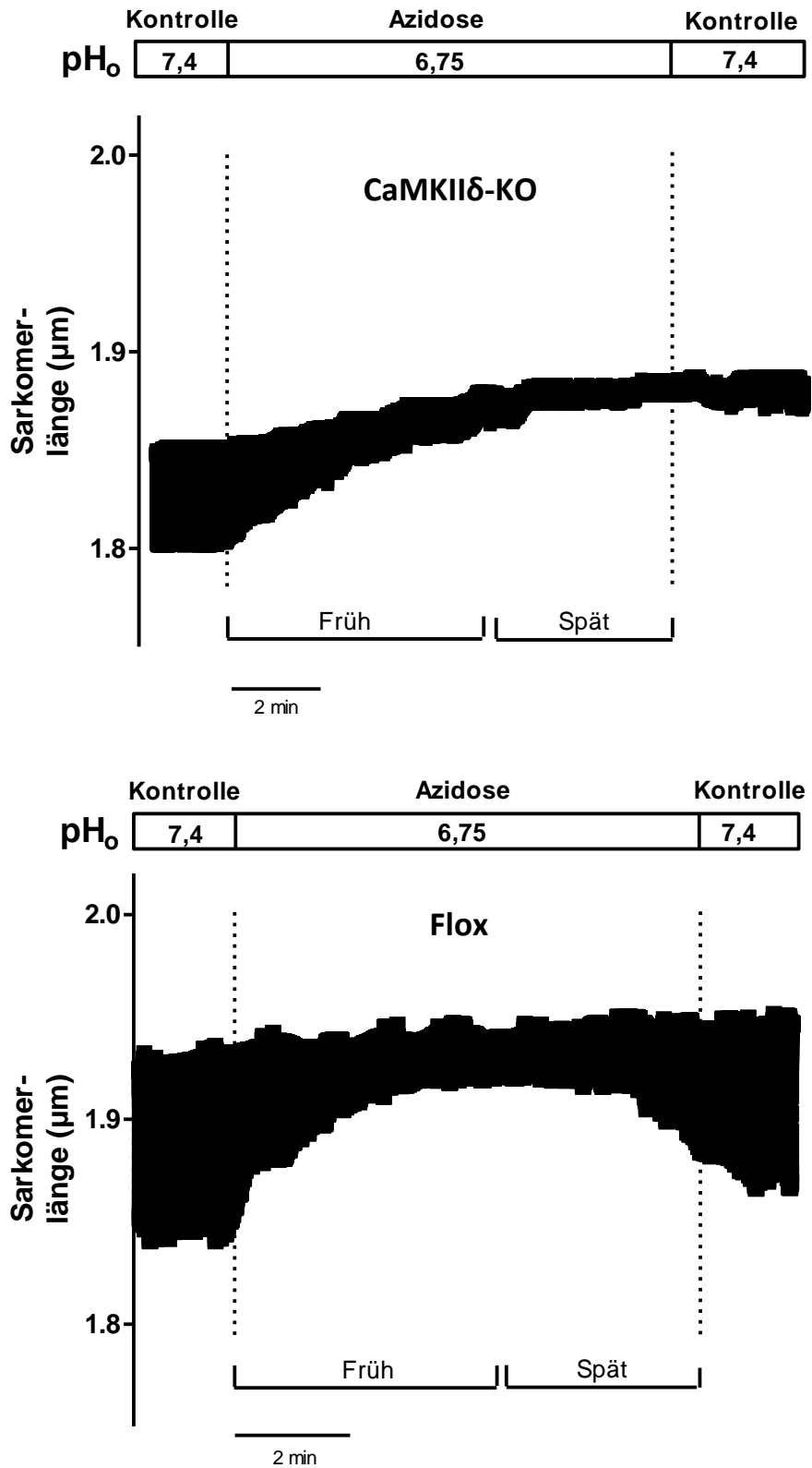


Abbildung 3.1 - Originalabbildungen der Myozytenverkürzung im Azidoseprotokoll. Während Flox-Zellen (unten) eine Wiedererholung der Kontraktilität zeigen, bleibt diese in CaMKII δ -KO-Zellen (oben) aus. pH_o = pH-Wert der Messlösung

Abbildung 3.2 dient der differenzierten Betrachtung einzelner systolisch-diastolischer Myozytenverkürzungen und zeigt typische Originalabbildungen der Kontraktionskraftamplituden aus den charakteristischen Phasen der Azidose bei Flox- und CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten. Im Flox konnte in der späten Azidose eine Zunahme der fraktionellen Myozytenverkürzung (in Prozent der Ruhezelllänge, RZL) beobachtet werden, wohingegen diese bei dem dargestellten typischen CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten ausblieb und im Verlauf der späten Azidose sogar weiter abnahm.

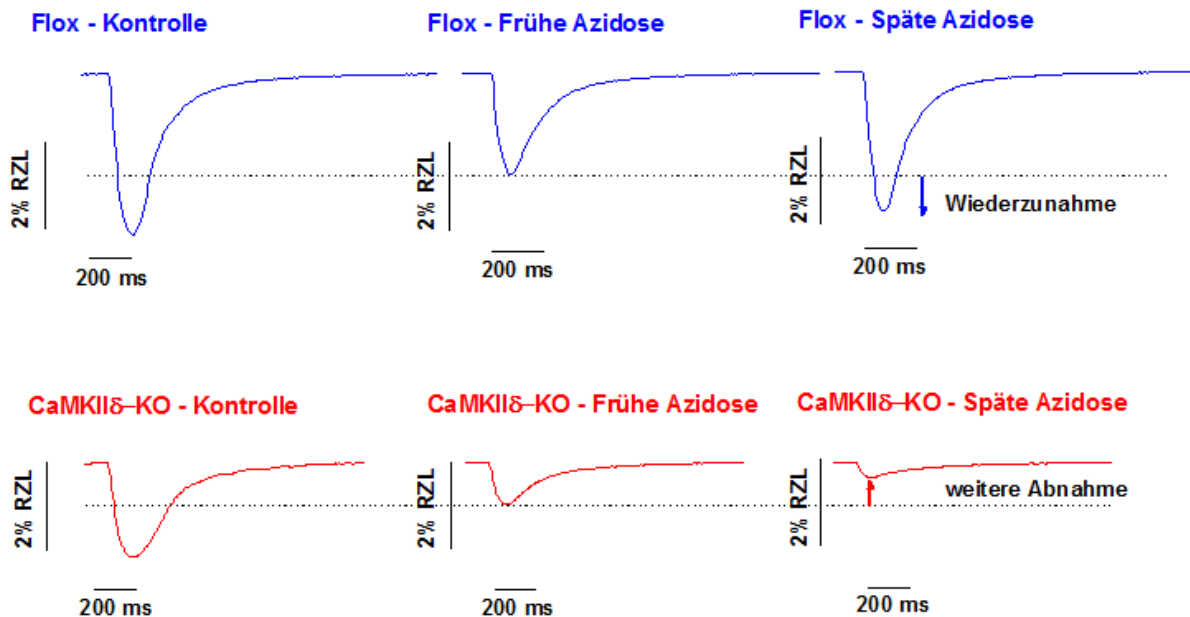


Abbildung 3.2 – Für den jeweiligen Genotyp (Flox vs. CaMKII δ -KO) charakteristische Originalabbildungen der Myozytenverkürzung im Verlauf der Azidose (pH 6,75). Anders als in der Kontrollmaus (Flox) bleibt die Wiederzunahme der fraktionellen Myozytenverkürzung bei dem dargestellten CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten in der späten Azidose aus. Stattdessen kommt es zu einer weiteren Abnahme der Kontraktilität

Zur Bestimmung etwaiger statistischer Signifikanzen wurden die Mittelwerte der fraktionellen Myozytenverkürzung aller in dieser Serie gemessenen Zellen bestimmt und in Abbildung 3.3 graphisch dargestellt.

Hierbei zeigte sich unter Kontrollbedingungen bei beiden Genotypen eine zunächst annähernd gleiche fraktionelle Myozytenverkürzung. Nach Beginn der Azidose sank diese bei Flox-Zellen von $3,85 \pm 0,24$ % der Ruhezelllänge (RZL) auf $1,54 \pm 0,15$ % der RZL ab ($P < 0,05$ vs. Kontrollphase). Auch bei den Knockout-Zellen nahm die fraktionelle Myozytenverkürzung signifikant von $3,33 \pm 0,24$ % RZL auf $1,64 \pm 0,17$ % ab ($P < 0,05$ vs. Kontrollphase). Wie bereits beispielhaft in den Originalabbildungen gezeigt (siehe Abbildung 3.1), blieb die Wiedererholung der fraktionellen Myozytenverkürzung beim CaMKII δ -Knockout in den allermeisten Fällen aus, sodass sich dies auch auf die Mittelwerte durch eine weitere signifikante Abnahme der fraktionellen Myozytenverkürzung auf $1,09 \pm 0,17$ % RZL auswirkte. Zellen des Flox zeigten dagegen in der späten Azidose eine Aufrechterhaltung der

fraktionellen Myozytenverkürzung mit $1,56 \pm 0,19$ % der Ruhezelllänge ($P < 0,05$ vs. CaMKII δ -KO). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine genetische Inhibition der CaMKII δ den Kontraktilitätserhalt der fraktionellen Myozytenverkürzung in der späten Azidose verhindert. Der δ -Isoform der CaMKII kommt somit eine essentielle Bedeutung für die spätazidotische Aufrechterhaltung der Kontraktilität zu.

Nach der Rückkehr auf die normazide Kontrolllösung erholten sich die Zellen beider Genotypen im Durchschnitt wieder auf $2,82 \pm 0,33$ % RZL (Flox) bzw. $1,88 \pm 0,3$ % RZL (Knockout; jeweils $P < 0,05$ vs. Spätphase der Azidose sowie $P < 0,05$ Knockout vs. Flox).

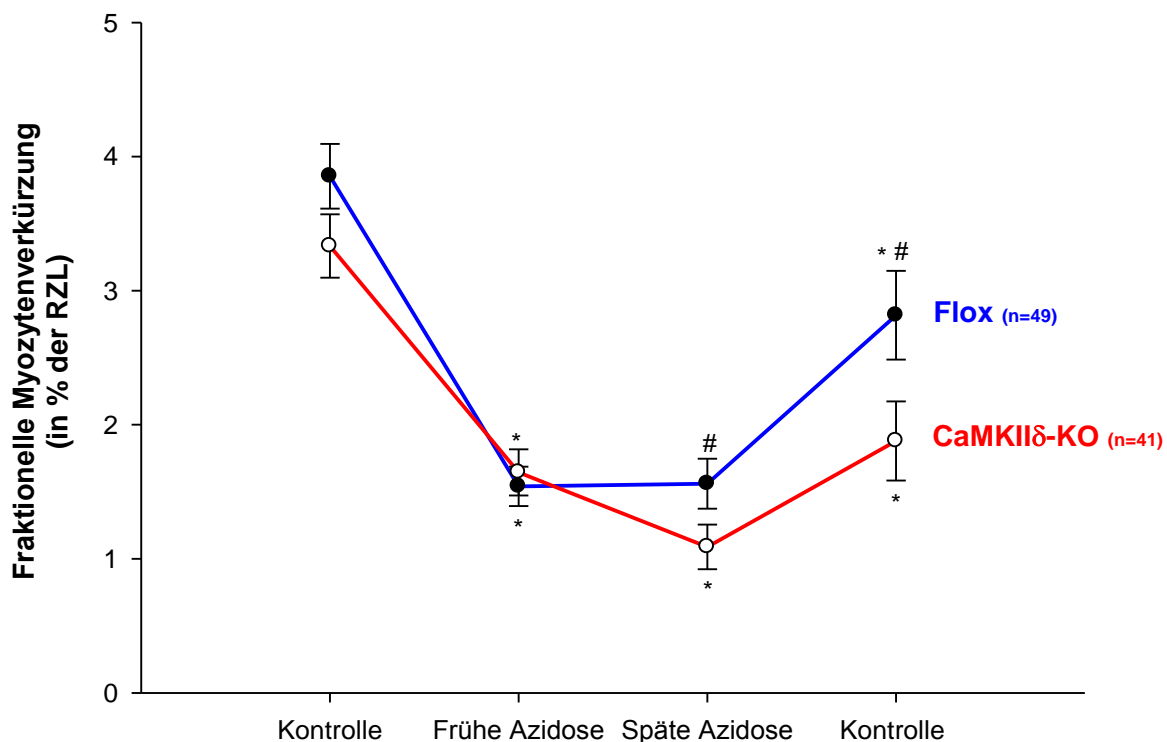


Abbildung 3.3 – Mittelwerte der fraktionellen Myozytenverkürzung im Verlauf der Azidose (pH 6,75) bei CaMKII δ -KO- vs. Flox-Kardiomyozyten. Nach initialem Abfall der Kontraktilität zu Beginn der Azidose bei beiden Genotypen bleibt diese bei Flox-Kardiomyozyten im weiteren Verlauf stabil, wohingegen es bei CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten zu einem weiteren signifikanten Kontraktilitätsverlust kommt. RZL = Ruhezelllänge; * signifikante Veränderung gegenüber vorheriger Phase; # signifikante Veränderung gegenüber anderem Genotyp. Flox: n=49 aus 13 Mäusen; KO: n=41 aus 12 Mäusen

3.1.2 Veränderung der Kalziumtransienten-Amplitude im Verlauf der Azidose bei CaMKII δ -KO

Auch bei der Kalziumtransienten-Amplitude ergaben sich unter dem Einfluss einer Azidose ähnliche Befunde wie bei der Kontraktilität.

Abbildung 3.4 stellt charakteristische originale Kalziumtransienten von Flox- und Knockout-Zellen dar. Beide Genotypen zeigten nach Umschalten auf die azide Messtyrode zunächst eine Transientenabnahme im Vergleich zur Kontrollphase. Im weiteren Verlauf kam es jedoch beim Flox

zu einer Aufrechterhaltung (bzw. leichten Wiederzunahme) der Kalziumtransienten, wohingegen die Kalziumtransienten-Amplitude der Knockout-Zellen weiter abnahm.

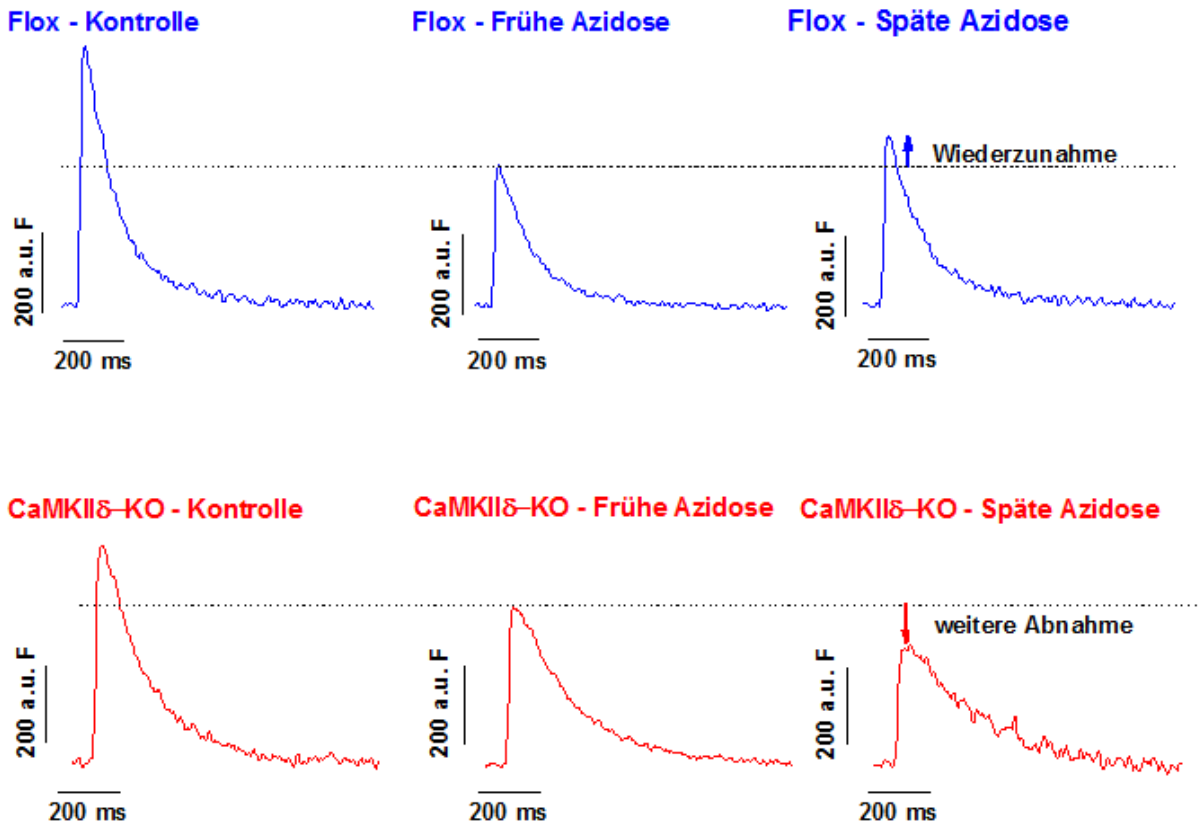


Abbildung 3.4 – Für den jeweiligen Genotyp (Flox vs. CaMKII δ -KO) charakteristische Originalabbildungen der Kalziumtransienten im Verlauf der Azidose (pH 6,75). Anders als bei der Kontrollmaus (Flox) bleibt die Wiederzunahme der Kalziumtransienten bei dem dargestellten CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten in der späten Azidose aus. Stattdessen kommt es zu einer weiteren Kalziumtransientenabnahme. a.u.F. (arbitrary unit of fluorescence) = Einheit der mit Fluo-3-AM gemessenen Fluoreszenz

Die dazu gehörigen Durchschnittswerte (siehe Abbildung 3.5) zeigen ein ähnliches Bild. Unter Kontrollbedingungen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Kalziumtransienten-Amplitude zwischen beiden Genotypen feststellen ($1,13 \pm 0,05$ a.U.F. (Flox) bzw. $1,02 \pm 0,06$ a.U.F. (KO), $P = n.s.$). Auch in der frühen Azidose nahmen beide Genotypen signifikant auf vergleichbare Werte ab ($0,82 \pm 0,05$ a.U.F. im Flox vs. $0,80 \pm 0,05$ a.U.F. im KO; $P < 0,05$ vs. Kontrollphase). Während es dem Flox jedoch gelang, die Kalziumtransienten-Amplitude in der späten Azidose mit $0,83 \pm 0,06$ a.U.F. stabil zu halten ($P < 0,05$ vs. KO), kam es im CaMKII δ -Knockout zu einer weiteren signifikanten Abnahme auf $0,65 \pm 0,06$ a.U.F. ($P < 0,05$ vs. frühe Azidose). Dadurch stellte sich der Kalziumtransient der KO-Zelle in der Spätphase signifikant kleiner dar als in der Kontrollgruppe. Schlussfolgernd scheint die Expression

der δ -Isoform der CaMKII essentiell für die Aufrechterhaltung der Kalziumtransienten-Amplitude in der späten Azidose zu sein.

Beim anschließenden Auswaschen mit normazider Tyrode stiegen die Amplituden beider Genotypen wieder signifikant an ($0,95 \pm 0,08$ a.U.F im Flox bzw. $0,81 \pm 0,08$ a.U.F im KO; jeweils $P < 0,05$ vs. späte Azidose).

Zusammenfassend fanden sich bei unter Kontrollbedingungen zunächst nicht signifikant unterschiedlicher systolischer Funktion (fraktionelle Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten-Amplitude) im Verlauf der Azidose deutliche Unterschiede zwischen CaMKII δ -Knockout- und Kontroll-Kardiomyozyten (Flox). Während dem Flox ein Erhalt von Kontraktilität und Kalziumtransienten gelang, blieb dieser in den CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten aus. Stattdessen kam es zu einer weiteren Abnahme der genannten Parameter. Demzufolge scheint die Expression der δ -Isoform der CaMKII eine essentielle Bedeutung für die spätazidotischen Erhaltungsvorgänge zu haben.

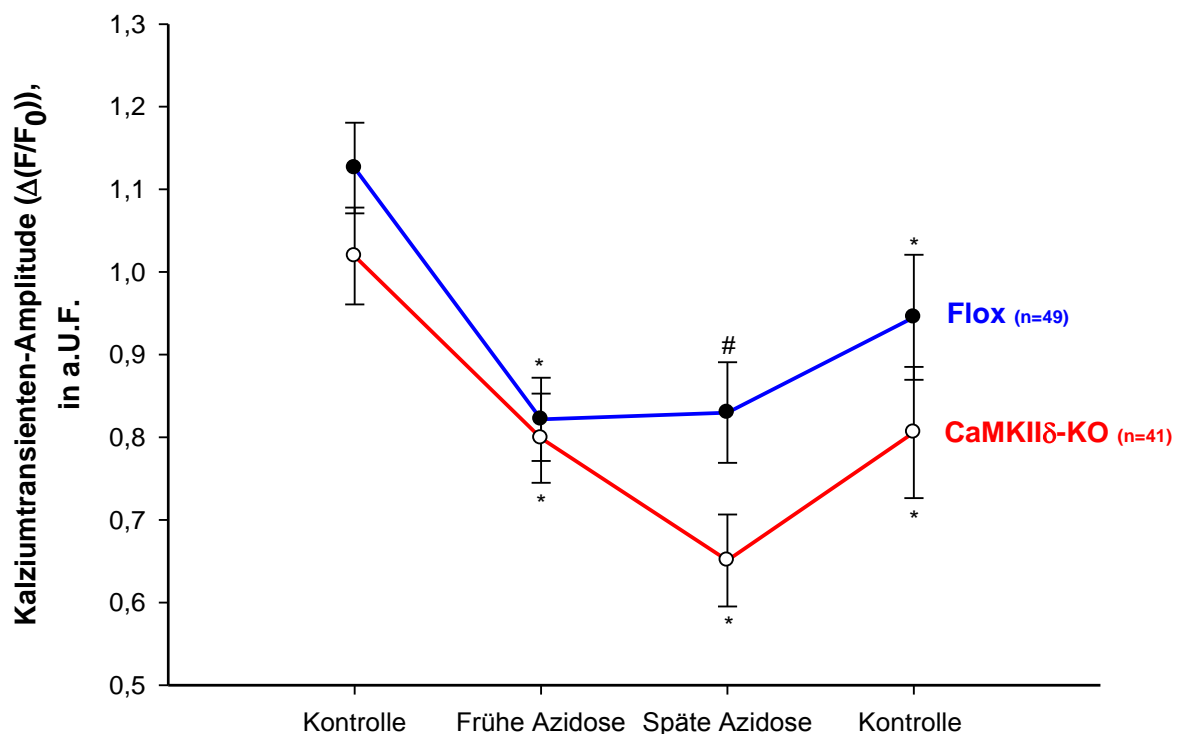


Abbildung 3.5 – Mittelwerte der mit Fluo-3-AM gemessenen Kalziumtransienten-Amplitude ($\Delta(F/F_0)$) im Verlauf der Azidose (pH 6,75) bei CaMKII δ -KO- vs. Flox-Kardiomyozyten. Nach initialem Abfall der Kalziumtransienten-Amplitude in der frühen Azidose bei beiden Genotypen bleibt diese bei den Flox-Kardiomyozyten im weiteren Verlauf stabil, wohingegen es bei CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten zu einer weiteren signifikanten Abnahme kommt. a.U.F. = arbitrary unit of fluorescence; * signifikante Veränderung gegenüber vorheriger Phase; # signifikante Veränderung gegenüber anderem Genotyp. Flox: n=49 aus 13 Mäusen; KO: n=41 aus 12 Mäusen

3.1.3 Effekt von CaMKII δ -KO auf die Veränderung der Relaxationszeiten im Verlauf der Azidose

Im Anschluss an die systolische Kalziumfreisetzung und Myozytenverkürzung folgt die diastolische Relaxation, bei der das Kalzium wieder in die Kalziumspeicher aufgenommen bzw. aus der Zelle transportiert wird und die Kardiomyozyten zur ursprünglichen Größe zurückkehren (siehe Abschnitt 1.1.3; S. 4). Bei den Azidose-Experimenten zeigten sich bereits in der Kontrollphase Unterschiede in der diastolischen Funktion zwischen CaMKII δ -Knockout- und Flox-Kardiomyozyten (siehe Abbildung 3.6). So war die Relaxationszeit der Kalziumtransienten (τ_{Ca} , siehe Abschnitt 2.6; S. 45), die als ein Maß für die SERCA-Aktivität gilt, mit 144 ± 11 ms im CaMKII δ -Knockout etwas verlangsamt gegenüber dem Flox (114 ± 7 ms, n.s.). Damit einhergehend war die Relaxationszeit der Myozytenverkürzung ($RZ_{90\%}$) im CaMKII δ -Knockout mit 308 ± 29 ms deutlich verlangsamt gegenüber den Flox-Kardiomyozyten (209 ± 16 ms, $P<0,05$). Somit schien die diastolische Funktion in den CaMKII δ -Knockout-Zellen bereits unter Kontrollbedingungen beeinträchtigt zu sein, bei jedoch erhaltener systolischer Funktion (Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten; siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2 sowie Abbildungen 3.3 und 3.5).

Mit Eintritt in die Azidose zeigten sowohl Flox- als auch Knockout-Mäuse eine signifikante Verlangsamung der Relaxationszeit der Kalziumtransienten (τ_{Ca}) von 114 ± 7 ms auf 139 ± 9 ms (Flox; $P<0,05$ vs. Kontrollphase) bzw. von 144 ± 11 ms auf 188 ± 16 ms (KO; $P<0,05$ vs. Kontrollphase und vs. Flox). Im Flox kam es im weiteren Verlauf der Azidose zu einer nicht-signifikanten, diskreten Wiederbeschleunigung der Relaxationszeit der Kalziumtransienten (siehe Abbildung 3.6). So nahm diese von 139 ± 9 ms auf 133 ± 8 ms leicht ab bzw. blieb stabil. Im CaMKII δ -Knockout hingegen zeigte sich eine weitere signifikante Verlangsamung von τ_{Ca} von 188 ± 16 ms auf 236 ± 26 ms ($P<0,05$ mittels ANOVA, $P<0,05$ vs. frühe Azidose sowie $P<0,05$ vs. Flox). Somit konnte diese Arbeit einen wichtigen Beitrag der δ -Isoform der CaMKII zum Relaxationserhalt in der Azidose nachweisen.

Nachdem im Anschluss an die Azidose erneut auf die normazide Superfusionslösung umgeschaltet wurde, reagierten beide Genotypen gleichartig mit einer nicht-signifikanten, diskreten Beschleunigung von τ_{Ca} auf 129 ± 9 ms (Flox) bzw. 228 ± 26 ms (KO). Dabei blieben die deutlichen Unterschiede zwischen beiden Genotypen erhalten ($P<0,05$ für CaMKII δ -KO vs. Flox).

Ergebnisse

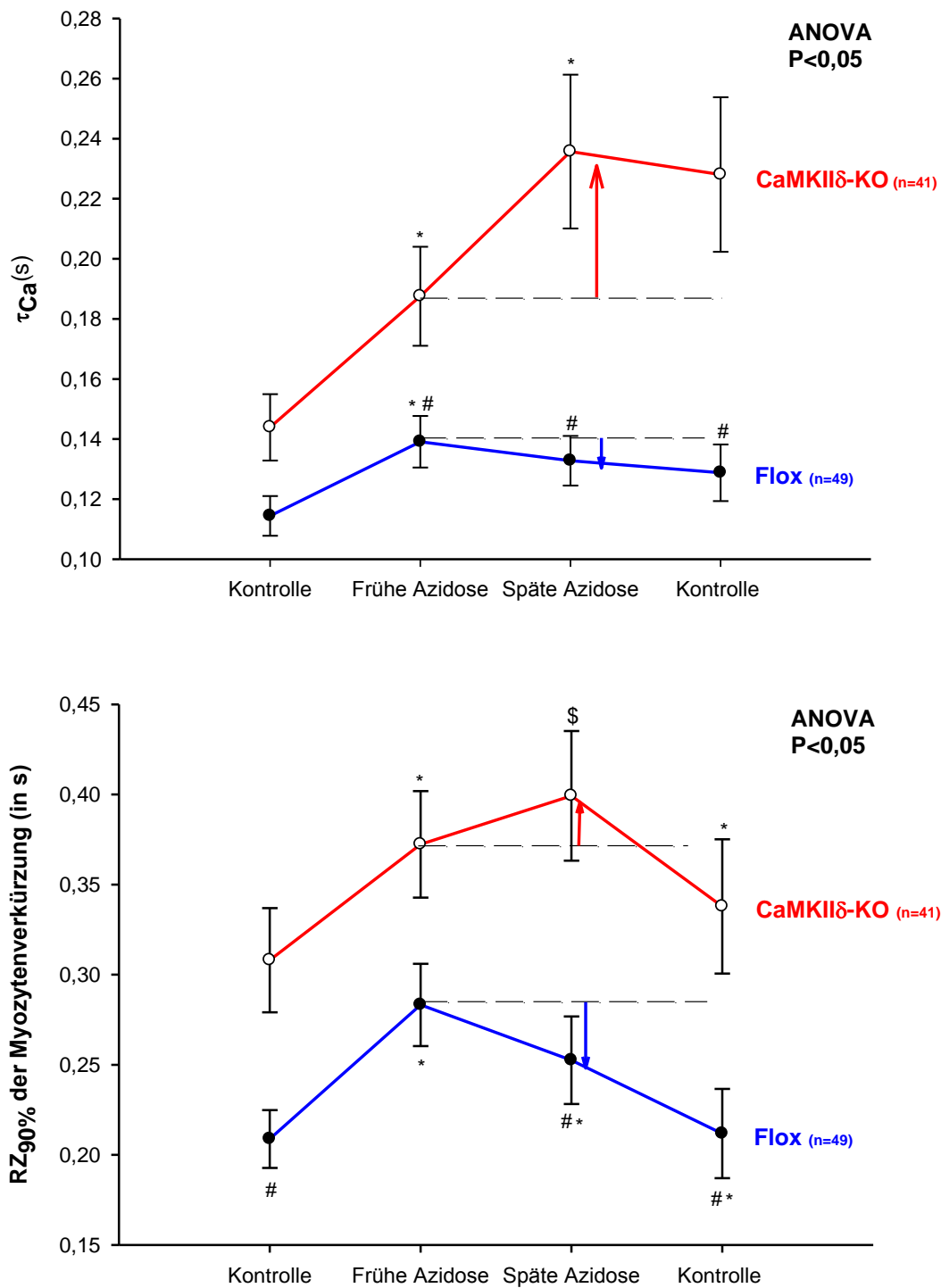


Abbildung 3.6 – Mittelwerte der Relaxationszeiten im Verlauf einer Azidose (pH 6,75) bei isolierten CaMKII δ -KO- vs. Flox-Kardiomyozyten. *Oben:* Relaxationszeit der Kalziumtransienten (τ_{Ca}). Nach initialer Verlangsamung bei beiden Genotypen gelingt es den Flox-Kardiomyozyten, die Relaxationszeit im weiteren Verlauf der Azidose stabil zu halten, wohingegen es im CaMKII δ -KO zu einer weiteren signifikanten Verlangsamung kommt. *Unten:* Relaxationszeit der Myozytenverkürzung (RZ_{90%}). Bereits in der Kontrollphase zeigen sich zwischen beiden Genotypen signifikante Unterschiede in der RZ_{90%}. Während es nach initialer Verlangsamung den Flox-Kardiomyozyten gelingt, die Relaxationszeit der Myozytenverkürzung im Verlauf der Azidose wieder signifikant zu beschleunigen, verlangsamt sich diese im CaMKII δ -KO weiter. * signifikante Veränderung gegenüber vorheriger Phase; § signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollphase; # signifikante Veränderung gegenüber anderem Genotyp. Flox: n=49 aus 13 Mäusen; KO: n=41 aus 12 Mäusen

Entsprechende Befunde ergaben sich auch für die Relaxationszeiten der Myozytenverkürzung ($RZ_{90\%}$; siehe Abbildung 3.6). Auch hier kam es zu Beginn der Azidose bei beiden Genotypen zu einer Verlangsamung von 209 ± 16 auf 283 ± 23 ms (Flox) bzw. von 308 ± 29 auf 372 ± 3 ms (KO; jeweils $P < 0,05$ vs. Kontrollphase). Im weiteren Verlauf zeigte sich dann eine signifikante Wiederbeschleunigung der $RZ_{90\%}$ im Flox auf 253 ± 24 ms ($P < 0,05$ frühe Azidose sowie $P < 0,05$ vs. KO), wohingegen diese beim CaMKII δ -Knockout ausblieb. Hier kam es stattdessen zu einer weiteren leichten Verlangsamung der Relaxationszeit der Myozytenverkürzung auf 399 ± 36 ms ($P < 0,05$ vs. Kontrollphase).

Beim Ausspülen mit normazider Lösung nach Ende der zehnmütigen Azidose zeigten beide Genotypen eine Beschleunigung der $RZ_{90\%}$ auf 212 ± 25 ms (Flox; $P < 0,05$ vs. späte Azidose) bzw. 338 ± 37 ms (KO; $P < 0,05$ vs. späte Azidose), wobei der Unterschied zwischen den Genotypen bestehen blieb ($P < 0,05$ Flox vs. KO).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass isolierte CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten bereits unter Kontrollbedingungen eine diastolische Dysfunktion mit verlangsamten Relaxationszeiten der Kalziumtransienten und der Myozytenverkürzung zeigten, bei allerdings intakter systolischer Funktion (Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten, siehe Abbildungen 3.3 und 3.5).

Im Verlauf der Azidose nahmen die Unterschiede zwischen beiden Genotypen zu. Während es im Flox zu einer Aufrechterhaltung (bzw. Wiederbeschleunigung) der Relaxationszeiten von Kalziumtransienten und Myozytenverkürzung kam, blieb diese beim CaMKII δ -Knockout aus. Dies ging, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, zeitlich einher mit einem Abfall von fraktioneller Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten in CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten. Die delta-Isoform der CaMKII scheint somit essentiell zur Aufrechterhaltung (bzw. Wiedererholung) dieser Parameter im Verlauf einer Azidose beizutragen.

3.2 Effekt von CaMKII δ -KO auf die diastolische Kalziumfluoreszenz und den SR-Kalziumgehalt im Verlauf der Azidose

Um die Ursachen zu finden, die bei CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten für den ausbleibenden spätazidotischen Erhalt von Kalziumtransienten und Kontraktilität verantwortlich sind, wurden 1.) das diastolische Kalzium und 2.) der Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums untersucht. Hinweise auf eine mögliche Bedeutung dieser Parameter für die spätazidotischen Erhaltungsvorgänge lieferten bereits die im Abschnitt 3.1 (S. 50) beschriebenen Untersuchungen zur Relaxationszeit der Kalziumtransienten (τ_{Ca}). Da sich im CaMKII δ -KO in der späten Azidose im Vergleich zum Flox eine deutlich verlangsamte τ_{Ca} zeigte, welche als ein Maß für die Aktivität der SR-Ca²⁺-ATPase gilt

(PERIASAMY et al. 2008), sollten die folgenden Experimente überprüfen, ob sich auch der resultierende SR-Kalziumgehalt und das diastolische Kalzium bei beiden Genotypen unterscheiden.

3.2.1 Auswirkungen von CaMKII δ -KO auf die diastolische Kalziumfluoreszenz im Verlauf der Azidose bei isolierten Kardiomyozyten

Die CaMKII δ -Knockout- und Flox-Kardiomyozyten unterschieden sich bereits in der Kontrollphase deutlich in der diastolischen Kalziumfluoreszenz (siehe Abbildung 3.7). Diese lag im CaMKII δ -Knockout mit $873,5 \pm 65,9$ a.U.F. (*engl.: arbitrary unit of fluorescence*) deutlich höher als im Flox mit $650,4 \pm 38,8$ a.U.F. ($P < 0,05$). Damit einhergehend fand sich in CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten auch eine verkürzte diastolische Sarkomerlänge ($1,797 \pm 0,008$ μm im Flox vs. $1,775 \pm 0,008$ μm im CaMKII δ -KO; $P < 0,05$).

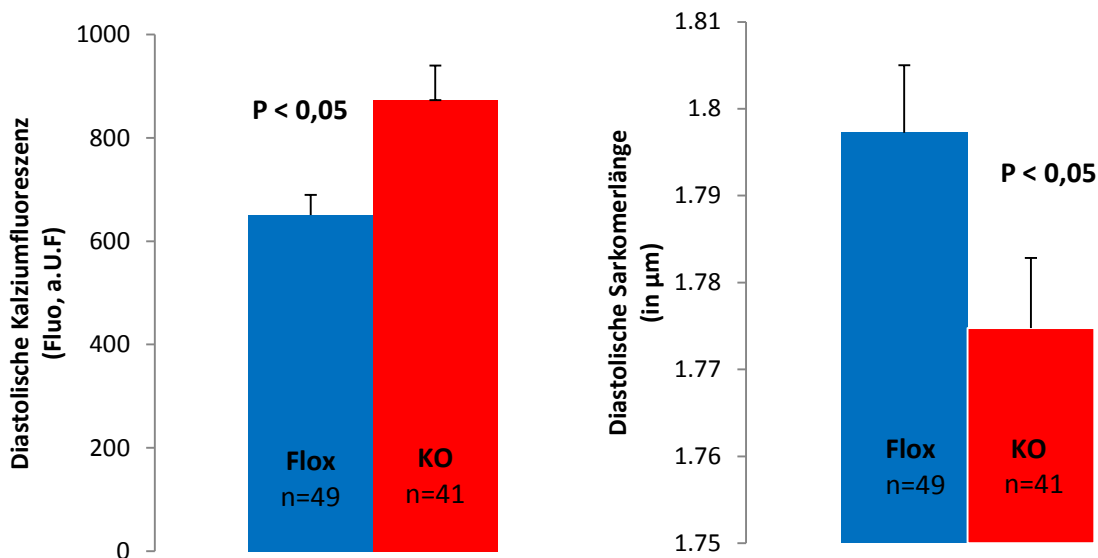


Abbildung 3.7 – Diastolische Kalziumfluoreszenz und Sarkomerlänge unter Kontrollbedingungen. Links: die mittels Fluo-3-AM bestimmte diastolische Kalziumfluoreszenz ist im CaMKII δ -Knockout signifikant höher als im Flox. Rechts: die diastolische Sarkomerlänge ist im CaMKII δ -Knockout signifikant niedriger als im Flox. a.U.F = *arbitrary unit of fluorescence* (*engl.*). Flox: n=49 aus 13 Mäusen; KO: n=41 aus 12 Mäusen

Betrachtet man im Verlauf der Azidose die diastolische Kalziumfluoreszenz (siehe Abbildung 3.8), die zur besseren Vergleichbarkeit auf die in der normaziden Kontrollphase ermittelten Werte normiert wurde ($= 100 \pm 0$ %), zeigte sich innerhalb der ersten 4 min der Azidose (frühe Azidose) zunächst ein nahezu identischer diskreter Anstieg des diastolischen Kalziums auf $101,7 \pm 2,4$ % (im Flox) vs. $101,2 \pm 2,1$ % (im Knockout; jeweils $P = n.s.$). Im weiteren Verlauf der Azidose setzte sich dieser Trend im Knockout auf $102,8 \pm 2,8$ % weiter fort, wohingegen es beim Flox zu einer signifikanten Abnahme der diastolischen Kalziumfluoreszenz auf $94,8 \pm 3,3$ % kam ($P < 0,05$ vs. frühe Azidose sowie $P < 0,05$ vs.

Knockout). Nach Auswaschen mit Kontrolllösung sank die diastolische Kalziumfluoreszenz in beiden Gruppen auf $95,4 \pm 3,8$ % im Knockout vs. $88,3 \pm 3,7$ % im Flox (jeweils $P < 0,05$ vs. späte Azidose) ab.

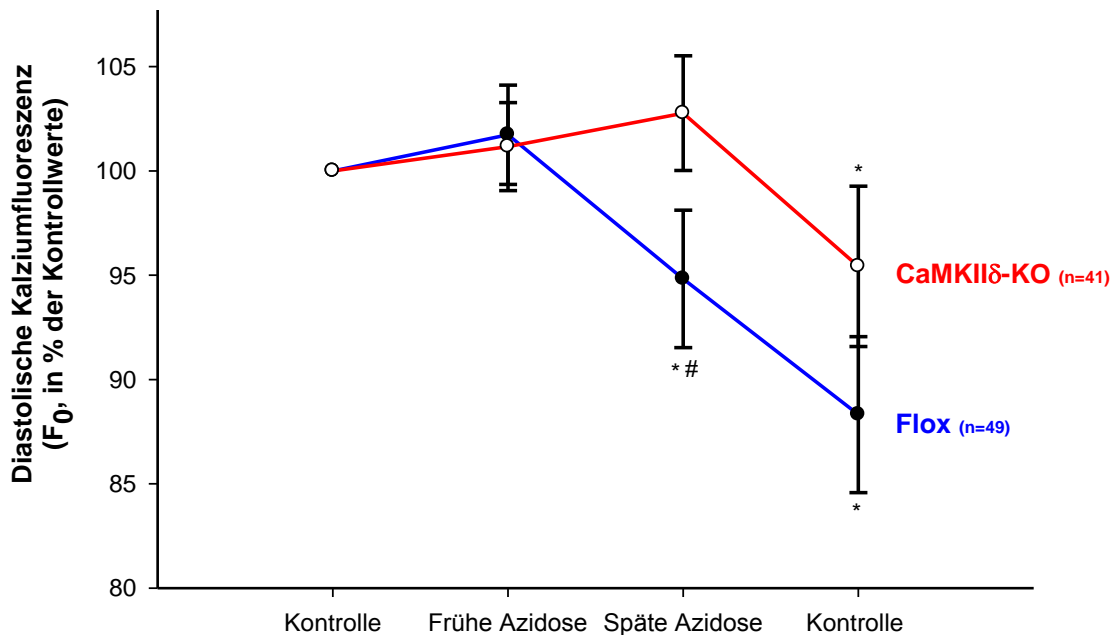


Abbildung 3.8 – Diastolische Kalziumfluoreszenz bei isolierten CaMKII δ -KO- vs. Flox-Kardiomyozyten im Verlauf der Azidose. Während die diastolische Kalziumfluoreszenz beim Flox im Verlauf der Azidose signifikant abnimmt, kommt es bei CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten über den gesamten Verlauf der Azidose zu einer tendenziellen leichten Zunahme.

* signifikante Veränderung gegenüber der vorherigen Phase; # signifikante Veränderung gegenüber dem anderem Genotyp. Flox: n=49 aus 13 Mäusen; KO: n=41 aus 12 Mäusen

Zusammenfassend zeigten sich sowohl unter Kontrollbedingungen als auch im Verlauf der Azidose deutliche Unterschiede im diastolischen Kalziumgehalt. Dieser war in CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten über alle Phasen hinweg deutlich erhöht gegenüber Flox-Kardiomyozyten, wobei die Unterschiede im Verlauf der Azidose weiter zunahm. Somit scheint eine genetische Inhibition der δ -Isoform der CaMKII insbesondere die relative Wiederabnahme des diastolischen Kalziums in der Spätphase der Azidose zu verhindern.

Um einen Einfluss des Sarkoplasmatischen Retikulums auf die Unterschiede im diastolischen Kalzium und auf das unterschiedliche Verhalten beider Genotypen im Verlauf der Azidose zu untersuchen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums mittels Koffein bestimmt.

3.2.2 Auswirkungen von CaMKII δ -KO auf den SR-Kalziumgehalt während der Azidose bei isolierten Kardiomyozyten

Bei Kontrollkardiomyozyten (Flox) kam es im Verlauf der Azidose zu einer Erhöhung des Kalziumgehalts des Sarkoplasmatischen Retikulums. Dagegen konnte gezeigt werden, dass eine genetische Deletion der δ -Isoform der CaMKII eine Erhöhung des Kalziumgehalts des Sarkoplasmatischen Retikulums im Verlauf der Azidose verhindert.

Zur qualitativen Beurteilung des SR-Kalziumgehalts wurden Messungen mit Koffein durchgeführt. Dieses führt, wie in Abschnitt 2.4 (S. 43) beschrieben, durch Öffnen der Ryanodinrezeptoren zu einer Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum, wodurch ein rascher Anstieg des mit Fluo-3-AM ermittelten intrazellulären Kalziums resultiert. Abbildung 3.9 zeigt charakteristische Originaltransienten. Dabei kam es bei der dargestellten Flox-Zelle über den gesamten Verlauf der Azidose zu einer Zunahme der koffeininduzierten Kalziumtransienten, während diese bei der beispielhaft dargestellten CaMKII δ -KO-Zelle im Verlauf der Azidose abnahmen.

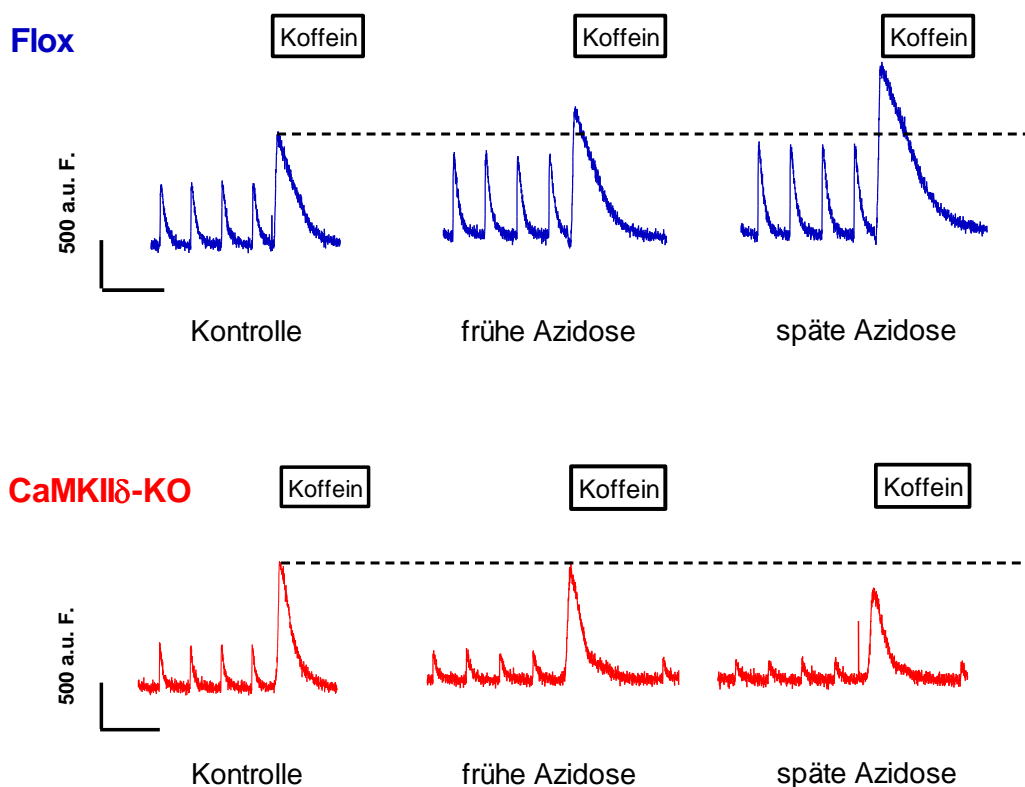


Abbildung 3.9 – Beispielhafte Koffein-Originaltransienten bei isolierten Kardiomyozyten aus einer CaMKII δ -KO vs. Kontrollmaus (Flox). Unmittelbar nach Pausieren der elektrischen Stimulation wurde ein Tropfen Koffein direkt neben die untersuchte Zelle gegeben. Dadurch kam es zu einer Ausschüttung des SR-Kalziumgehalts ins Zytoplasma. Je höher der mit Fluo-3-AM gemessene koffeininduzierte Kalziumtransient ist, desto höher ist der SR-Kalziumgehalt. Die Abbildung zeigt, dass der koffeininduzierte Kalziumtransient bei der beispielhaft dargestellten Flox-Maus über den gesamten Verlauf der Azidose ansteigt, während es bei der typischen CaMKII δ -KO-Zelle zu einer Abnahme kommt. *a.u.F.* = *arbitrary unit of fluorescence* (engl.)

Die Durchschnittswerte aller mit Koffein gemessenen Zellen werden in Abbildung 3.10 dargestellt. Hierbei zeigten CaMKII δ -Knockout- und Flox-Kardiomyozyten in der Kontrollphase zunächst einen annähernd identischen Koffeintransienten als Maß für den Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums.

Im Verlauf der Azidose kam es im Flox ausgehend von einem Kontrollwert von $2,2 \pm 0,17$ a.U.F. zu einem kontinuierlichen Anstieg der koffeininduzierten Fluoreszenz und somit des Kalziumgehalts des Sarkoplasmatischen Retikulums über die gesamte Azidose. Die regelmäßig alle 2 min durchgeführten Messungen des Koffeingehalts ergaben in der frühen Azidose nach 2 min $2,31 \pm 0,21$ a.U.F. sowie nach 4 min $2,39 \pm 0,23$ a.U.F. In der späten Azidose stiegen die Werte weiter auf $2,51 \pm 0,26$ a.U.F. (nach 6 min Azidose), $2,61 \pm 0,3$ a.U.F. (nach 8 min Azidose; $P < 0,05$ vs. frühe Azidose) und $2,66 \pm 0,33$ a.U.F. (nach 10 min Azidose; $P < 0,05$ vs. frühe Azidose).

Die Zellen des CaMKII δ -Knockouts zeigten einen signifikant anderen Verlauf der koffeininduzierten Fluoreszenzwerte und somit des SR-Kalziumgehalts ($P < 0,05$ im ANOVA). Durch die genetische Inhibition der δ -Isoform blieb der Anstieg des SR-Kalziumgehalts im Verlauf der Azidose aus. Stattdessen sanken die koffeininduzierten Kalziumtransienten von $2,25 \pm 0,15$ a.U.F. (nach 2 min Azidose) über $2,08 \pm 0,12$ a.U.F. (nach 4 min Azidose), $1,86 \pm 0,11$ a.U.F. (nach 6 min Azidose; $P < 0,05$ vs. frühe Azidose) und $1,64 \pm 0,14$ a.U.F. (nach 8 min Azidose; $P < 0,05$ vs. frühe Azidose und vs. Flox) auf $1,49 \pm 0,15$ a.U.F. am Ende der 10-minütigen Azidose ($P < 0,05$ vs. frühe Azidose und vs. Flox).

Somit zeigten beide Genotypen im Verlauf der Azidose einen signifikant unterschiedlichen SR-Kalziumgehalt. Während es den Kontrollkardiomyozyten gelang, das Sarkoplasmatische Retikulum mit Kalzium zu beladen, blieb dies beim CaMKII δ -KO aus. Mechanismen, die im Zusammenhang mit der δ -Isoform der CaMKII stehen, scheinen somit essentiell für die Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums im Verlauf der Azidose zu sein.

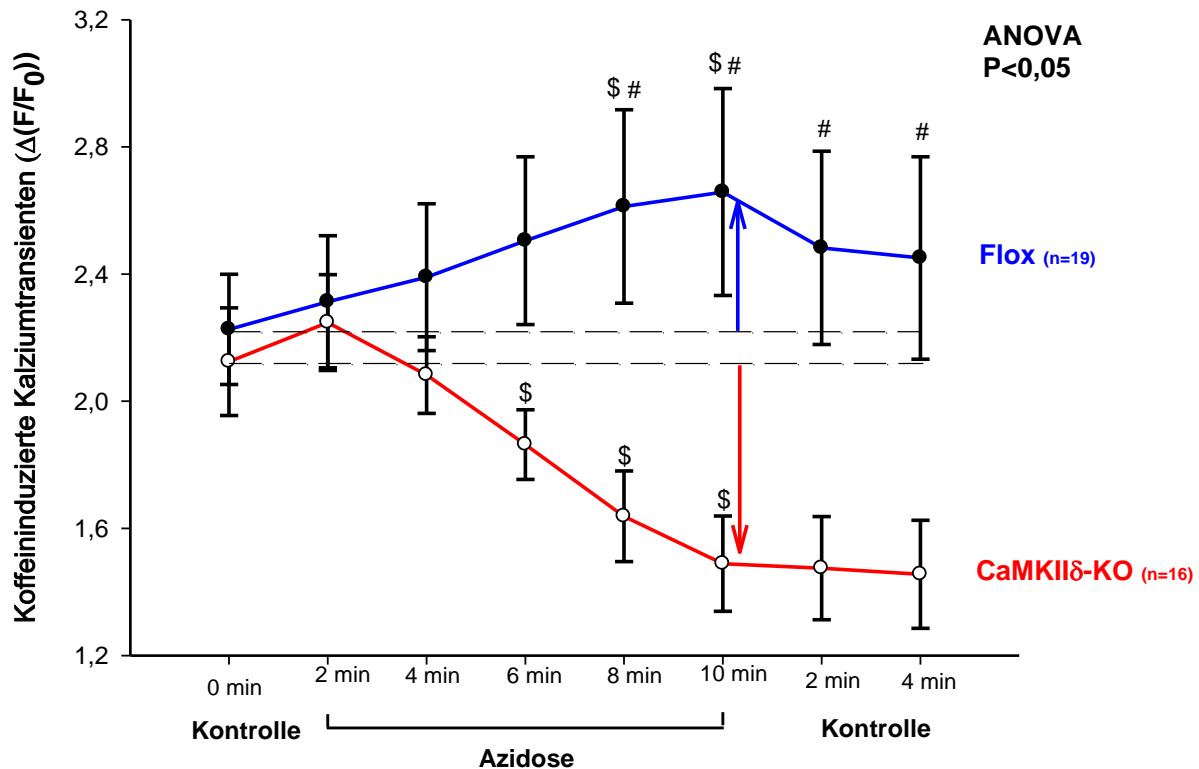


Abbildung 3.10 – Koffeininduzierte Kalziumtransienten im Verlauf einer Azidose bei isolierten CaMKIIδ-KO- vs. Kontrollkardiomyozyten (Flox). Gemessen mit Fluo-3-AM alle 2 min. Während es beim Flox zu einer kontinuierlichen Zunahme der koffeininduzierten Kalziumtransienten als qualitativem Maß für den SR-Kalziumgehalt kommt, sinken diese beim CaMKIIδ-KO im Verlauf der Azidose kontinuierlich ab. # signifikant verschieden zwischen beiden Genotypen; \$ signifikant verschieden im Vergleich zur frühen Azidose (2 min). Flox: n=19 aus 7 Mäusen; KO: n=16 aus 6 Mäusen

3.3 Effekt von CaMKIIδ-KO auf den Natrium/Kalzium-Austauscher im Verlauf der Azidose bei isolierten Kardiomyozyten

Da auch eine verminderte Kalziumextrusion für das im CaMKIIδ-KO erhöhte diastolische Kalzium mitverantwortlich sein könnte, wurde die Aktivität des Natrium/Kalzium-Austauscher (NCX) mithilfe der Relaxationszeit der Koffeintransienten (τ_{koffein}) näherungsweise ermittelt.

Hierbei zeigte sich bei beiden Genotypen mit Eintritt in die Azidose zunächst eine leichte Abnahme der NCX-Aktivität im Sinne eines verlangsamten Abfalls der Koffeintransienten (d.h. τ_{koffein} stieg an; siehe Abbildung 3.11). Während die NCX-Aktivität in den Kontrollzellen (Flox) im weiteren Verlauf der Azidose stabil blieb bzw. allenfalls diskret weiter abnahm, zeigte sich in CaMKIIδ-KO-Kardiomyozyten in der späten Azidose eine sehr deutliche weitere Abnahme. Erst nach erneutem Umschalten auf die normazide Kontrolllösung nahm die NCX-Aktivität wieder in Richtung des Ausgangsniveaus zu. Somit

wurden die Unterschiede zwischen beiden Genotypen im Verlauf der Azidose zunehmend größer, auch wenn es bereits in der Kontrollphase Hinweise auf eine diskret reduzierte NCX-Aktivität im CaMKII δ -Knockout gab.

Konkret zeigte sich bei Flox-Kardiomyozyten eine Verlangsamung der Abfallskinetik der Koffeintransienten von $0,62 \pm 0,08$ s in der Kontrollphase auf $1,07 \pm 0,08$ s nach 2 min Azidose und $1,07 \pm 0,10$ s nach 4 min Azidose. Im Verlauf der späten Azidose sank diese allenfalls diskret weiter ab bzw. blieb stabil ($1,10 \pm 0,10$ s nach 6 min Azidose; $1,13 \pm 0,09$ s nach 8 min Azidose; $1,19 \pm 0,11$ s nach 10 min Azidose). Nach Rückkehr auf die normazide Kontrolllösung beschleunigte sich die Abfallskinetik wieder auf $1,00 \pm 0,13$ s (nach 2 min) und schließlich $0,73 \pm 0,15$ s (nach 4 min). Signifikante Unterschiede gab es im zeitlichen Verlauf der Flox-Kardiomyozyten nicht.

Bei CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten kam es von der Kontrollphase ($0,97 \pm 0,20$ s) zur frühen Azidose ($1,18 \pm 0,26$ s nach 2 min Azidose; $1,39 \pm 0,14$ s nach 4 min Azidose) zunächst ebenfalls nur zu einer langsamen und statistisch nicht-signifikanten Verlangsamung der Abfallskinetik der Koffeintransienten und somit näherungsweise der NCX-Aktivität. Im weiteren Verlauf der Azidose kam es dann aber zu einer deutlichen Verlangsamung auf $2,28 \pm 0,30$ s (nach 6 min Azidose; $P < 0,05$ vs. Kontrollphase und vs. Flox), $3,04 \pm 0,45$ s (nach 8 min Azidose; $P < 0,05$ vs. Kontrollphase und vs. Flox) und schließlich $2,99 \pm 0,40$ s (nach 10 min Azidose; $P < 0,05$ vs. Kontrollphase und vs. Flox). Nach erneutem Umschalten auf die normazide Kontrolllösung beschleunigte sich die Koffeintransienten-Abfallskinetik wieder deutlich auf zunächst $2,16 \pm 0,45$ s (2 min Kontrolllösung; $P < 0,05$ vs. späte Azidose und vs. Flox) und letztlich $2,02 \pm 0,38$ s (4 min Kontrolllösung; $P < 0,05$ vs. späte Azidose und vs. Flox).

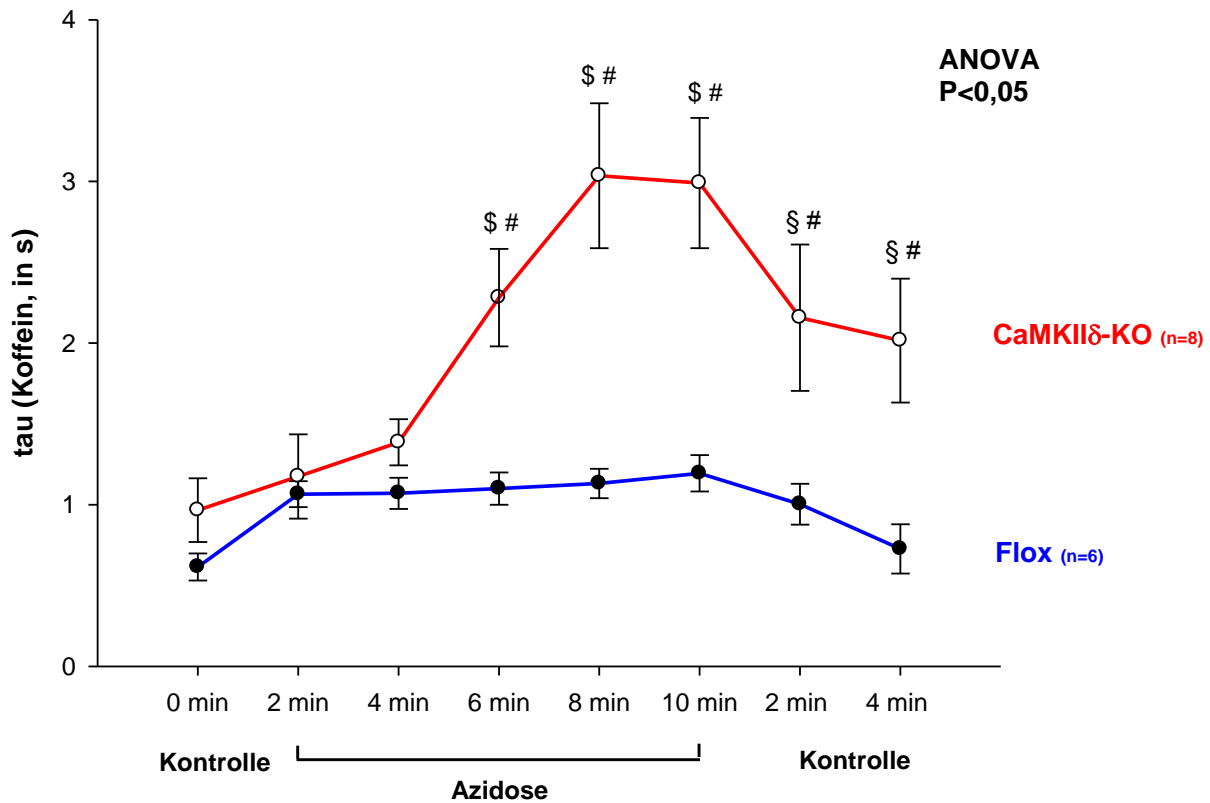


Abbildung 3.11 – Abfallskinetik der Koffeintransienten zur Beurteilung der Aktivität des Natrium/Kalzium-Austauschers (NCX) bei isolierten Kardiomyozyten von CaMKII δ -KO vs. Flox im Verlauf einer Azidose. Zu Beginn der Azidose kommt es bei beiden Genotypen zu einer diskreten (nicht-signifikanten) Verlangsamung des Koffeintransientenabfalls und somit näherungsweise der NCX-Aktivität. Während diese im weiteren Verlauf bei den Kontrollzellen (Flox) stabil bleibt bzw. allenfalls diskret weiter abnimmt, kommt es bei CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten in der späten Azidose zu einer weiteren, deutlichen Verlangsamung des Koffeintransientenabfalls. \$ signifikant im Vergleich zur Kontrollphase; § signifikant im Vergleich zur späten Azidose (10 min); # signifikant gegenüber dem anderen Genotyp. Flox: n=6 aus 5 Mäusen; KO: n=8 aus 6 Mäusen

3.4 Einfluss der δ -Isoform der CaMKII auf die spätazidotische Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten bei isolierten Kardiomyozyten

3.4.1 Einfluss der δ -Isoform der CaMKII auf die Inzidenz der spätphasigen Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten während der Azidose

Wie bereits im Abschnitt 1.5 (S. 21) im Detail beschrieben, gilt die Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten als charakteristisches Merkmal einer Azidose und wird v.a. auf CaMKII-abhängige Prozesse zurückgeführt (MATTIAZZI et al. 2007).

Daher wurde bei beiden Genotypen der Anteil an Zellen ermittelt, die im Verlauf einer Azidose nicht nur stabile, sondern erneut ansteigende Kalziumtransienten und Kontraktilität zeigten. Bemerkenswerterweise fanden sich während der Messungen vereinzelt auch CaMKII δ -Knockout-

Kardiomyozyten, die trotz des Fehlens der δ -Isoform eine Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten im Verlauf der Azidose zeigten.

Abbildung 3.12 zeigt eine Gegenüberstellung der Inzidenzen von spätphasigen Wiedererholungen in beiden Genotypen. Daraus ist ersichtlich, dass die Inzidenz im CaMKII δ -Knockout mit gerade einmal 12 % der gemessenen Zellen sehr viel niedriger war als im Flox mit 57 % ($P < 0,05$ im Fisher's Exact Test). Dies erklärt, weshalb auch die Durchschnittswerte für Kontraktilität und Kalziumtransienten in der späten Azidose im Flox stabil bzw. diskret ansteigend waren, wohingegen es im CaMKII δ -KO zu einer deutlichen Abnahme dieser Parameter kam (siehe Abbildungen 3.3 und 3.5).

Dennoch bleibt festzuhalten, dass eine genetische Inhibition der delta-Isoform der CaMKII nicht zu einem völligen Ausbleiben der für den Flox typischen spätphasigen Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten führt, sondern diese lediglich deutlich verringert.

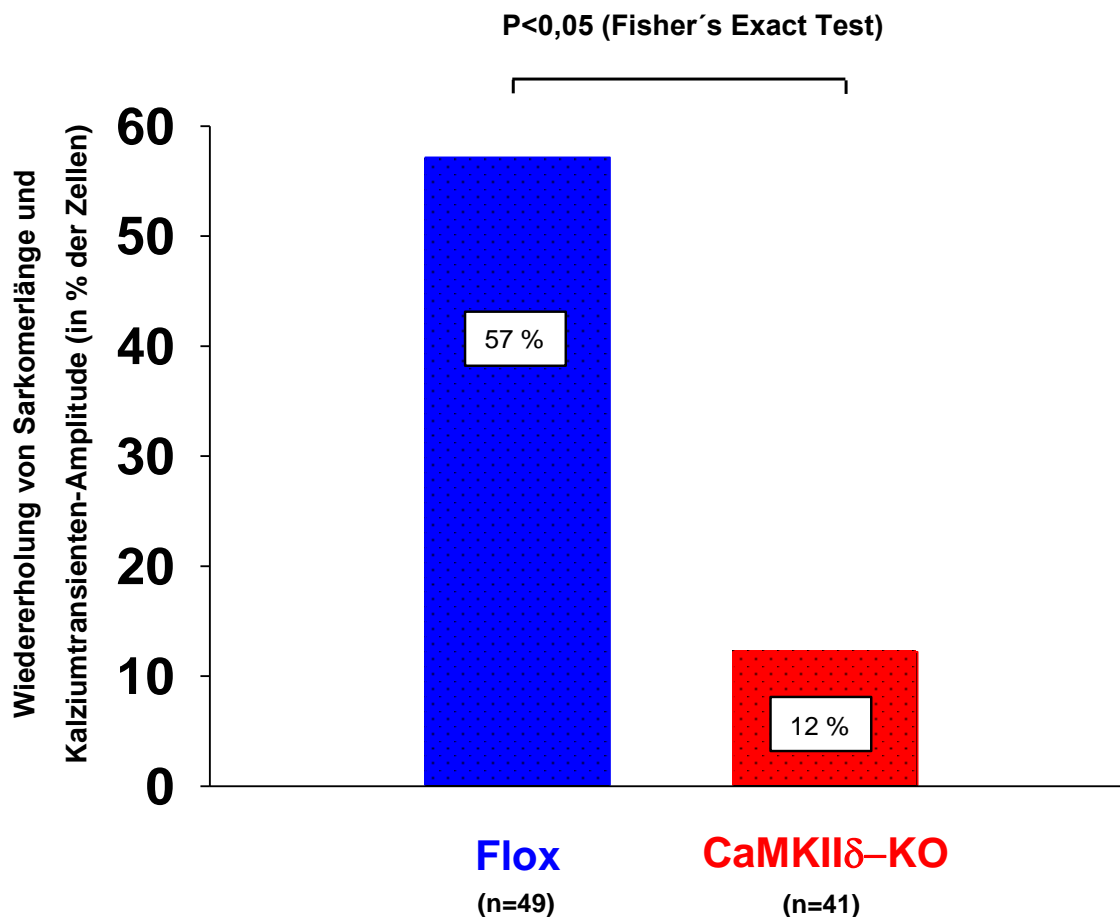


Abbildung 3.12 – Inzidenz der spätazidotischen Wiedererholung von Sarkomerlänge und Kalziumtransienten-Amplitude bei CaMKII δ -KO- vs. Flox-Kardiomyozyten. CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten zeigen signifikant seltener eine Wiedererholung von Sarkomerlänge und Kalziumtransienten-Amplitude im Verlauf einer Azidose. Flox: $n=49$ aus 13 Mäusen; KO: $n=41$ aus 12 Mäusen

3.4.2 CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten mit Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten

Abbildung 3.13 zeigt beispielhaft Originaltransienten eines CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten, der nach initialem Abfall in der frühen Azidose eine Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten zeigte.

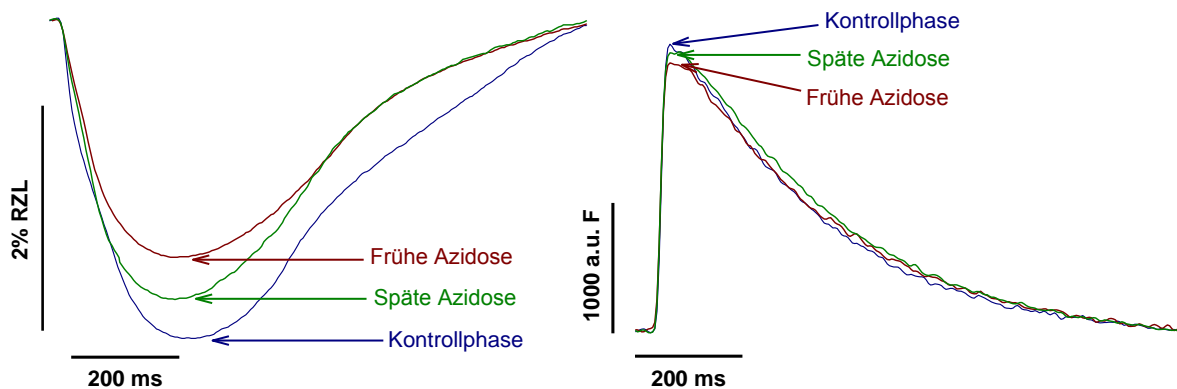


Abbildung 3.13 – Originalabbildung eines CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten, der eine Wiedererholung von Myozytenverkürzung (links) und Kalziumtransienten (rechts) zeigte. RZL = Ruhezelllänge; a.u.F. = arbitrary unit of fluorescence

Interessanterweise unterschieden sich die spätphasigen Wiedererholungen der CaMKII δ -Knockout-Zellen von denen in Kontrollzellen (Flox). Abbildung 3.14 zeigt den Vergleich ausschließlich der Flox- und CaMKII δ -Knockout-Zellen, die eine Wiedererholung von fraktioneller Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten im Verlauf der Azidose aufwiesen. Dabei sind alle Werte auf die Kontrollphase normiert, die als 100 % definiert wurde.

Während Flox-Zellen von früher zu später Azidose sowohl in Bezug auf fraktionelle Myozytenverkürzung, Kalziumtransienten-Amplitude, als auch Relaxationszeiten eine signifikante Wiederzunahme bzw. Wiederbeschleunigung zeigten, fiel diese bei den CaMKII δ -Knockout-Zellen trotz der Selektion geringer aus. Innerhalb der Zellpopulation mit Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten scheint das Ausmaß der Wiedererholung bei Kardiomyozyten mit genetischer Inhibition der δ -Isoform der CaMKII demzufolge schwächer zu sein.

Konkret zeigten die selektierten Flox-Zellen in Bezug auf die normierte fraktionelle Myozytenverkürzung eine signifikante Wiederzunahme von $42,2 \pm 3,7$ % in der frühen Azidose auf $59,1 \pm 4,9$ % in der späten Azidose ($P < 0,05$ vs. frühe Azidose). Bei CaMKII δ -Knockout-Zellen mit Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten fiel diese etwas schwächer und somit

nicht statistisch signifikant aus mit $49,5 \pm 6,7$ % in der frühen Azidose und $59,3 \pm 8,3$ % in der späten Azidose ($P=n.s.$ vs. frühe Azidose).

Ähnlich waren die Ergebnisse bei der auf die Kontrollphase normierten Kalziumtransienten-Amplitude. Diese stieg im Flox signifikant von $80,5 \pm 3,4$ % (frühe Azidose) auf $94,4 \pm 4,8$ % (späte Azidose; $P < 0,05$ vs. frühe Azidose) an. Die CaMKII δ -Knockout-Zellen erreichten dagegen im arithmetischen Mittel nur eine Zunahme von $80,4 \pm 9,5$ % auf $89,2 \pm 9,9$ % ($P=$ nicht signifikant vs. frühe Azidose).

Einhergehend mit diesen Unterschieden zeigte sich auch ein unterschiedliches Relaxationsverhalten. Wie schon bei den Durchschnittswerten aller gemessenen Zellen (siehe Abbildung 3.6) zu beobachten war, kam es auch bei der Selektion auf sich in Bezug auf Kontraktilität und Kalziumtransienten wiedererholende Flox-Zellen zu einer signifikanten Wiederbeschleunigung der Relaxationszeit der Kalziumtransienten (τ_{Ca}) im Verlauf der Azidose.

So kam es im Flox zu einer starken Wiederbeschleunigung von τ_{Ca} von $121,0 \pm 3,9$ % (frühe Azidose) auf $109,4 \pm 3,6$ % (späte Azidose; $P < 0,05$ vs. frühe Azidose). Diese Wiederbeschleunigung könnte, wie bereits im Abschnitt 3.2 (S. 58) beschrieben, den Anstieg des SR-Kalziumgehalts und letztendlich den Anstieg der Kalziumtransienten und der Kontraktilität im Verlauf der Azidose erklären.

Bei den selektierten CaMKII δ -Knockout-Zellen, die zwar eine Wiedererholung von Kalziumtransienten und Kontraktilität zeigten, fand sich dagegen keine Wiederbeschleunigung von τ_{Ca} und somit der SERCA-Aktivität. Die Werte änderten sich lediglich im Rahmen der normalen Messwertschwankungen von $128,6 \pm 9,3$ % (frühe Azidose) auf $127,4 \pm 10,4$ % (späte Azidose; $P=$ nicht signifikant vs. frühe Azidose).

Zusammenfassend scheint die delta-Isoform der CaMKII somit trotz des vereinzelten Auftretens von spätazidotischen Wiedererholungen von fraktioneller Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten-Amplitude essentiell für die Wiederbeschleunigung von τ_{Ca} und somit der SERCA zu sein, die bei den Flox-Zellen der entscheidende Faktor für die spätazidotische Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten zu sein scheint. Den vereinzelten Wiedererholungen im CaMKII δ -KO könnte dagegen ein anderer Mechanismus zugrunde liegen.

Ergebnisse

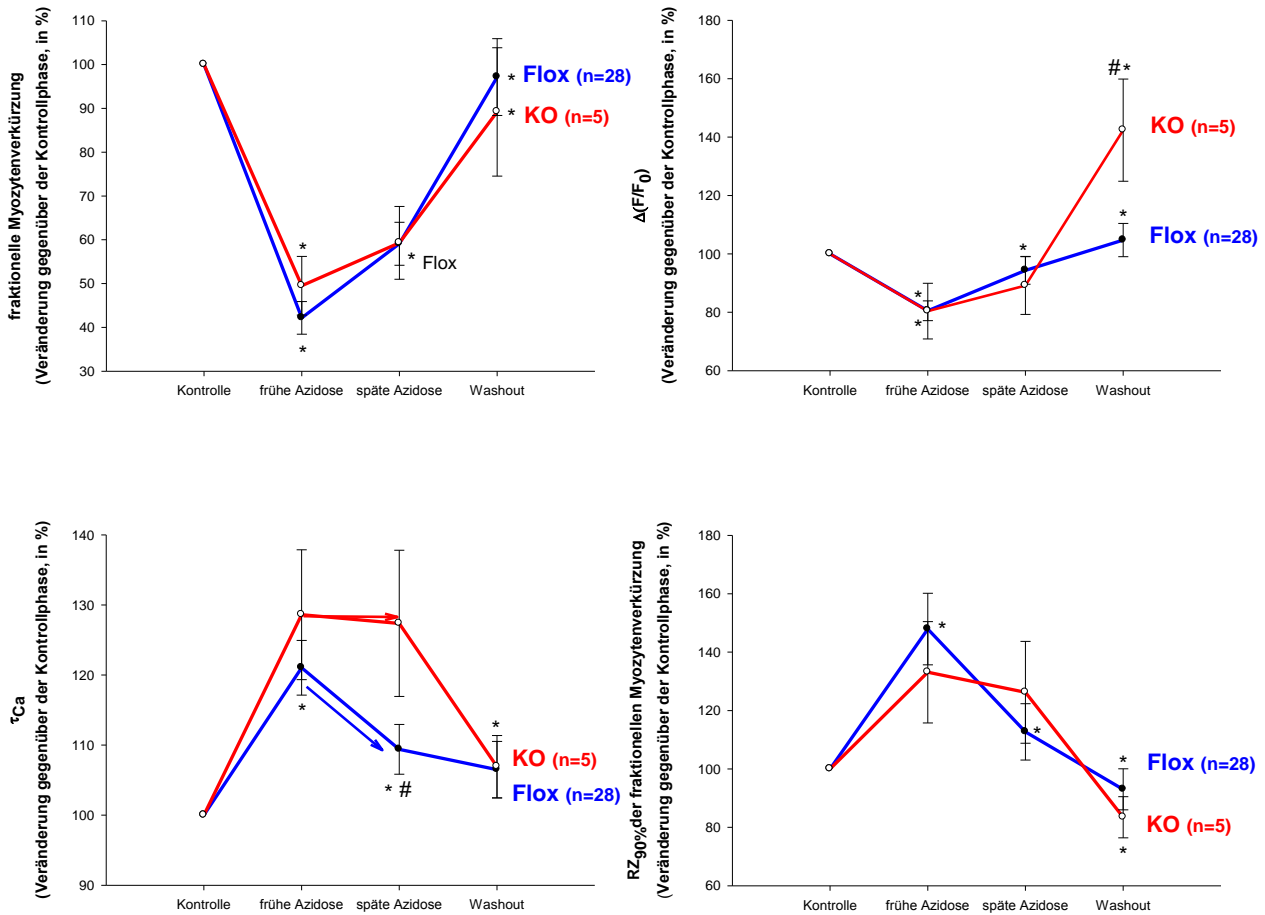


Abbildung 3.14 – Mittelwerte der fraktionellen Myozytenverkürzung, Kalziumtransienten-Amplitude ($\Delta(F/F_0)$), Relaxationszeit der Kalziumtransienten (τ_{Ca}) und der fraktionellen Myozytenverkürzung (RZ90%) ausschließlich bei isolierten CaMKII δ -KO- und Flox-Kardiomyozyten, die eine Wiedererholung von fraktioneller Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten-Amplitude im Verlauf der Azidose zeigen. Es findet sich bei Flox-Zellen eine stärkere Wiedererholung von fraktioneller Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten-Amplitude als bei CaMKII δ -KO-Zellen. Ursächlich könnte ein anderer Mechanismus sein, der für die Wiederholungsvorgänge verantwortlich ist. So stehen diese beim Flox möglicherweise im Zusammenhang zu einer Wiederbeschleunigung der Relaxationszeiten, im Sinne einer verstärkten SERCA-Aktivität. Diese bleibt im CaMKII δ -KO allerdings aus. * signifikant gegenüber vorheriger Phase; # signifikant gegenüber anderem Genotyp. Flox: $n=28$ aus 12 Mäusen; KO: $n=5$ aus 5 Mäusen

3.5 Das Verhalten von CaMKII δ -KO- und Flox-Kardiomyozyten nach pharmakologischer Inhibition aller Isoformen der CaMKII durch KN-93 im Verlauf der Azidose

In der Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse zeigten sich bereits unter Kontrollbedingungen, v.a. aber im Verlauf der Azidose, Unterschiede zwischen Flox- und CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine genetische Inhibition der δ -Isoform der CaMKII die im Flox zu beobachtenden spätaqidotischen Erhaltungsvorgänge fast vollständig verhindert. Um deren CaMKII-Abhängigkeit zu belegen, wurden Experimente mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 durchgeführt.

Da KN-93 zu einer vollständigen Inhibition aller CaMKII-Isoformen führt (siehe Abschnitt 1.4; S. 19), ermöglicht es zudem, die CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten hinsichtlich der Wirkung weiterer CaMKII-Isoformen auf die Azidose zu untersuchen. So könnten möglicherweise andere Isoformen zumindest teilweise kompensatorisch auf die Wiederholungsvorgänge im Verlauf der Azidose wirken.

Aufgrund unspezifischer Effekte von KN-93 (GAO et al. 2006) wurden jeweils Vergleichsuntersuchungen mit dem in Bezug auf die CaMKII-inaktiven KN-92 durchgeführt. Als Indikator zur Beurteilung der spätazidotischen Wiederholungsvorgänge wurden die Kalziumtransienten gewählt. Da im Unterschied zu den bisherigen Versuchen die Myozytenverkürzung nicht als Indikator herangezogen werden sollte, ermöglichte dies die Verwendung eines anderen Fluoreszenzfarbstoffs, Fura-2-AM. Dessen für die vorherigen Versuche bedeutender Nachteil einer stärkeren Kalziumbindung und somit niedrigerer Sarkomverkürzung (siehe Abschnitt 2.2; S. 32) war für diese Versuchsreihe weniger relevant. Stattdessen ermöglichte Fura-2-AM eine häufigere Durchführung von Kalziumtransientenmessungen, da es im Gegensatz zu Fluo-3-AM deutlich geringere Ausbleicheffekte zeigte. Somit war es möglich, genau alle zwei Minuten eine mindestens 20 s andauernde Kalziumtransientenmessung durchzuführen.

3.5.1 Überprüfung der CaMKII-Abhängigkeit der spätazidotischen Erhaltungsvorgänge in isolierten Flox-Kardiomyozyten mittels des CaMKII-Inhibitors KN-93 bzw. seines inaktiven Analogons KN-92

Um zu überprüfen, ob die CaMKII unabdingbar für die Vorgänge in der späten Azidose ist oder ob die spätazidotischen Kalziumtransienten auch ohne die CaMKII aufrechterhalten werden können, wurden Flox-Kardiomyozyten mit einer Kontrolllösung bzw. aziden Lösung (pH 6,75) perfundiert, die zusätzlich den CaMKII-Inhibitor KN-93 (1 μ M) enthielt. Aufgrund weiterer unspezifischer Effekte von KN-93 erfolgte ein Vergleich mit dem in Bezug auf die CaMKII inaktiven Analogon KN-92 (ebenfalls 1 μ M). Abbildung 3.15 stellt beispielhaft charakteristische Originalabbildungen dar. Unter dem inaktiven KN-92 kam es zu Beginn der Azidose zu einem Abfall der mittels Fura-2-AM-gemessenen Kalziumtransienten-Amplitude, die im weiteren Verlauf der Azidose wieder anstieg. Dieser Verlauf entspricht somit dem Verlauf von mit Fluo-2 AM gemessenen Kalziumtransienten in Flox-Zellen (siehe Abbildungen 3.4 und 3.5).

Anders verhält es sich nun bei den mit KN-93 gemessenen Zellen. Durch die vollständige Inhibition aller Isoformen der CaMKII durch KN-93 kam es zwar initial ebenfalls zu einem Absinken der Kalziumtransienten, die anschließende spätazidotische Erhaltung bzw. in diesem Fall sogar

signifikante Wiedererholung derselben blieb allerdings aus. Stattdessen kam es zu einer weiteren Abnahme der Fura-2-AM-Amplitude.

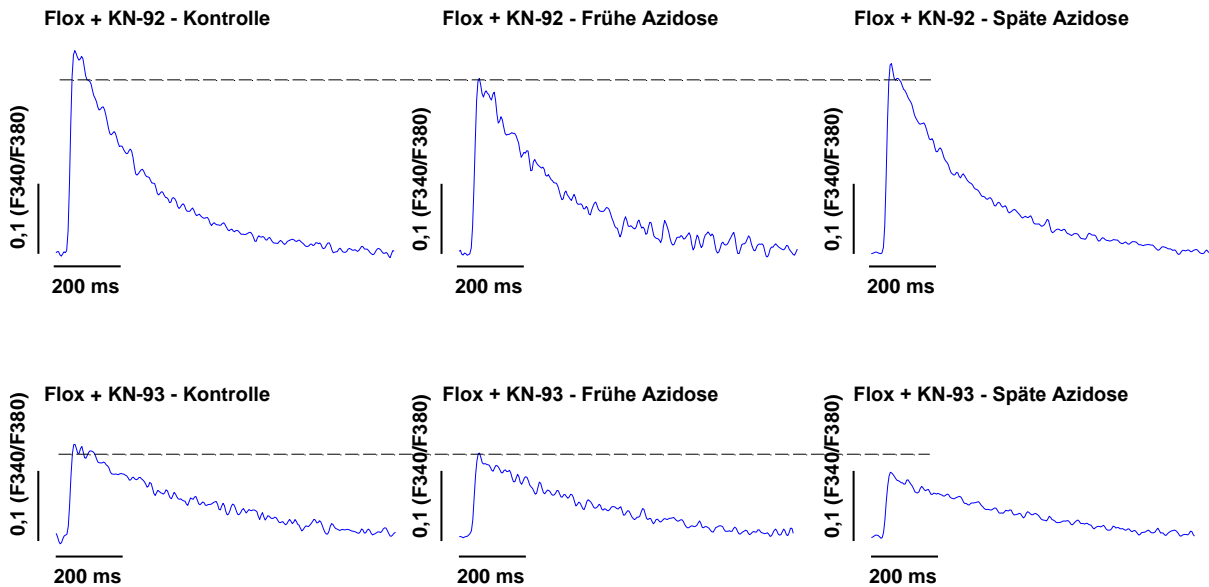


Abbildung 3.15 – Beispielhafte Originalabbildungen der mit Fura-2-AM gemessenen Kalziumtransienten-Amplitude bei Flox-Zellen mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 bzw. dem inaktiven Analogon KN-92. Während die mit KN-92 perfundierte Zelle die Kalziumtransienten-Amplitude in der späten Azidose erhalten und sogar leicht wiedererholen kann, sinkt diese bei Perfusion mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 weiter ab. F_{340nm}/F_{380nm} = Fura-2-AM-Verhältniseinheiten

Einen entsprechenden Verlauf zeigen auch die Durchschnittswerte (siehe Abbildung 3.16) aller nach diesem Protokoll gemessenen Zellen. So fielen die Fura-2-AM-Transienten unter KN-92 zunächst von $0,24 \pm 0,03$ Fura-2-AM-Verhältniseinheiten ($F_{340\text{ nm}} / F_{380\text{ nm}}$) in der Kontrollphase auf $0,21 \pm 0,02$ Einheiten in der frühen Azidose ab ($P < 0,05$ vs. Kontrollphase). Im weiteren Verlauf der Azidose erholten sie sich wieder auf $0,24 \pm 0,03$ Fura-2-AM-Verhältniseinheiten ($P < 0,05$ vs. frühe Azidose). Ein anschließendes Auswaschen mit normazider KN-92-Lösung führte zu einem weiteren Anstieg der Kalziumtransienten auf $0,32 \pm 0,04$ Einheiten ($P < 0,05$ vs. späte Azidose).

Unter KN-93 ergab sich dagegen in der Spätphase der Azidose ein anderes Ergebnis. Zunächst sanken die Transienten auch hier zwischen Kontrollphase und früher Azidose von $0,13 \pm 0,02$ auf $0,11 \pm 0,02$ Fura-2-AM-Verhältniseinheiten ($P = \text{n.s.}$). Dieser Abfall setzte sich aber in der späten Azidose auf $0,09 \pm 0,02$ Fura-2-AM-Verhältniseinheiten fort ($P < 0,05$ vs. Kontrollphase). Das anschließende Auswaschen mit normazider Kontrolllösung ließ die Kalziumtransienten wieder auf $0,18 \pm 0,03$ Einheiten ansteigen ($P < 0,05$ vs. späte Azidose).

Somit zeigt diese Messserie, dass eine vollständige CaMKII-Inhibition mittels KN-93 die spätazidotischen Erhaltungsvorgänge verhindern kann. Die CaMKII scheint somit von entscheidender Bedeutung für die Vorgänge zu sein, die für die Aufrechterhaltung bzw. Wiedererholung der Kalziumtransienten im Verlauf der Azidose verantwortlich sind.

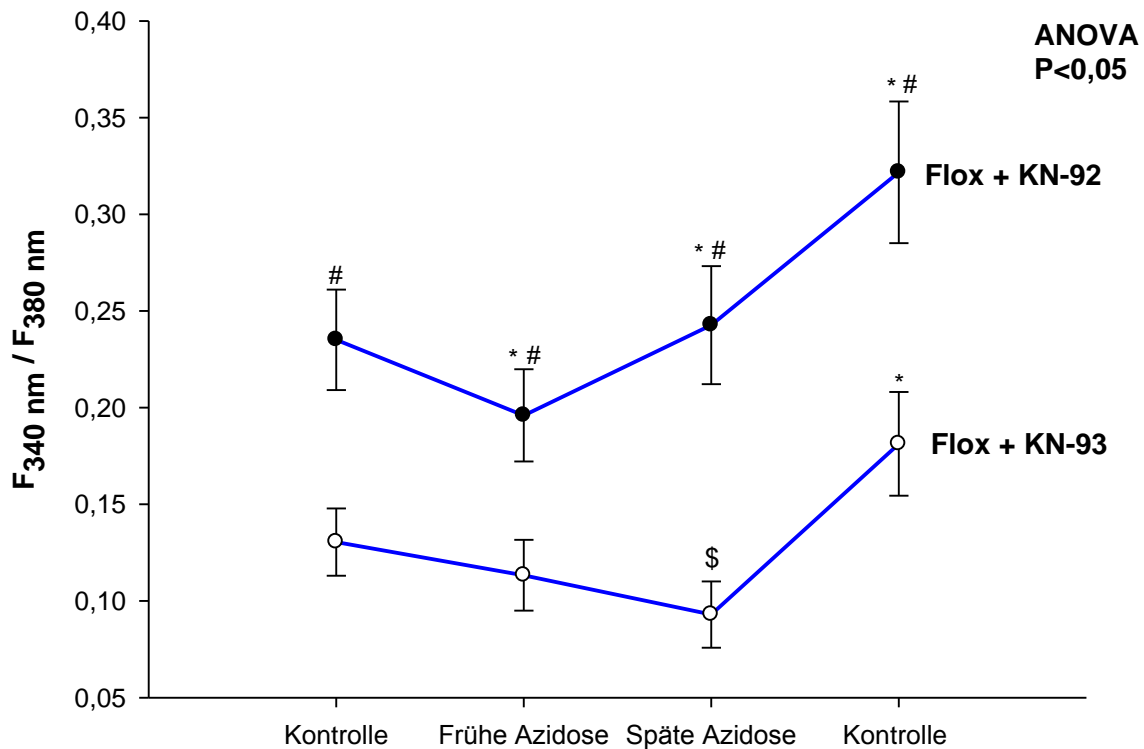


Abbildung 3.16 – Verlauf der Kalziumtransienten-Amplitude bei isolierten Kontroll-Kardiomyozyten (Flox) unter dem CaMKII-Inhibitor KN-93 vs. dem inaktiven Analogon KN-92 während der Azidose. Der CaMKII-Inhibitor KN-93 verhindert bei Flox-Kardiomyozyten die Wiedererholung der Kalziumtransienten im Verlauf der Azidose. F_{340nm}/F_{380nm} = Fura-2-AM-Verhältniseinheiten; * signifikant gegenüber der vorherigen Phase; \$ signifikant gegenüber der Kontrollphase; # signifikant gegenüber dem anderen Genotyp. Flox + KN-93: n=16 aus 8 Mäusen; Flox + KN-92: n=14 aus 6 Mäusen

3.5.2 Auswirkungen einer zusätzlichen, pharmakologischen Inhibition aller CaMKII-Isoformen durch KN-93 auf isolierte CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten im Verlauf der Azidose

Wie im Abschnitt 3.1 (S. 50) im Detail erörtert wird, kann eine genetische Inhibition der δ -Isoform der CaMKII die bei Kontrollzellen (Flox) beobachteten spätazidotischen Erhaltungsvorgänge fast vollständig verhindern. So kam es bei fast allen CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten in der späten Azidose zu einer weiteren signifikanten Abnahme von fraktioneller Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten. Dennoch gab es, wie in Abbildung 3.12 dargestellt wurde, vereinzelt Kardiomyozyten, die trotz genetischer Inhibition der CaMKII δ eine Wiedezunahme von fraktioneller Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten zeigten. Eine vollständige, pharmakologische Inhibition

aller CaMKII-Isoformen bei Kontrollzellen konnte dagegen jegliche Wiedererholung der Kalziumtransienten verhindern (siehe Abschnitt 3.5.1; S. 70). Um die Bedeutung weiterer CaMKII-Isoformen näher zu untersuchen, wurden bereits hinsichtlich der δ -Isoform inhibierte Kardiomyozyten (CaMKII δ -KO-Zellen) einer die CaMKII vollständig hemmenden KN-93-Lösung ausgesetzt. Zum Vergleich diente das inaktive Analogon KN-92.

Abbildung 3.17 zeigt beispielhaft charakteristische Originaltransienten jeweils einer CaMKII δ -Knockout-Zelle mit KN-92 bzw. KN-93. Dabei verhielten sich die mit KN-92 als dem inaktiven Analogon des pharmakologischen CaMKII-Inhibitors KN-93 gemessenen Zellen ähnlich denen ohne KN-92 (siehe Messreihe mit Fluo-3-AM, Abschnitt 3.1.2, S. 53). So kam es, wie bei der Beispielzelle dargestellt, in fast allen Fällen zu einer Abnahme der Kalziumtransienten zwischen früher und später Azidose. Dennoch resultierten (anders als bei der Messreihe mit CaMKII δ -KO-Zellen unter Fluo-3-AM) Durchschnittswerte mit annähernd konstanten Kalziumtransienten im weiteren Verlauf der Azidose (siehe Abbildung 3.18). Ursächlich dafür waren vereinzelte Kardiomyozyten, die trotz der genetischen CaMKII δ -Inhibition eine leichte Wiedererholung der Kalziumtransienten zeigten. Hierbei ist unbedingt darauf hinzuweisen, dass sich die Kontrollmäuse mit intakter CaMKII-Funktion (Flox) völlig anders verhielten. Bei ihnen stiegen die mit Fura-2-ermittelten Kalziumtransienten im Verlauf der Azidose nicht nur leicht, sondern sehr deutlich an (siehe Abbildungen 3.16 und 3.19).

Im Detail ergaben sich folgende Ergebnisse für die Kalziumtransienten bei CaMKII δ -KO-Zellen unter KN-92. Zunächst sank die Kalziumfluoreszenz von $0,18 \pm 0,01$ Fura-2-AM-Verhältniseinheiten in der Kontrollphase auf $0,15 \pm 0,02$ Fura-2-AM-Verhältniseinheiten in der frühen Azidose. Sie blieb dann bis zur späten Azidose mit $0,16 \pm 0,02$ Fura-2-AM-Verhältniseinheiten nahezu konstant (P =nicht signifikant vs. frühe Azidose). Nach erneutem Umschalten auf eine normazide Kontrolllösung stiegen die Kalziumtransienten wieder deutlich auf $0,25 \pm 0,04$ Fura-2-AM-Verhältniseinheiten an ($P < 0,05$ vs. späte Azidose).

Das eigentlich Interessante ist allerdings der Vergleich mit den Kalziumtransienten unter dem vollständigen CaMKII-Inhibitor KN-93. Hier kam es, wie anhand der beispielhaften Originalabbildung 3.17 gezeigt wird, zu einer deutlichen Abnahme der Kalziumtransienten über die gesamte Azidose. Gemittelt auf alle gemessenen Zellen ergaben sich somit deutlich unterschiedliche Werte zu denen der KN-92-Messreihe. Im Detail kam es zwischen Kontrollphase und früher Azidose mit KN-93 ebenfalls zu einem Absinken von $0,12 \pm 0,01$ auf $0,11 \pm 0,01$ Fluoreszenzeinheiten. Zwischen früher und später Azidose setzte sich nun aber die Fluoreszenzabnahme deutlich auf $0,09 \pm 0,01$ Fluoreszenzeinheiten in der späten Azidose fort ($P < 0,05$ vs. Kontrollphase und $P < 0,05$ vs. KN-92 perfundierte CaMKII δ -KO-Zellen).

Das abschließende Umschalten auf eine normazide Kontrolllösung ließ die Kalziumtransienten erneut auf $0,18 \pm 0,02$ Fluoreszenzeinheiten ansteigen ($P < 0,05$ vs. späte Azidose, $P < 0,05$ vs. KN-92 perfundierte CaMKII δ -Knockout-Zellen).

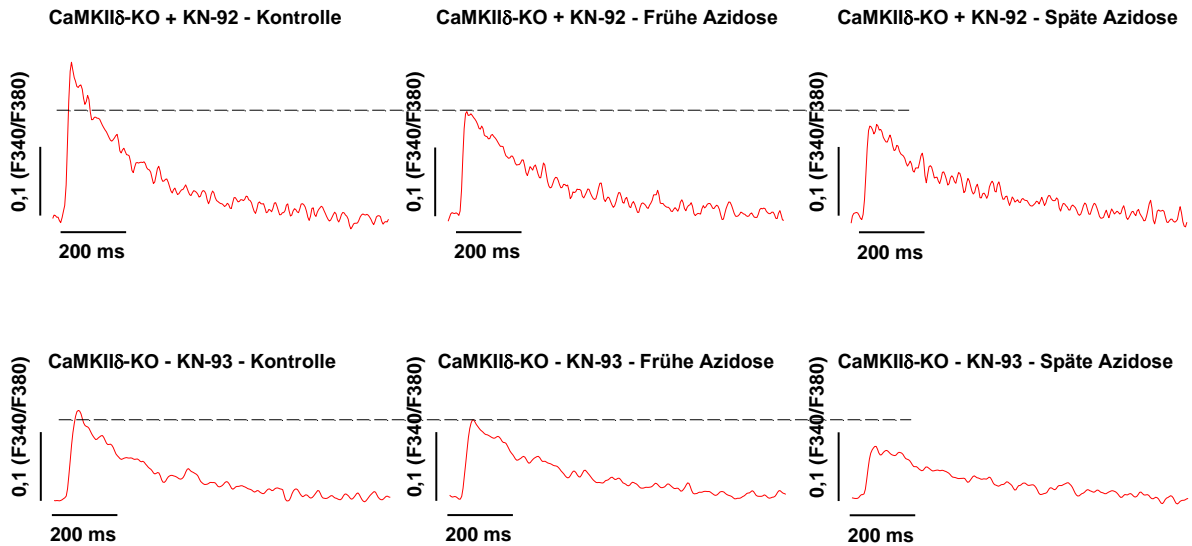


Abbildung 3.17 – Beispielhafte Originalabbildungen der mit Fura-2-AM gemessenen Kalziumtransienten-Amplitude bei CaMKII δ -KO-Zellen mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 bzw. dem inaktiven Analogon KN-92. Sowohl mit KN-92 als auch KN-93 kommt es zu einer Abnahme der Kalziumtransienten über den gesamten Verlauf der Azidose. Unter KN-93 kommt es aber zu einer stärkeren Abnahme der Kalziumtransienten in der späten Azidose. F_{340nm}/F_{380nm} = Fura-2-AM-Verhältniseinheiten

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine vollständige, pharmakologische Inhibition aller CaMKII-Isoformen über den gesamten Verlauf der Azidose eine ausgeprägtere Abnahme der mit Fura-2-AM gemessenen Kalziumtransienten zur Folge hatte als eine alleinige, genetische Inhibition der δ -Isoform.

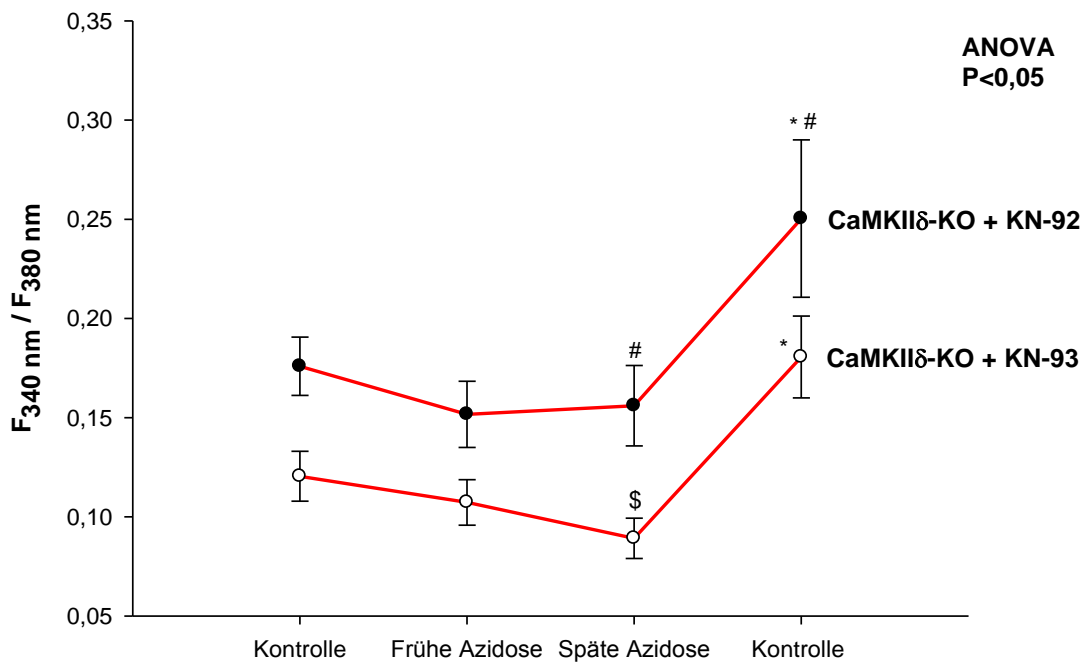


Abbildung 3.18 – Verlauf der Kalziumtransienten-Amplitude bei isolierten CaMKIIδ-KO-Kardiomyozyten unter dem CaMKII-Inhibitor KN-93 vs. dem inaktiven Analogon KN-92 während einer Azidose. Während die Kalziumtransienten unter KN-92 im Verlauf der Azidose weitgehend stabil bleiben, kommt es bei CaMKIIδ-KO-Zellen mit KN-93 zu einer kontinuierlichen Abnahme über den gesamten Verlauf der Azidose. F_{340nm}/F_{380nm} = Fura-2-AM-Verhältniseinheiten. * signifikant gegenüber der vorherigen Phase; \$ signifikant gegenüber der Kontrollphase; # signifikant gegenüber dem anderen Genotyp. KO + KN-93: n=16 aus 11 Mäusen; KO + KN-92: n=9 aus 7 Mäusen

3.5.3 Effekt einer KN-93-vermittelten vollständigen CaMKII-Inhibition auf CaMKIIδ-KO- vs. Kontrollkardiomyozyten (Flox) im Verlauf der Azidose

Abbildung 3.19 stellt die bereits in den beiden vorherigen Abschnitten präsentierten Daten der CaMKIIδ-Knockout- und Flox-Kardiomyozyten mit KN-92 bzw. KN-93 in einer gemeinsamen Abbildung dar. Anders als zuvor werden alle in zweiminütigen Abständen durchgeführten Kalziumfluoreszenzmessungen gezeigt.

Neben den bereits im Detail beschriebenen Ergebnissen zeigt diese Abbildung eindrucksvoll, dass eine vollständige Inhibition aller CaMKII-Isoformen mittels KN-93 bei Flox- und CaMKIIδ-Knockout-Kardiomyozyten zu einem nahezu identischen Verlauf der Kalziumtransienten-Amplitude über das gesamte Versuchsprotokoll führt.

Weiterhin scheint die Kalziumtransienten-Amplitude in der KN-92-Serie bei Flox-Kardiomyozyten bereits in der Kontrollphase etwas höher zu sein als bei CaMKIIδ-Knockout-Kardiomyozyten. Dies erreicht allerdings noch nicht das Signifikanzniveau von $P < 0,05$.

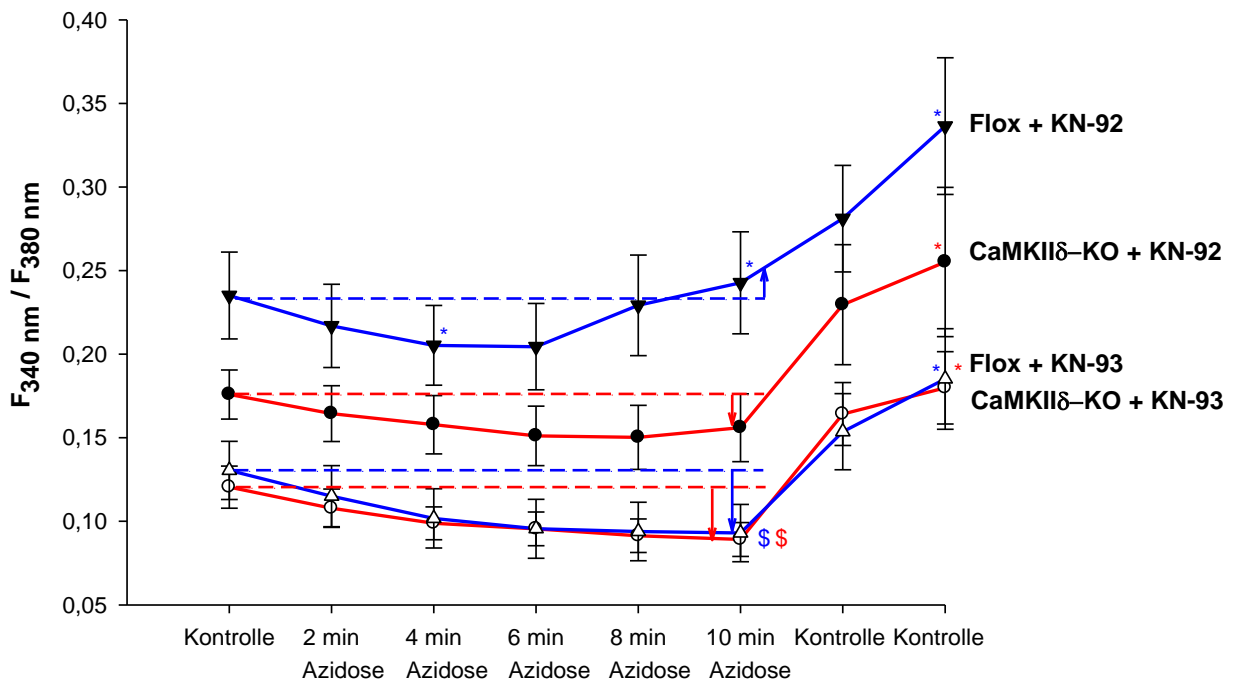


Abbildung 3.19 – Verlauf der Kalziumtransienten-Amplitude bei Flox vs. CaMKIIδ-KO-Kardiomyozyten mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 vs. dem inaktiven Analogon KN-92 über eine 10-minütige Azidose. Während es bei den Kontrollmäusen (Flox) mit KN-92 im Verlauf der Azidose zu einer signifikanten Wiedererholung der Kalziumtransienten-Amplitude kommt, bleibt diese bei CaMKIIδ-KO-Mäusen mit KN-92 aus. Die Inhibition weiterer CaMKII-Isoformen durch KN-93 führt zu einer stärkeren Abnahme der Kalziumtransienten im Verlauf der Azidose. Dies lässt vermuten, dass neben der δ-Isoform weitere CaMKII-Isoformen einen Einfluss auf die Wiedererholung der Kalziumtransienten im Verlauf der Azidose haben könnten.
 * signifikant gegenüber der vorherigen Phase (d.h. Kontrollphase, Azidose bei 2 min oder Azidose bei 10 min); \$ signifikant gegenüber der Kontrollphase. Flox + KN-93: n=16 aus 8 Mäusen; Flox + KN-92: n=14 aus 6 Mäusen; KO + KN-93: n=16 aus 11 Mäusen; KO + KN-92: n=9 aus 7 Mäusen

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten trotz einer unter Kontrollbedingungen weitgehend erhaltenen systolischen Funktion unter der pathophysiologischen Situation einer Azidose eine deutliche Funktionsbeeinträchtigung aufweisen. Während vergleichend untersuchte Kontrollmäuse (Flox) im Verlauf der Azidose eine Wiedererholung bzw. Aufrechterhaltung von Kontraktilität und Kalziumtransienten zeigten, blieb diese bei der Mehrzahl der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten aus. Die Ursache dafür ist am ehesten eine beeinträchtigte Kalziumbeladung des Sarkoplasmatischen Retikulums im Verlauf der Azidose bei CaMKII δ -KO. Dies deutet auf eine wichtige Funktion der δ -Isoform der CaMKII für die Phosphorylierung des SERCA-Regulators Phospholamban hin, wie bereits BACKS et al. (2009) vermuteten. Bei den wenigen Kardiomyozyten, die trotz genetischer Inhibition der CaMKII eine Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten zeigten, könnten andere CaMKII-abhängig regulierte Prozesse von Bedeutung sein.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich für die Klinik schlussfolgern, dass eine therapeutische CaMKII δ -Inhibition, wie sie unter anderem zur Behandlung einer Herzinsuffizienz diskutiert wird (ANDERSON ME 2009), mit einer erheblichen Beeinträchtigung der kardialen Funktion unter einer Azidose einhergehen könnte. Dies sollte in bestimmten klinischen Situationen, wie z.B. einem kardiogenen Schock, berücksichtigt werden.

4.1 Das Verhalten von CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen

Bereits die Untersuchung des CaMKII δ -Knockouts in der Kontrollphase erbrachte einige für das funktionale Verständnis der δ -Isoform interessante Ergebnisse. So zeigte sich zusammenfassend, dass CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten trotz tendenziell beeinträchtigter diastolischer Funktion eine intakte systolische Funktion aufweisen. So war u.a. die diastolische Kalziumkonzentration im CaMKII δ -Knockout signifikant gegenüber Kontrollzellen (Flox) erhöht.

4.1.1 Erhaltene systolische Funktion unter Kontrollbedingungen

Trotz genetischer Ablation der δ -Isoform der CaMKII zeigte sich unter Kontrollbedingungen *in vitro* eine erhaltene systolische Funktion. Um diese zu untersuchen, wurden aus Mäuseventrikeln isolierte CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten mit einer normaziden Lösung perfundiert und mit einer Frequenz

von 1 Hz stimuliert. Im Anschluss wurden sie hinsichtlich der fraktionellen Myozytenverkürzung und der Kalziumtransienten im Epifluoreszenz-Mikroskop untersucht und mit Flox-Kardiomyozyten verglichen.

Dabei zeigten beide Genotypen unter normaziden Bedingungen ähnliche Werte für die fraktionelle Myozytenverkürzung (siehe Abbildung 3.3) und die Kalziumtransienten (siehe Abbildung 3.5; jeweils $P =$ nicht signifikant gegenüber dem anderen Genotyp).

Diese Ergebnisse vereinfachen nicht nur die Interpretation der im Verlauf der Azidose erhobenen Befunde (siehe Abschnitt 3; S. 50); sie liefern auch neue Erkenntnisse über die Funktion der δ -Isoform der CaMKII. Über die Funktionen der CaMKII im Allgemeinen für den kardialen Kalziumstoffwechsel und die Myozytenkontraktion konnten in den vergangenen Jahren viele Erkenntnisse gewonnen werden (siehe Abschnitt 1.3; S. 11). Über die Funktionen einzelner Isoformen ist dagegen noch wenig bekannt (ZHANG T und BROWN 2004). Obwohl die CaMKII δ die häufigste Isoform der CaMKII im Myokard ist, kann daraus nicht abgeleitet werden, dass sämtliche der CaMKII im Allgemeinen zugeschriebenen Funktionen von der δ -Isoform vermittelt werden. So vermuteten SINGH et al. (2009) aufgrund der räumlichen Lokalisation in der Nähe der SERCA2a, dass die β -Isoform eine Rolle bei der PLB-Phosphorylierung einnehmen könnte. COLOMER et al. (2003) zeigten weiterhin, dass die γ -Isoform bei einer kardialen Drucküberlastung vermehrt exprimiert wird. Insgesamt ist zu vermuten, dass je nach CaMKII-Isoform unterschiedliche Aufgaben im Vordergrund stehen (ZHANG T und BROWN 2004).

Auch Überexpressionsexperimente, die nur bei der zytoplasmatischen CaMKII δ_c , nicht aber bei der Überexpression der CaMKII δ_b die Entwicklung einer Herzinsuffizienz belegen konnten (ZHANG T et al. 2007), stützen diese These. Unlängst berichteten MISHRA et al. (2011) allerdings, dass die funktionellen Unterschiede zwischen CaMKII δ_b und CaMKII δ_c weniger von der Isoform als vielmehr von der Lokalisation im Zytoplasma oder im Zellkern abhängen.

Dass CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten im Rahmen dieser Arbeit eine intakte systolische Funktion zeigten, ist zunächst erstaunlich aufgrund der vielfältigen Aufgaben, die die CaMKII im Allgemeinen für die Feinabstimmung der elektromechanischen Kopplung erfüllt. Allein die seit langem bekannte aktivierende Funktion der CaMKII auf Ryanodinrezeptoren (MAIER und BERS 2007) hätte beim CaMKII δ -Knockout eine verminderte fraktionelle Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum und dadurch verringerte Kalziumtransienten und Kontraktilität zur Folge haben können. Allerdings zeigten bereits TRAFFORD et al. (1998) und später CHOI et al. (2000), dass Effekte auf den Ryanodinrezeptor aufgrund gegenregulatorischer Maßnahmen nur von vorübergehender Wirkung sind. Dennoch konnten BELL et al. (2011 b) unlängst zeigen, dass eine chronische CaMKII-Inhibition *in vivo* zu einer reduzierten Kontraktilität führt. Und so sind auch die Folgen einer genetischen Inhibition der δ -Isoform der CaMKII auf isolierte Kardiomyozyten komplex und nicht vorhersehbar.

Eine intakte systolische Funktion bedeutet insofern nicht, dass die einzelnen Bestandteile des Kalziumstoffwechsels gegenüber dem Flox unverändert sind. In der Tat zeigten sich, wie bereits erwähnt und im kommenden Abschnitt im Detail erläutert, Hinweise auf eine diastolische Dysfunktion im CaMKII δ -Knockout.

Auch eine gegenregulatorische Überexpression anderer Isoformen der CaMKII ist als mögliche Ursache für die intakte systolische Funktion zu diskutieren. Diese könnten unter der Voraussetzung einer chronisch inhibierten CaMKII δ einen Teil der sonst von der δ -Isoform ausgeübten Funktionen übernehmen.

In der Tat konnten BACKS et al. (2009), welche die in dieser Arbeit verwendete CaMKII δ -Knockout-Maus entwickelt und erstmals beschrieben haben, zeigen, dass die für die CaMKII charakteristische Bindungsstelle an Phospholamban-Thr-17 nur etwas weniger phosphoryliert ist als bei Flox-Zellen. Als Ursache vermuteten sie eine partielle kompensatorische Phosphorylierung durch andere Kinasen. Allerdings konnten sie keine Erhöhung der β - oder γ -Isoform der CaMKII nachweisen. Die CaMKII α ließ sich gar nicht nachweisen. Dennoch folgerten die Autoren, dass dies nicht eine kompensatorische Funktion der CaMKII β oder CaMKII γ ausschließe. Auch XU L et al. (2010) untersuchten die in dieser Arbeit verwendete CaMKII δ -Knockout-Maus hinsichtlich der Proteinexpressionsmenge der CaMKII und konnten zeigen, dass die gesamte CaMKII-Aktivität durch die genetische Ablation um 62% gegenüber den Kontrollzellen reduziert ist. Die verbleibende CaMKII-Aktivität führten sie auf eine unveränderte Expression der CaMKII γ zurück. Aber auch andere Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinasen könnten bei der CaMKII δ -Knockout-Maus kompensatorische Funktionen übernehmen. Zu nennen sind unter anderem CaMKI und CaMKIV. CaMKI findet sich ubiquitär im menschlichen Körper und somit auch in Kardiomyozyten, wohingegen CaMKIV vor allem im Thymus, Hoden und Gehirn vorkommt. Das Vorkommen von CaMKIV im Herzen ist aktuell noch umstritten. Es wird allerdings eine Funktion in der Hypertrophiekaskade diskutiert (KATO et al. 2000, PASSIER et al. 2000, WU et al. 2002, COLOMER et al. 2003).

Auch unterstützen die von BACKS et al. (2009) und XU L et al. (2010) auf Einzelzellebene erhobenen Befunde die in dieser Arbeit gezeigte intakte systolische Funktion. So zeigten diese bei einer Stimulation von 1 Hz ebenfalls normale Kalziumtransienten und Kontraktilität. Bei höheren Frequenzen konnten XU L et al. (2010) allerdings eine Reduktion der systolischen Funktion feststellen. Interessant sind auch die von XU L et al. (2010) mittels Echokardiographie erhobenen *in vivo* Daten. Diese konnten eine in Ruhe sogar verstärkte Kontraktilität im CaMKII δ -Knockout nachweisen. Auch beobachteten BACKS et al. (2009) eine unter physiologischen Bedingungen bis ins Erwachsenenalter normale Entwicklung in Bezug auf Herzstruktur und Funktion.

4.1.2 Beeinträchtigte diastolische Funktion unter Kontrollbedingungen

Trotz intakter systolischer Funktion zeigten sich bei der Untersuchung der CaMKII δ -Knockout-Maus bereits unter Kontrollbedingungen Hinweise auf eine gestörte diastolische Funktion. Dazu wurde die diastolische Kalziumelimination anhand des Relaxationsverhaltens der isolierten Kardiomyozyten untersucht.

Hierbei zeigten sich eine tendenziell, aber noch nicht signifikant, langsamere Relaxationszeit der Kalziumtransienten sowie eine signifikant langsamere Relaxationszeit der Myozytenverkürzung (siehe Abbildung 3.6) in CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten. Ergänzend in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte und noch unveröffentlichte Messungen konnten eine basale Verlangsamung der Relaxationszeiten in CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten eindeutig bestätigen.

Ursächlich für die langsameren Relaxationszeiten ist am ehesten eine verringerte SERCA-Aktivität, da dieser, insbesondere bei Mäusen, der größte Anteil an der diastolischen Elimination von Kalzium aus dem Zytoplasma zukommt (MAIER et al. 2003). Dies korreliert gut mit dem von BACKS et al. (2009) beschriebenen Befund, dass die Thr-17-Phosphorylierung an Phospholamban, dem wichtigsten Regulator der SERCA-Aktivität, im CaMKII δ -Knockout reduziert ist.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die Relaxationszeit der Koffeintransienten, die als ein Maß für die Aktivität des Natrium/Kalzium-Austauschers sowie in geringerem Maße auch von mitochondrialen Kalziumtransportern und sarkolemaler Ca²⁺-ATPase gilt (LI et al. 1998), bereits in der Kontrollphase in CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten tendenziell erniedrigt ist (siehe Abbildung 3.11). Begleitend in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte, aber noch unveröffentlichte Untersuchungen konnten die Signifikanz dieser Aussage anhand einer größeren Zellzahl bestätigen.

Somit scheinen CaMKII δ -KO-Mäuse zumindest *in vitro* und bei niedriger Stimulationsfrequenz (1 Hz) vermindert in der Lage zu sein, das in der Systole freiwerdende Kalzium in der Diastole ins Sarkoplasmatische Retikulum und aus der Zelle hinaus zu transportieren, bei allerdings erhaltener systolischer Funktion.

Ob diese Ergebnisse eine physiologische Relevanz haben, lässt sich anhand der in dieser Arbeit erhobenen Befunde nicht beurteilen. Interessanterweise konnten XU L et al. (2010) im CaMKII δ -KO bei höheren Herzfrequenzen (3 Hz) reduzierte Kalziumtransienten und Sarkomerverkürzung feststellen. Dies führten sie unter anderem auf eine verringerte SERCA-Aktivität bei höheren Herzfrequenzen zurück. Insofern könnte der negativ inotrope Effekt der diastolischen Dysfunktion bei höheren Herzfrequenzen stärker zur Ausprägung kommen. Allerdings konnte in einem anderen CaMKII δ -Knockout-Mausmodell von LING et al. (2009) bei hämodynamischen Messungen (*in vivo*)

keine Veränderung der Relaxation festgestellt werden. Diese Messungen wurden allerdings unter Vorlast durchgeführt, wodurch die Relaxation per se erleichtert ist. Weiterhin muss die direkte Vergleichbarkeit zu dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell (BACKS et al. 2009) kritisch betrachtet werden, da sich beide in der ausgeschalteten Region des CaMKII δ -Gens unterscheiden. So wurden bei BACKS et al. (2009) die Exons 1 und 2, die für die ATP-bindende Domäne verantwortlich sind, ausgeschaltet, wohingegen LING et al. (2009) die Exons 9 - 11, welche für die katalytische Domäne verantwortlich sind, ausschalteten (ANDERSON ME 2009).

4.1.3 Erhöhtes diastolisches Kalzium unter Kontrollbedingungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der diastolische Kalziumgehalt in CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten bereits unter Kontrollbedingungen signifikant gegenüber dem Flox erhöht ist (siehe Abbildung 3.7 (links)). Damit einhergehend zeigte sich auch eine signifikant niedrigere diastolische Sarkomerlänge (siehe Abbildungen 3.1 und 3.7 (rechts)).

Ursächlich für einen erhöhten diastolischen Kalziumgehalt kann ein erhöhter diastolischer Kalziumverlust aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum sein. Um die Funktion des Sarkoplasmatischen Retikulums zu überprüfen, wurde der SR-Kalziumgehalt in dieser Arbeit mittels Koffein zwischen CaMKII δ -Knockout- und Flox-Kardiomyozyten verglichen. Hierbei zeigte sich bei einer Stimulation von 1 Hz bei beiden Genotypen allerdings ein zumindest unter Kontrollbedingungen annähernd gleicher SR-Kalziumgehalt (siehe Abbildungen 3.9 und 3.10). XU L et al. (2010) beobachteten dagegen beim gleichen Mausmodell bereits bei einer Stimulation mit 1 Hz, vermehrt aber bei 3 Hz, einen im δ -Knockout verminderten SR-Kalziumgehalt.

Vor dem Hintergrund einer reduzierten SERCA-Aktivität und somit verminderter SR-Kalziumaufnahme im verwendeten CaMKII δ -KO-Modell (siehe Abschnitt 4.1.2; S. 80) ist der in dieser Arbeit gemessene, gegenüber Kontrollzellen unveränderte, SR-Kalziumgehalt ein erstaunliches Ergebnis. Ursächlich könnte eine Verringerung des diastolischen Kalziumverlustes über Ryanodinrezeptoren sein (Ca^{2+} -sparks). So konnten CURRIE et al. (2004) zeigen, dass eine CaMKII-Inhibition durch AIP bei Mäusekardiomyozyten den diastolischen Kalziumverlust (Ca^{2+} -sparks) reduzieren kann. Auch LING et al. (2009) beobachteten an einem ähnlichen CaMKII δ -Knockout-Mausmodell eine verringerte Phosphorylierung an Serin-2815, einer für die CaMKII-typischen Phosphorylierungsstelle am Ryanodinrezeptor. Begleitend in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte und noch unveröffentlichte Experimente konnten mithilfe der Konfokalmikroskopie in der Tat eine Reduktion der Ca^{2+} -sparks bei CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten feststellen. Unter Berücksichtigung der genannten Literatur und der Ergebnisse dieser Arbeit erscheint es daher wahrscheinlich, dass der δ -

Isoform der CaMKII eine wichtige Funktion für die Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors und den damit verbundenen diastolischen SR-Kalziumverlust zukommt.

Bezogen auf die ursprüngliche Fragestellung nach der Ursache des erhöhten diastolischen Kalziumgehalts in CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten, scheint den Ryanodinrezeptoren daher eine untergeordnete Funktion zuzukommen. Einen alternativen Erklärungsansatz ermöglicht allerdings eine Beobachtung von XU L et al. (2010). Diese Autoren konnten nachweisen, dass der CaMKII δ -Knockout eine erhöhte Dichte an L-Typ-Kalziumkanälen (LTCC) aufweist. Da eine aktivierende Wirkung der CaMKII auf den LTCC bekannt ist (ANDERSON ME et al. 1994), vermuteten sie eine kompensatorisch erhöhte Expression des LTCC, über den die Zelle versucht, eine infolge der CaMKII δ -Inhibition verminderte Öffnung der LTCC zu kompensieren. Dieser Kompensationsmechanismus scheint sehr effektiv zu sein, da die Autoren einen erhöhten maximalen Kalziumeinstrom in CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten beobachten konnten. Diesen machten sie zudem für eine *in vivo* erhöhte Ruhekontraktilität verantwortlich.

Das Zusammenwirken eines erhöhten systolischen Kalziumeinstroms über vermehrt exprimierte L-Typ-Kalziumkanäle und eines verminderten diastolischen Kalziumausflusses über vermindert aktivierte SR-Kalzium-ATPase und Natrium/Kalzium-Austauscher könnte somit das in dieser Arbeit beobachtete erhöhte diastolische Kalzium im CaMKII δ -Knockout erklären.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass eine genetische Inhibition der δ -Isoform der CaMKII vielfältige Auswirkungen auf die elektromechanische Kopplung hat. Insgesamt resultiert aber trotz einer gewissen diastolischen Dysfunktion eine zumindest unter Kontrollbedingungen intakte systolische Funktion.

4.2 Das Verhalten der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten im Verlauf der Azidose

Während sich Kardiomyozyten der CaMKII δ -Knockout-Maus unter Kontrollbedingungen noch weitgehend unauffällig verhielten (siehe Abschnitt 4.1; S. 77), demarkierte sich unter der pathophysiologischen Situation einer Azidose eine deutliche Dysfunktion im Vergleich zu Kontrollmäusen (Flox). So blieb der in Kontrollzellen zu beobachtende spätazidotische Kontraktilitätserhalt in CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten weitgehend aus und sie entwickelten eine zunehmende systolische und diastolische Dysfunktion. In dieser Arbeit konnte somit erstmals die wichtige Bedeutung der δ -Isoform der CaMKII für die Aufrechterhaltung einer adäquaten systolischen und diastolischen Funktion im Verlauf einer Azidose gezeigt werden.

4.2.1 Abnahme von Kontraktilität und Kalziumtransienten in der frühen Azidose bei CaMKII δ -Knockout- und Flox-Kardiomyozyten

Charakteristischerweise reagieren Kardiomyozyten auf eine intrazelluläre Azidose mit einer initialen Abnahme der Kontraktilität. Dies geht meist einher mit reduzierten Kalziumtransienten und verlangsamten Relaxationsgeschwindigkeiten (MATTIAZZI et al. 2007; siehe auch Abschnitt 1.5, S. 21).

Um das Verhalten von CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten im Verlauf einer Azidose zu untersuchen, wurden diese einer 10-minütigen metabolischen Azidose mit einem pH-Wert von 6,75 in der Superfusionslösung ausgesetzt und mit Flox-Kardiomyozyten verglichen. Bisherige Untersuchungen zum Verhalten von Kardiomyozyten unter Azidose wurden vor allem mit einem niedrigeren pH-Wert von 6,5 in der Superfusionslösung durchgeführt, bei dem KOMUKAI et al. (2001) einen Abfall des intrazellulären pH-Werts um 0,51 – 0,55 pH-Einheiten feststellen konnten. Trotz des in dieser Arbeit zu erwartenden geringeren intrazellulären pH-Wert-Abfalls, zeigten nicht nur Kontrollmäuse, sondern auch die erstmals bei einer Azidose untersuchten CaMKII δ -KO-Mäuse die oben erwähnten typischen Veränderungen einer intrazellulären Azidose.

So zeigten beide Genotypen unmittelbar nach Beginn der aziden Superfusion eine langsame, signifikante Abnahme von Kontraktilität (siehe Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3) und Kalziumtransienten (siehe Abbildungen 3.4 und 3.5). Trotz der in dieser Arbeit zeitgleich auftretenden Abnahme beider Parameter ist vermutlich eine reduzierte Myofilamentsensitivität und weniger die Abnahme der Kalziumtransienten für die in der frühen Azidose verringerte Kontraktilität verantwortlich (ORCHARD und KENTISH 1990). Unter einer reduzierten Myofilamentsensitivität versteht man eine reduzierte Kalziumbindung an die Myofilamente aufgrund von konkurrierenden Protonen. Dazu passend konnten in anderen Arbeiten je nach Autor eine Zunahme (NOMURA et al. 2002), Abnahme (u.a. SAG et al. 2007) oder auch gleichbleibende (HULME und ORCHARD 1998) Kalziumtransienten zu Beginn der Azidose festgestellt werden.

Weiterhin zeigten beide Genotypen in dieser Arbeit die für eine beginnende Azidose typische Abnahme der Relaxationszeiten von Myozytenverkürzung und Kalziumtransienten (siehe Abbildung 3.6). Auch hierfür ist am ehesten die Protonenkonkurrenz um Kalziumbindungsstellen, in diesem Fall an der SERCA2a, und somit eine verringerte SERCA-Aktivität verantwortlich (MANDEL et al. 1982).

Zudem konnte in dieser Arbeit bei beiden Genotypen ein Anstieg des diastolischen Kalziums in der frühen Azidose festgestellt werden (siehe Abbildung 3.8). Dieser lässt sich vermutlich auf mehrere Mechanismen zurückführen. So ließ sich eine bereits von PHILIPSON et al. (1982) beschriebene Hemmung des Natrium/Kalzium-Austauschers (NCX) durch die Azidose anhand verlangsamter Relaxationsgeschwindigkeiten der Koffeintransienten bestätigen (siehe Abbildung 3.11). Dieses

Verhalten konnte bei beiden Genotypen beobachtet werden und führt zu einem Anstieg der diastolischen Kalziumkonzentration. Weiterhin könnte auch der von HARRISON et al. (1992) beschriebene Mechanismus einer vermehrten Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers durch die in einer Azidose erhöhte intrazelluläre Protonenkonzentration in dieser Arbeit zu einem erhöhten diastolischen Kalzium beigetragen haben. Dadurch würde laut den genannten Autoren die intrazelluläre Natriumkonzentration ansteigen, welche zu einer Verlangsamung des regulären Modus des NCX im Sinne einer verminderten Kalziumextrusion oder sogar zu einer Umkehr mit Kalziumeinstrom über den NCX führen könnte. Auch die von SPERELAKIS und LEE (1971) beschriebene Inaktivierung der Na^+/K^+ -ATPase durch die Azidose könnte über einen weiteren Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration und den NCX einen Beitrag am erhöhten diastolischen Kalzium geleistet haben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass anhand der Kontrollzellen (Flox) gezeigt werden konnte, dass sich auch bei einem pH-Wert von 6,75 in der Superfusionslösung die typischen für die Frühphase der Azidose beschriebenen Phänomene (siehe MATTIAZZI et al. 2007) einstellen. Zudem konnte erstmals nachgewiesen werden, dass auch CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten zumindest initial in ähnlicher Weise auf eine Azidose reagieren wie Kontrollzellen.

Betrachtet man die Ergebnisse allerdings genauer, dann ließen sich interessanterweise auch in der frühen Azidose wichtige Unterschiede zwischen beiden Genotypen feststellen. So zeigten sich bereits in der Kontrollphase Hinweise auf eine diastolische Dysfunktion in der CaMKII δ -KO-Maus im Sinne von verlangsamten Relaxationszeiten (siehe Abbildung 3.6). Diese Unterschiede nahmen in der frühen Azidose im Vergleich zur Kontrollphase weiter zu. So zeigte der CaMKII δ -Knockout eine signifikant langsamere Relaxationszeit der Kalziumtransienten, im Sinne einer geringeren SERCA-Aktivität, als Kontrollzellen. Dennoch fand sich bei CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten in der frühen Azidose noch eine den Kontrollzellen vergleichbar erniedrigte systolische Funktion (Myozytenkontraktilität und Kalziumtransienten; siehe Abbildungen 3.3 und 3.5) und auch der SR-Kalziumgehalt unterschied sich noch nicht zwischen beiden Genotypen (siehe Abbildung 3.10). Verantwortlich dafür könnten die bereits im Abschnitt 4.1 (S. 77) vermuteten Kompensationsmechanismen im Sinne eines verringerten SR-Kalziumverlustes über Ryanodinrezeptoren (Ca^{2+} -sparks) sein.

Auch die beim CaMKII δ -KO vermehrt exprimierte L-Typ-Kalziumkanäle (XU L et al. 2010) könnten in der frühen Azidose zu Unterschieden im Kalziumstoffwechsel beider Genotypen geführt haben. So zeigten IRISAWA und SATO (1986), dass eine Azidose eine Inhibition des LTCC zur Folge hat. Diese Inhibition könnte möglicherweise beim CaMKII δ -KO gravierendere Folgen als bei Kontrollzellen haben. So vermuteten XU L et al. (2010), dass die Überexpression des LTCC im CaMKII δ -KO ein Kompensationsmechanismus aufgrund verringerter CaMKII δ -abhängiger Aktivierung ist. Dadurch

würde ein ausreichender Kalziumeinstrom im Rahmen der kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung und in der Folge adäquate Kalziumtransienten und Kontraktilität sichergestellt werden. Insofern ist zu vermuten, dass die Kalziumtransienten beim CaMKII δ -KO in einem größeren Ausmaß von der Aktivität des LTCC abhängen als bei Kontrollzellen. Eine azidosebedingte Inhibition dieses Kanals könnte daher im CaMKII δ -KO gravierendere Auswirkungen haben. Dennoch konnten, wie zuvor erwähnt, in beiden Genotypen ähnliche Kalziumtransienten in der frühen Azidose beobachtet werden, sodass möglicherweise weitere kompensatorische Mechanismen eine Rolle spielen. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht näher untersucht.

4.2.2 Aufrechterhaltung von Kontraktilität und Kalziumtransienten in Kontrollzellen in der späten Azidose

Bereits im Jahr 1983 beobachteten ALLEN und ORCHARD ein mittlerweile als charakteristisch für den Verlauf einer Azidose angesehenes Phänomen einer erneuten Wiederzunahme bzw. Aufrechterhaltung adäquater Kalziumtransienten und Kontraktilität nach initialer Abnahme dieser Parameter und trotz fortbestehender Azidose. Mittlerweile wird angenommen, dass ein Anstieg der SERCA-Aktivität und damit einhergehend ein Anstieg des SR-Kalziumgehalts eine entscheidende Rolle für diesen Vorgang spielen (siehe Abschnitt 1.5; S. 21).

Die genauen zeitlichen Abläufe dieser Wiedererholungs- bzw. Erhaltungsvorgänge variieren in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen, insbesondere zwischen metabolischer und respiratorischer Azidose. So kam es bei SAID et al. (2008) bei einer respiratorischen Azidose bereits innerhalb von ca. 2 min nach Beginn der Azidose zu einer raschen Wiedererholung der Kontraktilität, wohingegen SAG et al. (2007) bei einer metabolischen Azidose erst ab ca. 5 min eine langsame Kontraktilitätswiedererholung beobachten konnten. Als Ursache beschrieben bereits FRY und POOLE-WILSON (1981) einen rascheren Abfall des intrazellulären pH-Werts bei einer respiratorischen Azidose. Damit einhergehend berichteten die Autoren auch von einem ausgeprägteren negativ inotropen Effekt einer respiratorischen Azidose.

Obwohl ein Anstieg des SR-Kalziumgehalts von den meisten Autoren als Voraussetzung für die spätazidotischen Wiedererholungs- bzw. Erhaltungsvorgänge akzeptiert wird (MATTIAZZI et al. 2007), besteht noch Uneinigkeit über dessen genaue Veränderungen. So maßen SAID et al. (2008) bereits eine Minute nach Beginn einer respiratorischen Azidose einen maximal erhöhten SR-Kalziumgehalt, der aber im weiteren Verlauf wieder abnahm, jedoch immer höher als in der Kontrollphase blieb. SAG et al. (2007) beobachteten dagegen bei einer metabolischen Azidose (extrazellulärer pH-Wert 6,5) einen Anstieg des SR-Kalziumgehalts um ca. 14 % von der frühen (ca. 1 – 4 min) auf die späte Azidose (ab ca. 5 min). Dass dies nicht allein auf Unterschiede zwischen respiratorischer und

metabolischer Azidose zurückgeführt werden kann, zeigten die Untersuchungen von NOMURA et al. (2002), die auch bei einer respiratorischen Azidose einen kontinuierlichen Anstieg des SR-Kalziumgehalts über den gesamten Verlauf der Azidose feststellen konnten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei Kontrollzellen (Flox) auch unter einer relativ milden metabolischen Azidose (extrazellulärer pH-Wert 6,75) nach initialem Abfall von Kontraktilität und Kalziumtransienten im weiteren Verlauf zu einer Aufrechterhaltung adäquater Werte dieser Parameter kam und dass dieses Verhalten im Einklang mit vorherigen Arbeiten (MATTIAZZI et al. 2007) a.e. auf einer Zunahme des SR-Kalziumgehalts beruht.

So sistierte die initial beobachtete Abnahme von Kontraktilität und Kalziumtransienten bei Flox-Kardiomyozyten nach ca. fünfminütiger Azidose und blieb im Durchschnitt bis zum Ende der Azidose stabil (siehe Abbildungen 3.3 und 3.5). Auf Einzelzellebene zeigten die meisten untersuchten Kardiomyozyten eine erneute Zunahme von Kontraktilität und Kalziumtransienten in der späten Azidose (siehe Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.4). Vom zeitlichen Verlauf deckt sich dies gut mit den Befunden von SAG et al. (2007), die ebenfalls nach ca. 5 min eine Wiederrücknahme der genannten Parameter beobachten konnten. Damit einhergehend kam es in dieser Arbeit zu einer Wiederbeschleunigung der Relaxationszeiten von Kalziumtransienten und Myozytenverkürzung (siehe Abbildung 3.6) als Hinweis auf eine beschleunigte SR-Kalzium-ATPase. Da es wie bereits erwähnt widersprüchliche Befunde bezüglich der resultierenden Folgen auf den SR-Kalziumgehalt gibt, wurde dieser im Verlauf der Azidose standardisiert alle 2 min gemessen. Hierbei zeigte sich eindeutig ein kontinuierlicher Anstieg über die gesamte Azidose (siehe Abbildung 3.10). Somit stützt diese Arbeit die Beobachtungen von u.a. NOMURA et al. (2002) und SAG et al. (2007) hinsichtlich eines über die gesamte Azidose kontinuierlich steigenden SR-Kalziumgehalts und ergänzt diese um eine häufigere Messfrequenz. In Bezug auf die SERCA-Aktivität wäre es interessant, im Rahmen weiterführender Untersuchungen auch den PLB-Phosphorylierungszustand bei einer metabolischen Azidose zu untersuchen, da sich bisherige Ergebnisse von SAID et al. (2008) und MUNDINA-WEILENMANN et al. (2005) auf eine respiratorische Azidose bezogen und diese möglicherweise für die beobachteten Unterschiede im SR-Kalziumanstieg verantwortlich sein könnte. Es bleibt aber festzuhalten, dass auch SAID et al. (2008) den SR-Kalziumanstieg als letztendlich ursächlich für die Aufrechterhaltung bzw. Wiederrücknahme von Kalziumtransienten und Kontraktilität ansahen.

In den vergangenen Jahren haben sich zudem die Hinweise auf eine CaMKII-Abhängigkeit der spätazidotischen Erhaltungsvorgänge verdichtet. So publizierten u.a. MUNDINA-WEILENMANN et al. (2005) und SAG et al. (2007), dass eine CaMKII-Inhibition mittels KN-93 die Wiederrücknahme der Kontraktilität im Verlauf einer Azidose verhindern kann. Dabei wird die CaMKII durch ein in der Azidose erhöhtes diastolisches Kalzium bei gleichzeitiger Hemmung der Proteinphosphatasen (wie

z.B. PP1) als ihren Gegenspielern aktiviert (VITTONI et al. 1998). Für die spätazidotischen Erhaltungsvorgänge scheint insbesondere eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung an Thr-17 des Phospholambans und in der Folge eine Aktivierung der SERCA von Bedeutung zu sein (siehe Abschnitt 1.5; S. 21). So konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass KN-93 bei einer Azidose die Wiedererholung der Relaxationsparameter, als Maß für die SERCA-Aktivität, verhindern kann (SAG et al. 2007, DESANTIAGO et al. 2004, KOMUKAI et al. 2001). MUNDINA-WEILENMANN et al. (2005) untersuchten zudem erstmals während einer Azidose den Phosphorylierungsstatus von PLB-Threonin-17 und konnten in den ersten Minuten der Azidose eine verstärkte Phosphorylierung feststellen, die sich durch KN-93, ebenso wie eine zeitgleich auftretende Beschleunigung der Relaxationszeiten, verhindern ließ. Weiterhin konnten DESANTIAGO et al. (2004) mithilfe einer Phospholamban-Knockout-Maus zeigen, dass ohne Phospholamban keine mechanische Wiedererholung stattfindet. Dieses Ergebnis erschien zunächst unlogisch, da die Autoren eine verstärkte Aktivität der SERCA und somit eine verstärkte Wiedererholung erwartet hatten. Sie vermuteten aber, dass ohne Phospholamban eine für die späte Azidose notwendige Regulationsmöglichkeit durch die CaMKII wegfällt. Dazu passend sind auch im Jahr 2002 von NOMURA et al. erhobene Befunde, die ergaben, dass Kardiomyozyten mit verstärkter Phospholamban-Serin-16-Phosphorylierung (infolge Isoproterenol-Behandlung und Hemmung der Phosphatasen) keine mechanische Wiedererholung zeigten. Somit spricht die derzeitige Befundlage für eine wichtige Bedeutung einer CaMKII-abhängigen Phosphorylierung von PLB an Threonin-17 für die spätazidotische Wiederbeschleunigung der SERCA und in der Folge auch für die Zunahme des SR-Kalziumgehalts, der Kalziumtransienten und der Kontraktionskraft (MATTIAZZI et al. 2007).

Neben PLB könnten auch andere CaMKII-abhängige Prozesse von Bedeutung für die spätazidotischen Erhaltungsvorgänge sein, wie z.B. L-Typ-Kalziumkanäle (MUNDINA-WEILENMANN et al. 2005). Darauf wird im Abschnitt 4.3 (S. 92) näher eingegangen.

Die CaMKII-Abhängigkeit der spätazidotischen Wiedererholungsvorgänge ließ sich auch in dieser Arbeit durch Experimente mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 bestätigen. Dieser konnte anders als das in Bezug auf die CaMKII inaktive Analogon KN-92 eine Wiederrücknahme der Kalziumtransienten im Verlauf der Azidose verhindern (siehe Abbildungen 3.15 und 3.16).

Die Rolle der einzelnen Isoformen der CaMKII für die spätazidotischen Erhaltungsvorgänge war bislang allerdings gänzlich unklar. Durch Überexpressionsexperimente der CaMKII δ c konnten SAG et al. (2007) lediglich zeigen, dass eine adenovirale, d.h. kurzfristige Überexpression dieser Isoform zu einer leichtgradigen Verbesserung der Wiedererholungsfähigkeit während der Azidose führt. Verantwortlich dafür machten diese Autoren eine durch erhöhte Phospholamban-Thr-17-Phosphorylierung beschleunigte SERCA-Aktivität. Eine transgene, d.h. langfristige Überexpression der

CaMKII δ c führte hingegen zu einer verminderten Wiedererholungsfähigkeit von der Azidose. Als Ursache dafür wurde eine verminderte Expressionsmenge von SERCA2a und Phospholamban als Zielproteinen der CaMKII angenommen.

In Bezug auf die Funktion der einzelnen CaMKII-Isoformen für die Azidose konnten im Rahmen dieser Arbeit einige neue Erkenntnisse über die δ -Isoform gewonnen werden, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.2.3 Deutliche Beeinträchtigung der spätazidotischen Erhaltungsvorgänge bei CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine genetische Inhibition der δ -Isoform der CaMKII mit deutlichen Nachteilen für den pathophysiologisch wichtigen Zustand einer Azidose einhergeht. Anders als die Kontrollzellen (Flox), die - wie im vorherigen Abschnitt beschrieben - in der Lage waren Kontraktilität und Kalziumtransienten im späten Verlauf der Azidose stabil zu halten, blieben diese Erhaltungsvorgänge in CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten weitgehend aus. Stattdessen kam es über den gesamten Verlauf der Azidose zu einer kontinuierlichen Abnahme der systolischen und diastolischen Funktion.

Konkret zeigte sich bei CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten eine um fast 80 % reduzierte Inzidenz einer spätazidotischen Wiederzunahme von Kontraktilität und Kalziumtransienten (siehe Abbildung 3.12). Abbildung 3.1 (oben) zeigt den charakteristischen Verlauf der fraktionellen Myozytenverkürzung bei einem CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten im Verlauf des 10-minütigen Azidoseprotokolls. Dabei lässt sich anstelle eines Wiederanstiegs der fraktionellen Myozytenverkürzung (siehe Abbildung 3.1 (unten) für eine charakteristische Kontrollzelle) ein kontinuierlicher Abfall der Kontraktilität über den gesamten Verlauf der Azidose beobachten. Abbildung 3.2 zeigt entsprechende Originaltransienten der fraktionellen Myozytenkontraktilität.

Damit einhergehend konnten im CaMKII δ -KO in der späten Azidose auch keine adäquaten Kalziumtransienten aufrechterhalten werden (siehe charakteristische Originaltransienten in Abbildung 3.4). Die Abbildungen 3.3 und 3.5 zeigen anhand der dazugehörigen Mittelwerte aller gemessenen CaMKII δ -KO-Kardiomyozyten jeweils signifikante Abnahmen der fraktionellen Myozytenverkürzung bzw. Kalziumtransienten gegenüber der frühen Azidose und signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu den gemessenen Kontroll-Kardiomyozyten.

Ursächlich für diese deutliche systolische Dysfunktion bei CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten im Verlauf der Azidose ist am ehesten eine verringerte Wiederbeschleunigung der SERCA und in der

Folge eine verringerte Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums mit Kalzium. Dies kann aufgrund deutlich verlangsamter Relaxationszeiten von Kalziumtransienten und Myozytenverkürzung im Vergleich zur frühen Azidose vermutet werden (siehe Abbildung 3.6). Während die Flox-Kardiomyozyten in der späten Azidose eine Wiederbeschleunigung der Relaxationszeiten zeigten, welcher vermutlich eine CaMKII-abhängige PLB-Thr-17-Phosphorylierung zugrunde liegt (siehe Abschnitt 4.2.2; S. 85), blieb die Wiederbeschleunigung im CaMKII δ -Knockout aus. Stattdessen zeigten sich deutlich langsamere Relaxationszeiten im Vergleich zum Flox. Diese wichtige Beobachtung ist am ehesten auf eine veränderte Phospholamban-Phosphorylierung bei CaMKII δ -Knockout-Mäusen zurückzuführen. Hervorragend dazu passend zeigten BACKS et al. (2009) in der Erstbeschreibung dieser Mauslinie eine schon in Ruhe reduzierte Phospholamban-Phosphorylierung an der für die CaMKII charakteristischen Threonin-17-Bindungsstelle.

Insofern können die in dieser Arbeit erhobenen Befunde so interpretiert werden, dass die verbleibende CaMKII-Aktivität nach einer genetischen Inhibition der δ -Isoform nicht mehr ausreichend ist, um in der Azidose eine für die Wiederbeschleunigung der SERCA adäquate PLB-Thr-17-Phosphorylierung sicherzustellen. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass der δ -Isoform der CaMKII eine sehr wichtige Bedeutung für die PLB-Phosphorylierung in der Azidose zukommt, die nicht ausreichend durch andere CaMKII-Isoformen kompensiert werden kann.

Die PLB-Phosphorylierung im zeitlichen Verlauf wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Ergebnisse von MUNDINA-WEILENMANN et al. (2005) und SAID et al. (2008) zeigten bei Wildtyp-Mäusen eine lediglich kurzfristige PLB-Thr-17-Phosphorylierung zu Beginn der Wiedererholungsphase und dann ein erneutes Absinken auf Kontrollwerte. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist zu vermuten, dass diese Phosphorylierung bei CaMKII δ -Knockout-Mäusen ausbleibt. Dies sollte im Rahmen künftiger Arbeiten weiter untersucht werden. Auch das Zusammenspiel zwischen Proteinkinase-A-abhängiger Serin-16- und CaMKII-abhängiger Threonin-17-Phosphorylierung in der Azidose sollte näher untersucht werden, da teilweise eine Kompensation durch die Proteinkinase A stattfinden könnte. Unter Kontrollbedingungen konnten BACKS et al. (2009) jedoch keine veränderte Serin-16-Phosphorylierung feststellen. Dies steht primär im Widerspruch zu einem anderen Modell einer chronischen CaMKII-Inhibition, der AC3-I-Maus, bei der eine Hochregulation der Proteinkinase A nachgewiesen werden konnte (ZHANG R et al. 2005). Unterschiede zwischen beiden Mausmodellen lassen sich laut XU L et al. (2010) am ehesten durch einen unterschiedlichen Grad der CaMKII-Inhibition erklären, mit vollständiger Inhibition sämtlicher CaMKII-Isoformen bei der AC3-I-Maus.

Im Einklang zur reduzierten SERCA-Aktivität bei CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten im Verlauf der Azidose konnte diese Arbeit weiterhin einen im Vergleich zum Flox deutlich reduzierten SR-Kalziumgehalt zeigen (siehe Abbildung 3.10). Während es dem Flox gelang, den Kalziumgehalt des

Sarkoplasmatischen Retikulums im Verlauf der Azidose kontinuierlich zu steigern, sank dieser im CaMKII δ -Knockout im gleichen Zeitraum deutlich ab. Neben einer verringerten Kalziumaufnahme über die SERCA kann auch eine vermehrte Kalziumabgabe über Ryanodinrezeptoren eine Rolle spielen. Dagegen sprechen allerdings begleitend in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte und noch unveröffentlichte Ergebnisse, die mithilfe der Konfokalmikroskopie einen reduzierten diastolischen Kalziumverlust (Ca^{2+} -sparks) über Ryanodinrezeptoren zeigen konnten. Weiterhin gilt die CaMKII als Aktivator der Ryanodinrezeptoren (WITCHER et al. 1991). Bei einer genetischen Ablation der CaMKII δ ist daher eher mit einer weiteren Abnahme des SR-Kalziumverlustes zu rechnen, was die Bedeutung der SERCA-Dysfunktion im CaMKII δ -KO weiter unterstreicht.

Eng mit der verminderten SR-Kalziumaufnahme im CaMKII δ -Knockout verbunden, sind die Veränderungen des diastolischen Kalziums im Verlauf der Azidose (siehe Abbildung 3.8). Während es bei den Kontrollzellen in der späten Azidose zu einer relativen Abnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration, a.e. durch Aufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum, kam, blieb diese beim CaMKII δ -KO unverändert bzw. stieg tendenziell sogar weiter an. Dies passt gut zu den Beobachtungen von NOMURA et al. (2002), die bei Kardiomyozyten mit ausbleibender spätazidotischer Kontraktilitätswiederzunahme einen stärkeren Anstieg des diastolischen Kalziums feststellen konnten als bei Kardiomyozyten mit Wiedererholung der Kontraktilität. Zu beachten ist, dass das diastolische Kalzium im CaMKII δ -Knockout bereits unter Ruhebedingungen deutlich gegenüber den Kontrollzellen erhöht war (siehe Abschnitt 4.1.3; S. 81). Obwohl der intrazelluläre Kalziumgehalt in dieser Arbeit nur qualitativ ermittelt wurde, ist es denkbar, dass es im Verlauf der Azidose zu einer massiven Kalziumüberladung der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten und damit einhergehend zu weiteren Schäden kommt. So wird eine intrazelluläre Kalziumüberladung u.a. mit einer Induktion der Apoptosekaskade in Verbindung gebracht (RIZZUTO et al. 2003). Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht, sollte aber Anlass für weiterführende Experimente im Rahmen künftiger Arbeiten sein.

Vermutlich trägt auch ein weiterer Mechanismus dazu bei, dass das diastolische Kalzium im CaMKII δ -Knockout im Gegensatz zum Flox weiter ansteigt. So kommt es mit Einsetzen der Azidose bei beiden Genotypen zu einer Verlangsamung des NCX, gemessen als Abfallskinetik der Koffeintransienten. Während die Kontrollzellen im weiteren Verlauf der Azidose eine weitgehend unveränderte Abfallskinetik zeigen, setzt sich die Verlangsamung bei den CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten über den gesamten Verlauf der Azidose kontinuierlich fort (siehe Abbildung 3.11). Diese Unterschiede beruhen am ehesten auf der bereits in der Kontrollphase vermuteten niedrigeren NCX-Aktivität im CaMKII δ -Knockout (siehe Abschnitt 4.1.2; S. 80), die sich unter dem pathophysiologischen Zustand

einer Azidose noch deutlicher manifestiert. In der Folge sinkt die Kalziumextrusion aus dem Zytoplasma und das diastolische Kalzium steigt weiter an.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit erstmals, dass eine genetische Inhibition der δ -Isoform der CaMKII die SR-Kalziumbeladung im Verlauf einer Azidose deutlich beeinträchtigt und eine in den Kontrollzellen zu beobachtende spätazidotische Erhaltung adäquater Kalziumtransienten und Kontraktilität weitgehend ausbleibt. Ursächlich dafür ist vermutlich eine verminderte CaMKII-abhängige Phospholamban-Phosphorylierung an Threonin-17 aufgrund einer deutlich reduzierten CaMKII-Aktivität. Während die diastolische Dysfunktion in der Kontrollphase und der frühen Azidose noch keine relevanten Konsequenzen für die systolische Funktion hat, kommt ihr negativ inotroper Effekt unter der pathophysiologischen Situation einer Azidose vollständig zur Ausprägung.

4.2.4 CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten vs. Flox-Kardiomyozyten in der post-azidotischen Phase

Nach Abschluss der zehnminütigen Azidose wurden die CaMKII δ -Knockout- und Flox-Kardiomyozyten erneut mit normazider Kontrolllösung perfundiert, um deren Vitalität sicherzustellen. Dies erschien notwendig, da Kontraktilität und Kalziumtransienten im CaMKII δ -Knockout zum Teil sehr deutlich abnahmen und kaum noch messbar waren. Hierbei zeigte sich bei beiden Genotypen eine deutliche Wiederzunahme von Myozytenkontraktilität und Kalziumtransienten (siehe Abbildungen 3.3 und 3.5).

Die postazidotische Phase ist auch aus einem anderen Grund interessant. So beobachteten SAID et al. (2008) bei Wildtyp-Kardiomyozyten ein vermehrtes Auftreten von Arrhythmien in dieser Phase. Die Ursache sahen sie in einem infolge der Azidose noch immer erhöhten SR-Kalziumgehalt zusammen mit vermehrt geöffneten Ryanodinrezeptoren durch den Wegfall der azidosebedingten Hemmung. Zudem beobachteten sie auch Arrhythmien durch vermehrt einströmende depolarisationsauslösende Natriumionen infolge einer postazidotischen Enthemmung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers. Interessanterweise ließen sich die postazidotischen Arrhythmien durch CaMKII-Inhibition mit KN-93 verhindern, vermutlich da der CaMKII-bedingte Anstieg des SR-Kalziumgehalts ausblieb. Bezogen auf die CaMKII δ -Knockout-Maus ließe sich daher eine geringere Inzidenz von postazidotischen Arrhythmien vermuten, was im Rahmen weiterführender Arbeiten geprüft werden sollte.

4.3 Die Bedeutung anderer CaMKII-abhängiger Prozesse für die spätazidotische Wiedererholung einiger CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten

Trotz genetischer Inhibition der δ -Isoform der CaMKII konnte bei einigen wenigen Kardiomyozyten dieses Genotyps eine spätazidotische Wiedererholung von Kontraktilität und Kalziumtransienten beobachtet werden (siehe Abbildungen 3.12 und 3.13). Interessanterweise scheint dieser Wiedererholung ein anderer Mechanismus als bei Kontrollzellen zugrunde zu liegen.

So blieb die beim Flox regelmäßig zu beobachtende Wiederbeschleunigung der Relaxationszeiten, der a.e. eine CaMKII-abhängige Phospholamban-Phosphorylierung zugrunde liegt, bei CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten aus (siehe Abbildung 3.14). Auch schien die spätazidotische Wiedererholung tendenziell geringer zu sein. Da weitere Experimente beim CaMKII δ -KO unter dem alle CaMKII-Isoformen inhibierenden KN-93 eine stärkere Abnahme der spätazidotischen Kalziumtransienten als unter KN-92 zeigen konnten (siehe Abbildungen 3.17 und 3.18), ist am ehesten von einem CaMKII-abhängigen Mechanismus auszugehen. XU L et al. (2010) konnten im CaMKII δ -Knockout eine um ca. 62% erniedrigte CaMKII-Aktivität feststellen. Für den verbleibenden Anteil machten sie insbesondere die γ -Isoform verantwortlich. Möglicherweise könnte diese Isoform über die Phosphorylierung anderer Proteine als Phospholamban für die gelegentlich zu beobachtenden spätazidotischen Wiedererholungsvorgänge bei CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten verantwortlich sein.

MUNDINA-WEILENMANN et al. (2005) vermuteten bereits bei Wildtyp-Kardiomyozyten, dass die Phospholamban-Phosphorylierung nur ein Mechanismus unter mehreren sein könnte, die letztendlich eine Kontraktilitätswiederzunahme im Laufe einer Azidose bewirken. Diese Autoren hatten beobachtet, dass 1 μ M KN-93 zwar die CaMKII-abhängige PLB-Threonin-17-Phosphorylierung und die SERCA-Wiederbeschleunigung verhinderte, es aber 5 μ M KN-93 benötigte, damit auch die kontraktile Wiedererholung vollständig ausblieb. Auch stellten sie fest, dass der PLB-Phosphorylierungsstatus bereits kurze Zeit nach Beginn der Azidose wieder auf seine Ausgangswerte zurückkehrte, die kontraktile Wiedererholung sich allerdings noch mehrere Minuten weiter fortsetzte. Als möglicherweise ergänzenden Mechanismus diskutierten die Autoren eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung von L-Typ-Kalziumkanälen. Da die CaMKII δ -Knockout-Maus den L-Typ-Kalziumkanal verstärkt exprimiert (XU L et al. 2010), erscheint es durchaus möglich, dass eine CaMKII γ -bedingte Aktivierung der L-Typ-Kalziumkanäle für die vereinzelt auftretende Wiedererholung der Kontraktilität bei CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten verantwortlich sein könnte.

Auch der Na⁺/H⁺-Austauscher könnte ein geeignetes Substrat der CaMKII γ oder einer anderen CaMKII-Isoform sein. Bis vor kurzem wurde die CaMKII-abhängige Regulierung dieses Transporters

kontrovers diskutiert (LEPRIGENT et al. 1997, KOMUKAI et al. 2001). Kürzlich konnten VILA-PETROFF et al. (2010) jedoch durch Messung des NHE1-Phosphorylierungsstatus und des intrazellulären pH-Werts sowohl bei adenoviraler Überexpression als auch bei chronischer Inhibition der CaMKII (AC3-I-Maus) die CaMKII-Abhängigkeit des NHE1 beweisen. Ein solcher Mechanismus könnte einen zusätzlichen Anstieg des SR-Kalziumgehalts und gleichzeitig, durch eine gewisse Normalisierung des pH-Werts, eine verbesserte Myofilamentsensitivität zur Folge haben, was beides zur spätazidotischen Wiedererholung der Kontraktilität beitragen könnte.

Weitere allgemeine Ursachen für Unterschiede im Verhalten der einzelnen CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten könnten eine unterschiedliche Verteilung der CaMKII-Isoformen zwischen verschiedenen Zellen sein (XU L et al. 2010) sowie Auswirkungen von Alter und Geschlecht auf die Azidose (KANDILCI et al. 2011, BELL et al. 2011 a). Um Auswirkungen von Alter und Geschlecht zu minimieren, wurde allerdings stets auf eine homogene Auswahl der untersuchten Mäuse geachtet.

4.4 „Ying und Yang“ einer therapeutischen CaMKII δ -Inhibition

In den vergangenen Jahren wurde intensiv über eine CaMKII-Inhibition als innovativem Therapieansatz für verschiedene kardiale Erkrankungen diskutiert. Vorausgegangen waren Erkenntnisse über die oft maladaptive Funktion der CaMKII, insbesondere für die Entstehung von Arrhythmien, Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Aufgrund wichtiger Funktionen, die die CaMKII außerhalb des Herzens einnimmt, stellte sich auch die Frage nach einer Isoform-spezifischen therapeutischen CaMKII-Inhibition (BACKS et al. 2009). Da die in dieser Arbeit genetisch inhibierte δ -Isoform die wichtigste Isoform der CaMKII im Herzen ist, kann die vorliegende Arbeit wichtige Erkenntnisse zu dieser Diskussion beitragen. So zeigte sich, dass eine chronische Inhibition der CaMKII δ mit einer verminderten Widerstandsfähigkeit gegenüber dem pathophysiologisch wichtigen Mechanismus einer Azidose einhergeht. Dies hat eine hohe klinische Relevanz. So könnten Patienten, die möglicherweise zukünftig aufgrund einer Herzinsuffizienz mit einem CaMKII-Inhibitor behandelt werden bei einem kardiogenen Schock erhebliche Nebenwirkungen erleiden.

Der Diskussion um eine therapeutische CaMKII δ -Inhibition vorausgegangen waren mehrere Arbeiten, die eine kardioprotektive Wirkung einer δ -Inhibition zeigen konnten. So beobachteten BACKS et al. (2009), dass die auch in dieser Arbeit verwendete CaMKII δ -Knockout-Maus nach einer Druckbelastung infolge einer Verengung der thorakalen Aorta einen geringeren hypertrophen Umbau der Herzstruktur zeigte als vergleichbar behandelte Kontrollmäuse. Ursächlich schien eine verringerte Phosphorylierung von HDAC4, einem wichtigen Regulator der Hypertrophiekaskade, zu sein. LING et al. (2009) konnten an einem anderen CaMKII δ -Knockout-Mausmodell zwar keine

deutlich verringerte Hypertrophiereaktion beobachten, jedoch entwickelten CaMKII δ -Knockout-Mäuse anders als Kontrollmäuse im weiteren Verlauf keine Herzinsuffizienz. ANDERSON ME (2009) vermutete, dass eine unterschiedlich ausgeprägte Aortenkonstriktion den Unterschieden zwischen beiden Mausmodellen zugrunde lag, arbeitete aber auch die Gemeinsamkeit beider Ergebnisse heraus. So schlussfolgerte er, dass der δ -Isoform der CaMKII in beiden Publikationen eine wichtige Funktion für die Transduktion von myokardialen Stress in klinisch relevante Phänotypen zukommt. Dass andersherum eine Überexpression der δ -Isoform eine Herzinsuffizienz verursachen kann, konnte bereits vor einiger Zeit sowohl für die nukleäre als auch die zytoplasmatische CaMKII δ nachgewiesen werden (ZHANG T et al. 2002, MAIER et al. 2003).

Dabei scheint sich die kardioprotektive Wirkung einer Inhibition der δ -Isoform nicht wesentlich von der einer generalisierten CaMKII-Inhibition zu unterscheiden. So zeigte sich bei der AC3-I-Maus, einem Mausmodell für eine chronische Inhibition aller CaMKII-Isoformen, ebenfalls ein reduzierter struktureller Myokardumbau in Reaktion auf eine chronische betaadrenerge Stimulation (ZHANG R et al. 2005). Dieses Ergebnis ist allerdings kritisch zu betrachten, da BACKS et al. (2009) nachweisen konnten, dass die AC3-I-Maus auch die Proteinkinase D in einem relevanten Ausmaß inhibiert, welche ebenfalls in die Hypertrophiekaskade involviert ist (FIELITZ et al. 2008).

Neben einer kardioprotektiven Funktion einer CaMKII δ -Inhibition auf Hypertrophie und Herzinsuffizienz konnten SAG et al. (2009) mithilfe des in dieser Arbeit verwendeten CaMKII δ -Knockout-Mausmodells weiterhin eine Reduktion der Arrhythmiefrequenz nach betaadrenerger Stimulation nachweisen. Aufgrund des Überwiegens der CaMKII δ im Herzen ist es zudem möglich, dass auch Arrhythmien während und im Anschluss an eine Azidose (PEDERSEN et al. 2009, BELL et al. 2011 b), die sich durch pharmakologische CaMKII-Inhibition reduzieren lassen, letztlich auf die δ -Isoform zurückzuführen sind. Diese Hypothese benötigt allerdings noch eine experimentelle Überprüfung.

Die bedeutende Erkenntnis der vorliegenden Arbeit, dass es mit der Azidose eine wichtige pathophysiologische Situation gibt, bei der eine CaMKII δ -Inhibition mit negativen Konsequenzen für die Herzfunktion verbunden ist, wird gestützt durch SAG et al. (2007). Diese Autoren beobachteten, dass eine akute Überexpression der δ -Isoform der CaMKII zu einer Verbesserung der spätazidotischen Wiedererholungsvorgänge führt. Auch in weiteren Situationen könnte eine CaMKII δ -Inhibition zu relevanten Problemen führen. So konnten XU L et al. (2010) anhand der in dieser Arbeit verwendeten CaMKII δ -Knockout-Maus zeigen, dass diese zwar basal eine normale Herzfrequenz aufweist, ein adäquater Anstieg der Herzfrequenz bei körperlicher Belastung oder betaadrenerger Stimulation allerdings ausbleibt.

Obwohl es bislang noch nicht speziell für die δ -Isoform der CaMKII untersucht wurde, so wird vermutet, dass die CaMKII im Allgemeinen auch eine protektive Funktion für den reversiblen Ischämie- / Reperfusionsschaden (sogenanntes *stunned heart*) hat. Hierbei handelt es sich um eine den azidotischen Wiederholungsvorgängen ähnliche Reaktion, bei der es infolge einer reversiblen Ischämie zunächst zu einer kontraktile Dysfunktion durch intrazelluläre Kalziumüberladung kommt. Diese ist im weiteren Verlauf durch eine CaMKII-abhängige PLB-Phosphorylierung und somit vermehrte SR-Kalziumbelastung wieder reversibel (VALVERDE et al. 2006, MATTIAZZI et al. 2007).

Zusammengefasst scheint eine therapeutische CaMKII-Inhibition ein viel versprechender Ansatz zur Behandlung verschiedener kardialer Erkrankungen zu sein. Dabei darf allerdings nicht vergessen werden, dass der CaMKII als wichtigem Regulator des Kalziumstoffwechsels auch kardioprotektive Funktionen bei bestimmten physiologischen und pathophysiologischen Situationen zukommen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine therapeutische CaMKII δ -Inhibition in bestimmten Situationen, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Azidose verbunden sind, mit gravierenden Nebenwirkungen assoziiert sein könnte. So muss die therapeutische Anwendung beispielsweise bei einem kardiogenen Schock infolge einer Herzinsuffizienz kritisch hinterfragt werden. Zur abschließenden Bewertung der klinischen Relevanz dieser Beobachtungen sind allerdings weiterführende Untersuchungen notwendig, insbesondere vor dem Hintergrund möglicher Spezies-Unterschiede zwischen Mensch und Mausmodell. Auch bleibt abzuwarten, welche neuen Erkenntnisse sich aus gerade in Entwicklung befindlichen CaMKII γ - und CaMKII δ -KO-Mäusen ergeben werden.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte diese Arbeit erstmalig zeigen, dass die δ -Isoform der CaMKII zwar für die Aufrechterhaltung einer normalen systolischen Funktion verzichtbar zu sein scheint, ihr allerdings eine bedeutende Funktion für den pathophysiologischen Zustand der Azidose zukommt. So gelang es CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten im Gegensatz zu Kontrollzellen nicht, den durch die Azidose bedingten Abfall der Kontraktilität aufzuhalten und im weiteren Verlauf stabile Werte sicherzustellen. Stattdessen sank die Kontraktilität über den gesamten Verlauf der Azidose kontinuierlich ab. Ursächlich ist am ehesten eine verminderte Fähigkeit der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten, das Sarkoplasmatische Retikulum in der Azidose mit Kalzium zu beladen und so adäquate Kalziumtransienten hervorzurufen. Dies wiederum hängt vermutlich mit einer verringerten Aktivität der SR-Kalzium-ATPase (SERCA) zusammen und weist auf eine essentielle Bedeutung der δ -Isoform der CaMKII für die Regulation der SERCA-Aktivität während der Azidose hin.

6. Literaturverzeichnis

AI X, CURRAN JW, SHANNON TR, BERS DM, POGWIZD SM (2005):

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure.

Circ Res 97, 1213-1215

ALLEN DG, ORCHARD CH (1983):

The effects of changes of pH on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle.

J Physiol 335, 555-567

ANDERSON KA, MEANS RL, HUANG QH, KEMP BE, GOLDSTEIN EG, SELBERT MA, EDELMAN AM, FREMEAU RT, MEANS AR (1998):

Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta.

J Biol Chem 273, 31880-31889

ANDERSON ME (2009):

CaMKII and a failing strategy for growth in heart.

J Clin Invest 119, 1082–1085

ANDERSON ME, BRAUN AP, SCHULMAN H, PREMACK BA (1994):

Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca(2+)-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes.

Circ Res 75, 854-861

ANDERSON ME, BRAUN AP, WU Y, LU T, WU Y, SCHULMAN H, SUNG RJ (1998):

KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart.

J Pharmacol Exp Ther 287, 996-1006

ANDERSON ME, BROWN JH, BERS DM (2011):

CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure.

J Mol Cell Cardiol 51, 468-473

BACKS J, BACKS T, NEEF S, KREUSSER MM, LEHMANN LH, PATRICK DM, GRUETER CE, QI X, RICHARDSON JA, HILL JA, KATUS HA, BASSEL-DUBY R, MAIER LS, OLSON EN (2009):

The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload.

Proc Natl Acad Sci USA 106, 2342-2347

BASSANI RA, MATTIAZZI A, BERS DM (1995):

CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes.

Am J Physiol 268, H703-H712

BAYER KU, DE KONINCK P, SCHULMAN H (2002):

Alternative splicing modulates the frequency-dependent response of CaMKII to Ca²⁺ oscillations.

EMBO J 21, 3590-3597

BELL JR, MELLOR KM, WOLLERMANN AC, DELBRIDGE LM (2011 A):

Cardiac ischaemic stress: cardiomyocyte Ca^{2+} , sex and sex steroids.
Clin Exp Pharmacol Physiol 38, 717-723

BELL JR, CURL CL, IP WT, DELBRIDGE LM (2011 B):

Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase inhibition suppresses post-ischemic arrhythmogenesis and mediates sinus bradycardic recovery in reperfusion.
Int J Cardiol (epub ahead of print)

BERS DM:

Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force, 2. Auflage.
Kluwer Academic Publishers, Amsterdam 2001

BERS DM (2002):

Cardiac excitation-contraction coupling.
Nature 415, 198-205

BERS DM, DESPA S (2006):

Cardiac Myocytes Ca^{2+} and Na^+ Regulation in Normal and Failing Hearts.
J Pharmacol Sci 100, 315-322

BIRKELAND JA, SEJERSTED OM, TARALDSEN T, SJAASTAD I (2005):

EC-Coupling in normal and failing hearts.
Scand Cardiovasc J 39, 13-23

BLANCHARD EM, SOLARO RJ (1984):

Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH.
Circ Res 55, 382-391

BOUNTRA C, VAUGHAN-JONES RD (1989):

Effect of intracellular and extracellular pH on contraction in isolated, mammalian cardiac muscle.
J Physiol 418, 163-187

BRAUN AP, SCHULMAN H (1995 A):

A non-selective cation current activated via the multifunctional Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase in human epithelial cells.
J Physiol 488, 37-55

BRAUN AP, SCHULMAN H (1995 B):

The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function.
Annu Rev Physiol 57, 417-445

CHOI HS, TRAFFORD AW, ORCHARD CH, EISNER DA (2000):

The effect of acidosis on systolic Ca^{2+} and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated rat ventricular myocytes.
J Physiol 529, 661-668

COLOMER JM, MAO L, ROCKMAN HA, MEANS AR (2003):

Pressure overload selectively up-regulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in vivo.
Mol Endocrinol 17, 183-192

COUCHONNAL LF, ANDERSON ME (2008):

The Role of Calmodulin Kinase II in Myocardial Physiology and Disease.
Physiology (Bethesda) 23, 151-159

CURRIE S, LOUGHREY CM, CRAIG MA, SMITH GL (2004):

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart.
Biochem J 377, 357-366

CURRIE S, ELLIOTT EB, SMITH GL, LOUGHREY CM (2011):

Two candidates at the heart of dysfunction: The ryanodine receptor and calcium/calmodulin protein kinase II as potential targets for therapeutic intervention-An in vivo perspective.
Pharmacol Ther 13, 204-220

DALLY S, BREDOUX R, CORVAZIER E, ANDERSEN JP, CLAUSEN JD, DODE L, FANCHAOUY M, GELEBART P, MONCEAU V, DEL MONTE F, GWATHMEY JK, HAJJAR R, CHAABANE C, BOBE R, RAIES A, ENOUF J (2006):

Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform (SERCA2c).
Biochem J 395, 249-258

DESANTIAGO J, MAIER LS, BERS DM (2002):

Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban.
J Mol Cell Cardiol 34, 975-984

DESANTIAGO J, MAIER LS, BERS DM (2004):

Phospholamban is required for CaMKII-dependent recovery of Ca transients and SR Ca reuptake during acidosis in cardiac myocytes.
J Mol Cell Cardiol 36, 67-74

DZHURA I, WU Y, COLBRAN RJ, BALSER JR, ANDERSON ME (2000):

Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels.
Nat Cell Biol 2, 173-177

ELGERSMA Y, SWEATT JD, GIESE KP (2004):

Mouse genetic approaches to investigating calcium/calmodulin-dependent protein kinase II function in plasticity and cognition.
J Neurosci 24, 8410-8415

ERICKSON JR, JOINER ML, GUAN X, KUTSCHKE W, YANG J, ODDIS CV, BARTLETT RK, LOWE JS, O'DONNELL SE, AYKIN-BURNS N, ZIMMERMAN MC, ZIMMERMAN K, HAM AJ, WEISS RM, SPITZ DR, SHEA MA, COLBRAN RJ, MOHLER PJ, ANDERSON ME (2008):

A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation.
Cell 133, 462-474.

ERKASAP N (2007):

SERCA in genesis of arrhythmias: what we already know and what is new.
Anadolu Kardiyol Derg 7, 43-46

FABIATO A (1983):

Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum.

Am J Physiol 245, C1-C14

FABIATO A, FABIATO F (1975):

Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.

J Physiol 249, 469-495

FABIATO A, FABIATO F (1978):

Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles.

J Physiol 276, 233-255

FIELITZ J, KIM MS, SHELTON JM, QI X, HILL JA, RICHARDSON JA, BASSEL-DUBY R, OLSON EN (2008):

Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling.

Proc Natl Acad Sci USA 105, 3059-3063

FRY CH, POOLE-WILSON PA (1981):

Effects of acid-base changes on excitation--contraction coupling in guinea-pig and rabbit cardiac ventricular muscle.

J Physiol 313, 141-160

GAO L, BLAIR LA, MARSHALL J (2006):

CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels.

Biochem Biophys Res Commun 345, 1606-1610

GASKELL WH (1880):

On the Tonicity of the Heart and Blood Vessels.

J Physiol 3, 48-92

GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS:

(NIH Publikationsnummer 85-23) National Academy Press, Washington D.C. 1996

HAFFEY TA (2009):

How to avoid a heart attack: putting it all together.

J Am Osteopath Assoc 109, S14-S20

HARRISON SM, FRAMPTON JE, MCCALL E, BOYETT MR, ORCHARD CH (1992):

Contraction and intracellular Ca²⁺, Na⁺, and H⁺ during acidosis in rat ventricular myocytes.

Am J Physiol 262, C348-C357

HOCH B, MEYER R, HETZER R, KRAUSE EG, KARCZEWSKI P (1999):

Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium.

Circ Res 84, 713-721

HRYSHKO LV, BERS DM (1990):

Ca current facilitation during postrest recovery depends on Ca entry.

Am J Physiol 259, H951-H961

HUDMON A, SCHULMAN H (2002):

Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II.
Biochem J 364, 593-611

HUKE S, BERS DM (2007):

Temporal dissociation of frequency-dependent acceleration of relaxation and protein phosphorylation by CaMKII.
J Mol Cell Cardiol 42, 590-599

HULME JT, ORCHARD CH (1998):

Effect of acidosis on Ca²⁺ uptake and release by sarcoplasmic reticulum of intact rat ventricular myocytes.
Am J Physiol 275, H977-H987

HUXLEY HE (1969):

The mechanism of muscular contraction.
Science 164, 1356-1366

IONOPTIX:

Myocyte Calcium & Contractility Recording System
http://www.ionoptix.com/userfiles/File/Database/Ca%20and%20Cont_HSW_digital.pdf (abgerufen am 18.07.2012)

IRISAWA H, SATO R (1986):

Intra- and extracellular actions of proton on the calcium current of isolated guinea pig ventricular cells.
Circ Res 59, 348-355

ISHIDA A, KAMESHITA I, OKUNO S, KITANI T, FUJISAWA H (1995):

A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II.
Biochem Biophys Res Commun 212, 806-812

ISLAM MS:

Calcium Signaling, 1. Auflage.
Springer Verlag, Heidelberg 2012

JETT MF, SCHWORER CM, SODERLING TR (1987):

Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart.
Arch Biochem Biophys 255, 354-360

JOHNSON I, SPENCE M:

Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11. Auflage.
www.probes.invitrogen.com, Molecular Probes, Eugene 2010

KANASEKI T, IKEUCHI Y, SUGIURA H, YAMAUCHI T (1991):

Structural features of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy.
J Cell Biol 115, 1049-1060

KANDILCI HB, TUNCAY E, ZEYDANLI EN, SOZMEN NN, TURAN B (2011):

Age-related regulation of excitation-contraction coupling in rat heart.
J Physiol Biochem 67, 317-330

KATO T, SANO M, MIYOSHI S, SATO T, HAKUNO D, ISHIDA H, KINOSHITA-NAKAZAWA H, FUKUDA K, OGAWA S (2000):

Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats.

Circ Res 87,937-945

KENNEDY MB, GREENGARD P (1981):

Two calcium/calmodulin-dependent protein kinases, which are highly concentrated in brain, phosphorylate protein I at distinct sites.

Proc Natl Acad Sci USA 78, 1293–1297

KENTISH JC (1986):

The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle.

J Physiol 370, 585-604

KENTISH JC, XIANG JZ (1997):

Ca²⁺- and caffeine-induced Ca²⁺-release from the sarcoplasmic reticulum in rat skinned trabeculae: effects of pH and Pi.

Cardiovasc Res 33, 314-323

KHOO MS, KANNANKERIL PJ, LI J, ZHANG R, KUPERSHMIDT S, ZHANG W, ATKINSON JB, COLBRAN RJ, RODEN DM, ANDERSON ME (2005):

Calmodulin kinase II activity is required for normal atrioventricular nodal conduction.

Heart Rhythm 2, 634-640

KLINKE R, SILBERNAGEL S:

Lehrbuch der Physiologie, 4. Auflage.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005

KOHLHAAS M, ZHANG T, SEIDLER T, ZIBROVA D, DYBKOVA N, STEEN A, WAGNER S, CHEN L, BROWN JH, BERS DM, MAIER LS (2006):

Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes.

Circ Res 98, 235-244

KOMUKAI K, PASCAREL C, ORCHARD CH (2001):

Compensatory role of CaMKII on ICa and SR function during acidosis in rat ventricular myocytes.

Pflügers Arch 442, 353-361

KONG H, JONES PP, KOOP A, ZHANG L, DUFF HJ, CHEN SR (2008):

Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor.

Biochem J 414, 441-452

KOSS KL, KRANIAS EG (1996):

Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility.

Circ Res 79, 1059–1063

LAI Y, NAIRN AC, GREENGARD P (1986):

Autophosphorylation reversibly regulates the Ca²⁺/calmodulin-dependence of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II.

Proc Natl Acad Sci USA 83, 4253-4257

LANGENDORFF O (1895):

Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen.

Pflügers Arch 61, 291-332

LEEM CH, LAGADIC-GOSSMANN D, VAUGHAN-JONES RD (1999):

Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte.

J Physiol 517, 159-180

LEPRIGENT K, LAGADIC-GOSSMANN D, FEUVRAY D (1997):

Modulation by pH_o and intracellular Ca²⁺ of Na⁺/H⁺-exchange in diabetic rat isolated ventricular myocytes.

Circ Res 80, 253-260

LI L, CHU G, KRANIAS EG, BERS DM (1998):

Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects.

Am J Physiol 274, H1335-H1347.

LING H, ZHANG T, PEREIRA L, MEANS CK, CHENG H, GU Y, DALTON ND, PETERSON KL, CHEN J, BERS D, HELLER BROWN J (2009):

Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice.

J Clin Invest 119, 1230-1240

LOU LL, LLOYD SJ, SCHULMAN H (1986):

Activation of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulate s production of an autonomous enzyme.

Proc Natl Acad Sci USA 83, 9497-9501

LÜLLMANN-RAUCH R:

Histologie, 3. Auflage.

Georg-Thieme Verlag, Stuttgart 2009

LUO W, GRUPP IL, HARRER J, PONNIAH S, GRUPP G, DUFFY JJ, DOETSCHMANN T KRANIAS EG (1994):

Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation.

Circ Res 75, 401-409

LUO W, CHU G, SATO Y, ZHOU Z, KADAMBI V, KRANIAS E (1998):

Transgenic approaches to define the functional role of dual site phospholamban phosphorylation.

J Biol Chem 273, 4734-4739

MAIER LS (2009):

Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart.

Front Biosci 14, 486-496

MAIER LS, BERS DM (2002):

Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond.
J Mol Cell Cardiol 34, 919-939

MAIER LS, BERS DM (2007):

Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart.
Cardiovasc Res 73, 631-640

MAIER LS, ZHANG T, CHEN L, DESANTIAGO J, BROWN JH, BERS DM (2003):

Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release.
Circ Res 92, 904-911

MANDEL F, KRANIAS EG, GRASSI DE GENDE A, SUMIDA M, SCHWARTZ A (1982):

The effect of pH on the transient-state kinetics of Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. A comparison with skeletal sarcoplasmic reticulum.
Circ Res 50, 310-317

MANNING G, WHYTE DB, MARTINEZ R, HUNTER T, SUDARSANAM S (2002):

The protein kinase complement of the human genome.
Science 298, 1912-1934

MATTIAZZI A, VITTONI L, MUNDINA-WEILENMANN C (2007):

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis.
Cardiovasc Res 73, 648-656

MEYER T, HANSON PI, STRYER L, SCHULMAN H (1992):

Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase.
Science 256, 1199-1202

MINTA A, TSIEN RY (1989):

Fluorescent indicators for cytosolic sodium.
J Biol Chem 264, 19449-19457

MINTA A, KAO JP, TSIEN RY (1989):

Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores.
J Biol Chem 264, 8171-8178

MISHRA S, GRAY CB, MIYAMOTO S, BERS DM, BROWN JH (2011):

Location matters: clarifying the concept of nuclear and cytosolic CaMKII subtypes.
Circ Res 109, 1354-1362

MUNDINA-WEILENMANN C, VITTONI L, CINGOLANI HE, ORCHARD CH (1996):

Effects of acidosis on phosphorylation of phospholamban and troponin I in rat cardiac muscle.
Am J Physiol 270, C107-C114

MUNDINA-WEILENMANN C, FERRERO P, SAID M, VITTONI L, KRANIAS EG, MATTIAZZI A (2005):

Role of phosphorylation of Thr(17) residue of phospholamban in mechanical recovery during hypercapnic acidosis.
Cardiovasc Res 66, 114-122

NAKAMURA TY, IWATA Y, ARAI Y, KOMAMURA K, WAKABAYASHI S (2008):

Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure.

Circ Res 103, 891-899

NEUMANN J, ESCHENHAGEN T, JONES LR, LINCK B, SCHMITZ W, SCHOLZ H, ZIMMERMANN N (1997):

Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure.

J Mol Cell Cardiol 29, 265-272

NIKI I, OKAZAKI K, SAITOH M, NIKI A, TAMAGAWA T, IGUCHI A, HIDAHA H (1993):

Presence and possible involvement of Ca/calmodulin-dependent protein kinases in insulin release from the rat pancreatic beta cell.

Biochem Biophys Res Commun 191, 255-261

NIKON:

Nikon Eclipse TE 2000-U

<http://www.nikon-instruments.jp/eng/page/products/te2000.aspx> (Seite abgerufen am 18.07.2012)

NOMURA N, SATOH H, TERADA H, MATSUNAGA M, WATANABE H, HAYASHI H (2002):

CaMKII-dependent reactivation of SR Ca²⁺ uptake and contractile recovery during intracellular acidosis.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 283, H193-H203

ORCHARD CH (1987):

The role of the sarcoplasmic reticulum in the response of ferret and rat heart muscle to acidosis.

J Physiol 384, 431-449

ORCHARD CH, KENTISH JC (1990):

Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle.

Am J Physiol 258, C967-C981

PASSIER R, ZENG H, FREY N, NAYA FJ, NICOL RL, MCKINSEY TA, OVERBEEK P, RICHARDSON JA, GRANT SR, OLSON EN (2000):

CaM signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo.

J Clin Invest 105, 1395-1406

PEDERSEN TH, GURUNG IS, GRACE A, HUANG CL (2009):

Calmodulin kinase II initiates arrhythmogenicity during metabolic acidification in murine hearts.

Acta Physiol (Oxf) 197, 13-25

PERIASAMY M, BHUPATHY P, BABU GJ (2008):

Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology.

Cardiovasc Res 77, 265-273

PHILIPSON KD, BERSOHN MM, NISHIMOTO AY (1982):

Effects of pH on Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles.

Circ Res 50, 287-293

PHYWE CHEMISTRY:

Trennverfahren für Suspensionen und Lösungen

<http://www.phywe.de/51/pid/23591/Trennverfahren-fuer-Suspensionen-und-Loesungen-Dekantieren,-Zentrifugieren,-Filtrieren,-Auskristallisieren-.htm> (abgerufen am 18.07.2012)

PICHT E, DESANTIAGO J, HUKU S, KAETZEL MA, DEDMAN JR, BERS DM (2007):

CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits frequency-dependent acceleration of relaxation and Ca²⁺ current facilitation.

J Mol Cell Cardiol 42, 196-205

PIESKE B, MAIER LS, BERS DM, HASENFUSS G (1999):

Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium.

Circ Res 85, 38-46

PIPER HM, ABDALLAH Y, SCHAFFER C (2004):

The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection.

Cardiovasc Res 61, 365-371

PITT GS (2007):

Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels.

Cardiovasc Res 73, 641-647

POOLE-WILSON PA (1989):

Regulation of intracellular pH in the myocardium; relevance to pathology.

Mol Cell Biochem 89, 151-155

REDDY LG, JONES LR, PACE RC, STOKES DL (1996):

Purified, reconstituted cardiac Ca²⁺-ATPase is regulated by phospholamban but not by direct phosphorylation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase.

J Biol Chem 271, 14964-14970

RELLOS P, PIKE AC, NIESEN FH, SALAH E, LEE WH, VON DELFT F, KNAPP S (2010):

Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation.

PLoS Biol 8, e1000426

RINGER S (1883):

A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart.

J Physiol 4, 29-43

RIZZUTO R, PINTON P, FERRARI D, CHAMI M, SZABADKAI G, MAGALHÃES PJ, DI VIRGILIO F, POZZAN T (2003):

Calcium and apoptosis: facts and hypotheses.

Oncogene 22, 8619-8627

ROST FWD:

Fluorescence Microscopy, Volume 1.
Cambridge University Press, Cambridge 1992

SAG CM, DYBKOVA N, NEEF S, MAIER LS (2007):

Effects on recovery during acidosis in cardiac myocytes overexpressing CaMKII.
J Mol Cell Cardiol 43, 696-709

SAG CM, WADSACK DP, KHABBAZZADEH S, ABESSER M, GREFE C, NEUMANN K, OPIELA MK, BACKS J, OLSON EN, BROWN JH, NEEF S, MAIER SK, MAIER LS (2009):

Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Contributes to Cardiac Arrhythmogenesis in Heart Failure.
Circ Heart Fail 2, 664-675

SAID M, BECERRA R, PALOMEQUE J, RINALDI G, KAETZEL MA, DIAZ-SYLVESTER PL, COPELLO JA, DEDMAN JR, MUNDIÑA-WEILENMANN C, VITTONI L, MATTIAZZI A (2008):

Increased intracellular Ca²⁺ and SR Ca²⁺ load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 295, H1669-H1683

SATOH H, HAYASHI H, KATOH H, TERADA H, KOBAYASHI A (1995):

Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchange in regulation of [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i during metabolic inhibition.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 268, H1239-H1248

SCHWORER CM, COLBRAN RJ, SODERLING TR (1986):

Reversible generation of a Ca²⁺-independent form of Ca²⁺(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism.
J Biol Chem 261, 8581-8584

SERGEANT GP, OHYA S, REIHILL JA, BERRINO BA, AMBERG GC, IMAIZUMI Y, HOROWITZ B, SANDERS KM, KOH SD (2005):

Regulation of Kv4.3 currents by Ca²⁺/calmodulin-independent protein kinase II.
Am J Physiol Cell Physiol 288, C304-C313

SINGH P, LEDDY JJ, CHATZIS GJ, SALIH M, TUANA BS (2005):

Alternative splicing generates a CaM kinase IIbeta isoform in myocardium that targets the sarcoplasmic reticulum through a putative alphaKAP and regulates GAPDH.
Mol Cell Biochem 270, 215-221

SINGH P, SALIH M, TUANA BS (2009):

Alpha-kinase anchoring protein alphaKAP interacts with SERCA2A to spatially position Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and modulate phospholamban phosphorylation.
J Biol Chem 284, 28212-28221

SOSSALLA S, FLUSCHNIK N, SCHOTOLA H, ORT KR, NEEF S, SCHULTE T, WITTKÖPPER K, RENNER A, SCHMITTO JD, GUMMERT J, EL-ARMOUCHE A, HASENFUSS G, MAIER LS (2010):

Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium.
Circ Res 107, 1150-1161

SPERELAKIS N, LEE EC (1971):

Characterization of Na⁺/K⁺-ATPase isolated from embryonic chick hearts and cultured chick heart cells. *Biochem Biophys Acta* 233, 562-579

STATISTISCHES BUNDESAMT (2010):

Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (Daten aus dem Jahr 2010)
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html> (abgerufen am 18.07.2012)

SUMI M, KIUCHI K, ISHIKAWA T, ISHII A, HAGIWARA M, NAGATSU T, HIDAKA HM (1991):

The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells.
Biochem Biophys Res Commun 181, 968–975

TADA M, YAMADA M, KADOMA M, INUI M, OHMORI F (1982):

Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban.
Mol Cell Biochem 46, 74-95

TAN H, KUPERSHMIDT S, ZHANG R, STEPANOVIC S, RODEN D, WILDE A, ANDERSON ME, BALSER JR (2002):

A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability.
Nature 415, 442-447

TESSIER S, KARCZEWSKI P, KRAUSE EG, PANSARDY, ACAR C, LANG-LAZDUNSKI M, MERCADIER JJ, HATEM SN (1999):

Regulation of the transient outward K⁺ current by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes.
Circ Res 85, 810-819

TOISCHER K, ROKITA AG, UNSÖLD B, ZHU W, KARARIGAS G, SOSSALLA S, REUTER SP, BECKER A, TEUCHER N, SEIDLER T, GREBE C, PREUSS L, GUPTA SN, SCHMIDT K, LEHNART SE, KRÜGER M, LINKE WA, BACKS J, REGITZ-ZAGROSEK V, SCHÄFER K, FIELD LJ, MAIER LS, HASENFUSS G (2010):

Differential cardiac remodeling in preload versus afterload.
Circulation 122, 993-1003

TRAFFORD AW, DÍAZ ME, EISNER DA (1998):

Stimulation of Ca-induced Ca release only transiently increases the systolic Ca transient: measurements of Ca fluxes and sarcoplasmic reticulum Ca.
Cardiovasc Res 37, 710-717

VALVERDE CA, MUNDIÑA-WEILENMANN C, SAID M, FERRERO P, VITTONI L, SALAS M, PALOMEQUE J, PETROFF MV, MATTIAZZI A (2005):

Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: a property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation.
J Physiol 562, 801–813

VALVERDE CA, MUNDIÑA-WEILENMANN C, REYES M, KRANIAS EG, ESCOBAR AL, MATTIAZZI A (2006):

Phospholamban phosphorylation sites enhance the recovery of intracellular Ca²⁺ after perfusion arrest in isolated, perfused mouse heart.
Cardiovasc Res 70, 335-345

VARIAN KD, JANSSEN PML (2007):

Frequency-dependent acceleration of relaxation involves decreased myofilament calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H2212-H2219

VILA-PETROFF M, SALAS MA, SAID M, VALVERDE CA, SAPIA L, PORTIANSKY E, HAJJAR RJ, KRANIAS EG, MUNDINA-WEILENMANN C, MATTIAZZI A (2007):

CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 73, 689-698

VILA-PETROFF M, MUNDIÑA-WEILENMANN C, LEZCANO N, SNABAITIS AK, HUERGO MA, VALVERDE CA, AVKIRAN M, MATTIAZZI A (2010):

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to intracellular pH recovery from acidosis via N⁹+/H⁺ exchanger activation.

J Mol Cell Cardiol 49, 106-112

VITTONI L, MUNDINA-WEILENMANN C, SAID M, MATTIAZZI A (1998):

Mechanisms involved in the acidosis enhancement of the isoproterenol-induced phosphorylation of phospholamban in the intact heart.

J Biol Chem 273, 9804-9811

VITTONI L, MUNDIÑA-WEILENMANN C, SAID M, FERRERO P, MATTIAZZI A (2002):

Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways.

J Mol Cell Cardiol 34, 39-50

WAGNER S, DYBKOVA N, RASENACK EC, JACOBSHAGEN C, FABRITZ L, KIRCHHOF P, MAIER SK, ZHANG T, HASENFUSS G, BROWN JH, BERS DM, MAIER LS (2006 A):

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels.

J Clin Invest 116, 3127-3138

WAGNER S, HACKER E, DYBKOVA N, FABRITZ L, KIRCHHOF P, BERS DM, MAIER LS (2006 B):

Ca/calmodulin Kinase II differentially modulates transient outward potassium current in heart failure. *Circulation* 114 (Suppl II), 60

WANG W, ZHU W, WANG S, YANG D, CROW MT, XIAO RP, CHENG H (2004):

Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway.

Circ Res 95, 798-806

WEHRENS XH, LEHNART SE, REIKEN SR, MARKS AR (2004):

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor.

Circ Res 94, e61-70

WIBO M, BRAVO G, GODFRAIND T (1991):

Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors.

Circ Res 68, 662-673

WITCHER DR, KOVACS RJ, SCHULMAN H, CEFALI DC, JONES LR (1991):

Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity.

J Biol Chem 266, 11144-11152

WU Y, MACMILLAN LB, MCNEILL RB, COLBRAN RJ, ANDERSON ME (1999):

CaM kinase augments cardiac L-type Ca^{2+} current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. *Am J Physiol* 276, H2168-H2178

WU Y, TEMPLE J, ZHANG R, DZHURA I, ZHANG W, TRIMBLE R, RODEN DM, PASSIER R, OLSON EN, COLBRAN RJ, ANDERSON ME (2002):

Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106, 1288-1293

WU Y, SHINTANI A, GRUETER C, ZHANG R, HOU Y, YANG J, KRANIAS EG, COLBRAN RJ, ANDERSON ME (2006):

Suppression of dynamic Ca^{2+} transient responses to pacing in ventricular myocytes from mice with genetic calmodulin kinase II inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 40, 213-223

XU A, NARAYANAN N (2000):

Reversible inhibition of the calcium-pumping ATPase in native cardiac sarcoplasmic reticulum by a calmodulin-binding peptide. Evidence for calmodulin-dependent regulation of the V_{max} of calcium transport. *J Biol Chem* 275, 4407-4416

XU L, MANN G, MEISSNER G (1996):

Regulation of cardiac Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by Ca^{2+} , H^+ , Mg^{2+} , and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. *Circ Res* 79, 1100-1109

XU L, LAI D, CHENG J, LIM HJ, KESKANOKWONG T, BACKS J, OLSON EN, WANG Y (2010):

Alterations of L-type calcium current and cardiac function in CaMKII $\{\delta\}$ knockout mice. *Circ Res* 107, 398-407

ZHANG R, KHOO MS, WU Y, YANG Y, GRUETER CE, NI G, PRICE EE JR, THIEL W, GUATIMOSIM S, SONG LS, MADU EC, SHAH AN, VISHNIVETSKAYA TA, ATKINSON JB, GUREVICH VV, SALAMA G, LEDERER WJ, COLBRAN RJ, ANDERSON ME (2005):

Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 11, 379-80

ZHANG T, BROWN JH (2004):

Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Res* 63, 476-486

ZHANG T, JOHNSON EN, GU Y, MORISSETTE MR, SAH VP, GIGENA MS, BELKE DD, DILLMANN WH, ROGERS TB, SCHULMAN H, ROSS J JR, BROWN JH (2002):

The cardiac-specific nuclear δ (B) isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277, 1261-1267

ZHANG T, MAIER LS, DALTON ND, MIYAMOTO S, ROSS J JR, BERS DM, BROWN JH (2003):

The δ C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912-919

ZHANG T, KOHLHAAS M, BACKS J, MISHRA S, PHILLIPS W, DYBKOVA N, CHANG S, LING H, BERS DM, MAIER LS, OLSON EN, BROWN JH (2007):

CaMKII δ Isoforms Differentially Affect Calcium Handling but Similarly Regulate HDAC/MEF2 Transcriptional Responses.

J Biol Chem 282, 35078-35087

ZHU W, WOO AY, YANG D, CHENG H, CROW MT, XIAO RP (2007):

Activation of CaMKII δ is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis.

J Biol Chem 282, 10833-10839

Publikationen zum Thema der Dissertation

Abstracts

NEEF S, BACKS T, SAG CM, RAFTOPOULOS M, BÄUMER H, GREFE C, OLSON EN, BACKS J, MAIER LS (2008):

Knockout of the “delta” Isoform of CaMKII does not Negatively Influence Cardiomyocyte Excitation-Contraction Coupling in Mice.

Circulation 118, S523, Abstract 5305

BÄUMER H, SAG CM, BACKS J, OLSEN E, MAIER LS (2009):

Isoform-specific Knockdown of Ca/Calmodulin-dependent Protein Kinase II “ δ ” (CaMKII δ -KO) impairs Recovery from Acidosis.

Clin Res Cardiol 98 (Suppl 1), Abstract V60

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Lars Maier sehr herzlich für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung danken. Bei jeglichen Problemen stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite und hat mich mit seiner beispiellosen Begeisterung für die Forschung angesteckt. Aufgrund seiner hohen fachlichen und sozialen Kompetenz ist er mir für meine weitere wissenschaftliche Laufbahn ein bedeutendes Vorbild geworden.

Ein weiterer besonderer Dank geht an Herrn Dr. med. Can Sag, der mich fortwährend bei der Durchführung der Versuche und der Interpretation der Daten unterstützt hat. Nach langen, teilweise frustrierenden Nachtschichten hat er mich immer wieder motiviert weiterzuarbeiten und mit seiner fröhlichen Art für eine angenehme Atmosphäre im Labor gesorgt.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. Stefan Neef, der für alle methodischen Probleme eine rasche Lösung gefunden hat und für alle Belange des Laboralltags immer ein offenes Ohr gehabt hat.

Für die technische Unterstützung möchte ich Timo Schulte und Thomas Sowa danken, die eine hervorragende Arbeit geleistet haben.

Mein Dank gilt zudem allen weiteren Mitgliedern des Labors, insbesondere Frau Dr. N. Dybkova, Herrn Dr. C. Grefe, Herrn S. Gupta, Frau S. Khabbazzadeh, Frau M. Daut, Herrn Dr. A. Rokita, Herrn Dr. S. Sossalla und Herrn Dr. S. Wagner für das freundliche und kollegiale Arbeitsklima, sowie die zahlreichen und fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen.