

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

**Die Effekte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängigen  
Proteinkinase II (CaMKII) auf die Aktionspotential-  
morphologie bei mechanischer Last**

**INAUGURAL - DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Shamindra Nath Gupta

aus

Bremen

Göttingen 2013

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/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2013

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Herzmuskelzelle .....	1
1.2 Ultrastruktur der Herzmuskelzelle .....	2
1.3 Die elektromechanische Kopplung.....	4
1.3.1 Die Elektrik: Das Aktionspotential .....	4
1.3.2 Der second messenger: Das Kalzium .....	5
1.3.3 Die Mechanik: die Myofilamente .....	6
1.4 Kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz .....	7
1.4.1 Grundlagen der Hypertrophie.....	8
1.4.2 Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz .....	9
1.5 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) .....	10
1.5.1 Aktivierung.....	11
1.5.2 Inaktivierung .....	12
1.6 Einfluss der CaMKII auf die elektromechanische Kopplung (ECC) und Aktionspotentiale.....	12
1.6.1 CaMKII und die elektromechanische Kopplung.....	12
1.6.2 CaMKII und Aktionspotentiale.....	13
1.7 Überexpressionsmodelle.....	14
1.7.1 Transgene CaMKII-Maus.....	14
1.7.2 Adenovirale CaMKII-Überexpression .....	15
1.8 CaMKII bei mechanischer Last .....	15
1.9 Zielsetzung und Fragestellung .....	16
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 Interventionsmodelle .....	17
2.1.1 Transversale Aortenkonstriktion (TAC) .....	17
2.1.2 Aortokavaler Shunt .....	18
2.2 Isolation der Myozyten .....	20
2.2.1 Lösungen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).....	20
2.2.2 Vorbereitung .....	21
2.2.3 Präparation der Herzen.....	21
2.2.4 Kanülierung, enzymatischer Verdau und Dissektion .....	22

2.3 Erhebung der biometrischen Daten.....	23
2.4 Patch Clamp .....	24
2.4.1 Lösungen.....	25
2.4.2 Versuchsaufbau.....	26
2.4.3 Versuchsdurchführung.....	28
2.5 Auswertung der Aktionspotentiale.....	31
2.5.1 Dauer und Amplitude .....	31
2.5.2 Nachdepolarisationen .....	31
2.6 Statistische Auswertung.....	32
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1 Auswertung der biometrischen Daten .....	34
3.1.1 TAC .....	34
3.1.2 Shunt.....	36
3.1.3 Auswertung der Membrankapazitäten.....	39
3.2 Effekte der Nachlasterhöhung (TAC, 7d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie .....	39
3.2.1 Effekte der Nachlasterhöhung (TAC, 7d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie .....	40
3.2.2 Einfluss der CaMKII-Inhibition.....	43
3.2.3 Einfluss der L-Typ-Kalzium-Strom-Inhibition .....	46
3.2.4 Einfluss der late $I_{Na}$ -Inhibition .....	52
3.2.5 Zeitlicher Einfluss auf die Messungen – Rundown/Vehicle.....	56
3.3 Effekte der Nachlasterhöhung (TAC, 21d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie .....	56
3.3.1 Effekte der Nachlasterhöhung (TAC, 21d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie .....	56
3.3.2 Einfluss der CaMKII-Inhibition.....	59
3.3.3 Einfluss der L-Typ-Kalzium-Strom-Inhibition .....	61
3.3.4 Einfluss der late $I_{Na}$ -Inhibition .....	63
3.4 Effekte der Vorlasterhöhung (Shunt, 7d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie .....	65
3.4.1 Dauer und Amplitude .....	65
3.4.2 Nachdepolarisationen .....	67
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>68</b>
4.1 Die differenzierte Regulierung der Hypertrophie bei verschiedenen Formen der mechanischen Last – erhöhte Vorlast vs. Nachlast .....	68

---

4.2 CaMKII-Aktivität und Elektrophysiologische Veränderungen .....	69
4.3 Elektrophysiologische Veränderungen durch CaMKII-Zielproteine - Aktionspotentialdauer .....	71
4.4 Elektrophysiologische Veränderungen durch CaMKII-Zielproteine - Frequency- dependent-acceleration of relaxation (FDAR) .....	73
4.5 Elektrophysiologische Veränderungen durch CaMKII-Zielproteine - Nachdepolarisationen .....	74
4.6 Elektrophysiologische Veränderungen im Shunt-Modell .....	75
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AF	Atemfrequenz
AIP	Autocamtide 2-related inhibitory peptide
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
APD <sub>30%</sub>	Aktionspotentialdauer bis 30% Repolarisation
APD <sub>50%</sub>	Aktionspotentialdauer bis 50% Repolarisation
APD <sub>80%</sub>	Aktionspotentialdauer bis 80% Repolarisation
APD <sub>90%</sub>	Aktionspotentialdauer bis 90% Repolarisation
AZV	Atemzugvolumen
BGA	Blutgasanalyse
DAD	Delayed Afterdepolarisation = späte Nachdepolarisation
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
EAD	Early Afterdepolarisation = frühe Nachdepolarisation
I <sub>Ca</sub>	Sarkolemmaler-L-Typ-Kalziumkanal-vermittelter Kalziueinstrom
I <sub>Kr</sub>	Sarkolemmaler Kaliumaustrom
I <sub>Na</sub>	Sarkolemmaler Natriumeinstrom
I <sub>to</sub>	Sarkolemmaler Kaliumaustrom
ip	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
late I <sub>Na</sub>	später Natriumeinstrom
LTCC	L-Typ-Kalziumkanal
RyR	Ryanodinrezeptor
Shunt	Aortokavaler Shunt
TAC	Transversale Aortenkonstriktion
TG	Transgene Mäuse (-zellen)
T-Tubuli	Transversale Tubuli
VCI	Vena cava inferior
WT	Wildtyp-Mäuse (-zellen)

## 1 Einleitung

Die Bedeutung der elektrischen Erregung für die muskuläre Kontraktion wurde schon von Luigi Galvani 1780 entdeckt, als er Froschschenkel als Mahlzeit für seine erkrankte Frau zubereitete und auf dem gleichen Tisch eine starke Elektriziermaschine betrieben wurde. Die Schenkel zuckten zusammen, wenn die freiliegenden Nerven mit dem Messer berührt wurden und gleichzeitig die Elektriziermaschine lief, so dass die Funken überspringen konnten. Galvani nannte das Phänomen „tierische Elektrizität“ und fasste die Ergebnisse in seiner Abhandlung „De viribus electricitatis in motu musculari commentarius“ 1791 zusammen.

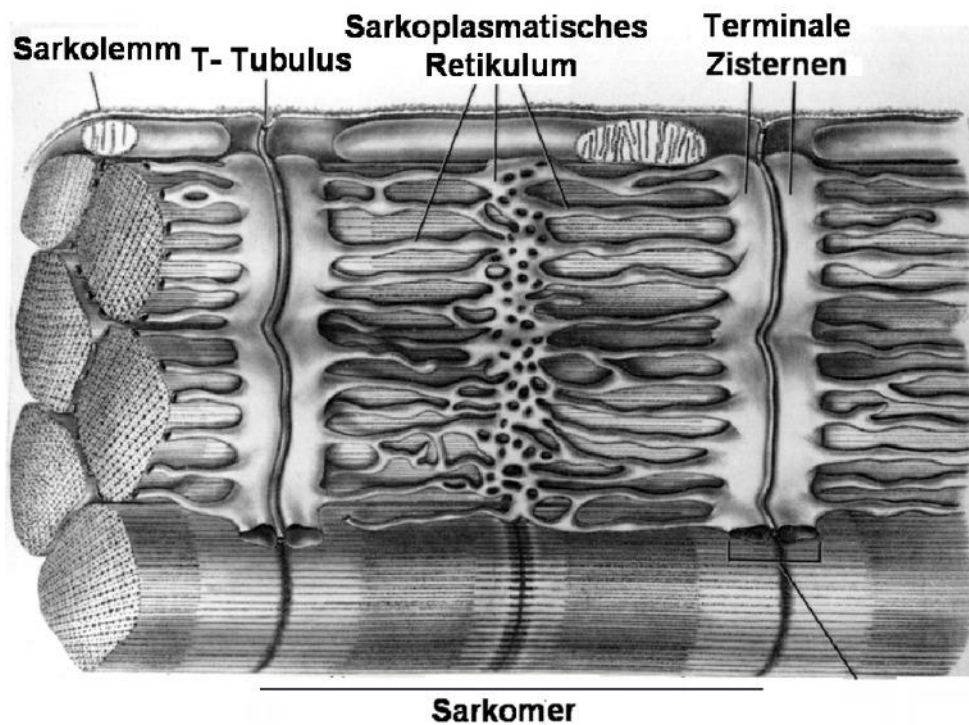
Jedoch bedarf es zur Kontraktion nicht nur der elektrischen Erregung durch ein Aktionspotential, sondern auch eines „second messenger“ in der Zelle, in diesem Fall der Kalziumionen. Deren Bedeutung für die physiologischen Kontraktionsvorgänge am Herzen wurden ein Jahrhundert später entdeckt, als Sydney Ringer mit isolierten Froschherzen experimentierte und dabei feststellte, dass diese zwar noch kontrahierten, wenn sie mit Leitungswasser umspült wurden, jedoch aufhörten sobald sie mit destilliertem Wasser umspült wurden. Daraus schloss er, dass etwas im Leitungswasser enthalten sein müsste, was die Herzen zur Kontraktion befähigt (Ringer 1883; Ringer 1895). Beide Aspekte zusammen ermöglichen eine koordinierte Kontraktion und damit adäquate Auswurfleistung des Herzens. Lokalisierte und generalisierte Fehlregulationen in Bezug auf Freisetzung, Aufnahme/Eintritt und Speicherung in diesem präzise ausbalancierten System können schwerwiegende Folgen, wie das Entstehen der Herzinsuffizienz und maligner Arrhythmien verursachen, da die Pathogenese ursächlich auf Störungen des Kalziumstoffwechsels beruht (Hasenfuss et al. 1994; Maier et al. 2003).

### 1.1 Die Herzmuskelzelle

Einzelbausteine des Herzmuskels sind die Kardiomyozyten, welche jeweils vom Sarkolemm umschlossen werden und die kontraktile Myofilamente enthalten, die der Zelle die charakteristische Streifung verleihen. Die Zellen sind untereinander netzartig verflochten, um so eine möglichst effektive Kontraktion des Ventrikels in vivo zu ermöglichen. Dabei beschränkt sich die Kopplung nicht nur auf den mechanischen Aspekt, der über Desmosomen, also Verbindungen der Intermediärfilamente erfolgt, sondern umfasst über die „gap-junctions“ auch den elektrisch/chemischen Aspekt (Junqueira und Carneiro, 1998). Diese „gap-junctions“ werden von Connexinen gebildet und ermöglichen die gezielte Erregungsausbreitung durch Ionenaustausch von Zelle zu Zelle im Sinne eines funktionellen

Synzytiums. Beide Verbindungen sind an den sog. Disci intercalares, den Glanzstreifen, lokalisiert.

## 1.2 Ultrastruktur der Herzmuskelzelle



**Abb. 1.1** Ultrastruktur der Herzmuskelzelle. Man erkennt die enge Nachbarschaft zwischen den transversalen (T)-Tubuli und den terminalen Zisternen des SR. Modifiziert nach Bers, 2001, Seite 3

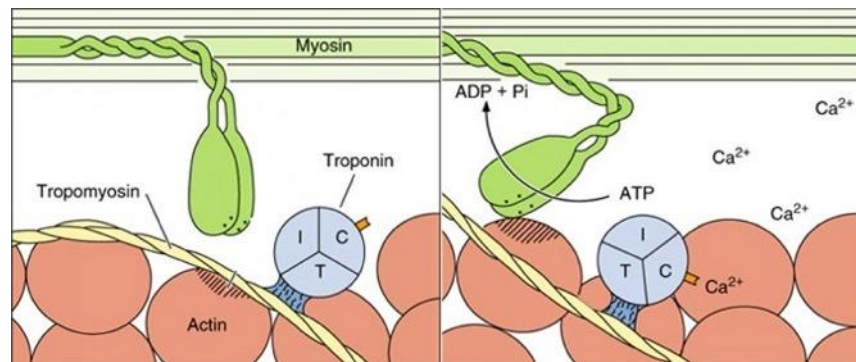
Als menschliche Zelle haben die Kardiomyozyten als Abgrenzung zum Extrazellulärraum das Sarkolemm, eine Doppelschicht aus Phospholipiden, Cholesterinmolekülen und einer Vielzahl spezifischer und unspezifischer Transportproteine und Ionenkanäle. Diese dienen sowohl dem Transport, z.B. für Stoffwechselprodukte, als auch der Signalübermittlung zwischen den Zellen. Dabei können die Transportvorgänge sowohl aktiv unter Energieverbrauch als auch passiv durch Diffusion oder erleichterte Diffusion entlang eines Gradienten erfolgen (Bers 2001).

Abb 1.1 zeigt schematisch die Ultrastruktur einer Herzmuskelzelle. Das Sarkolemm stülpt sich als transversale Tubuli (T-Tubuli) tief in Richtung der terminalen Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums ein und vergrößert somit die Oberfläche, über die das



Aktionspotential in die Tiefe geleitet werden kann, und ist somit von großer Bedeutung für die elektromechanische Kopplung (s.u.).

Die charakteristische Streifung der Zelle kommt durch die parallele Anordnung der kontraktilen Myofilamente zustande, die in Sarkomeren hintereinander angeordnet sind. In der Anordnung folgen dabei von außen nach innen: Die Z-Scheibe, an der die Aktinfilamente verankert sind, die I-Bande, der Bereich an dem die Aktinfilamente sich noch nicht mit den Myosinfilamenten überlappen, die A-Bande als Bereich Überlappungsbereich, die H-Bande, der Bereich in dem die Myosinfilamente nicht mehr überlappt werden und in der Mitte die M-Scheibe als Verankerungsort der Myosinfilamente. Der Abstand zwischen den Z-Scheiben beträgt in Ruhe etwa 2  $\mu\text{m}$  und ändert sich je nach Kontraktionszustand der Zelle (Gleitfilamenttheorie nach (Huxley 1969)).



**Abb. 1.2** Prinzip der Gleitfilamenttheorie: Das Binden von Kalzium an Troponin C führt zur Freigabe der Bindungsstelle für Myosin an Aktin, so dass es zu einer Interaktion von Myosin und Aktin kommt. Anschließend kommt es unter Energieverbrauch zu einer Drehung des Myosinkopfes, wodurch sich das Aktinfilament gegenüber dem Myosinfilament bewegt. Modifiziert nach Junqueira und Carneiro 1998, Seite 227

Neben dem kontraktilen Apparat enthält die Zelle auch alle weiteren Bestandteile zur Aufrechterhaltung des physiologischen Haushaltes wie Mitochondrien, Golgi-Apparat u.ä. (Bers 2001).

## 1.3 Die elektromechanische Kopplung

### 1.3.1 Die Elektrik: Das Aktionspotential

Zu Beginn der physiologischen Erregung am Myokard steht der elektrische Stimulus in Form eines Aktionspotentials, welches am Herzen in 5 Phasen eingeteilt werden kann (Birkeland et al. 2005);(Couchonnal und Anderson 2008)

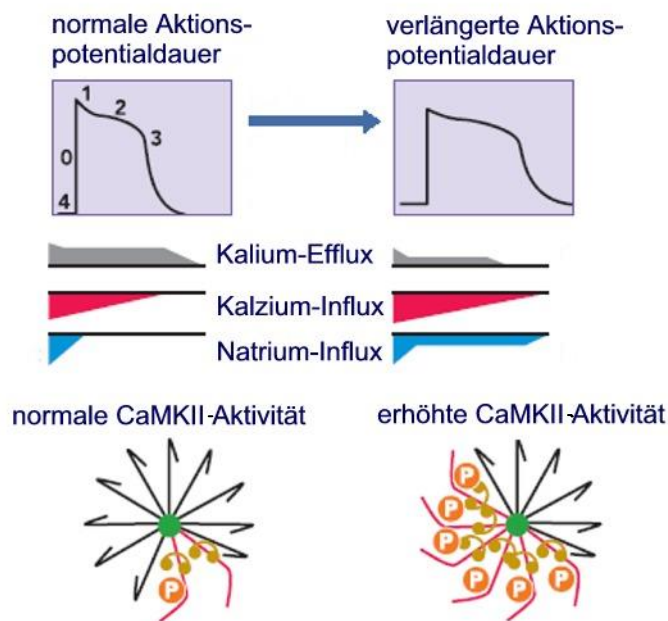
In der Phase 0 (Depolarisations- oder Aufstrichphase) kommt es durch die Öffnung von spannungsabhängigen einwärts gerichteten Natriumkanälen ausgehend vom Ruhemembranpotential ( $E_m$ ) zu einer Membrandepolarisation bis weit in den positiven Bereich hinein (Overshoot). Dabei folgen die Natriumionen dem elektrochemischen Gradienten. Die Kanäle inaktivieren sich noch während des Aufstrichs, also innerhalb weniger Millisekunden.

Anschließend öffnen in Phase 1 auswärtsgerichtete Kaliumkanäle („transient outward“,  $I_{to}$ ), so dass es zu einer Repolarisation kommt. Diese Kanäle bleiben während der Depolarisation durchgehend geöffnet.

In Phase 2 kommt es zur Ausbildung des sogenannten Plateaus: Das Membranpotential bleibt aufgrund der Balance zwischen den auswärtsgerichteten Kaliumkanälen ( $I_{to}$ ) und den einwärts gerichteten Kalziumkanälen ( $I_{Ca}$ ) stabil. Dieser transmembranöse Kalziumeinstrom erfolgt weitestgehend über spannungsgesteuerte L-Typ-Kalziumkanäle (sog. „Dihydropyridin“ (DHP)-Rezeptoren. Durch diesen Einstrom wird die Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum getriggert (calcium induced calcium release CICR, (Birkeland et al. 2005; Fabiato und Fabiato 1975)) und die Kontraktion ausgelöst.

Phase 3 ist die Repolarisationsphase, in der die Aktivität der einwärtsgerichteten Kalziumkanäle abnimmt und die der verzögert korrigierenden Kaliumkanäle (delayed rectifier channels) zunimmt, so dass in der Summe die auswärtsgerichteten Ströme überwiegen und das Membranpotential auf Ruhewerte zurückkehrt. In dieser Phase wird auch das zytosolische Kalzium wieder eliminiert, und die Zelle relaxiert wieder. Die Elimination geschieht dabei über die ATP-getriebene Kalziumpumpe (SR- $Ca^{2+}$ -ATPase oder SERCA2a) in das SR oder über den membranständigen  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher (NCX) in den Extrazellulärraum.

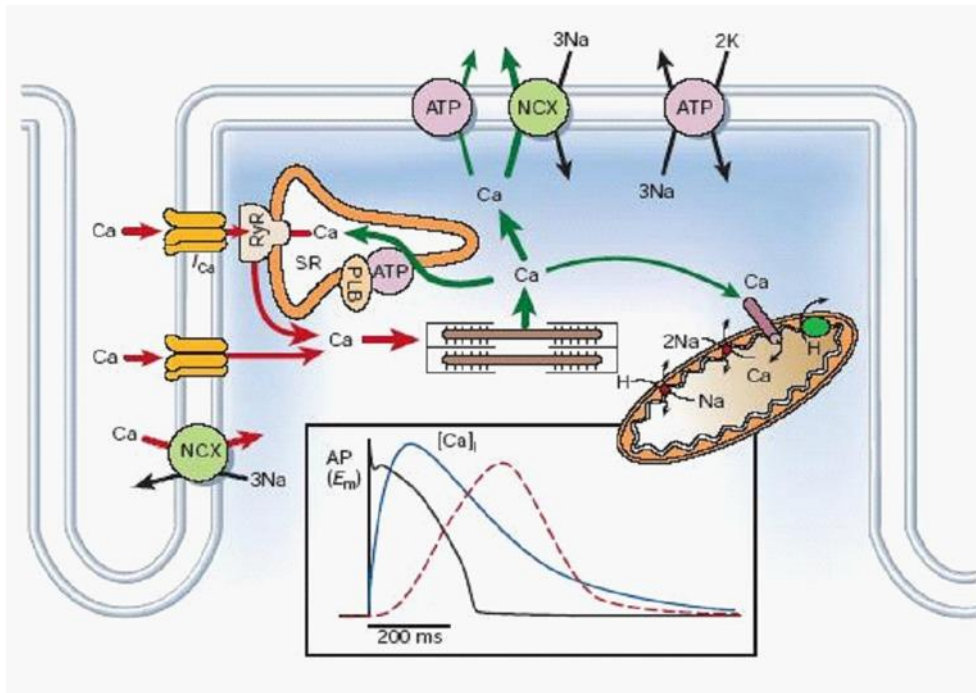
In Phase 4 halten einwärts gleichgerichtete Kaliumkanäle (inward rectifier channels) die Membranspannung auf Ruhenniveau, bis das nächste Aktionspotential ausgelöst wird (Birkeland et al. 2005, Bers 2008).



**Abb. 1.2** Der Ablauf des Aktionspotentials in Phasen und mögliche Veränderungen durch erhöhte CaMKII-Aktivität, modifiziert nach Couchonnal und Anderson, Seite 153

### 1.3.2 Der second messenger: Das Kalzium

Die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung in Phase 2 beginnt mit dem Einstrom von Kalzium durch den L-Typ-Kalziumkanal und führt lokal zu einer Aktivierung der Ryanodinrezeptoren (RyR), die in einem Couplon mit den L-Typ-Kalziumkanälen in enger räumlicher Beziehung liegen und das Kalzium aus dem SR entlassen. Dabei kommen auf 100 RyR ca. 10-25 DHPR. Die ubiquitäre Kalziumausschüttung in der Zelle wird dadurch erreicht, dass alle Couplons gleichzeitig durch das AP erregt und aktiviert werden (Bers 2002). Dadurch steigt die zytosolische Kalziumkonzentration im physiologischen Zustand von 100 nM diastolisch auf über 1 mM systolisch (Bers 2001) an.



**Abb. 1.3** Die elektromechanische Kopplung am Herzen: Nach Erregung eines Kardiomyozyten durch ein AP (s. Kasten) kommt es zur sog. Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung (rote Pfeile), die einerseits die Plateauphase des APs bedingt, andererseits zu einer Aktivierung der Myofilamente führt. Anschließend wird das Kalzium im Rahmen der myokardialen Relaxation über die durch Phospholamban regulierte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ins SR, bzw. über den Natrium/Kalzium-Austauscher in den Extrazellulärraum (EZR) transportiert (grüne Pfeile). Die grünen Pfeile stellen den Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  ins SR oder in den EZR während der Relaxation dar. Im Kasten ist die Beziehung von Aktionspotential (AP, schwarz), intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}]_i$ , blau) sowie Kontraktion (rot) verdeutlicht. Modifiziert nach Bers, 2002, Seite 200

Die Bedeutung der L-Typ-Kalziumkanäle wird ersichtlich, wenn man die Experimente von Ringer (1883) und Bers (1983) betrachtet, in denen gezeigt wird, dass das extrazelluläre Kalzium während der Kontraktion abnimmt. Ohne dieses extrazelluläre Kalzium und den L-Typ-Kalziumkanal erfolgt keine Kontraktion, obwohl der Beitrag zur Kontraktionskraft mit 5-30% je nach Spezies und Herzfrequenz im Vergleich zum Kalzium aus der SR-Ausschüttung vergleichsweise gering ausfällt.

### 1.3.3 Die Mechanik: die Myofilamente

Durch Bindung des freigesetzten Kalziums an das Troponin C, einer regulatorischen Untereinheit des Aktins, kommt es zu einer Konformationsänderung und damit Freilegung der Interaktionsstellen zwischen Aktin und Myosin. Außerdem führt die gestiegene

intrazelluläre Kalziumkonzentration zu einer erhöhten Aktivität der Adenosintriophosphatase (ATPase) der Myosinfilamente, die eine Hydrolyse eines an Myosin gebundenen ATP-Moleküls bedingt. Dieses hydrolysierte Phosphatmolekül wird abgegeben, wonach der so entstandene Myosin-ADP-Komplex nunmehr an Aktin binden kann. Unter Abgabe des ADP-Moleküls kippt das Myosinköpfchen von  $90^\circ$  auf  $45^\circ$  gegenüber Aktin und verschiebt sich damit um ca. 10 nm.

Die Querverbindung wird durch erneutes Binden von ATP gelöst, da dadurch die Affinität des Myosins zum Aktin abnimmt. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Prozesses (Gleitfilamenttheorie nach Huxley 1969) kann es dabei zu einer stärkeren Kontraktion am Herzen kommen.

Auch bei der Relaxation spielt das Kalzium eine hervorgehobene Rolle, da dieses dafür aus dem Zytosol eliminiert werden muss. Dabei sind als wichtigste Mechanismen die Wiederaufnahme in das SR über die SERCA (reguliert durch Phospholamban) und der Transport nach Extrazellulär über die Natrium-Kalzium-ATPase (NCX) zu nennen.

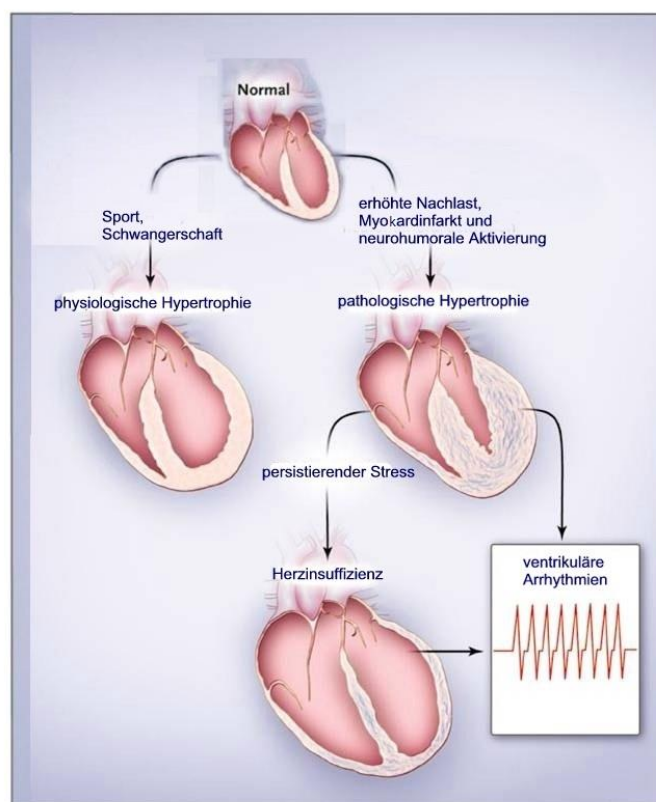
Speziesbedingte Unterschiede ergeben sich dabei in der anteilmäßigen Verteilung der Kalziumelimination; während beim Kaninchen (und damit ähnlich wie beim Menschen) 70% über die SERCA eliminiert werden und 28% über den NCX, beträgt das Verhältnis bei der Ratte (und damit ähnlich der Maus, dem in dieser Arbeit untersuchten Versuchstier) 92% für die SERCA und lediglich 7% für den NCX. Die Differenz zu 100% entsteht durch langsame Systeme wie z.B. die mitochondriale Ca-Aufnahme oder die sarkolemme Ca-ATPase, die für die vorliegende Arbeit jedoch nur von nachrangiger Bedeutung sind (Bers 2002; Bers 2008; Maier et al. 2000).

## 1.4 Kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz

Das Bild der kardialen Hypertrophie ist schon seit langer Zeit bekannt. So diagnostizierte der schwedische Arzt Henschen bereits im späten 19. Jahrhundert bei Skilangläufern eine Vergrößerung des Herzschattens, welchen er durch Perkussion des Thorax untersuchte. Damals wurde jedwede Vergrößerung als pathologisch erachtet, wie auch im Artikel „Bicycle Heart“, erschienen im British Medical Journal 1898, über die „Effekte der Überbelastung auf dem Fahrrad“ berichtet wird. Kurze Zeit zuvor hatte William Osler 1892 in „The Principles and Practice of Medicine“ bereits den Zusammenhang zwischen Hypertrophie und Herzinsuffizienz beschrieben, indem er die Hypertrophie als Vorstufe in der Entwicklung der Herzinsuffizienz benennt, die von einer Schwächung und Degeneration gefolgt wird (Osler 1892).

### 1.4.1 Grundlagen der Hypertrophie

Dabei kann der Vorgang auf mehreren Mechanismen und Ursachen beruhen: Einerseits regen physiologische Stimuli, wie z.B. bei sportlicher Belastung oder Schwangerschaft, das Herz zum Wachstum an, andererseits führen pathologische Stimuli wie z.B. eine erhöhte Druckbelastung des Ventrikels zu einer Hypertrophie mit weitergehenden Veränderungen im Sinne eines Remodelings mit Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie einer Gefügedilatation und Fibrosierung. Im Unterschied zum Wachstum bei physiologischen Stimuli kann die pathologische Hypertrophie bei Persistenz zu Herzinsuffizienz und malignen Arrhythmien führen, siehe Abb 1.4.



**Abb. 1.4** Physiologische und pathologische Mechanismen der Hypertrophie und die Folgen bzgl. Herzinsuffizienz und Arrhythmien, modifiziert nach Hill und Olsen 2008, Seite 1371

Das Wachstum des Organs geschieht auf zellulärer Ebene: Bei physiologischen Stimuli ist dabei kein Unterschied im Aufbau erkennbar, wohingegen bei der pathologischen Hypertrophie verschiedenste Fehler wie z.B. Desorganisation der Sarkomere, Verlust von funktionalem Gewebe mit anschließendem fibrotischen Umbau oder auch „elektrisches Remodeling“ und Veränderungen im Kalziumstoffwechsel nachweisbar sind.

Funktionell dient die Hypertrophie dem Herzen dabei als Maßnahme gegen die erhöhte Wandspannung im Ventrikel und kann in sehr kurzer Zeit erfolgen. So nimmt die ventrikuläre Masse nach Nachlasterhöhung durch Aortenkonstriktion innerhalb der ersten Tage substantiell zu (Hill und Olson 2008). Damit hat die Hypertrophie auf den ersten Blick etwas protektives, was auch durch hämodynamische Messungen bei Patienten mit Herzklappenerkrankungen in den 1970er und 1980er Jahren unterstützt wurde, so dass man von einer adaptiven Hypertrophie ausging, welche, erst wenn sie inadäquat wurde, zu systolischer Dysfunktion führt (Gunther und Grossman 1979; Huber et al. 1981; Krayenbuehl et al. 1988). Jedoch zeigte die Framingham Studie, die ebenfalls zu der Zeit veröffentlicht wurde, dass eine linksventrikuläre Hypertrophie ein Risikomarker für kardiovaskuläre Ereignisse, wie z.B. Herzinsuffizienz und Arrhythmien, ist (Koren et al. 1991; Levy et al. 1990).

#### **1.4.2 Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz**

Die Herzinsuffizienz stellt ein Versagen der physiologischen Pumpfunktion des Herzen dar und geht im Endstadium meist auch mit einer Ventrikeldilatation einher. Die folgenden 3 Ursachen sind dabei die häufigsten:

- ❖ Schädigung auf zellulärer Ebene durch ischämische oder entzündliche Prozesse führen zu verminderter Inotropie des Myokards und anschließender Gefügedilatation
- ❖ Persistierende Druckbelastung der Ventrikel durch eine erhöhte Nachlast im großen oder kleinen Kreislauf, ausgelöst durch (pulmonal-) arteriellen Hypertonus oder stenosierende Herzklappenerkrankungen. Zunächst kommt es dabei zu einer konzentrischen Hypertrophie, welche im zeitlichen Verlauf dilatieren kann.
- ❖ Persistierende Volumenbelastung der Ventrikel durch eine erhöhte Vorlast, die durch Schädigung der Klappen (Klappeninsuffizienzen → Pendelvolumina) verursacht wird.

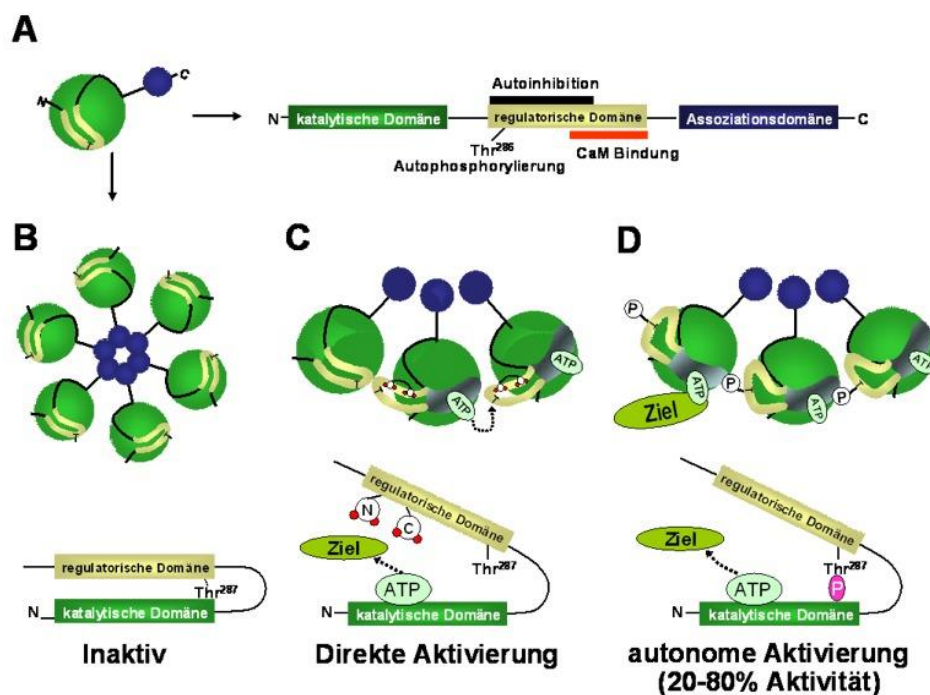
Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit sind die beiden letzten Ursachen. Die erhöhte Nachlast wird durch das TAC-Modell simuliert, während die erhöhte Vorlast durch das Shunt-Modell simuliert wird.

Epidemiologisch ist die Herzinsuffizienz in den Industrieländern aktuell eine der wichtigsten internistischen Erkrankungen und Haupttodesursachen (McMurray und Stewart 2000). Auf Grund der zukünftig prognostizierten demographischen Entwicklung (STATISTISCHES BUNDESAMT 2006) und höheren Prävalenz von bis zu 10% in der Altersklasse der über 80jährigen ist mit einer weiteren Zunahme der Krankheit zu rechnen.

## 1.5 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

Die CaMKII ist eine multifunktionale Serin/Threonin-Proteinkinase und gehört zu einer Gruppe von Kinasen, die durch den Kalzium/Calmodulin-Komplex aktiviert werden. Im aktivierten Zustand phosphoryliert sie diverse intrazelluläre Proteine.

Zu dieser Gruppe gehören die CaMK-Isoformen I, II und IV, die sich sowohl im Nervensystem (Braun und Schulman 1995) als auch im Herzen (Edman und Schulman 1994; Jett et al. 1987; Uemura et al. 1995) finden. Die im Herzen dominierende Isoform ist die CaMKII (Jett et al. 1987), von dieser sind vier verschiedene Gene bekannt,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , dabei ist die CaMKII $\delta$ -Isoform im Herzen vorherrschend (Braun und Schulman 1995; Zhang und Brown 2004). Von dieser Isoform wiederum existieren 2 Splicevarianten: Die CaMKII $\delta_B$  welche durch eine nukleare Lokalisierungssequenz (NLS) ausschließlich im Nukleus lokalisiert ist, und die CaMKII $\delta_C$  welche im Zytosol lokalisiert ist (Braun und Schulman 1995; Zhang und Brown 2004).



**Abb. 1.5** CaMKII: Struktur und Aktivierung.

A: Das CaMKII-Monomer, bestehend aus drei Domänen; B: Die Oligomerisation der CaMKII-Monomere an deren carboxyterminalen Enden (blauer Kreis) führt zu einem radartigen Holoenzym; C: Ca/CaM (Calmodulin) aktiviert die CaMKII durch Bindung an der zentral-regulatorischen Domäne. D: Durch Autophosphorylierung benachbarter CaMKII-Monomere an Thr-287 kann die CaMKII zu 20-80%ig aktiv bleiben, selbst nach Abdiffusion von Ca/CaM. Modifiziert nach Maier und Bers, 2002, Seite 924



Wie aus Abb. 1.5 ersichtlich wird, besteht die CaMKII aus drei Domänen: einer katalytischen, gefolgt von einer zentralen regulatorischen Domäne mit autoinhibitorischer als auch Calmodulin-Bindungs-Region und einer assoziativen Domäne, welche für die Oligomerisation des Enzyms verantwortlich ist, wobei sich 6-12 Untereinheiten, mit der assoziativen Domäne in der Mitte, radspeichenartig anordnen (Braun und Schulman 1995; Bronstein et al. 1993; Colbran und Soderling 1990).

### 1.5.1 Aktivierung

Für die Aktivierung der CaMKII muss der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex, bestehend aus Apocalmodulin und vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, an die regulatorische Domäne binden. Dies verdeckt die Autoinhibitionsregion, woraufhin eine Konformationsänderung erfolgt, durch die die aktive katalytische Seite freigelegt wird. Somit ist der Zugang zu den Zielproteinen frei.

Eines dieser Zielproteine ist die CaMKII selbst, so dass benachbarte Untereinheiten an Threonin-286/287 (Thr-286/287) autophosphoryliert werden können und die Kinase sich damit selbst in einem aktiven Zustand hält (Zhang und Brown 2004). Durch die Autophosphorylierung kommt es zu einer Affinitätssteigerung gegenüber dem  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex (Braun und Schulman 1995), welches eine Bindung von mehreren Sekunden ermöglicht, in denen die Kinase ihre volle Aktivität behält. Durch die Autophosphorylierung kann die Kinase ihre Aktivität, wenn auch in vermindertem Maße (etwa 20-80%), beibehalten obwohl der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex bereits abdissoziiert ist (Lai et al. 1986; Lou et al. 1986; Maier 2005; Miller und Kennedy 1986; Schworer et al. 1986).

Als neuartiger alternativer Aktivierungsweg der CaMKII wurde jüngst die Oxidation der CaMKII an Methionin-281 und -282 beschrieben (Erickson et al. 2008). Durch diesen reversiblen Vorgang wird, ebenso wie bei der Autophosphorylierung, die Affinität der CaMKII zum  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex erhöht bzw. ihre Inaktivierung nach Bildung des Komplexes gehemmt. Durch diesen Mechanismus fungiert die CaMKII also auch als Sensor für oxidativen Stress (Erickson et al. 2008)

Eine verstärkte CaMKII-Aktivierung findet z.B. im Rahmen einer verlängerten Aktionspotentialdauer u.a. bei Herzinsuffizienz (Beuckelmann et al. 1993; O'Rourke et al. 1999) statt, da durch das verlängerte AP vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  über die LTCC in die Zelle einströmen kann, wobei jedoch grundsätzlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient bei Herzinsuffizienz vermindert ist (Wu et al. 1999). Jedoch ist die verlängerte APD nicht der einzige mögliche Aktivierungsweg, auch eine erhöhte Stimulationsfrequenz übt den gleichen Einfluss aus.

## 1.5.2 Inaktivierung

Die Dephosphorylierung der CaMKII durch Proteinphosphatasen wie z.B. PP1, PP2A führt zur Inaktivierung (Huke und Bers 2007; Zhang und Brown 2004).

Daneben besteht, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, interventionell die Möglichkeit, die CaMKII durch den Peptid-Inhibitor Autocamide-2-related-inhibitory-peptide (AIP) hochselektiv zu inaktivieren, ohne weitere Nebeneffekte befürchten zu müssen, dabei bindet AIP an die Substrat-Bindungsstelle der CaMKII und inhibiert deren Aktivität so unabhängig von Ca<sup>2+</sup>/CaM-Bindung (Ishida et al. 1995). Ein weiterer pharmakologischer CaMKII-Inhibitor ist KN-93. Dieses ist ein Methoxybenzen-Sulfonyl-Derivat, welches kompetitiv die CaM-Bindung der CaMKII inhibiert (Sumi et al. 1991). Im Gegensatz zu AIP zeigt KN-93 jedoch auch unspezifische Wirkungen, so eine Inhibition des LTCC (Li GR et al. 1997).

## 1.6 Einfluss der CaMKII auf die elektromechanische Kopplung (ECC) und Aktionspotentiale

### 1.6.1 CaMKII und die elektromechanische Kopplung

Als multifunktionale Proteinkinase phosphoryliert und moduliert die CaMKII viele wichtige Proteine im Kalziumstoffwechsel der Zelle, wie z.B. Phospholamban (Bers 2002; Maier und Bers 2002), den Ryanodinrezeptor (Currie et al. 2004; Kohlhaas et al. 2006; Maier et al. 2003) , den L-Typ-Kalziumkanal (Dzhura et al. 2002; Kohlhaas et al. 2006; Zhang et al. 2003), den kardialen Natriumkanal, verantwortlich für späten Anteil des Natriumstroms (late I<sub>Na</sub>) (Wagner et al. 2006) möglicherweise auch die SERCA2a (DeSantiago et al. 2002) u.a.

Damit scheint sie eine Art Schalterfunktion auf molekularer Ebene auszuüben, indem sie auf Veränderungen der intrazellulären Kalziumspiegel oder auch auf veränderte Aktivitätslevel der Phosphatasen reagiert.

Die CaMKII bewirkt bei hohen Stimulationsfrequenzen auch eine beschleunigte Elimination des Kalziums aus dem Zytosol und verkürzt damit die Relaxationszeit (DeSantiago et al. 2002; Maier und Bers 2002). Dieser Effekt wird als „frequency-dependent acceleration of relaxation (FDAR)“ bezeichnet. Ein möglicher Weg ist dafür die Phosphorylierung von Phospholamban an Threonin-17 (Thr-17) durch die CaMKII. Dadurch wird die inhibierende Wirkung, die das Phospholamban im dephosphorylierten Zustand auf die SERCA ausübt, aufgehoben, und die SERCA kann mehr Kalzium in das SR pumpen (Maier und Bers 2002).

Durch die gleichzeitige Phosphorylierung des RyR durch die CaMKII und dadurch erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit und Zeit kommt es zu einem gesteigerten Ca-Leck. Dies lässt sich durch die erhöhte Rate an Sparks zeigen.

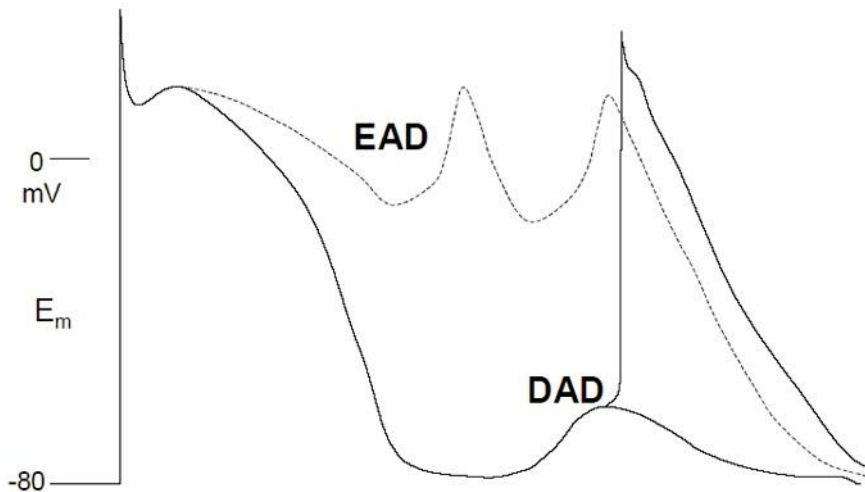
### 1.6.2 CaMKII und Aktionspotentiale

Eine verlängerte Aktionspotentialdauer bedingt eine erhöhte CaMKII-Aktivität (1.5.1), allerdings ist die CaMKII auch selbst in der Lage, durch ihre Aktivität die APD zu verlängern. Der transmembranöse Kalziumeinstrom in die Zelle nimmt zu (Dzhura et al. 2002; Kohlhaas et al. 2006), was auch als Trigger einer gesteigerten SR-Kalziumausschüttung dient. Dabei kommt es zusätzlich noch zur sog. „Fazilitation“ (Kohlhaas et al. 2006; Yuan und Bers 1994), einem weiteren CaMKII-bedingten dynamischen Anstieg des Kalziumeinstroms. Daneben kommt es, wie von (Wagner et al. 2006) gezeigt, zu einer Erhöhung der späten Komponente des Natriumstromes late  $I_{Na}$ . Dieser beträgt physiologisch rund 1% der Amplitude des peak  $I_{Na}$ , also der schnellen Komponente, die für den Aufstrich des AP verantwortlich ist, bleibt jedoch während des gesamten AP aktiv bzw. reaktiviert wieder. Im Rahmen pathologischer Prozesse (z.B. myokardiale Ischämie, Herzinsuffizienz, erhöhte Level von Sauerstoffradikalen) kann die Amplitude bis auf 5% des peak  $I_{Na}$  ansteigen, was zu einer erheblichen Natriumüberladung der Zelle führt und damit eine Verlängerung der APD und elektrische Instabilität bewirkt (Sossalla et al. 2008).

Betrachtet man noch die auswärtsgerichteten Kaliumströme  $I_{to}$ , die durch die erhöhte CaMKII-Aktivität herunter reguliert werden (Maier et al. 2003; Wu et al. 2002), ergibt sich in der Summe eine Nettoladungsverschiebung in die Zelle hinein, bei gleichzeitig ausbleibendem Ausgleich in Form einer Ladungsverschiebung nach außen. Diese exzessive Verlängerung der APD mit gleichzeitig hochregulierter CaMKII stellt eine Prädisposition für frühe (EAD) (Anderson et al. 1998) und späte (DAD) Nachdepolarisationen dar. Mechanistisch kommen dabei für die EADs der Kalziumeinstrom in Betracht, der sich im Rahmen der verlängerten APD wieder reaktivieren kann (Wu et al. 1999; Wu et al. 2002; Zeng und Rudy 1995) oder der späte Natriumstrom (Burashnikov und Antzelevitch 2006; Undrovinas et al. 2006), für die späten Nachdepolarisationen eine spontane Freisetzung aus dem SR in Form von Sparks (Bers 2002) mit Aktivierung des Natrium-Kalziumaustauschers und folgendem Natriumeinstrom.

Als Nachdepolarisationen gelten dabei Oszillationen im Membranpotential der Zelle, die dem AP folgen. EADs treten dabei noch vor der Repolarisation in Phase 2 oder 3 des kardialen APs auf, wohingegen die DADs erst nach vollständiger Repolarisation in Phase 4 auftreten. Überschreitet die Depolarisation dabei den Schwellenwert, so wird ein erneutes AP

ausgelöst, was sich als Extrasystole bemerkbar machen und als Auslöser (= Trigger) von Arrhythmien dienen kann (Burashnikov und Antzelevitch 2006).



**Abb. 1.6** Frühe (EAD) und späte (DAD) Nachdepolarisationen. Erläuterungen im Text  
(modifiziert aus Bers 2001, Seite 98)

## 1.7 Überexpressionsmodelle

### 1.7.1 Transgene CaMKII-Maus

In einer 2003 veröffentlichten Arbeit von Zhang et al. wurde gezeigt, dass die transgene Überexpression der CaMKII $\delta_C$  in einem Mausmodell zu Herzinsuffizienz sowie massiver kardialer Hypertrophie und Dilatation führt. Auch die transgene Überexpression der nuklearen Splicevariante CaMKII $\delta_B$  führte zu einer Hypertrophie, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß (Zhang et al. 2002) als die der zytosolischen Form.

Die von Hoch et al. (1999) und Kirchhefer et al. (1999) ursprünglich geäußerten Vermutungen, dass es sich bei dem erhöhten Expressions- und Aktivitätslevel der CaMKII im insuffizienten menschlichen Myokard um eine kompensatorische Maßnahme handelt, die auf

Beobachtungen der positiven Korrelation zwischen CaMKII-Aktivität und Kontraktionskraft in terminal insuffizienten Myokard beruhen, wurden in Frage gestellt.

Maier et al. konnten in der 2003 veröffentlichten Arbeit zeigen, dass die transgene Überexpression der CaMKII $\delta_C$  zu einem gesteigerten Kalziumleck aus dem SR führt, welches durch eine Hyperphosphorylierung der RyR und damit einhergehend erhöhter Öffnungswahrscheinlichkeit verursacht wird. Dieser diastolische Kalziumverlust führt zu einer Kalziumdepletion des SR, sichtbar am deutlich geringeren Koffeintransienten in den transgenen Zellen. Dennoch findet sich ein signifikant erhöhtes Fractional-Release, der Anteil des Kalziums, der ausgeschüttet wird im Verhältnis zum Gesamtgehalt an Kalzium, aus dem SR, was sich durch die CaMKII-Aktivität erklären lässt.

Ein weiterer beobachteter Aspekt in den transgenen Mäusen ist eine signifikante Verlängerung der APD gegenüber den WT Mäusen, u.a. ausgelöst durch einen verstärkten Kalziumeinstrom.

### **1.7.2 Adenovirale CaMKII-Überexpression**

Interessant in diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Kohlhaas et al. von 2006, in der gezeigt wird, dass es auch im „akuten“ (24 h) Modell der adenoviralen Überexpression der CaMKII $\delta_C$  in Kaninchenmyozyten, über die Hyperphosphorylierung der RyR mit SR-Kalziumleck, zu einem drastisch verringerten SR-Kalziumgehalt kommt. Dennoch bleibt das Kontraktionsverhalten im Gegensatz zu den transgenen Mäusen unverändert. Als kompensatorischer Mechanismus wird von den Autoren ein erhöhter Einstrom über die L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle beschrieben. Dieser scheint den Verlust des SR-Kalziums auszugleichen und eine unveränderte Kontraktilität zu ermöglichen. Dabei muss jedoch der speziesbedingte Unterschied bedacht werden. In Kaninchenzellen trägt der NCX zu fast 30% der Kalziumelimination bei, so dass Kalzium, welches aus dem SR verloren geht, zu einem größeren Anteil in den Extrazellulärraum eliminiert wird, als das in Mauszellen der Fall ist (s.o.). Auch ist in Kaninchenzellen der Anteil des Kalziums für die Kontraktion aus dem SR vergleichsweise geringer als dies in Mauszellen der Fall ist (Bers 2002).

### **1.8 CaMKII bei mechanischer Last**

In der Arbeit von Zhang et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass die CaMKII $\delta$  bei mechanischer Last, in Form erhöhter Nachlast durch TAC, sowohl auf dem Expressions- als auch Aktivitätslevel hochreguliert ist. Der Anstieg lässt sich schon am 1. Tag post-operativ

nachweisen und erreicht auf dem Aktivitätslevel das 3-4fache Niveau am 4. postoperativen Tag.

Jedoch sind in der Arbeit keine funktionellen Untersuchungen durchgeführt worden, so dass nicht klar ist, welche Auswirkungen die CaMKII-Aktivität auf die elektromechanischen Aspekte und Stoffwechselfvorgänge in der Zelle hat.

Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen für beide Modelle, sowohl für die Volumenbelastung als auch für die Druckbelastung, eine signifikante Hypertrophie an.

Wie auch in der Arbeit von Zhang T et al. (2004) gezeigt, haben die TAC-Mäuse erhöhte CaMKII-Expressions- und Aktivitätslevel (Toischer et al. 2010). Daneben wurden auch andere Proteine in der Hypertrophiekaskade untersucht, die ebenfalls hochreguliert sind, wie z.B. Histon-Deacetylasen (HDAC5) und die Proteinkinase D (PKD).

## 1.9 Zielsetzung und Fragestellung

Die Fragestellung, die sich somit für die vorliegende Arbeit ergibt, ist folglich, welche Effekte die Erhöhung der Nachlast im Vergleich zur Vorlast auf die Aktionspotentialmorphologie hat und welches die entscheidenden Mechanismen hierfür sind. In den einzelnen Subgruppen soll daher

- ❖ die Auswirkung der globalen CaMKII-Inhibition untersucht
- ❖ und im nächsten Schritt spezifische Zielproteine der CaMKII gezielt inhibiert werden, um so deren jeweiligen Einfluss zu eruieren.

Des Weiteren soll der Frage des arrhythmogenen Potentials der CaMKII nachgegangen werden und auch unter diesem Aspekt die Inhibition verschiedener Zielproteine untersucht werden, um auch hier die Mechanismen zu verstehen.

Um einen möglichen Progress der pathologischen Prozesse zu erfassen, werden die Daten zu einem frühen, 7d post-OP, und einem spätem Zeitpunkt, 21d post-OP, erhoben.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Interventionsmodelle**

Für die Interventionen wurden weibliche Mäuse (Wildtype Littermates) aus der internen Zucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen vom Zuchtstamm C57/B6N verwendet. Diese waren zum Interventionstermin ca. 12-14 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von ca. 22-24 g.

Die postoperative Analgesie mit Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm / ratiopharm, Ulm, 1,3mg/ml Trinkwasser) wurde 1 Tag präoperativ eingeleitet und bis zum 7.Tag postoperativ fortgeführt.

Alle Tiere wurden vor den Interventionen und bis 6-7 Tage post interventionem täglich gewogen und klinisch kontrolliert, um die Tiere bei Verschlechterung aus dem Versuch nehmen zu können. Anschließend erfolgte die klinische Kontrolle weiterhin täglich, die Gewichtskontrollen jedoch nur wöchentlich.

Alle Tierexperimente sind von der örtlichen Tierschutzkommission gesehen und von der Landesbehörde in Oldenburg (LAVES) genehmigt worden (Aktenzeichen Az 33.9.42502-04/088/06, Bezirksregierung Braunschweig, Anzeigender PD Dr. Lars S. Maier) und wurden unter Berücksichtigung des Guide for the care and use of laboratory animals (1996) durchgeführt.

#### **2.1.1 Transversale Aortenkonstriktion (TAC)**

##### **2.1.1.1 Präoperative Maßnahmen**

Die Einleitung der Narkose erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion eines Ketamin/Xylazin- Gemisches (0.1 mg/g bzw. 0.005mg/g KG) (Pfizer Inc ,London, UK). Nach Wirkungseintritt wurden die Tiere an der Brust und am Hals mit einem Keratolyticum (elca®med / ASID BONZ GmbH, Herrenberg) enthaart. Dazu wurde die Creme vorsichtig in das Fell einmassiert und nach einer Einwirkzeit von ca. 5 min mit einem Wattetupfer wieder abgenommen. Anschließend erfolgte die Lagerung in Rückenlage auf der OP-Unterlage mit Fixierung der Extremitäten.

### 2.1.1.2 Banding

Vor Beginn des Eingriffs wurde die Narkosetiefe mittels eines gezielten Schmerzreizes kontrolliert.

Die Haut wurde mit einer 10-15 mm langen queren Inzision oberhalb des Sternums eröffnet und in stumpfer Präparation die Trachea und A. carotis communis aufgesucht, entlang derer Verläufe anschließend der Aortenbogen aufgesucht und dargestellt wurde.

Nach vorsichtiger Mobilisation des transversalen Aortenbogens wurde ein chirurgischer Faden (5-0) um die Aorta gelegt und verknötet. Für eine standardisierte und reproduzierbare Stenose diente eine stumpfe 26G Kanüle auf der Aorta als Platzhalter. Anschließend wurde die Kanüle entfernt und die Wunde schichtweise verschlossen.

Die Sham Operationen verliefen analog zu den Banding Operationen, jedoch wurde nach Mobilisierung der Aorta die Wunde direkt wieder verschlossen.

Nach Ausleitung der Narkose kamen die Tiere nach Subgruppen getrennt zurück in die Käfige.

## 2.1.2 Aortokavaler Shunt

### 2.1.2.1 Präoperative Maßnahmen

Die Einleitung der Narkose erfolgte im Exsikkator, der je nach KG der Maus mit 500-700  $\mu$ l Isofluran (Forene™ / Abbott AG, Ludwigshafen) gefüllt wurde. Die Tiefe der Narkose wurde anhand der klinischen Parameter Atemfrequenz (AF) und Atemtiefe überwacht. Sobald die Atemfrequenz abnahm und die Mäuse zur Schnappatmung übergingen, wurden diese aus dem Exsikkator genommen und auf der OP-Unterlage gelagert. Die Beatmung erfolgte nun per Maske über ein Beatmungsgerät (Minivent / Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach) mit den folgenden Einstellungen: Sauerstoff 100%, Atemzugvolumen (AZV) 300  $\mu$ l bei einer AF von 400  $\text{min}^{-1}$ . Der Vapor mit Isofluran wurde zu Beginn auf 2,5 Vol% eingestellt und im Verlauf auf 1,1- 1,5 Vol% reduziert.

Die Erhaltung der Narkose wurde mit einem AZV/AF von etwa 150  $\mu$ l/150  $\text{min}^{-1}$  abhängig nach erforderter Narkosetiefe sichergestellt.

Das OP-Gebiet, vom Xyphoid entlang der Medianlinie nach caudal bis zur Symphyse, wurde analog den TAC-Operationen mit elca®med enthaart.

Anschließend wurden die Mäuse in Rückenlage an den Extremitäten fixiert.



### 2.1.2.2 Aortokavale Fistelung

Vor Beginn des Eingriffs wurde die Narkosetiefe mittels eines gezielten Schmerzreizes kontrolliert.

Nach medianer Laparotomie erfolgte die Präparation der großen abdominalen Gefäße nach Abgang der Aa renales. Die Aorta wurde distal der Aa renales mit einer Gefäßklemme abgeklemmt, um danach caudal der Abgänge mit einer 23G Kanüle (B. Braun / Melsungen) die Aorta zu punktieren und durch vorsichtiges Weiterschieben die Fistel in die Vena cava inferior (VCI) zu stechen. Die Punktionsstelle in die Aorta wurde mit Cyanoacrylatkleber (Pattex® Blitz Matic / Henkel, Düsseldorf) verschlossen und anschließend die Gefäßklemme gelöst. Bei erfolgreicher Fistelung schwellte die VCI an und verfärbte sich sichtbar hellrot.

Nach Rückverlagerung der abdominalen Organe erfolgte der schichtweise Wundverschluss. Die Sham Operationen verliefen analog zu den Shunt Operationen, jedoch wurde nach Abklemmen der Aorta lediglich ein Tropfen Cyanoacrylatkleber neben die Aorta appliziert. Abschließend wurde zur Infektionsminimierung die Wunde mit Braunol (BBraun, Melsungen) bestrichen.

Nach Narkoseausleitung kamen die Tiere nach Subgruppen getrennt zurück in die Käfige.

### 2.1.2.3 Blutgasanalyse und Kardiektomie

Vor Beginn aller Maßnahmen nach 7 bzw. 21 Tagen wurde zunächst das aktuelle KG der Tiere erfasst.

Zur Narkoseeinleitung und Erhaltung s. 2.1.2.1 präoperative Maßnahmen.

Die Darstellung der Trachea und des Larynx geschah nach Hautschnitt und Durchtrennung der prätrachealen Muskulatur. Die Trachea wurde zwischen Schild- und Ringknorpel eröffnet und eine Intubationskanüle (Föhr Medical Instruments GmbH / Seeheim-Ober Beerbach) eingeführt, wonach das AZV und die AF wiederum auf ein Verhältnis von etwa 150  $\mu\text{l}/150 \text{ min}^{-1}$  reduziert wurden um einer Überblähung vorzubeugen.

Das Abdomen wurde V-förmig von der Medianlinie in Richtung der vorderen Extremitäten eröffnet und das Diaphragma zirkulär entlang der Costae abpräpariert, um das Herz freizulegen. Danach vorsichtige Blutentnahme (etwa 1 ml) mit einer 23G Kanüle (B. Braun / Melsungen) aus dem rechten Ventrikel, um die gemischtvenöse Sauerstoffsättigung anhand einer Blutgasanalyse (BGA) zu bestimmen (Bayer Rapidlab 865 / Bayer, Leverkusen).

Hiernach wurde das Herz entnommen und in Isolationstyrode versetzt mit Heparin ( Heparin-Natrium 25.000 ratiopharm / ratiopharm, Ulm; 3.000 IE Heparin auf 15 ml Tyrode) zur Antikoagulation, auf Eis, zur Isolation transportiert.

## 2.2 Isolation der Myozyten

### 2.2.1 Lösungen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

	Substanz	Molarität		
Isolationstyrode	NaCl	113	mM	gelöst in Aqua bidest; pH 7,46 bei 37°C mit NaOH; lagern bei +4°C
	KCl	4,7	mM	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,6	mM	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,6	mM	
	MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	1,2	mM	
	Phenolrot	0,032	mM	
	NaHCO <sub>3</sub>	12	mM	
	KHCO <sub>3</sub>	10	mM	
	HEPES	10	mM	
	Taurin	30	mM	
	BDM	10	mM	
	Glucose	5,5	mM	

Tab. 2.1

	Substanz	Menge/Volumen		
Verdauulösung	Isolationstyrode	20	ml	unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt
	Liberase Blendzyme	5	mg	
	Trypsin (10fach)	111,2	µl	
	CaCl <sub>2</sub> (10 mM)	25	µl	

Tab. 2.2

	Substanz	Menge/Volumen		
Stopplösung I (10% BCS)	Isolationstyrode	2,25	ml	unmittelbar vor Gebrauch ansetzen
	Bovine calf serum (BCS)	0,25	ml	
	CaCl <sub>2</sub> (10 mM)	3,125	µl	

Tab. 2.3

	Substanz	Menge/Volumen		
<b>Stopplösung II (5% BCS)</b>	Isolationstyrode	28,5	ml	unmittelbar vor Gebrauch ansetzen
	Bovine calf serum (BCS)	1,5	ml	

Tab. 2.4

	Substanz	Molarität		
<b>Kalziumaufbau</b>	CaCl <sub>2</sub>	0,1	mM	in Stopplösung II; unmittelbar vor Gebrauch ansetzen
	CaCl <sub>2</sub>	0,2	mM	
	CaCl <sub>2</sub>	0,4	mM	
	CaCl <sub>2</sub>	0,8	mM	

Tab. 2.5

### 2.2.2 Vorbereitung

Bereitstellen der benötigten Lösungen und Geräte, Fluten der Anlage mit Isolationstyrode, welche auch im System verblieb.

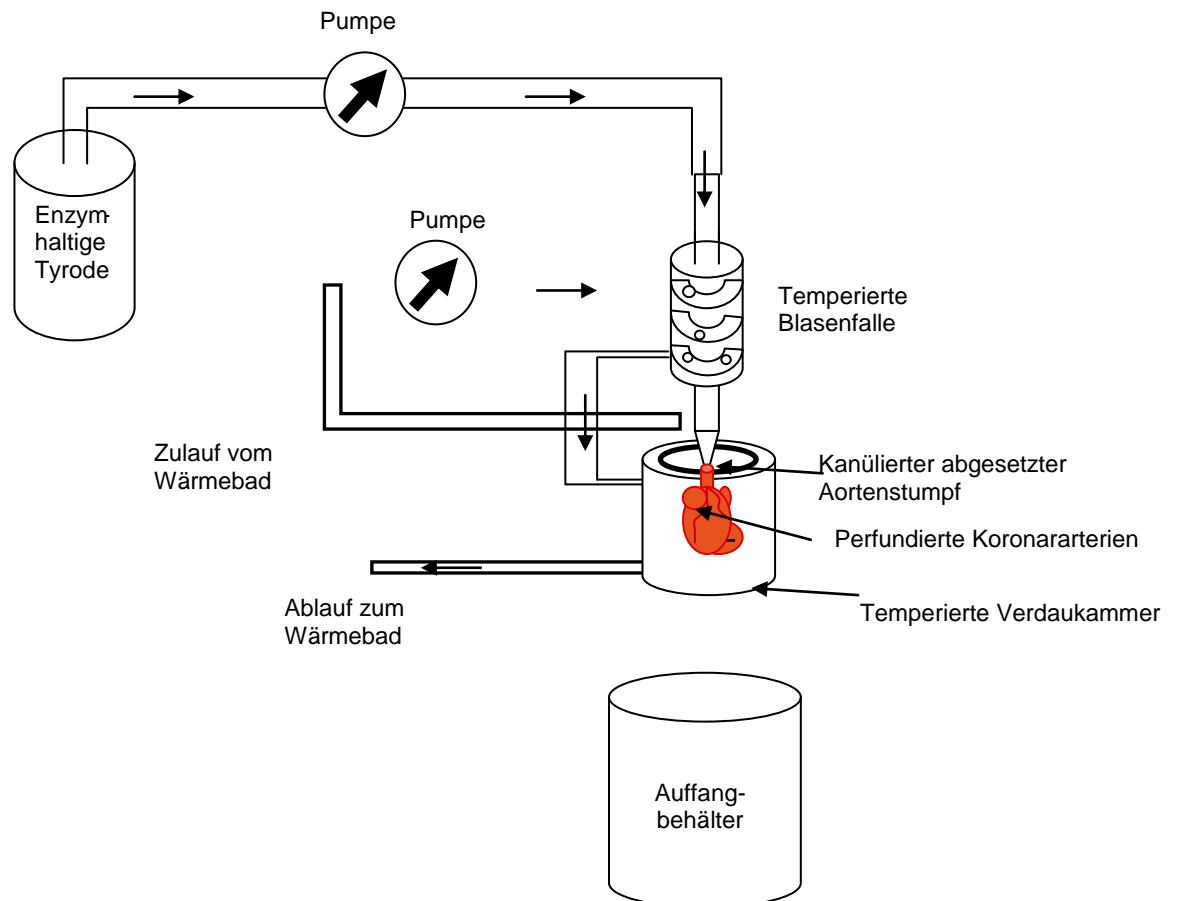
Vor Beginn aller Maßnahmen wurde das aktuelle KG der Tiere erfasst und die Enzymlösung unmittelbar vor Beginn angesetzt.

### 2.2.3 Präparation der Herzen

Die Einleitung der Narkose erfolgte wie in 2.1.2.1 beschrieben. Nachdem die Tiere regungslos verharrten und sich deutlich sichtbar die Schnappatmung zeigte, wurden die Tiere mittels Genickbruch schmerzfrei getötet und in Rückenlage an den Extremitäten fixiert. Die Eröffnung des Abdomens erfolgte V-förmig von der Medianlinie in Höhe des Nabels in Richtung der vorderen Extremitäten bis zum Rippenbogen. Nach Darstellung und Präparation des Diaphragmas Erweiterung der Schnitte in Richtung Axilla, um die vordere Thoraxwand nach kranial wegklappen und fixieren zu können. Mit einer gebogenen Pinzette wurden die Abgänge der großen Gefäße gefasst und kranial der Pinzette scharf abgesetzt. Das Herz wurde umgehend in eisgekühlte Perfusionslösung (s. 2.2.1 Lösungen) überführt und das restliche im Herzen verbliebene Blut durch vorsichtige Kompression entfernt. Die

Bestimmung der Herzgewichte erfolgte in einer zuvor tarierten Petrischale auf einer Feinwaage (Sartorius), ebenfalls unter gekühlten Bedingungen.

## 2.2.4 Kanülierung, enzymatischer Verdau und Dissektion



**Abb. 2.1** Perfusionsanlage nach Langendorff zur retrograden Perfusion der Koronararterien mit temperierter Blasenfalle, um die enzymhaltige Verdaulösung auf 37°C anzuwärmen. Diese fließt von dort aus in den kanülierten Aortenstumpf

Ab diesem Punkt verläuft der weitere Ablauf für beide Interventionsgruppen gleich.

Die Aorta wurde unter dem Binokular auf eine stumpfe 18G-Kanüle aufgezogen und mit Knoten und zusätzlichem Clip fixiert. Dabei war zu beachten, dass das Ende der Kanüle kranial der Aortenklappe liegt, da nur auf diese Weise die retrograde Perfusion der Koronararterien gewährleistet war. Zur Kontrolle wurden die Koronargefäße vorsichtig mit Perfusionslösung (s. 2.2.1 Lösungen) gespült, wonach sie sich blutleer darstellten. War dies

erfolgt wurden die Herzen anschließend an die Perfusionsanlage nach Langendorff Abb. 2.1 zum weiteren enzymatischen Verdau eingesetzt.

Der Verdau fand bei 37°C und einem konstantem Fluss von 3ml/min statt und lief je nach Herz für 8 ½ bis 9 min, bis das Herz leicht glasig aufgetrieben erschien.

Die Ventrikel wurden in der Klappenebene abgesetzt, mit einer Schere vorsichtig zerkleinert und anschließend mit einer 1000 µl Pipette resuspendiert, bis keine groben Gewebstücke mehr sichtbar waren. Abschließend wurde die Zellsuspension durch Nylongaze (Porengröße 200µm) gefiltert und 7 min stehen gelassen um die Sedimentation der Zellen zu gewährleisten. Auf eine Zentrifugation wurde bewusst verzichtet, da die hohen Scherkräfte, welche dabei auftreten, sich negativ auf die Zellqualität auswirken. Die Zellen wurden nun wieder vorsichtig an höhere Kalziumkonzentrationen adaptiert, indem der Überstand nach Sedimentation verworfen und durch eine Lösung mit höherer Kalziumkonzentration (s. 2.2.1 Lösungen) ersetzt wurde. In 4 Einzelschritten (0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM und 0,8 mM) von jeweils 7 min wurde die Endkonzentration von 0,8 mM Ca<sup>2+</sup> erreicht um einer Kalziumüberladung der Zellen durch schlagartige Erhöhung der Kalziumkonzentration (Konzentration in Perfusionslösung: 1 mM) vorzubeugen.

Als indirekte Qualitätskontrolle der TAC-Operationen konnte der makroskopische Aspekt der Aorta während der Kanülierung herangezogen werden. Diese war bei den Interventionstieren weißlich fibrosiert und dilatiert, gelegentlich konnte auch der Faden optisch gesichert werden.

## 2.3 Erhebung der biometrischen Daten

Aus den erhobenen Herz- und Körpergewichten wurde mit nachstehender Formel das Verhältnis Herz- zu Körpergewicht (HG/KG) berechnet, um die Hypertrophie einschätzen und einordnen zu können:

$$\frac{\text{HG}}{\text{KG}} \text{Ratio} = \frac{\text{Herzgewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}}$$

**Formel 1** Berechnung des Verhältnisses von Herzgewicht (HG) zu Körpergewicht (KG)

## 2.4 Patch Clamp

Die Patch-Clamp-Technik ist heute eine der wichtigsten elektrophysiologischen Arbeitsmethoden und wurde in der Form, wie wir sie heute benutzen, von Erwin Neher und Bert Sakmann (Hamill et al. 1981; Neher und Sakmann 1976) entwickelt, wofür sie 1991 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden. Dabei können je nach Anforderung, einzelne Ströme über die Membran (im *whole-cell voltage clamp mode*) oder auch die Spannungsverläufe (im *current-clamp mode*) gemessen werden.

Um dies zu erreichen, wird ein kleiner Membranfleck (*patch*) mit der Pipette von der Umgebung elektrisch isoliert. Dazu wird die Pipette (Durchmesser an der Spitze ca. 1-5  $\mu\text{m}$ ) unter leichtem Überdruck bis an die Zelle herangeführt und erst dann der Druck abgelassen, um zu vermeiden, dass sich beim Durchbrechen der Flüssigkeitsoberfläche Schmutzpartikel anhaften und die Spitze verstopfen. Sollte sich dadurch die Zellmembran noch nicht an die Pipettenspitze anheften, kann anschließend noch mit leichtem Sog die Zellmembran vorsichtig an die Pipettenspitze angesaugt werden. Dadurch bildet sich eine sehr dichte und stabile Verbindung mit einem Widerstand im Bereich von  $>1\text{G}\Omega$  (*Gigaseal*)  $\rightarrow$  *on-cell mode*. Erst dadurch kann gewährleistet werden, dass man Messungen durchführen kann, in denen der Messwert nicht vom Hintergrundrauschen überdeckt wird.

Um eine leitende Verbindung mit dem Zytosol zu erhalten und Ableitungen über die gesamte Zelle zu ermöglichen (*whole-cell mode*), können nun durch ruckartiges Anlegen eines starken Soges die Membran durchbrochen werden (*ruptured patch*) oder mit bestimmten Pharmaka (Amphotericin B, Nystatin) Poren in die Membran gesetzt werden (*perforated patch*). In diesem Zustand lässt sich auch eine definierte Membranspannung, die Kommandospannung, einstellen, welche dann vom Amplifier konstant gehalten wird (Spannungsklemme).

Es ist aber auch möglich die Spannungsverläufe als Funktion der Zeit über der Zellmembran zu messen. Dazu wird vom *whole-cell voltage clamp mode* in den *current-clamp mode* gewechselt, d.h. der Amplifier hält nicht mehr die Spannung konstant, sondern die applizierte Strommenge (Stromklemme), wodurch Aktionspotentiale gemessen werden können.

Für eine präzise Messung ist die korrekte Kompensation der kapazitiven Artefakte von zentraler Bedeutung, im Wesentlichen sind das  $C_{\text{fast}}$  und  $C_{\text{slow}}$ , die schnelle und die langsame Komponente. Ursache des ersten ist die Kapazität der Pipettenlösung, des zweiten die Beladung der Zellmembran nach Ruptur.

Weiterer Korrekturbedarf besteht bei den Übergangspotentialen (Offsetpotential), welche am Übergang der verschiedenen Lösungen (durch die unterschiedliche Wanderfähigkeit der

Ionen) zueinander entstehen, insbesondere dem Liquid-Junction-Potential. All diese Größen werden durch die Patchmaster-Software automatisiert abgeglichen.

### 2.4.1 Lösungen

	Substanz	Molarität		
<b>Badlösung</b>	KCl	5,4	mM	gelöst in Aqua bidest; pH 7,4 bei 37°C mit NaOH; lagern bei +4°C
	NaCl	135	mM	
	MgCl <sub>2</sub>	1	mM	
	HEPES	10	mM	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,33	mM	
	Glucose	10	mM	
	CaCl <sub>2</sub>	1	mM	
optional	Nifedipin	0,5	µM	frisch ansetzen
	Ranolazin	10	µM	
<b>Pipettenlösung</b>	K-Aspartat	120	mM	gelöst in Aqua bidest; pH 7,2 bei RT mit KOH; lagern bei -20°C
	KCl	8	mM	
	NaCl	7	mM	
	MgCl <sub>2</sub>	1	mM	
	Mg-ATP	5	mM	
	HEPES	10	mM	
optional	AIP	0,1	µM	frisch ansetzen

**Tab. 2.6** Bad- und Pipettenlösung mit den jeweiligen optionalen Zusätzen

**Badlösung:** Die Zusammensetzung der extrazellulären Lösung entspricht in Bezug auf die Ionenzusammensetzung näherungsweise der Extrazellulärflüssigkeit in vivo.

Die Titration des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte mit NaOH bei 37°C.

Je nach Fragestellung wurden die Pharmaka Nifedipin (0,5 µM), zur Hemmung des L-Typ-Kalzium-Stromes, oder Ranolazin (10 µM), für die Hemmung des späten Natriumstromes, hinzugefügt.

**Pipettenlösung:** Die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung entspricht ebenfalls in etwa den Werten, wie sie in vivo vorgefunden werden.

Die Titration des pH-Wertes erfolgte mit KOH bei RT.

Da nach der Ruptur der Zellmembran eine Äquilibration der Pipettenlösung mit der Intrazellulärflüssigkeit stattfindet, ist es für die Vergleichbarkeit der Untersuchungen von

besonderer Bedeutung, gleiche Bedingungen zu schaffen. Deshalb wurde die gesamte Versuchsreihe mit Aliquots (je 500 µl, gelagert bei -20°C) aus einem Ansatz durchgeführt. Entsprechend der Fragestellung der CaMKII-Inhibition wurde für eine Subgruppe AIP (0,1 µM) hinzugefügt.

Das Ansetzen der Badlösung geschah möglichst zeitnah zu den Versuchen und die Lösung wurde auch nach wenigen Tagen verworfen. Alle Lösungen mit zugesetzten Pharmaka wurden bereits am Ende des Versuchstages verworfen, um eine Degradation und bakterielle Besiedlung zu vermeiden.

## **2.4.2 Versuchsaufbau**

### **2.4.2.1 Zellen und Messkammern**

Die Messkammern (Eigenkonstruktion, Technische Werkstätten, UMG) wurden gründlich getrocknet und der Glasboden gleichmäßig mit 1,7µl Laminin (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) beschichtet, um ein Anhaften der Zellen zu gewährleisten. Nachdem das Laminin 5 min angetrocknet war, wurde je nach Dichte der Zellsuspension 250-600 µl in die Kammer plattiert und für 12 min zur Sedimentation und Anhaftung ruhen gelassen. Um ein Austrocknen der Kammern zu vermeiden, wurden diese in befeuchtete Petrischalen gelegt und abgedeckt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **2.4.2.2 Die Patch-Clamp Messanlage**

Zur Betrachtung der Zellen wurde ein invertiertes Mikroskop (Nikon Eclipse, Tokyo) benutzt welches bei einer maximalen Vergrößerung von 400fach (10x Okular, 40x Objektiv) eine ausreichende Präzision ermöglichte, um die Patchpipette über der Zelle auszurichten. Das Mikroskop war auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert, um Erschütterungen zu vermeiden.

Ebenfalls auf der Arbeitsplatte befanden sich der Mikromanipulator, mit Befestigung des Pipettenhalters sowie die Heizung zur Temperierung des Zulaufs der Badlösung. Diese waren so angebracht, dass sie immer in konstanter Position zur Messkammer blieben, nachdem sie durch die jeweiligen Mikromanipulatoren justiert waren. Vom Pipettenhalter führte ein luftdichtes Schlauchsystem aus dem Käfig heraus, an dem über einen Dreiwegehahn 2 Spritzen angeschlossen waren, um die Druckverhältnisse an der



Pipettenspitze einzustellen. Um den Arbeitsplatz gegen elektromagnetische Interferenzen abzuschirmen, war ein Faraday-Käfig um die Anlage montiert, sowie ein Netzfilter gegen die Störungen aus dem Stromnetz. Die Perfusionssysteme waren innerhalb des Käfigs angebracht, um die Außenkontakte zu minimieren, und die Absaugung erfolgte mittels einer Vakuumpumpe (Eigenkonstruktion) ohne elektrische Bauteile. Alle Zuläufe und Leitungen in den Käfig waren mechanisch entkoppelt, um ein Fortleiten von Schwingungen zu vermeiden. Die Superfusion der Zellen geschah durch Gravitation und wurde mit Flusreglern (BBraun, Melsungen) auf ca. 2 ml/min eingestellt

Zentrales Bauteil der Anlage war der Patch-Clamp-Verstärker (EPC 10 von HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) mit integriertem AD/DA Wandler. Über einen Vorverstärker (Probe) waren die Pipetten- und die Referenzelektrode angeschlossen. Der Verstärker diente dazu, die Signale zu verstärken, zu filtern und von analog zu digital (AD-Wandler) umzuwandeln. Zur Bedienung wurde ein PC eingesetzt, der auch der Datenakquisition und -speicherung diente.

#### 2.4.2.3 Patch-Pipette und Elektroden

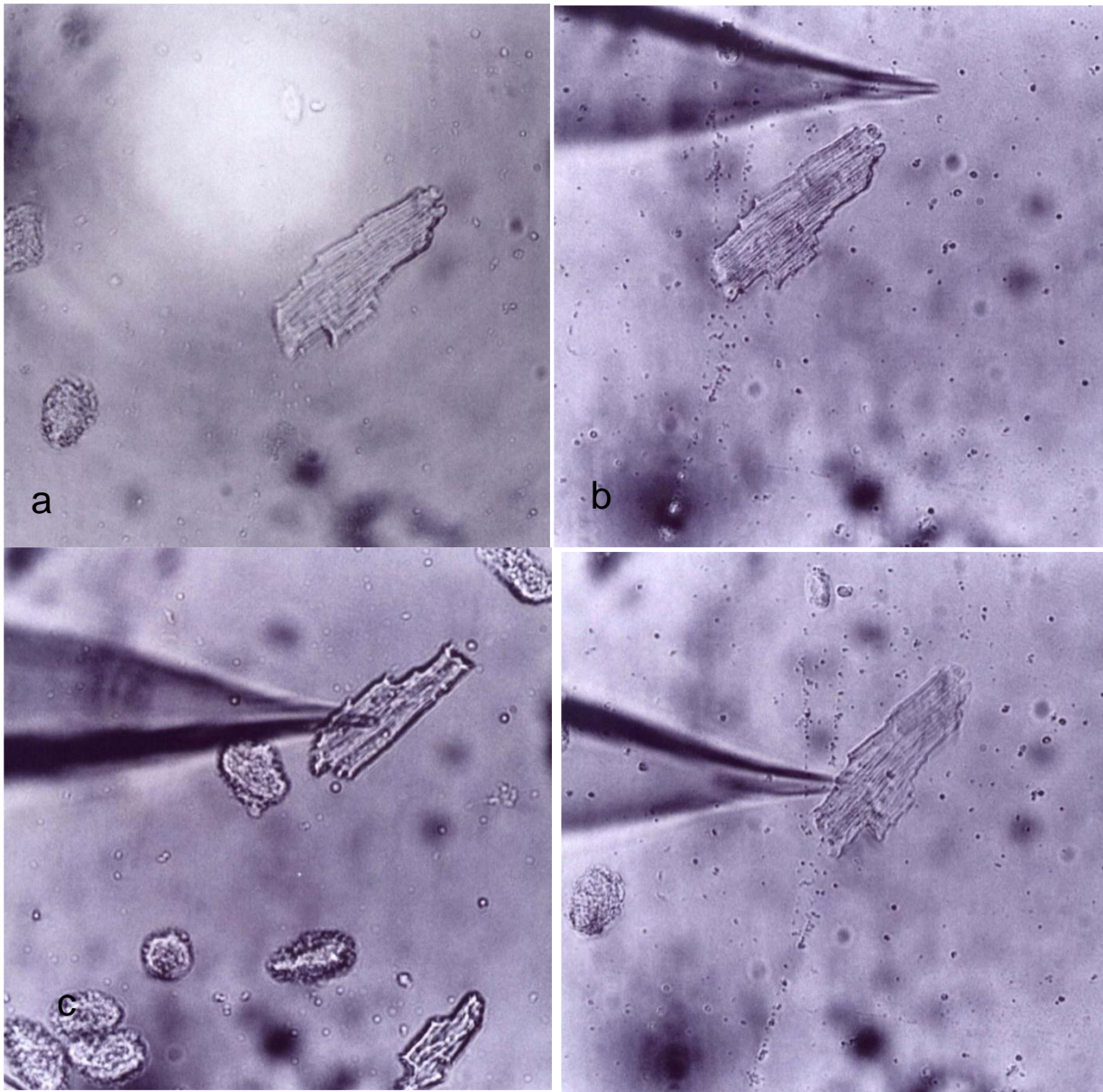
Die Pipette dient dazu, eine elektrisch isolierte Verbindung zur Zelle zu schaffen. Zur Herstellung dienten dünnwandige Borosilicat-Kapillaren (World Precision Instruments, Sarasota, USA). Die Pipetten wurden in einem Pipettenziehgerät (*Puller*) (Zeitz Puller GmbH, München) gezogen und vor Benutzung hitzepoliert. Dabei wurden die Pipetten horizontal eingespannt und in einem zweistufigen Prozess so gezogen, dass an den Enden konisch zulaufende Spitzen mit definierter Geometrie entstanden. Anpassungen der Geometrie konnten über die Parameter Hitze, Wartezeit und Zugkraft vorgenommen werden. Versuche mit verschiedenen Pipettenwiderständen und –geometrien zeigten, dass für die Untersuchung der murinen Kardiomyozyten mittelohmige (2,5-4 M $\Omega$ ) Pipetten mit relativ kurzem Lauf die zuverlässigsten und am besten reproduzierbaren Ergebnisse ermöglichten. Die Hitzepolitur diente einer weiteren Optimierung der Seal-Eigenschaften der Pipette, da hierdurch ein schmaler Rundsaum an der Spitze entstand, durch welchen die Dichtigkeit der Pipette erhöht wurde.

Zum Befüllen der Pipetten unmittelbar vor Benutzung dienten Einfüllhilfen (Microfil / World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) mit zusätzlichem vorgeschaltetem Filter (Filtropur / Sarstedt AG, Porengröße 0,2 $\mu$ m), um Verschmutzungen und ein Verstopfen der Pipette zu vermeiden.

Als Pipettenelektrode (Messelektrode) diente ein chlorierter Silberdraht (Silber/Silberchloridelektrode). Die Badelektrode (Referenzelektrode) bestand aus einem massiven Silber/Silberchloridpellet.

### 2.4.3 Versuchsdurchführung

Als erstes erfolgte das Ziehen einer Pipette, wie in 2.4.2.3 beschrieben. Nach Hitzepolitur und Befüllen der Pipette mit der Pipettenlösung wurde diese in die Pipettenhalterung eingespannt und luftdicht fixiert, da als nächstes leichter Überdruck angelegt wurde, um einen geringen Ausfluss aus der Spitze zu haben. Das war erforderlich, um die Spitze frei von Verunreinigungen, insbesondere beim Durchtritt durch Grenzflächen, zu halten.



**Abb. 2.2** a) Einstellen des Lichtkegels im Blickfeld b) Scharfstellen der Pipettenspitze c) Ausrichten der Pipettenspitze über der Zelle d) Vorsichtiges Herabfahren auf die Zelle

Nach Aussuchen einer Zelle wurde die Pipette mit dem Joystick in die Lösung gefahren und unter Sichtkontrolle der Lichtkegel der Spitze im Blickfeld des Mikroskops eingestellt.

An diesem Punkt, nach Durchqueren der Luft- Flüssigkeitsgrenze, aber noch im niederohmigen Bereich in der Badlösung, wurde der Nullabgleich für das Potential durchgeführt (Kompensation des Liquid-Junction Potentials). Nach erfolgtem Abgleich wurde kontinuierlich ein biphasischer rechteckiger Testpuls erzeugt (je 5 mV Amplitude in beide Richtungen) und am Monitor beobachtet.

War dies erfolgt, wurde der Objektisch geringfügig heruntergefahren, um die Pipettenspitze nicht in der Ebene der Zellen zu fokussieren, sondern in einer Ebene knapp darüber. Danach wurde die Spitze bei niedriger Geschwindigkeit weiter heruntergefahren, bis sie im Fokus erschien. In dieser Höhe wurde die Spitze dann, sofern es noch nicht erfolgt war, genau über der Zelle positioniert.

Die weiteren Schritte wurden nicht mehr unter Sichtkontrolle, sondern unter Kontrolle des Testpulses durchgeführt. Da die Amplitude des Testpulses ein indirektes Maß für den Strom darstellt, der zwischen den beiden Elektroden fließt, besteht nach dem Ohm'schen Gesetz

$$U = R \times I$$

**Formel 2** Berechnung des Widerstandes nach dem Ohm'schen Gesetz

eine inverse Beziehung zum Widerstand. D.h. wird der Widerstand bei Annäherung an die Zellmembran größer, nimmt der Strom und entsprechend die Amplitude ab. Anhand dieser Abnahme konnte man abschätzen, wie nah man schon an der Zellmembran war: Bei einer Reduktion um ca. 30-50% war man nah genug an der Membran und brauchte nicht weiter herunter zu fahren. Ließ man jetzt den Überdruck ab, so heftete sich die Membran häufig schon an die Spitze, tat sie es nicht, konnte man dies durch leichten Sog an der Spitze forcieren. Dadurch stieg der Widerstand bis in den Bereich von mehreren Gigaohm (GΩ), was dazu führte dass der Testpuls sich als gerade Linie darstellte, da kein Strom mehr fließen konnte. Damit war das Gigaseal entstanden.

Nun wurde in den *On-cell-mode* gewechselt und damit die kapazitiven Ströme kompensiert. Um einen Zugang zum Zellinneren zu erhalten, wurde nun eine kurzer, kräftiger Sog an die Pipettenspitze angelegt, wodurch der Membranflecken innerhalb der Pipettenspitze durchbrochen wurde (*rupturen*). Der offene Zugang zum Zytosol erlaubte es, einen Zustand des Äquilibrium zwischen Zytosol und Pipettenlösung zu erhalten. Dazu wurde vor Beginn jeder Messung 5 min abgewartet, wodurch auch der Inhibitor genug Zeit hatte, sein Zielprotein zu binden.

In der nun erreichten Ganzzellkonfiguration (*whole-cell-mode*) konnten Ableitungen über die gesamte Zellmembran erfolgen. Da die Fragestellung nach Aktionspotentialen lautete, musste noch eine weitere Umschaltung in den *current-clamp-mode* vorgenommen werden. In diesem Modus wird nicht das Potential der Zelle durch eine variable Menge applizierten Stroms konstant gehalten (Spannungsklemme), sondern es wird eine bestimmte Menge Strom appliziert (Stromklemme), um das gewünschte Ruhemembranpotential zu erreichen. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Zelle ein stabiles Ruhemembranpotential erreicht, da sonst keine korrekten Messungen möglich sind.

#### 2.4.3.1 Protokolle

Die Aktionspotentiale wurden durch Rechteckimpulse von 1-6ms Dauer mit einer Amplitude von 1000 pA ausgelöst. Es wurden 4 verschiedenen Frequenzen gemessen: 0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz und 4 Hz, um frequenzabhängige Unterschiede erfassen zu können.

Alle Daten wurden mit einer Abtastrate von 4 kHz aufgezeichnet. Je nach Fragestellung wurden die Protokolle angepasst:

Für die CaMKII-Inhibitionsversuche wurde AIP akut über die Pipettenlösung in die Zelle eindialysiert und dann nach der Äquilibrationszeit gemessen. Die Versuche mit Nifedipin oder Ranolazin wurden als gepaarte Experimente durchgeführt, indem nach der Äquilibrationszeit erst einmal eine Serie aufgezeichnet wurde, um die Ausgangswerte zu erhalten. Anschließend wurden die Pharmaka durch die Superfusionslösung eingewaschen und die Messungen nach 5, 10 und 15 min Inkubationszeit wiederholt, um den zeitlichen Verlauf der Veränderungen zu erfassen.

Die gleichen Protokolle wurden an den Sham-Mäusen gemessen, um die Wirkung der Pharmaka in den Kontrolltieren mit der in den Interventionstieren vergleichen zu können.

Um eine etwaige zeitliche Komponente der Veränderung der APD auszuschließen, wurden in einer Subgruppe die Messungen ohne Pharmaka nur mit Badlösung (*Vehicle*) im zeitlichen Verlauf durchgeführt.

## 2.5 Auswertung der Aktionspotentiale

### 2.5.1 Dauer und Amplitude

Um die Aktionspotentiale auswerten zu können, mussten die Rohdaten erst aus der Mess-Software (Patchmaster, HEKA) exportiert, mit „ABF-Utility“ konvertiert und in Clampfit importiert werden. Hier erfolgte die Trennung zwischen Stimulus und eigentlichem AP sowie die Bildung des Mittelwertes der ausgewählten APs. Dieses gemittelte AP wurde dann als XY-Funktion in ein speziell dafür geschriebenes „MS-Excel Spreadsheet“ übertragen, welches die gewünschten Parameter berechnete und die Werte geordnet ausgab. Eine Auswahl der errechneten Parameter sind in den folgenden Abbildungen zusammengefasst.

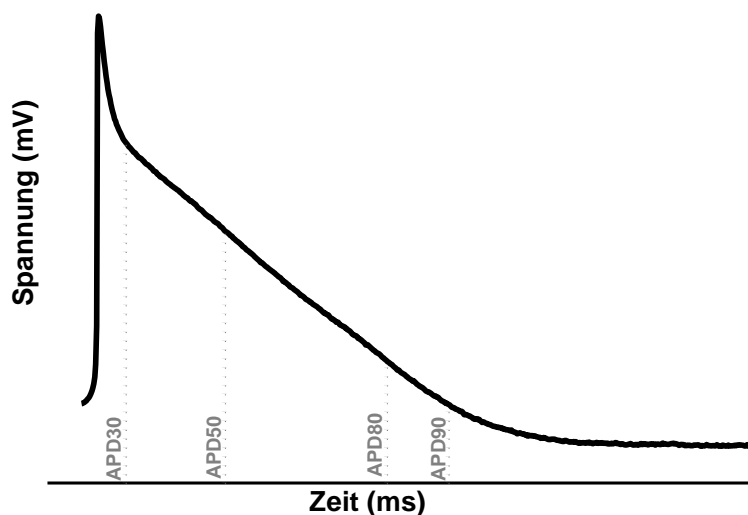


Abb. 2.3 Beispielhafte Darstellung der analysierten Werte

### 2.5.2 Nachdepolarisationen

Die Nachdepolarisationen wurden einzeln in Clampfit ausgezählt, gewertet wurden dabei nur die Nachdepolarisationen, denen ein reguläres AP vorangeht.

Um die Nachdepolarisationen quantifizieren zu können, wurde nach einem einheitlichen Schema verfahren: Dabei wurden EADs als eine erneute Depolarisation des

Membranpotentials angesehen, wenn diese vor Ende der vollständigen Repolarisation eintraten und mindestens 10% der Gesamtamplitude des APs erreichten.

Analog dazu wurden DADs als Schwankungen des Ruhemembranpotentials nach vollständiger Repolarisation gewertet. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur solche Schwankungen gewertet, die in der Lage waren, ein spontanes AP auszulösen.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die Daten sind im Folgenden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben.

Statistische Analysen wurden je nach Anforderung mittels Zwei-Wege-Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA, Vergleich von longitudinalen Daten mehrerer Gruppen), in Kombination mit einem Holm-Sidak Test, einem Student's t test (ein oder zweiseitig) oder Fisher Exact Test mit den Programmen SigmaPlot oder GraphPad Prism durchgeführt. Getestet wurde gegen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, als  $p < 0.05$  (Werte kleiner 1% oder 1‰ sind gesondert angegeben) .

### 3 Ergebnisse

Bereits bei makroskopischer Betrachtung der Herzen nach Kardiektomie fällt auf, dass die Herzen der Interventionstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich hypertrophiert sind. In den folgenden Punkten werden die Daten objektiviert.



**Abb. 3.1** Herzen nach Kardiektomie 7d post-OP und histologische Schnitte

### 3.1 Auswertung der biometrischen Daten

#### 3.1.1 TAC

Abb. 3.2 zeigt die Herzgewichte 7d post-OP. Diese sind im Mittel mit  $225,82 \pm 7,6$  vs  $181,23 \pm 6,02$  mg (t-test  $p < 0,001$ ) in den Interventionstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht und zeigen somit eine kardiale Hypertrophie an.

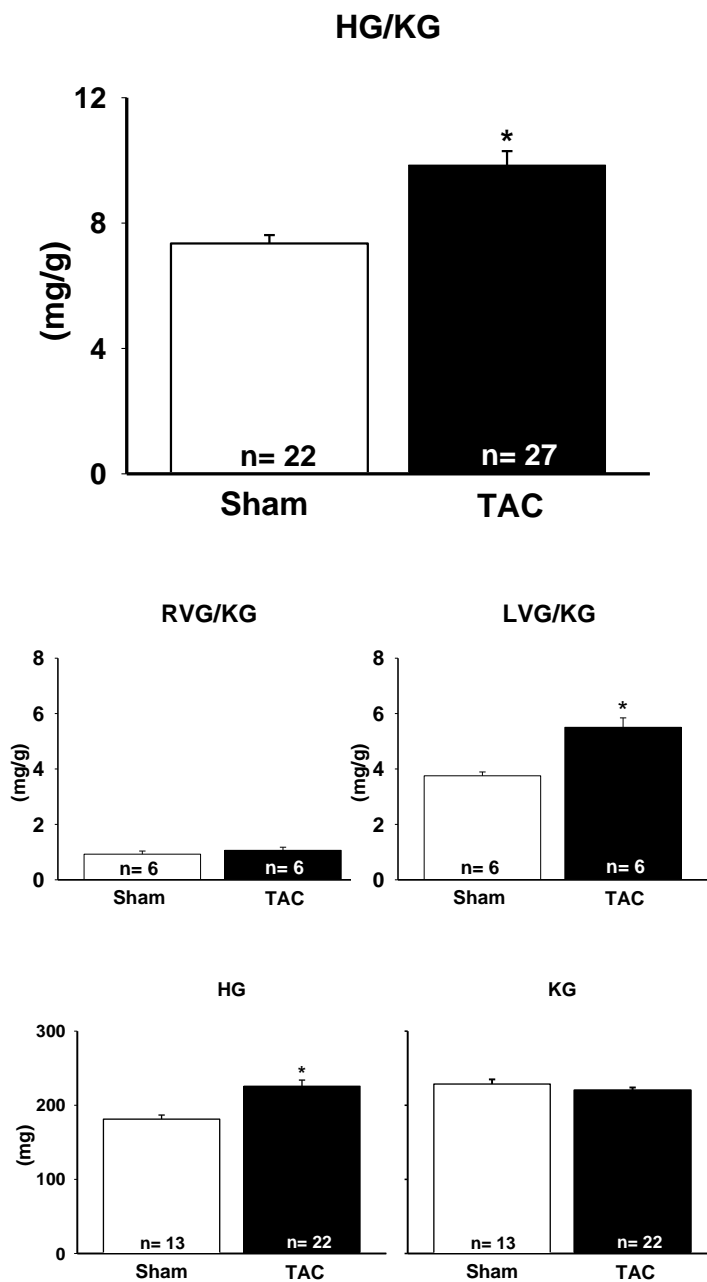


Abb. 3.2 Biometrische Daten der TAC-Gruppe 7d post-OP



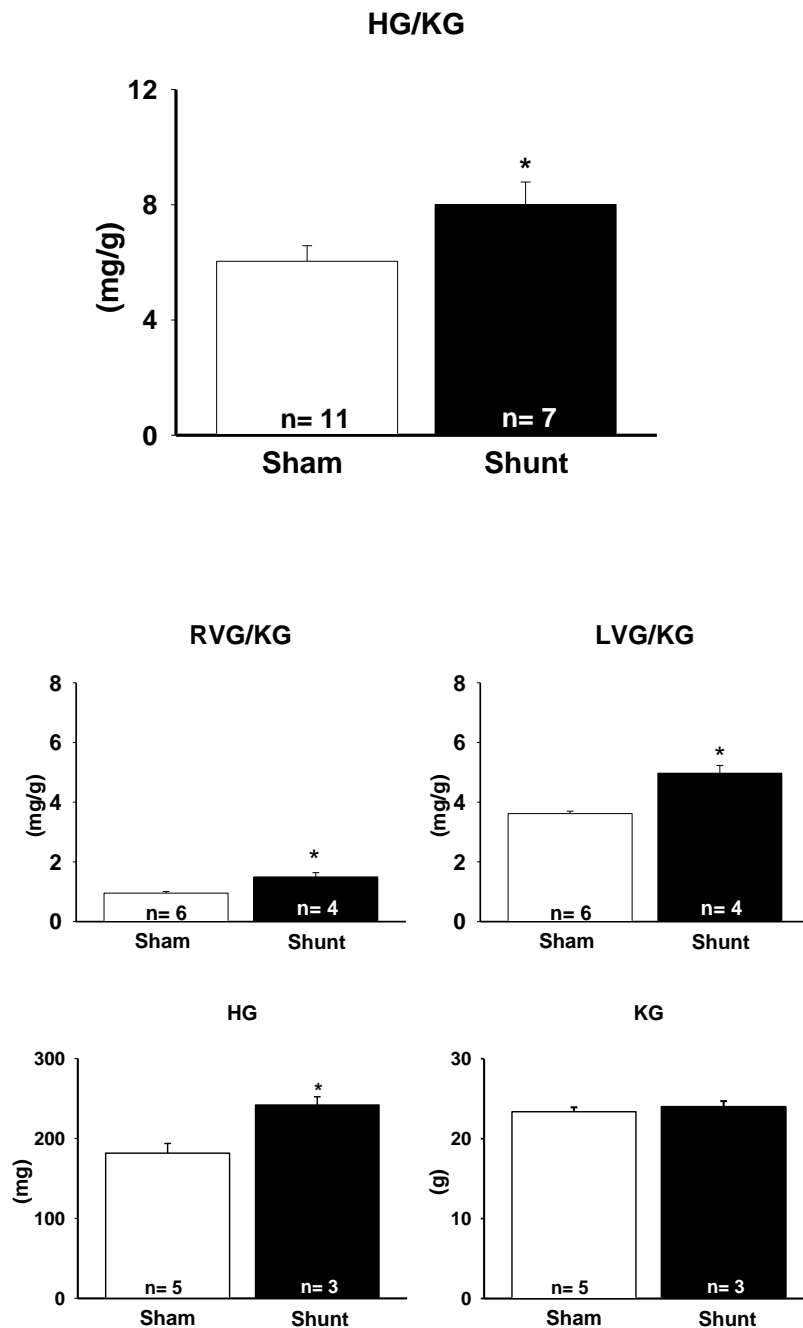
Betrachtet man die Ventrikel jeweils getrennt voneinander, so stellt man fest, dass die Hypertrophie vornehmlich im linken Ventrikel stattgefunden hat (s. Abb 3.2). Setzt man das Herzgewicht zum Körpergewicht ins Verhältnis, unterstützt dies die Aussage noch, da hier ebenfalls ein signifikanter Unterschied sowohl im Verhältnis linker Ventrikel / Körpergewicht mit  $5,50 \pm 0,34$  vs.  $3,75 \pm 0,14$  mg/g (t-test  $p < 0,001$ ), als auch im Verhältnis Herzgewicht / Körpergewicht mit  $10,37 \pm 0,46$  vs.  $7,95 \pm 0,21$  mg/g auftritt, was einer Steigerung um 30.44% entspricht (t-test  $p < 0,001$ ) (Abb 3.2), gerade vor dem Hintergrund eines nicht veränderten Körpergewichtes ( $22,02 \pm 0,42$  vs.  $22,86 \pm 0,67$  g,  $p = n.s.$ ) Abb 3.2.

	Sham	7d TAC	
Herzgewicht (mg)	$181,23 \pm 6,02$	<b><math>225,82 \pm 7,6^*</math></b>	<b>* <math>p &lt; 0,05</math></b>
Körpergewicht (g)	$22,86 \pm 0,67$	$22,02 \pm 0,42$	
Ratio	$7,95 \pm 0,21$	<b><math>10,37 \pm 0,46^*</math></b>	
Tage post-OP	$7,23 \pm 0,30$	$7,32 \pm 0,20$	
Anzahl	13	22	

**Tab. 3.1** Biometrische Daten der TAC-Gruppe 7d post-OP

Die Daten für 21d post-OP sind wie folgt zusammenzufassen: Es zeigt sich ein ähnliches Bild wie nach 7d. Die Herzgewichte sind signifikant erhöht und damit auch das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht, bei ebenfalls weitestgehend gleichbleibenden Körpergewichten. Das Verhältnis nimmt im Vergleich zu den 7d post-OP erhobenen Daten sogar nochmals zu.

### 3.1.2 Shunt



**Abb. 3.3** Biometrische Daten der Shunt-Gruppe 7d post-OP

Die Herzgewichte bei Shunt sind in den Interventionstieren 7d post-OP im Mittel mit  $242,00 \pm 10,12$  vs.  $181,60 \pm 12,12$  mg (t-test  $p < 0,05$ ) signifikant erhöht (Abb. 3.3), betrachtet man aber in diesem Modell die Ventrikel voneinander getrennt, so zeigt sich, dass beide Ventrikel hypertrophiert sind (Abb. 3.3). Das Verhältnis von Herz-zu Körpergewicht ist entsprechend in

beiden Ventrikeln mit  $1,50 \pm 0,29$  vs.  $0,95 \pm 0,14$  mg/g (t-test  $p < 0,01$ ) rechtsventrikulär und  $4,97 \pm 0,26$  vs.  $3,62 \pm 0,08$  mg/g (t-test  $p < 0,001$ ) linksventrikulär als auch in der Summe mit  $10,10 \pm 0,27$  vs.  $7,76 \pm 0,46$  mg/g (t-test  $p < 0,05$ ) signifikant erhöht (Abb. 3.3) was einer Zunahme um 30.15% entspricht, bei ebenfalls unveränderten Körpergewichten (Abb. 3.3).

Zur Verifizierung des Shuntes wurde in diesem Modell die Sauerstoffsättigung bestimmt (Abb. 3.4 zeigt 2 Originalscans der Blutgasanalysen und die Mittelwerte der Sättigung), man erkennt eine signifikante Zunahme der Sättigung von  $57,75 \pm 9,42$  % in der Kontrolle auf  $93,23 \pm 2,28$  % (t-test  $p < 0,05$ ) in den Interventionstieren, was eine Zunahme auf beinahe arterielle Werte bedeutet.

**PATIENTENPROBENBERICHT** 10 MÄR 2008 13:23  
 System 865-7444 10 MÄR 2008 13:22  
 Uhrzeit  
 Entnahmedatum  
 Entnahmezeit  
 Bediener-ID  
 Sequenznr. 1681  
 Proben-ID 1  
 Art gem.venös  
 Patient-ID 12  
 Geburtsdatum  
 Alter  
 Geschlecht  
 Arzt-ID  
 Abteilung  
**SPRITZE**  
**SAÜRE/BASE 37°C**  
 Einheiten Normalbereich  
 pH 7.257↓ ( 7.350 - 7.450)  
 pCO2 36.6 mmHg ( 35.0 - 45.0)  
 pO2 36.0↓ mmHg ( 75.0 - 100.0)  
 HCO3-akt 15.9 mmol/l  
 HCO3-std 15.4 mmol/l  
 tCO2 17.1 mmol/l  
 BE(B) -10.3 mmol/l  
 BE(ecf) -11.2 mmol/l  
**SAUERSTOFF 37°C**  
 cHb 13.3 g/dl ( 12.0 - 18.0)  
 Hkt 39 %  
 ctO2(v) 8.9↓ mL/dl ( 15.0 - 23.0)  
 B02 18.3 mL/dl ( 16.0 - 24.0)  
 pO2 36.0↓ mmHg ( 75.0 - 100.0)  
 p50 32.4 mmHg  
 sO2 48.3↓ % ( 92.0 - 98.5)  
 F02Hb 47.8↓ % ( 94.0 - 97.0)  
 FCOHb 0.3 % ( 0.0 - 1.5)  
 FMetHb 0.7 % ( 0.0 - 1.5)  
 FHhb 51.2↓ % ( 0.0 - 5.0)  
**ELEKTROLYTE**  
 Na+ \*\*\*\*\* mmol/l ( 135.0 - 148.0)  
 K+ 2.61↓ mmol/l ( 3.50 - 5.30)  
 Ca++ \*\*\*\*\* mmol/l ( 1.13 - 1.32)  
 Cl- 105 mmol/l ( 98 - 106)

† oder ↓ = außerhalb des Normalbereichs  
 \*\*\*\*\* = Nicht kalibriert

Sham

**PATIENTENPROBENBERICHT** 18 MÄR 2008 11:29  
 System 865-7444 Datum 18 MÄR 2008  
 Uhrzeit 11:27  
 Entnahmedatum  
 Entnahmezeit  
 Bediener-ID  
 Sequenznr. 1686  
 Proben-ID 1  
 Art gem.venös  
 Patient-ID 9 *Shunt*  
 Geburtsdatum  
 Alter  
 Geschlecht  
 Arzt-ID  
 Abteilung  
**SPRITZE**  
**SAÜRE/BASE 37°C**  
 Einheiten Normalbereich  
 pH 7.175↓ ( 7.350 - 7.450)  
 pCO2 31.7↓ mmHg ( 35.0 - 45.0)  
 pO2 88.7 mmHg ( 75.0 - 100.0)  
 HCO3-akt 11.4 mmol/l  
 HCO3-std 12.5 mmol/l  
 tCO2 12.4 mmol/l  
 BE(B) -15.8 mmol/l  
 BE(ecf) -17.0 mmol/l  
**SAUERSTOFF 37°C**  
 cHb 12.2 g/dl ( 12.0 - 18.0)  
 Hkt 36 %  
 ctO2(v) 16.2 mL/dl ( 15.0 - 23.0)  
 B02 16.8 mL/dl ( 16.0 - 24.0)  
 pO2 88.7 mmHg ( 75.0 - 100.0)  
 sO2 94.7 % ( 92.0 - 98.5)  
 F02Hb 94.0 % ( 94.0 - 97.0)  
 FCOHb 0.4 % ( 0.0 - 1.5)  
 FMetHb 0.3 % ( 0.0 - 1.5)  
 FHhb 5.3↑ % ( 0.0 - 5.0)  
**ELEKTROLYTE**  
 Na+ 151.4↑ mmol/l ( 135.0 - 148.0)  
 K+ 2.41↓ mmol/l ( 3.50 - 5.30)  
 Ca++ \*\*\*\*\* mmol/l ( 1.13 - 1.32)  
 Cl- 105 mmol/l ( 98 - 106)  
 Anionenlücke 37.4 mmol/l

† oder ↓ = außerhalb des Normalbereichs  
 \*\*\*\*\* = Nicht kalibriert

Shunt

	Sham	7d Shunt	
Herzgewicht (mg)	181,23 ± 6,02	<b>242,00 ± 17,52*</b>	* p<0,05
Körpergewicht (g)	23,37 ± 1,21	23,97 ± 1,27	
Ratio	7,76 ± 1,04	<b>10,10 ± 0,47*</b>	
Tage post-OP	6,80 ± 1,30	7,00 ± 1,00	
Sättigung	57,75 ± 18,84	<b>93,23 ± 3,96*</b>	
Anzahl	5	3	

Abb. 3.4 Originalscans der Blutgasanalysen und Mittelwerte der biometrischen Daten

### 3.1.3 Auswertung der Membrankapazitäten

Die Auswertung der Membrankapazitäten gibt einen Anhalt für die Zelloberfläche und damit Größe und Hypertrophie auf Einzelzellebene. Wie in Abb. 3.5 sichtbar wird, sind die Membrankapazitäten in den TAC-Zellen signifikant erhöht ( $p < 0.05$ ), in den Shunt-Zellen zwar auch deutlich, aber nicht signifikant ( $p = \text{n.s.}$ ).

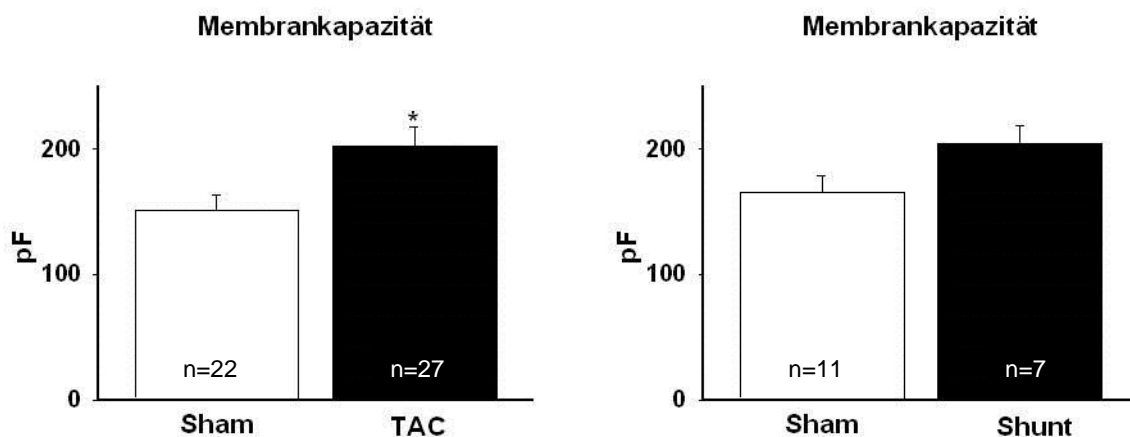


Abb. 3.5 Auswertung der Membrankapazitäten 7d post-OP

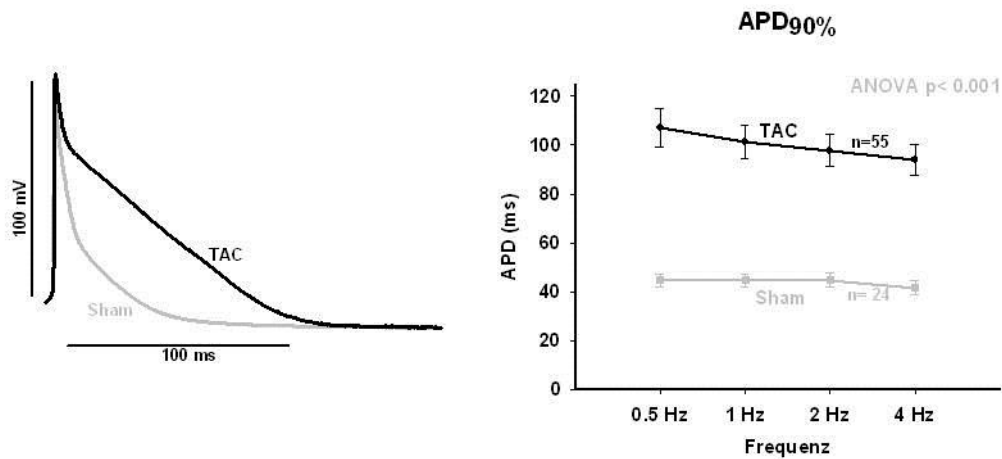
### 3.2 Effekte der Nachlasterrhöhung (TAC, 7d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie

Untersucht wurden die Effekte auf die Dauer und Amplitude des Aktionspotentials, sowie die Häufigkeit von Nachdepolarisationen.

Bei der Darstellung der gepaarten Experimente ist zunächst der zeitliche Verlauf anhand einer Frequenz (1 Hz) gezeigt, gefolgt von der Analyse des frequenzabhängigen Verhaltens zu einem Zeitpunkt im Steady-State (10 min Inkubationszeit für Nifedipin, 5 min für Ranolazin).

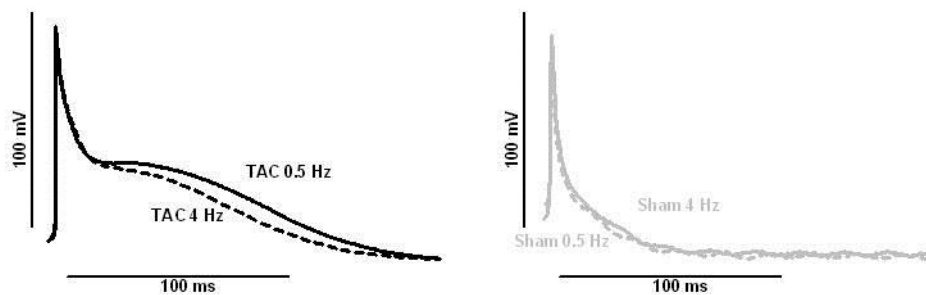
### 3.2.1 Effekte der Nachlasterhöhung (TAC, 7d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie

#### 3.2.1.1 Dauer und Amplitude



**Abb. 3.6** Originalregistrierung und Mittelwerte der **APD<sub>90%</sub>**, TAC 7d post-OP

In Abb 3.6 sind repräsentative Originalregistrierungen von Aktionspotentialen aus TAC-Mäusen (schwarz) und den entsprechenden Sham-Mäusen (grau) dargestellt. Betrachtet man beispielhaft die  $APD_{90\%}$ , so zeigen die Mittelwerte in den TAC-Mäusen eine Verlängerung um 121% auf  $98,97 \pm 7,39$  ms im Vergleich zur Kontrolle mit  $44,88 \pm 3,27$  ms (1 Hz,  $p < 0,001$ ). Ebenso wie die  $APD_{90\%}$  sind auch die anderen erhobenen Aktionspotentialdauern in den TAC-Mäusen ( $APD_{30\%}$ ,  $APD_{50\%}$  und  $APD_{80\%}$ ) über alle Frequenzen (0,5, 1, 2 und 4 Hz) verlängert (nicht dargestellt), während sich die Amplitude mit  $110,46 \pm 2,80$  vs.  $109,07 \pm 2,18$  mV ( $p = n.s.$ ) unverändert präsentiert.



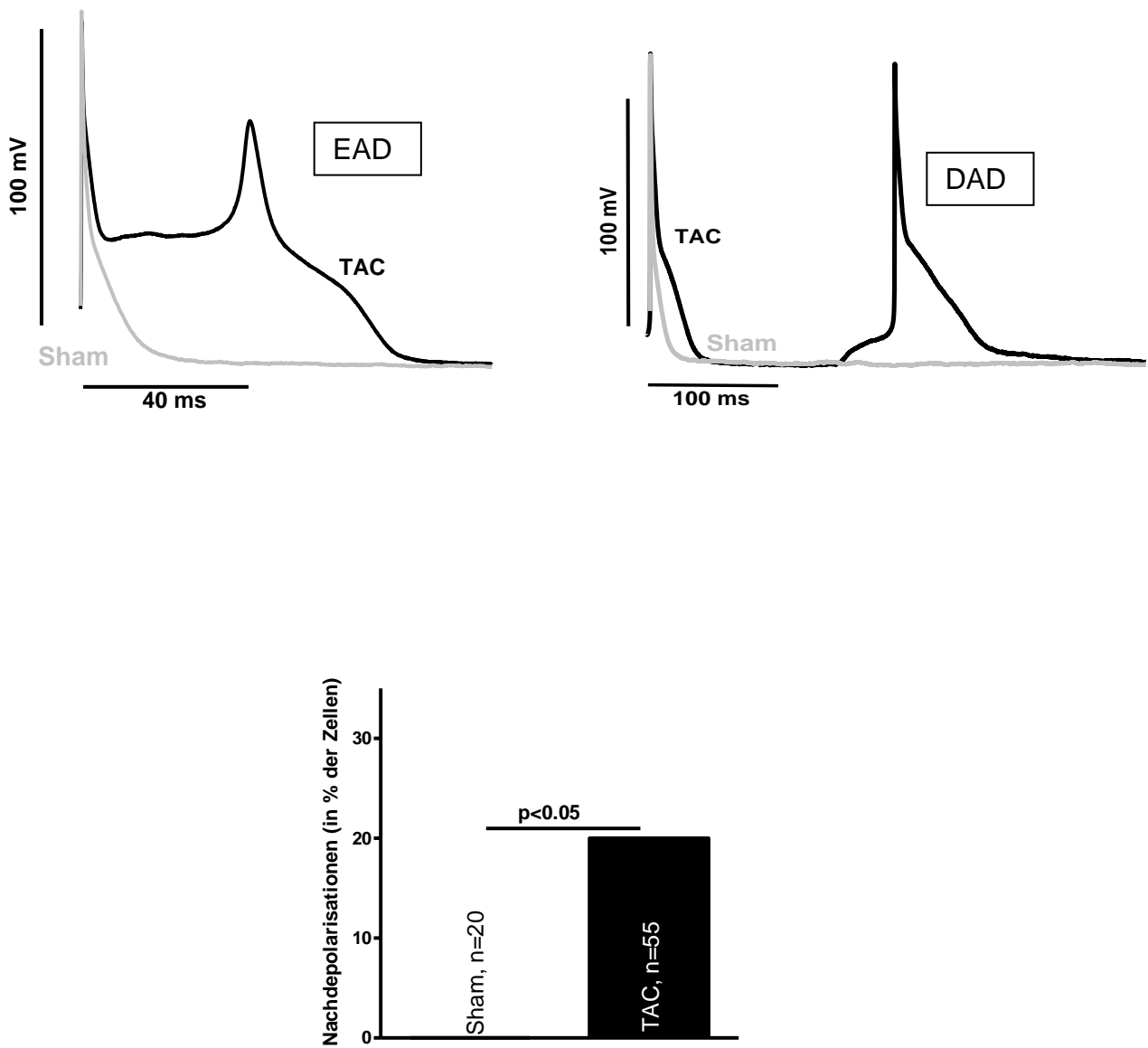
**Abb. 3.7** FDAR in TAC und Sham-Zellen 7d post-OP

Analysiert man die  $APD_{90\%}$  der TAC-Mäuse über die gemessenen Frequenzen, sieht man eine signifikante Verkürzung der APD bei den höheren Frequenzen, was einer frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation entspricht (*frequency dependent acceleration of relaxation, FDAR*). Die Mittelwerte nehmen von  $104,61 \pm 8,04$  ms bei 0,5 Hz auf  $92,14 \pm 6,42$  ms bei 4 Hz ab, was eine Reduktion um 11,9% bedeutet ( $p < 0,05$ )

Diese Relaxationsbeschleunigung tritt in den Sham-Mäusen nur in sehr geringem Umfang auf.

### 3.2.1.2 Nachdepolarisationen

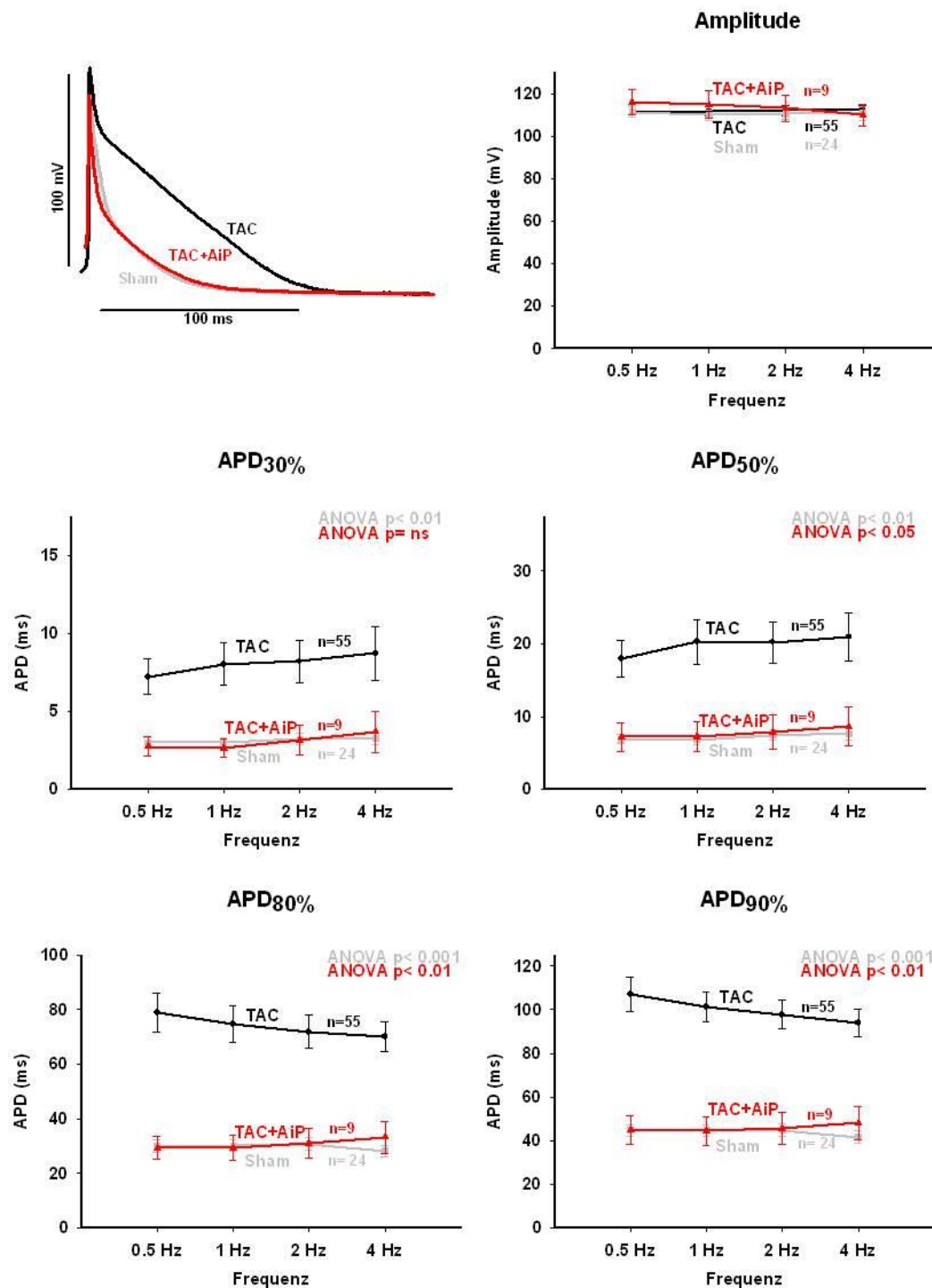
Frühe (early afterdepolarisation, EAD) und späte (delayed afterdepolarisation, DAD) Nachdepolarisationen treten in den Interventionsmäusen summiert signifikant häufiger auf : 20,1 % der Zellen vs. Kontrolle 0%, ( $p < 0,05$  mittels Fisher Exact Test,  $n=55$  vs.  $n=9$ ). Abb 3.8 zeigen repräsentative Originalregistrierungen einer frühen und einer späten Nachdepolarisation.



**Abb. 3.8** Repräsentative Originalregistrierungen und statistische Auswertung der Nachdepolarisationen 7d post-OP in TAC-Tieren, verglichen mit Kontrolle



### 3.2.2 Einfluss der CaMKII-Inhibition

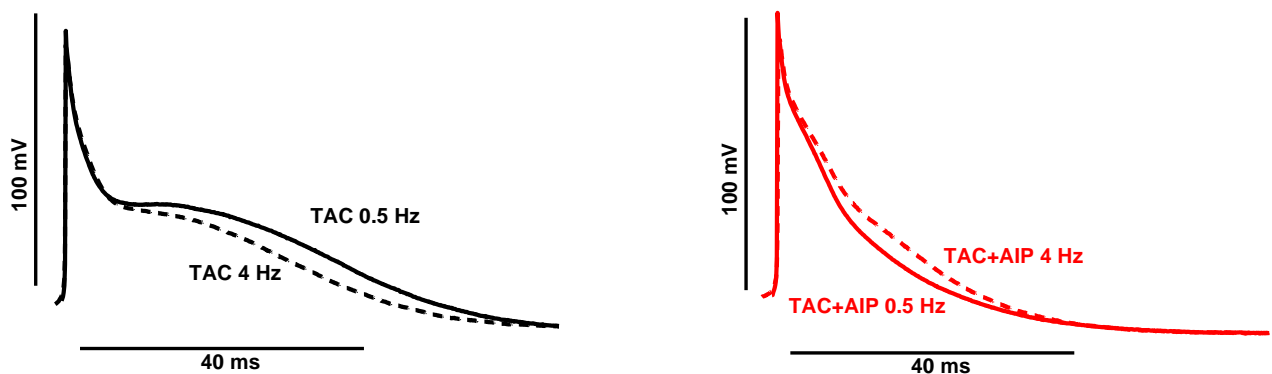


**Abb. 3.9** Repräsentative Originalregistrierungen und Auswertung der Mittelwerte 7d post-OP, es zeigt sich keine Veränderung der Amplitude, jedoch sind die APDs über alle gemessenen Zeitpunkte deutlich verlängert. Unter Inhibition mit AIP kommt es zu einer Normalisierung auf Kontrollniveau

### 3.2.2.1 Dauer und Amplitude

Eine CaMKII-Blockade mittels des spezifischen Inhibitors AiP (0,1  $\mu$ M, s. 2.4.1) führt zu einer vollständigen Rückbildung der Aktionspotentialverlängerung auf Kontrollniveau (z.B.: 1 Hz APD<sub>90%</sub>, 44,53  $\pm$  4,41 vs. 44,88  $\pm$  3,27 ms für TAC+AiP vs. Sham) (Abb 3.9). Die Mittelwerte zeigen, dass dies für alle gemessenen APDs und Frequenzen zutrifft.

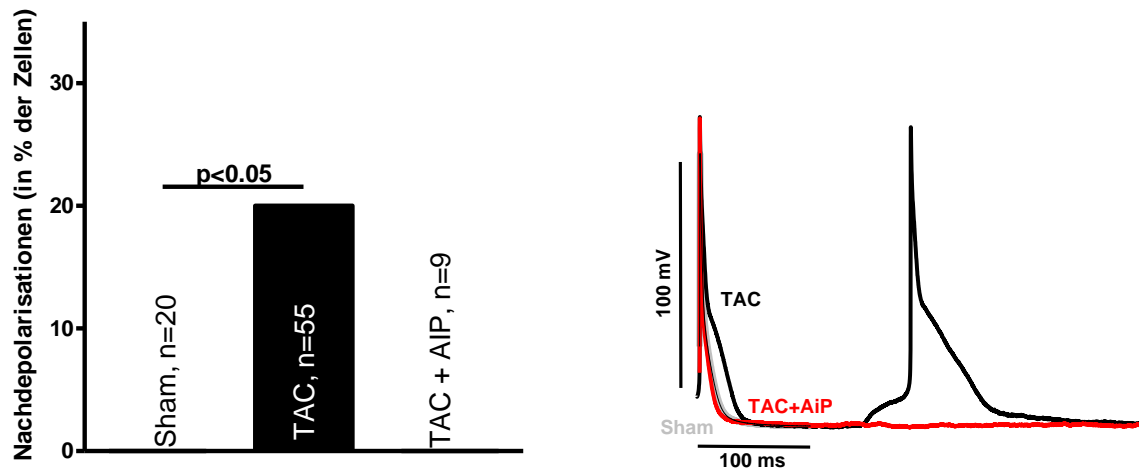
Betrachtet man das frequenzabhängige Verhalten der APD, ist bemerkenswert, dass unter CaMKII-Inhibition die frequenzabhängige Verkürzung der APD vollständig ausbleibt und es im Gegenteil sogar zu einer signifikanten Verlängerung bei den höheren Frequenzen kommt (APD<sub>90%</sub> von 44,03  $\pm$  4,43 ms bei 0,5 Hz vs 46,69  $\pm$  4,99 bei 4 Hz, Zunahme um 6%,  $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.10** FDAR in TAC-Zellen nach CaMKII-Inhibition mit AiP, 7d post-OP im Vergleich dazu ohne pharmakologische Inhibition. Es zeigt sich eine Umkehr im Frequenzverhalten bzgl der APD

### 3.2.2.2 Nachdepolarisationen

Wie in Abb. 3.11 gezeigt treten unter CaMKII-Inhibition keine Nachdepolarisationen (0%,  $n=9$ ) auf und auch hier zeigt sich wieder die Verkürzung der APD auf Kontrollniveau wie in 3.2.2.1 beschrieben.



**Abb. 3.11** Statistische Auswertung der Nachdepolarisationen 7d post-OP, diese traten ausschließlich in den operierten Tieren auf und waren unter Inhibition nicht nachweisbar.

### 3.2.2.3 Kontrolle in Sham-Zellen

Sham-Zellen ( Abb 3.12 grau) zeigen nach CaMKII-Inhibition (rot) eine verlängerte APD wie aus den Originalregistrierungen in Abb 3.12 zu sehen ist. Die Mittelwerte für die  $APD_{90\%}$  zeigen bei 1 Hz eine Zunahme um 15,9%, von  $44,88 \pm 3,27$  auf  $52,00 \pm 9,28$  ms, erreichen jedoch keine statistische Signifikanz. Weiterhin zeigt sich frequenzabhängig eine leichte Abnahme der Amplitude.

In den Sham Mäusen sind in allen Messreihen lediglich Dauer und Amplitude der Aktionspotentiale untersucht worden, da Nachdepolarisationen nicht auftraten. Die Ausnahme bilden hierbei die Zellen nach CaMKII-Inhibition mit AiP, in dieser Gruppe traten in 33,33% der Zellen Nachdepolarisationen auf.

Die leichte Zunahme der APD unter diesen Bedingungen korreliert sehr schön mit den Nachdepolarisationen und unterstreicht die Bedeutung der APD für Nachdepolarisationen.

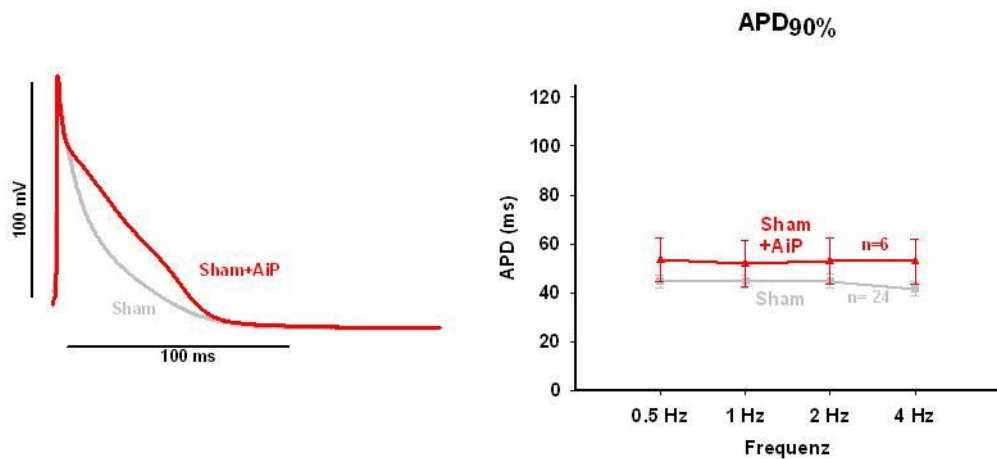


Abb. 3.12 Repräsentative Originalregistrierungen und Auswertung der Mittelwerte 7d post-OP

### 3.2.3 Einfluss der L-Typ-Kalzium-Strom-Inhibition

#### 3.2.3.1 Dauer und Amplitude

Wie in 2.4.3.1 (Seite 30) beschrieben, wurden die Versuche mit Nifedipin als gepaarte Experimente durchgeführt, d.h. am Anfang wurden die Zellen mit normaler Badlösung umspült und nach Erhebung der ersten Messreihe wurde auf die Lösung mit Nifedipin umgeschaltet (orangener Balken über der Zeitleiste). Nach der Inkubationszeit wurde das Messprotokoll fortgesetzt.

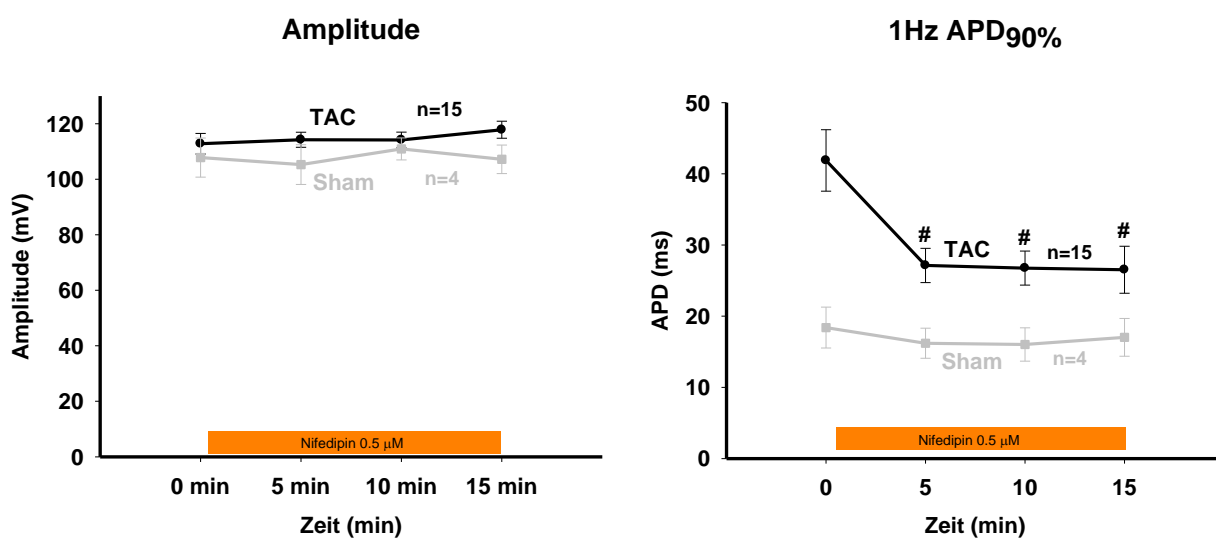


Abb. 3.13 Zeitlicher Verlauf der Versuche mit Nifedipin 7d-post-OP, Zeitpunkt 0 markiert den Zeitpunkt des Beginns der Messungen nach dem Äquilibrium. Der orangene Balken markiert die Zeit der Superfusion mit Nifedipin-haltiger Badlösung, diese wurde nach der ersten Reihe Messungen begonnen und bis zum Ende durchgeführt.

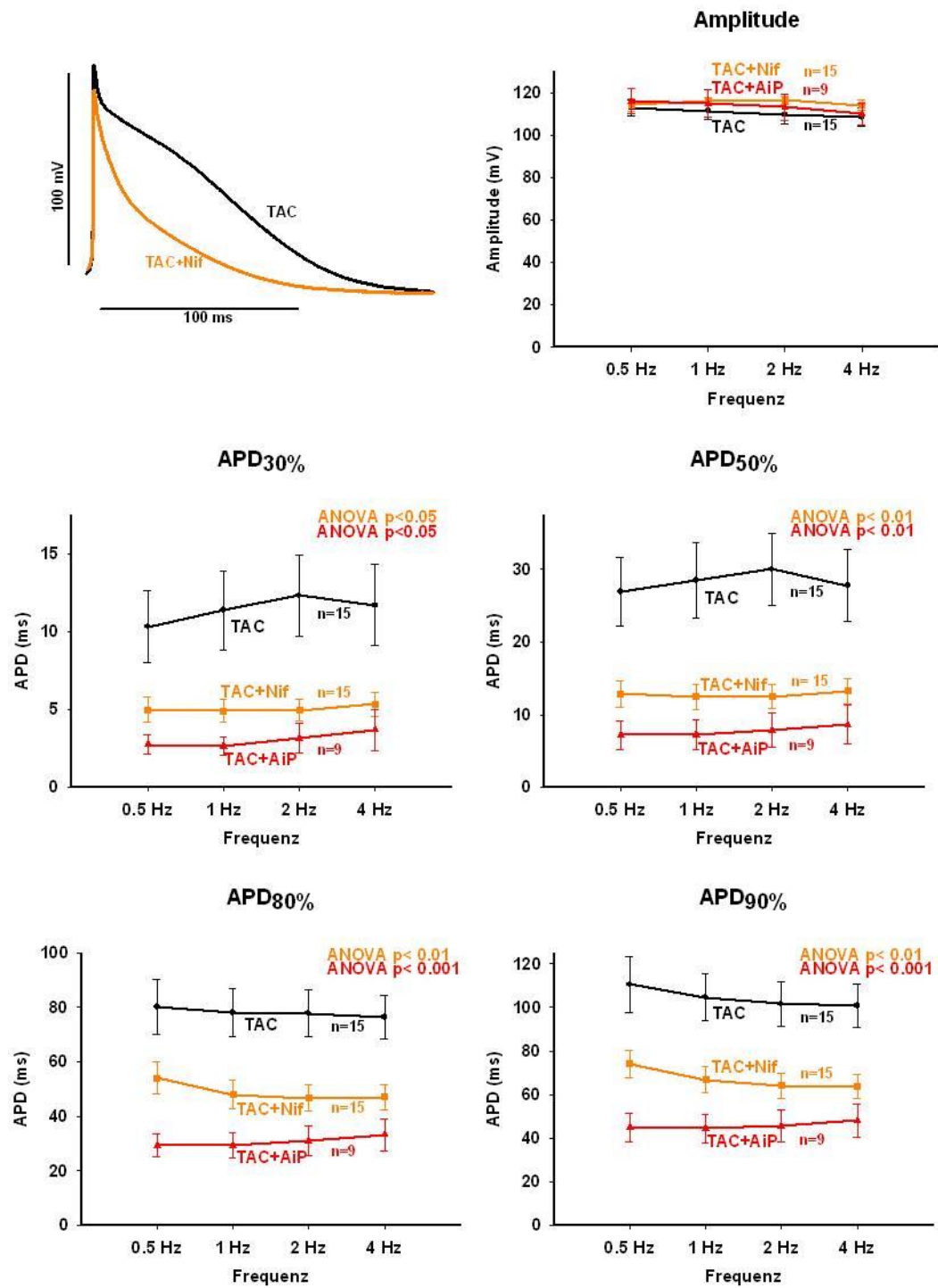
Dabei zeigt sich eine signifikante Verkürzung der APD nach Inkubation mit Nifedipin um 36,2% (beispielhafte Originalabbildung vorher/nachher Abb 3.14) im zeitlichen Verlauf (Mittelwerte für  $APD_{90\%}$  bei 1 Hz:  $104,70 \text{ ms} \pm 10,80 \text{ ms}$  auf  $66,88 \text{ ms} \pm 5,99 \text{ ms}$ ,  $p < 0,05$  vs. Ausgangswert, Abb 3.14).

Die Amplitude zeigt eine leichte Zunahme von  $111,40 \text{ mV} \pm 4,27 \text{ mV}$  auf  $115,81 \text{ mV} \pm 1,84 \text{ mV}$ , die jedoch nicht die statistische Signifikanz erreicht.

Schaut man sich das frequenzabhängige Verhalten an, sieht man in Abb 3.14 anhand der  $APD_{90\%}$  auch in dieser Subgruppe wiederum den FDAR-Effekt, wie zuvor beschrieben mit einer Abnahme der  $APD_{90\%}$  um 8,8% von  $110,50 \text{ ms} \pm 12,85$  auf  $100,82 \pm 10,08 \text{ ms}$  (0,5 Hz vs. 4 Hz,  $p < 0,05$ )

Da im vorhergehenden Punkt gezeigt wurde, dass die CaMKII-Inhibition die APD auf Kontrollniveau reduziert, ist dieser Graph in den folgenden Abbildungen als Kontrolle verwendet worden, um den Anteil der jeweiligen L-Typ-Kalziumkanalinhibition am Gesamteffekt zu eruieren: Man sieht, dass die Inhibition des L-Typ-Kalziumkanals nicht ausreichend ist, um die APD so stark zu reduzieren wie mit der globalen CaMKII-Inhibition.

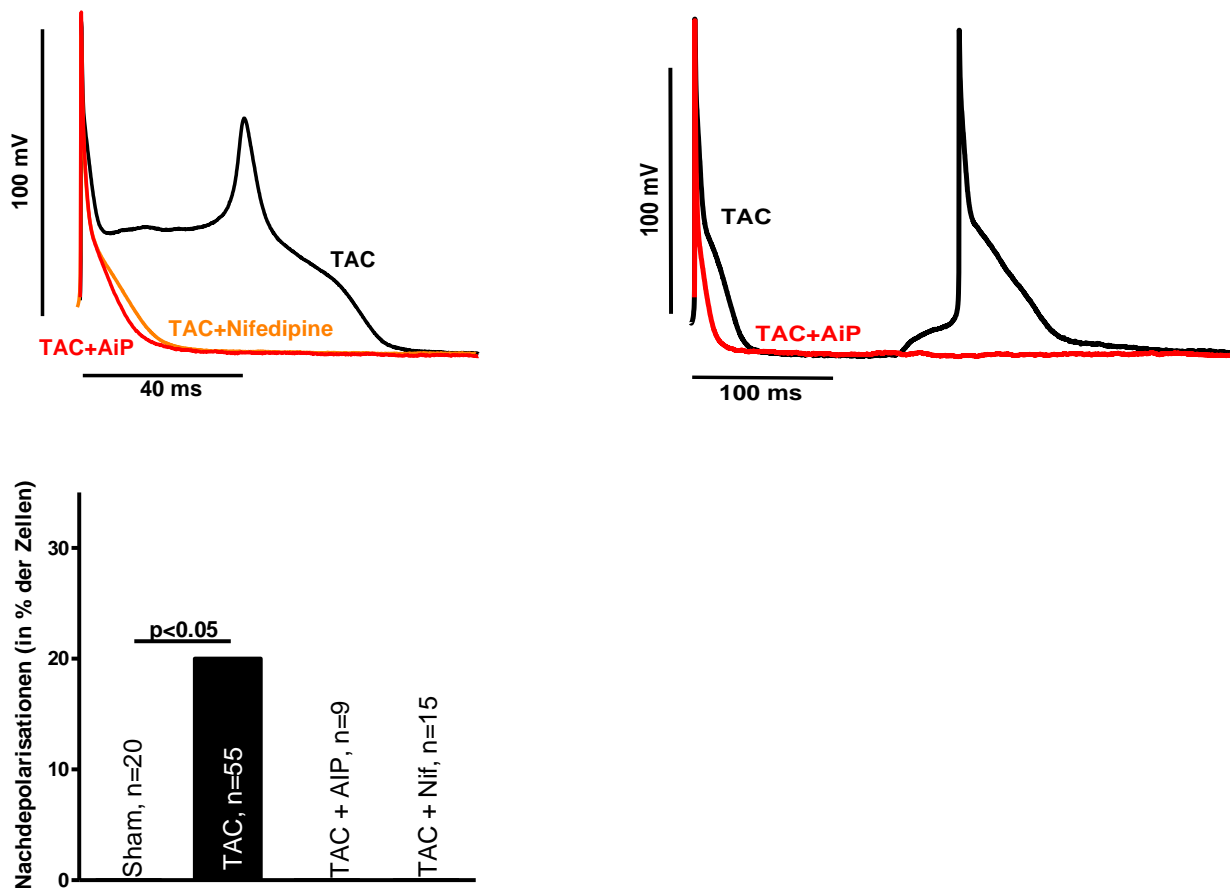
Betrachtet man einen Zeitpunkt im Steady-state nach Inkubation mit Nifedipin, zeigt sich ein ausgeprägterer FDAR-artiger Effekt als in den Ausgangswerten vor Inkubation. Die Abnahme beträgt hier 16,2%, nämlich von  $74,07 \text{ ms} \pm 6,43 \text{ ms}$  auf  $63,72 \text{ ms} \pm 5,45 \text{ ms}$  (0,5 Hz vs. 4Hz,  $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.14** Repräsentative Originalregistrierungen und Auswertung der Mittelwerte 7d post-OP. Als Kontrollniveau ist TAC+AIP angegeben. Es zeigt sich eine Reduktion der APD über alle Frequenzen, jedoch nicht auf Kontrollniveau

### 3.2.3.2 Nachdepolarisationen

Nachdepolarisationen, die in den Ausgangsmessungen in 33,3% der Zellen auftraten, wurden, unabhängig von der Morphologie, nach Inkubation mit Nifedipin vollständig unterdrückt ( $p < 0,05$  Fisher Exact Test,  $n=15$ ) wie beispielhaft anhand einer frühen Nachdepolarisation im vorher/nachher Vergleich in Abb 3.14 gezeigt.



**Abb. 3.14** Repräsentative Originalregistrierungen und statistische Auswertung der Nachdepolarisationen 7d post-OP

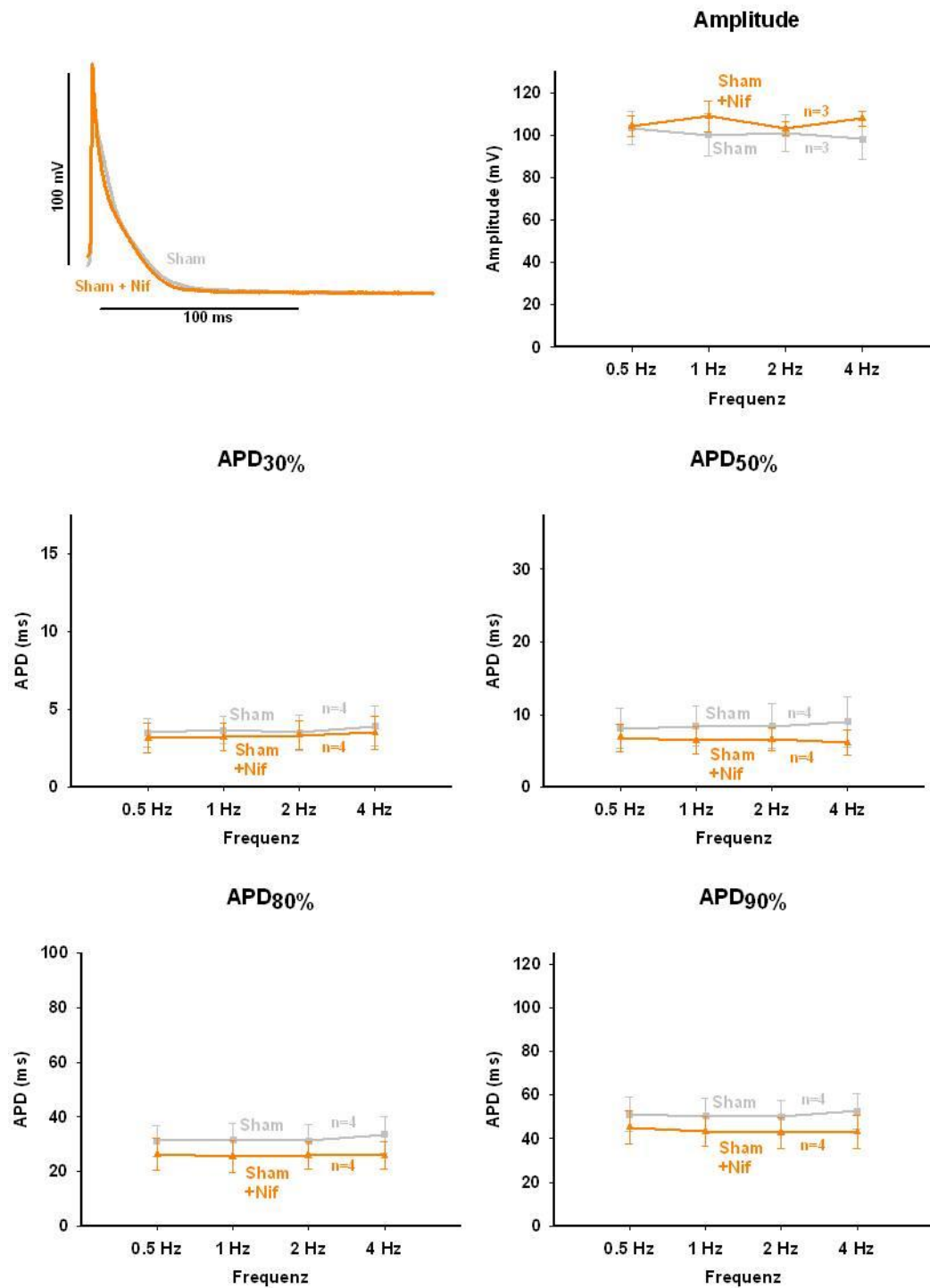
### 3.2.3.3 Kontrolle in Sham-Zellen

Die Inhibition des L-Typ Kalziumstromes wurde auch in den Sham-Zellen analog zu den Versuchen in 3.2.3.1 durchgeführt.

Dabei zeigt sich im vorher (grau)/nachher(orange) Vergleich der Originalregistrierungen kaum ein Unterschied, was unter physiologischen Bedingungen für den geringen Anteil des L-Typ-Kalziumstroms an der elektromechanischen Kopplung unterstreicht.

Im zeitlichen Verlauf (z.B.:  $APD_{90\%, 1 \text{ Hz}}$ ) zeigt sich nach Umschalten der Superfusion auf die Nifedipin-haltige Lösung (orangener Strich über der Zeitachse) eine geringe Abnahme um 11%, von  $46,56 \pm 7,12$  auf  $41,44 \pm 6,44$  ms, die nicht im Bereich der statistischen Signifikanz liegt (Abb 3.16).





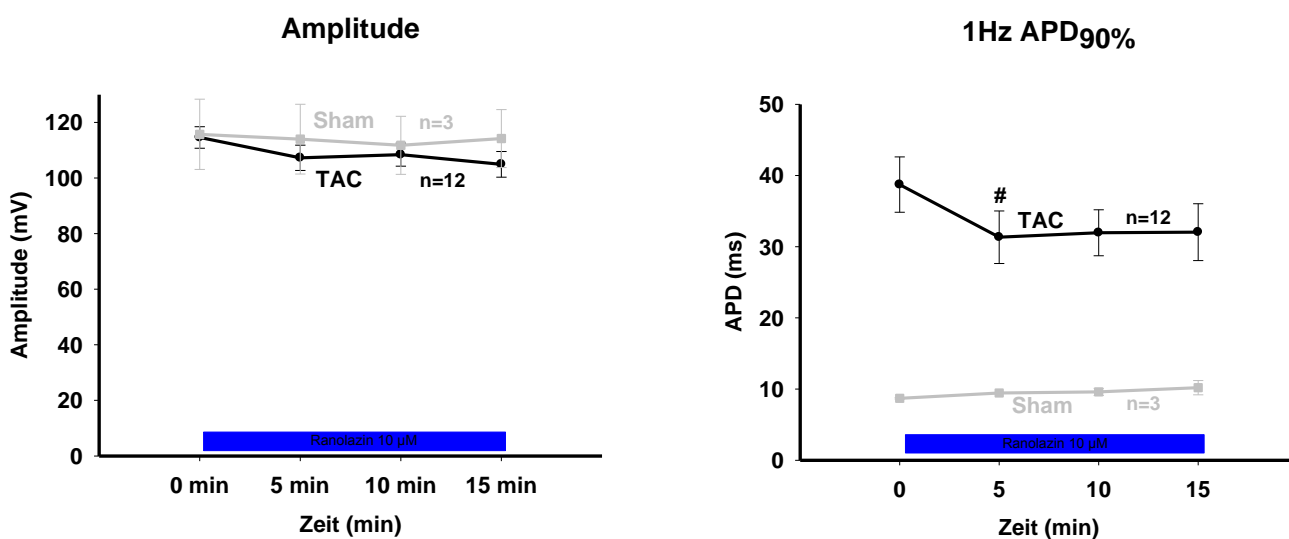
**Abb. 3.16** Repräsentative Originalregistrierungen und Auswertung der Mittelwerte 7d post-OP in Shamtieren mit Nifedipin-haltiger Badlösung. Es zeigt sich eine leichte Reduktion der APD.

Betrachtet man die Mittelwerte der Messungen im frequenzabhängigen Verlauf, sieht man wiederum die geringfügige Abnahme der APD nach der Inkubation mit Nifedipin, jedoch keine frequenzabhängige Änderung. Auch die Amplitude lässt keinen klaren Trend erkennen.

### 3.2.4 Einfluss der late $I_{Na}$ -Inhibition

#### 3.2.4.1 Dauer und Amplitude

Wie im vorhergehenden Punkt gesehen, reicht die Inhibition des L-Typ-Kalzium-Kanals nicht aus, um den Effekt der CaMKII-Inhibition zu erklären. Daher wurde im folgenden Schritt der späte Natriumstrom (late oder persistent  $I_{Na}$ ) inhibiert, der ein neues CaMKII-Ziel darstellt (Wagner et al. 2006). Die Versuche wurden, analog den Versuchen mit Nifedipin, als gepaarte Experimente durchgeführt. Der Wechsel auf die Superfusionslösung mit Ranolazin ist mittels des blauen Kastens über der Zeitachse gekennzeichnet.



**Abb. 3.17** Zeitlicher Verlauf der Versuche mit Ranolazin 7d-post-OP, der blaue Balken indiziert die Einwaschung von Ranolazin-haltiger Badlösung (10  $\mu$ M) nach Erreichen des Äquilibrium und initialer Messung

Es kommt zu einer signifikanten Verkürzung der APD<sub>90%</sub> von  $96,81 \text{ ms} \pm 16,17 \text{ ms}$  auf  $78,33 \text{ ms} \pm 9,94 \text{ ms}$  im zeitlichen Verlauf bei 1 Hz, was eine Reduktion um 19,1% bedeutet ( $p < 0,05$  vs. Ausgangswert). Die Amplitude nimmt geringfügig ab, jedoch erreicht die Reduktion keine

statistische Signifikanz. Eine mögliche Erklärung wäre eine partielle Hemmung des Peak  $I_{Na}$ , also der schnellen Natriumkanäle die für den Aufstrich verantwortlich sind.

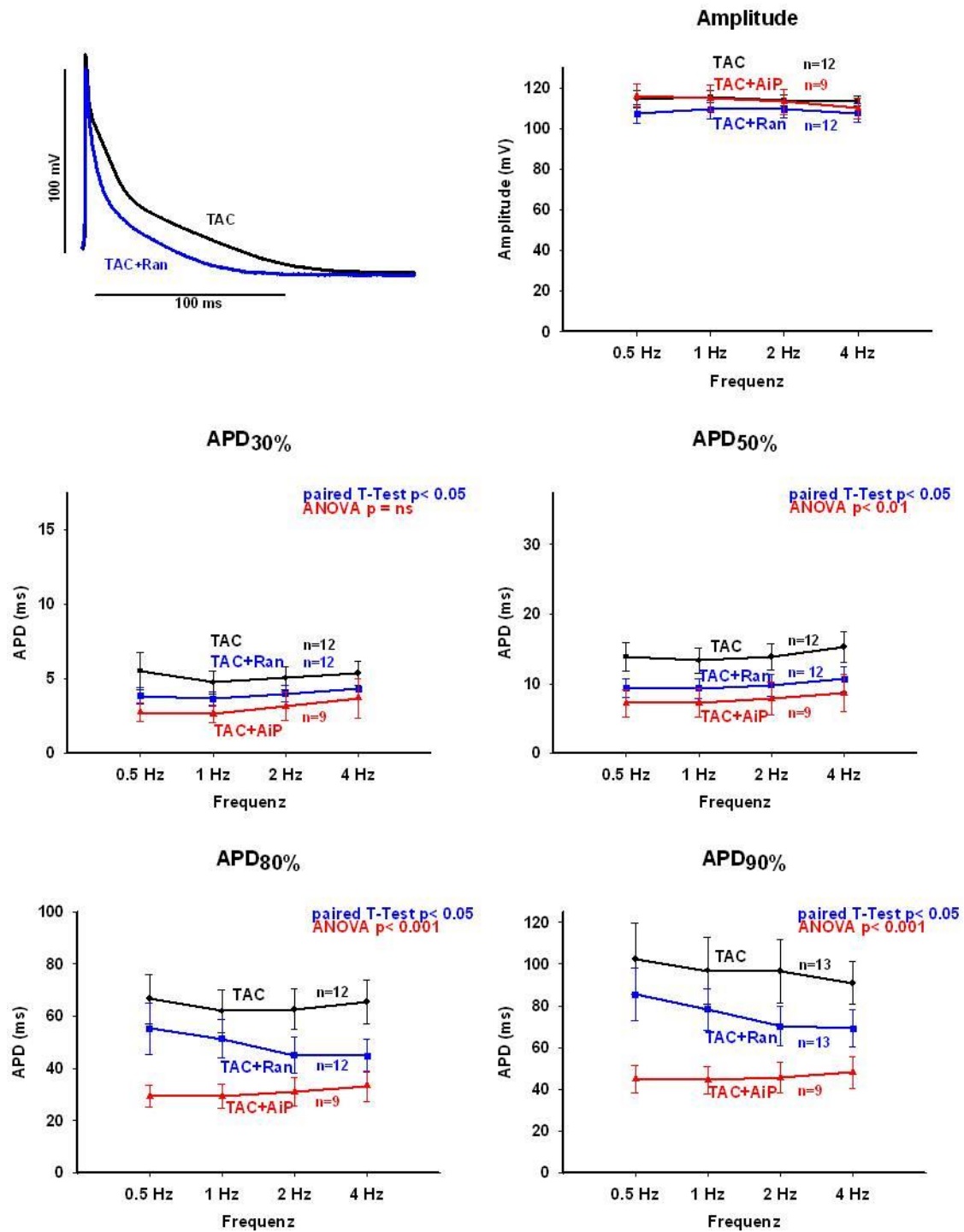


Abb. 3.18 Repräsentative Originalregistrierungen und Auswertung der Mittelwerte 7d post-OP

Betrachtet man in dieser Subgruppe einen Querschnitt im Steady-State und betrachtet den Verlauf über die Frequenzen, sieht man einen deutlich stärkeren frequenzabhängigen Unterschied im Verlauf, als in den vorhergehenden Subgruppen. Während die Ausgangswerte von 0,5 Hz auf 4 Hz um 11,3% abnehmen ( $p=n.s.$ ), nehmen die Werte nach Inkubation mit Ranolazin von  $85,42 \text{ ms} \pm 12,5 \text{ ms}$  auf  $69,21 \text{ ms} \pm 8,84 \text{ ms}$  ab, was einer Reduktion um 18,9% ( $p<0,05$ ) entspricht. Das bedeutet, dass Ranolazin zur allgemeinen Verkürzung des APs frequenzabhängig zusätzlich noch eine Verkürzung um 7,6% bewirkt.

Wie aus dem Graphen ersichtlich wird, reicht die Inhibition des späten Natriumstromes alleine ebenso wenig aus, wie Nifedipin alleine, um die APD auf das Kontrollniveau zu reduzieren, die Reduktion ist auch deutlich geringer als die durch Nifedipin.

#### 3.2.4.2 Kontrolle in Sham-Zellen

In den Originalregistrierungen (Abb 3.19) zeigt sich im vorher (grau)/ nachher (blau) Vergleich kein Unterschied. Dementsprechend zeigt der Graph (z.B.:  $APD_{90\%,1 \text{ Hz}}$ ) auch im zeitlichen Verlauf, nach Umschalten der Superfusion auf die Ranolazin-haltige Lösung (blauer Strich über der Zeitachse), fast keine Änderung. Die APD nimmt leicht um 5% zu, von  $25,00 \pm 3,25$  auf  $26,25 \pm 2,63 \text{ ms}$ . Im frequenzabhängigen Verlauf liegen beide Graphen übereinander, und es ergibt sich somit offensichtlich keine Signifikanz.

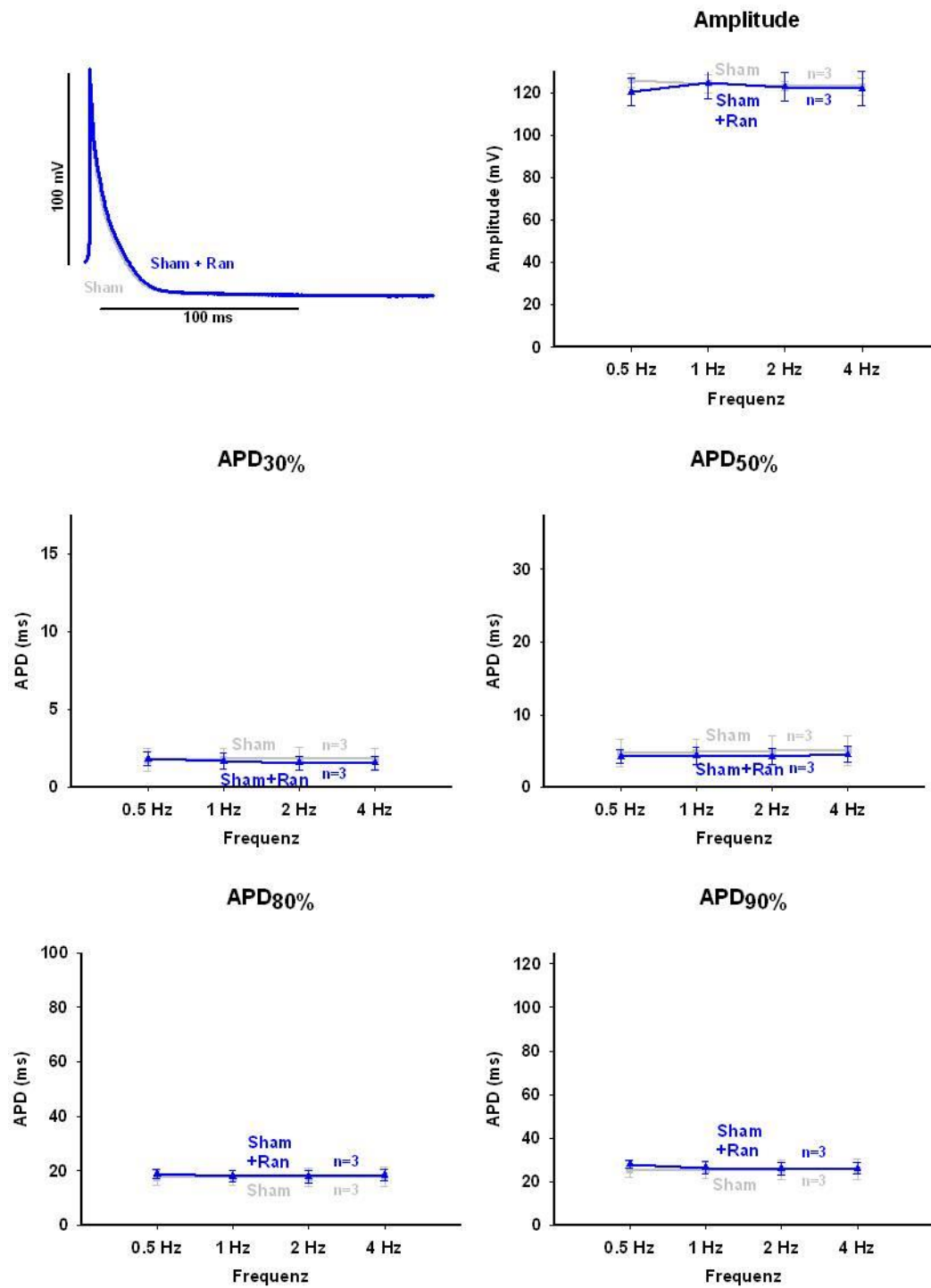


Abb. 3.19 Repräsentative Originalregistrierungen und Auswertung der Mittelwerte 7d post-OP

### **3.2.5 Zeitlicher Einfluss auf die Messungen – Rundown/Vehicle**

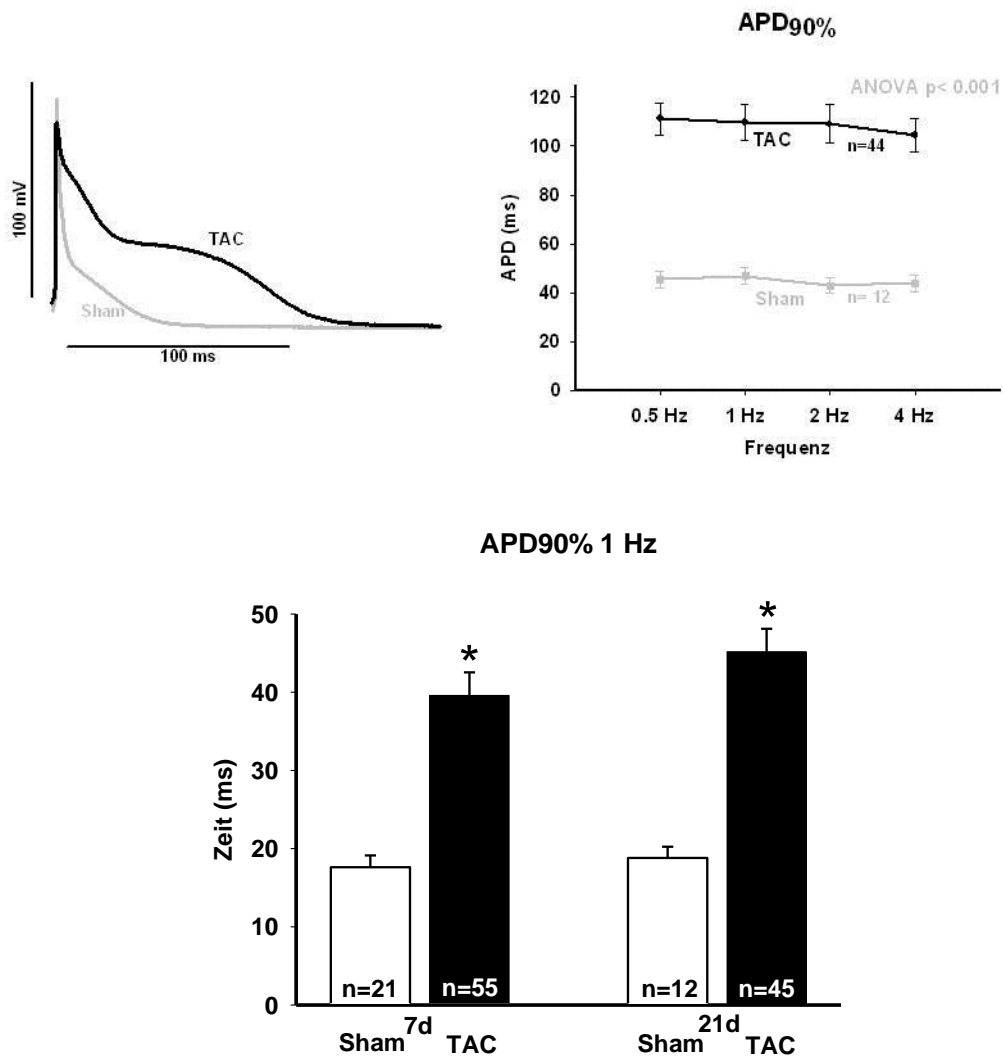
Um eine zeitliche Komponente bei den Veränderungen der APD zu eruieren, wurden die Zellen mit Badlösung perfundiert und das normale Protokoll über die 4 Zeitpunkte gemessen. Dabei zeigt sich eine leichte Verlängerung der APD im Verlauf, jedoch nicht statistisch signifikant. Beachtlich ist, dass die Amplitude im Verlauf von  $108,15 \pm 5,11$  auf  $95,88 \pm 6,56$  mV (1 Hz,  $p < 0,05$  vs. Ausgangswert) abnimmt.

## **3.3 Effekte der Nachlasterhöhung (TAC, 21d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie**

### **3.3.1 Effekte der Nachlasterhöhung (TAC, 21d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie**

#### **3.3.1.1 Dauer und Amplitude**

Für die TAC-Mäuse konnten zum späten Zeitpunkt, 21d post-OP, ähnliche Daten erhoben werden wie zum früheren Zeitpunkt 7d post-OP. Die Originalregistrierungen in Abb 3.20 zeigen ein um mehr als das Doppelte verlängertes AP in den TAC-Mäusen, gegenüber den Sham-Mäusen. Morphologisch interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich quasi eine Plateauphase ausbildet, die in Mäusen physiologisch nicht vorkommt.



**Abb. 3.20** Originalregistrierung und Mittelwerte der APD<sub>90%</sub>, TAC 21d post-OP, sowie im Vergleich dazu die Werte der 7d post-OP Gruppe

Die Mittelwerte zeigen eine stärkere Verlängerung der TAC- APs im Vergleich zu den Daten 7d post-OP, der Unterschied erreicht jedoch nicht die statistische Signifikanz. Die APD<sub>90%</sub> bei 1 Hz ist mit  $112,95 \text{ ms} \pm 7,34 \text{ ms}$  vs  $47,00 \text{ ms} \pm 3,60 \text{ ms}$  in der Kontrolle signifikant (ANOVA  $p < 0,001$ ) verlängert. Die Verlängerung beträgt zu diesem Zeitpunkt 140%, während sich der Wert zum frühen Zeitpunkt, nach 7 Tagen, auf 121% beläuft. Die Sham-Zellen zeigen bezüglich der APD keine Veränderung verglichen zum frühen Zeitpunkt.

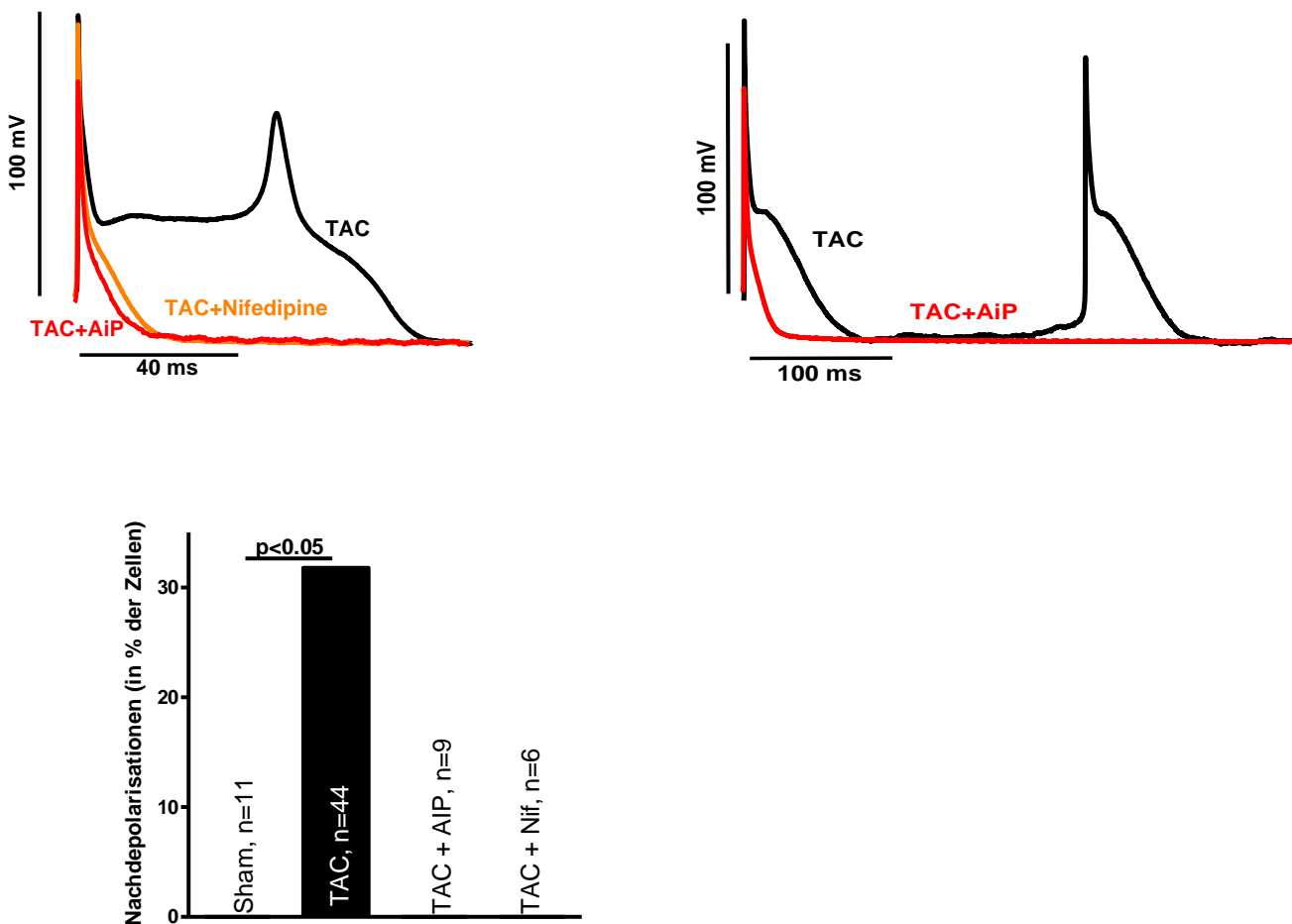
Auch nach 21 Tagen zeigt sich eine Verkürzung der APD bei den höheren Frequenzen, jedoch nicht so stark ausgeprägt wie nach 7 Tagen.

Die  $APD_{90\%}$  nimmt dabei von  $114,15 \pm 6,57$  ms bei 0,5 Hz auf  $100,25 \pm 7,46$  ms bei 4 Hz ab, eine Abnahme um 12,2%. In den Sham-Zellen dagegen ist kein frequenzabhängiger Effekt sichtbar.

Die Amplituden ergeben wiederum keinen signifikanten Unterschied, jedoch lässt sich im Vergleich zum früheren Zeitpunkt eine signifikante Abnahme von  $111,68$  mV  $\pm$   $2,20$  mV auf  $102,63$  mV  $\pm$   $2,45$  mV (7d post-OP vs 21d post-OP,  $p < 0,05$ ) in den TAC-Zellen feststellen.

### 3.3.1.2 Nachdepolarisationen

Wie auch schon zum frühen Zeitpunkt festgestellt, treten frühe und späte Nachdepolarisationen in den TAC-Zellen signifikant häufiger auf. Jedoch nimmt die Inzidenz nochmals zu und beträgt nun 33,33% vs. 0% für Sham ( $p < 0,05$  gegen Kontrolle,  $n=44$  vs.  $n=12$ ).



**Abb. 3.21** Repräsentative Originalregistrierungen und statistische Auswertung der Nachdepolarisationen 21d post-OP, sowie der Inhibition



### 3.3.2 Einfluss der CaMKII-Inhibition

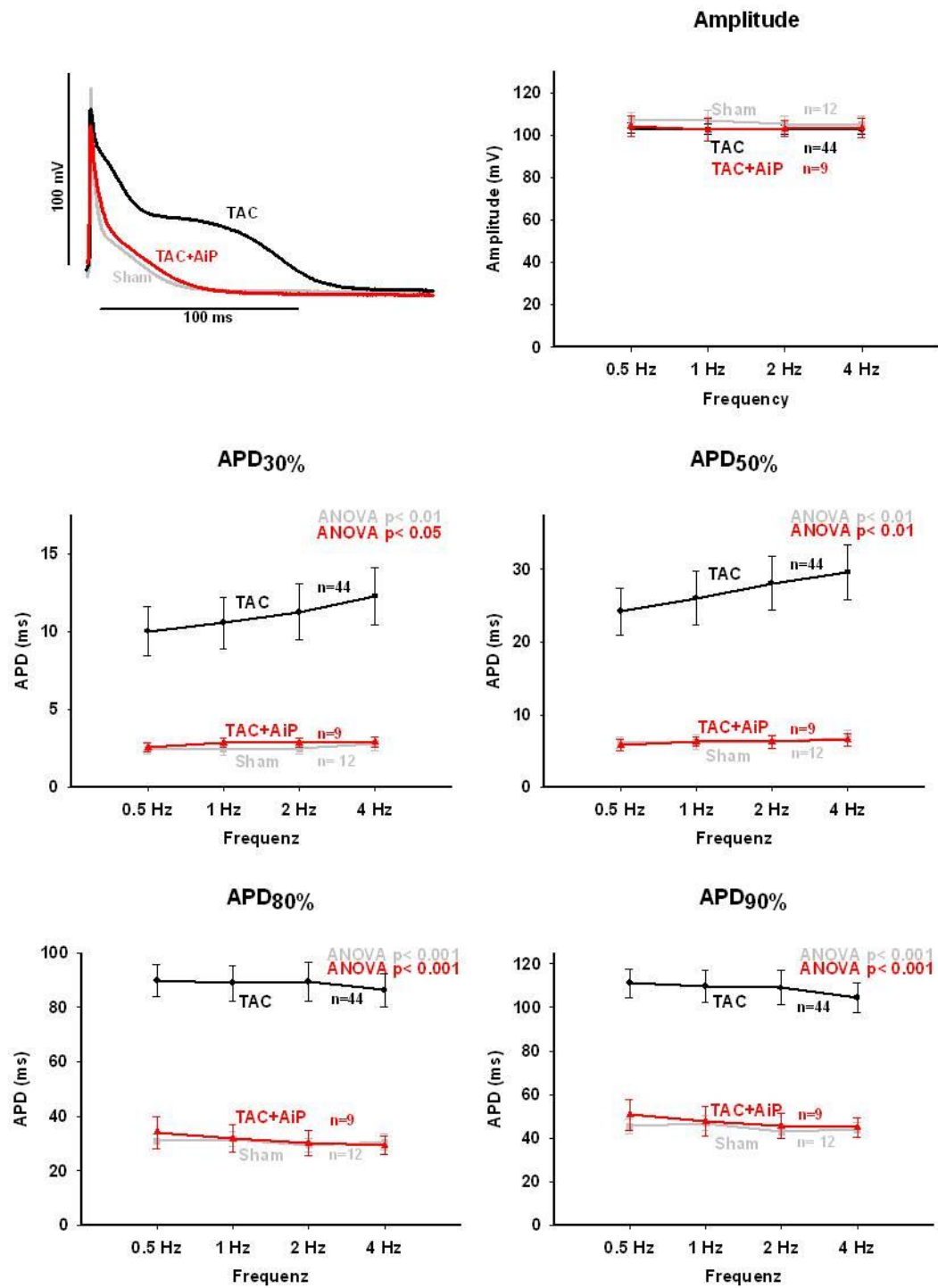
#### 3.3.2.1 Dauer und Amplitude

Wie in der Originalregistrierung ( u.a. Abb 3.11) zu sehen, normalisiert die CaMKII-Inhibition mit AIP die Verlängerung des APs auf Kontrollniveau. Die Reduktion beträgt 58%, von  $112,95 \pm 7,34$  ms in den TAC-Zellen auf  $47,75 \pm 6,58$  ms nach CaMKII-Inhibition (ANOVA  $p < 0,001$ ) und ist damit in ihrer Wirkung vergleichbar mit der zum frühen Zeitpunkt.

Eine signifikante Beschleunigung der Repolarisation ist nach CaMKII-Inhibition nicht mehr nachweisbar.

#### 3.3.2.2 Nachdepolarisationen

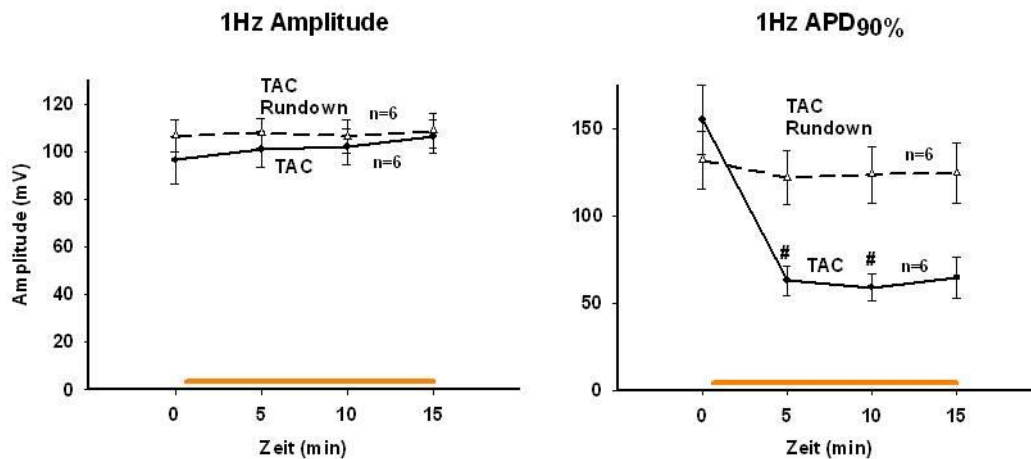
Abb 3.21 zeigt beispielhaft APs mit einer frühen und späten Nachdepolarisation und im Vergleich dazu ein AP nach CaMKII-Inhibition. Wie in den Abbildungen zu sehen ist, treten nach Normalisierung des APs keine Nachdepolarisationen mehr auf.



**Abb. 3.22** Repräsentative Originalregistrierungen und statistische Auswertung der Nachdepolarisationen 21d post-OP

### 3.3.3 Einfluss der L-Typ-Kalzium-Strom-Inhibition

#### 3.3.3.1 Dauer und Amplitude



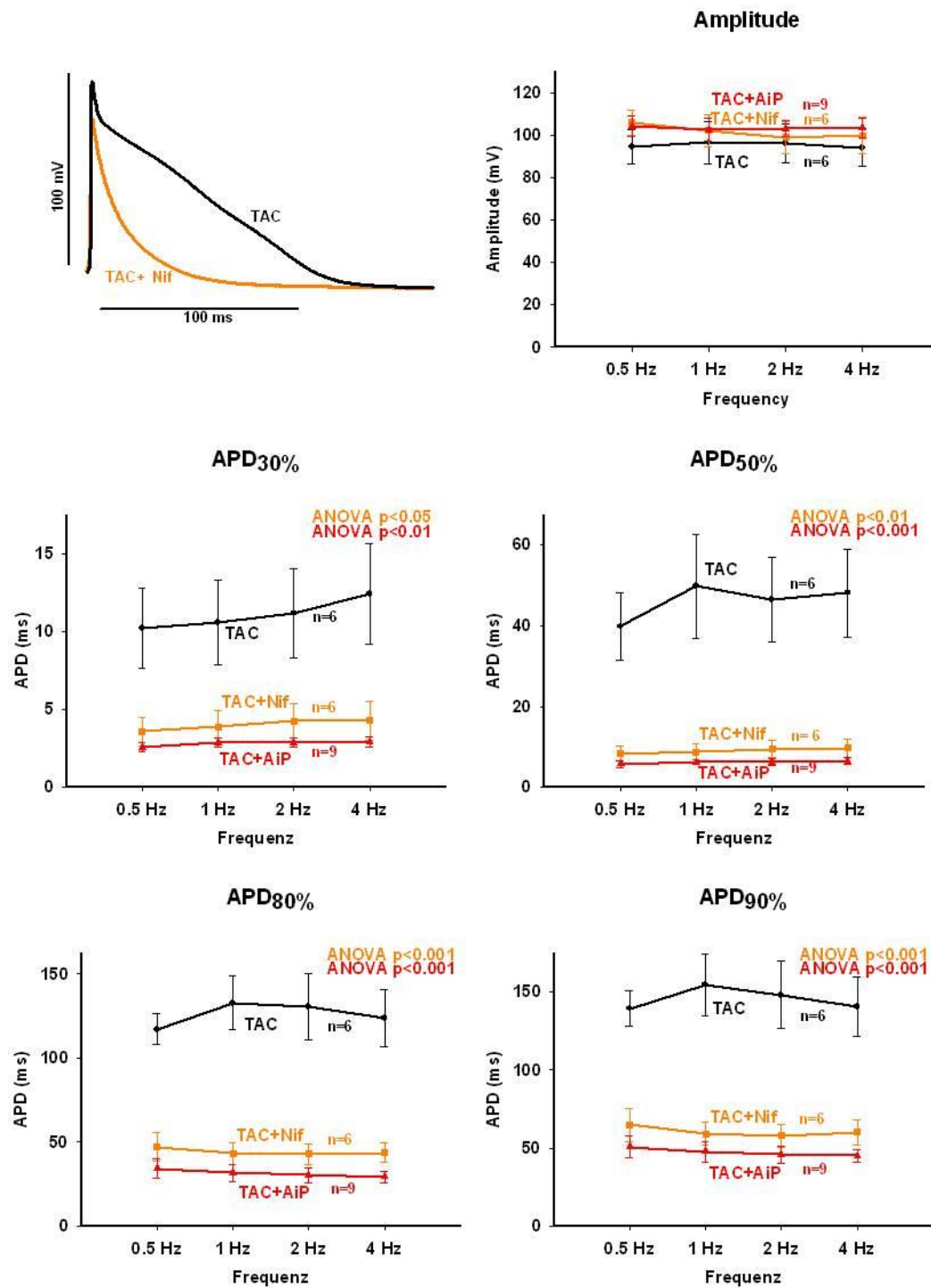
**Abb. 3.23** Zeitlicher Verlauf der Versuche mit Nifedipin 21d-post-OP

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich nach Inkubation mit Nifedipin eine erhebliche Reduktion der APD, wie im Vorher (schwarz)/ Nachher (orange) Vergleich der Originalregistrierungen ersichtlich wird. So nimmt die APD<sub>90%</sub> bei 1 Hz um 62% von  $154,83 \pm 19,77$  auf  $59,21 \pm 7,63$  ms ab ( $p < 0,01$ ). Damit ist die Reduktion nicht so stark wie im Vergleich zu AiP, welches eine Reduktion von 69% (bezogen auf diese Subgruppe) bewirkt.

In der frequenzabhängigen Analyse sieht man ebenfalls den signifikanten (ANOVA  $p < 0,001$ ) Unterschied in den beiden Messreihen vorher und nachher, jedoch lässt sich ein signifikanter FDAR-Effekt in dieser kleinen Subgruppe nicht nachweisen.

Die Amplitude nimmt nach Superfusion mit Nifedipin leicht um 10,5% von  $96,38 \pm 9,78$  auf  $106,47 \pm 7,08$  mV zu, erreicht jedoch nicht die statistische Signifikanz.

(Es bleibt zu dieser Subgruppe anzumerken, dass sie von den Ausgangswerten überdurchschnittlich stark verlängert ist)



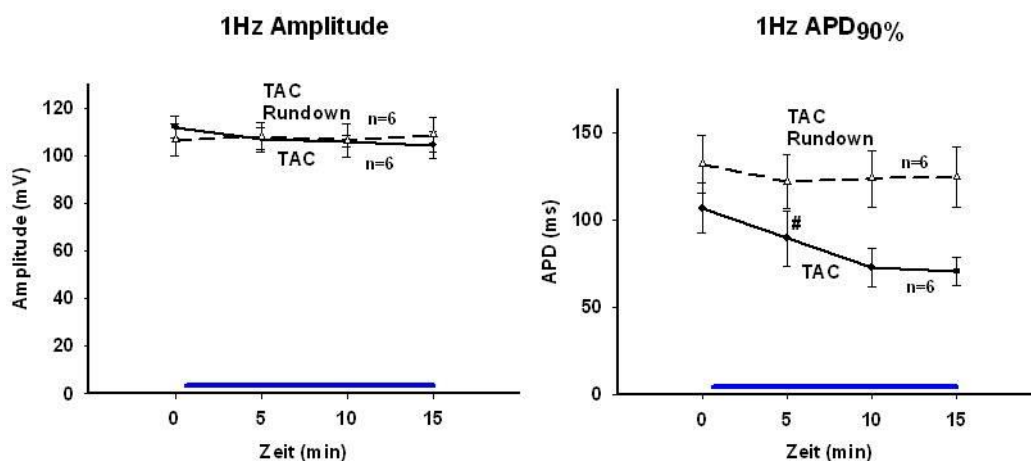
**Abb. 3.24** Repräsentative Originalregistrierungen und Auswertung der Mittelwerte 21d post-OP

### 3.3.3.2 Vergleich mit den Kontrollmessungen – Rundown/Vehicle

Wie in Abb. 3.23 ersichtlich wird treten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der APD oder Amplitude in zeitlichen Verlauf in den Kontrollmessungen auf. Im Gegensatz dazu sieht man, dass der TAC+Nifedipin-Graph bzgl der APD nach der Inkubation mit Nifedipin stark abnimmt, wie oben bereits beschrieben.

### 3.3.4 Einfluss der late $I_{Na}$ -Inhibition

#### 3.3.4.1 Dauer und Amplitude

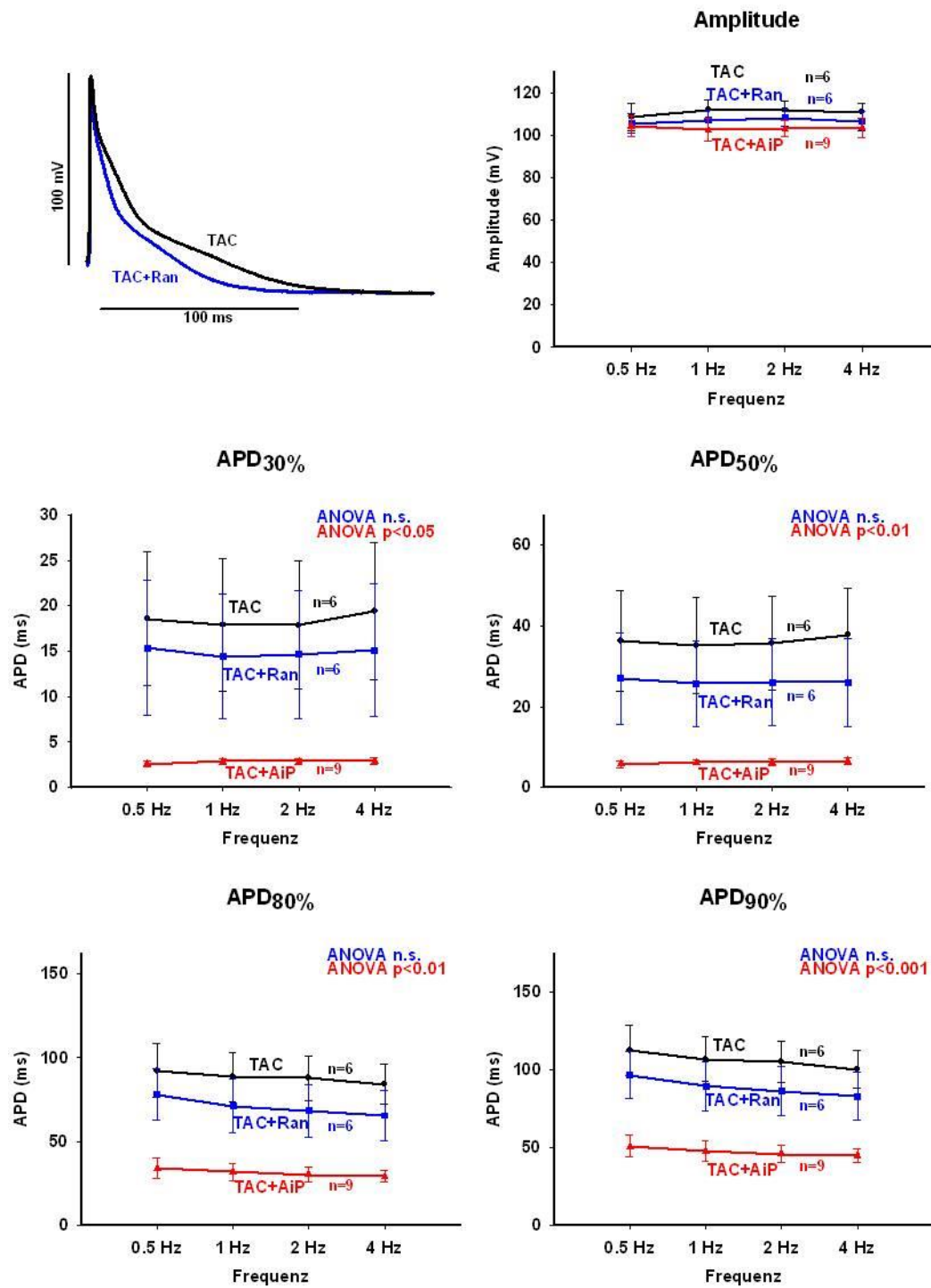


**Abb. 3.25** Zeitlicher Verlauf der Versuche mit Ranolazin 21d-post-OP

Ranolazin verkürzt die APD<sub>90%</sub> bei 1 Hz nach Inkubation um 16,2 % von  $106,79 \pm 14,25$  auf  $89,50 \pm 15,84$  ms. Im Vergleich dazu reduziert AiP die APD, bezogen auf diese Subgruppe, um 55,3 %.

Damit ist die Wirkung des Ranolazins deutlich geringer als die des Nifedipins und steht somit mit den Ergebnissen 7d post-OP im Einklang.

In der frequenzabhängigen Analyse sieht man eine leichte Abnahme der APD, vor Inkubation, von 10,9 % ( $112,46 \pm 16,06$  ms bei 0,5 Hz vs.  $100,25 \pm 11,86$  ms bei 4 Hz) und eine etwas stärkere Abnahme nach Inkubation mit Ranolazin von 14,3% ( $96,58 \pm 15,34$  ms bei 0,5 Hz vs.  $82,75 \pm 15,45$  ms bei 4 Hz).



**Abb. 3.26** Repräsentative Originalregistrierungen und Auswertung der Mittelwerte 21d post-OP

### 3.3.4.2 Vergleich mit den Kontrollmessungen – Rundown/Vehicle

Analog zu der Abbildung mit Nifedipin, zeigt sich auch im Vergleich des Graphen nach Inkubation mit Ranolazin gegenüber der Kontrollmessung, in der kein Pharmakon, eingewaschen wird, dass nur die pharmakologische Intervention eine signifikante Veränderung bzgl. der APD bewirkt.

## 3.4 Effekte der Vorlasterhöhung (Shunt, 7d post-OP) auf die Aktionspotentialmorphologie

### 3.4.1 Dauer und Amplitude

Die Gegenüberstellung der Aktionspotentiale aus Shunt und Sham Zellen zeigt eine geringe aber signifikante Verlängerung in den Interventionstieren.

Betrachtet man die Mittelwerte, sieht man, dass die Shunt Zellen über alle Frequenzen und Zeiten signifikant verlängerte APs zeigen, z.B. 1 Hz  $APD_{90\%}$  Shunt  $59,55 \pm 5,76$  vs. Sham  $31,20 \pm 1,47$  ms, eine Verlängerung um 90,1% (ANOVA  $p < 0,001$ ;  $n=22$  und  $23$ ).

Ein frequenzabhängiger Effekt ist weder in Shunt noch in Sham-Zellen nachweisbar, da frequenzabhängig keine Unterschiede entstehen, z.B. für Shunt-Zellen:  $APD_{90\%}$  bei 0,5 Hz  $63,07 \text{ ms} \pm 6,49 \text{ ms}$  vs. 4 Hz  $62,94 \text{ ms} \pm 6,14 \text{ ms}$  oder Sham:  $APD_{90\%}$  bei 0,5 Hz  $32,40 \text{ ms} \pm 1,53 \text{ ms}$  vs. 4 Hz  $30,3 \text{ ms} \pm 2,5 \text{ ms}$ .

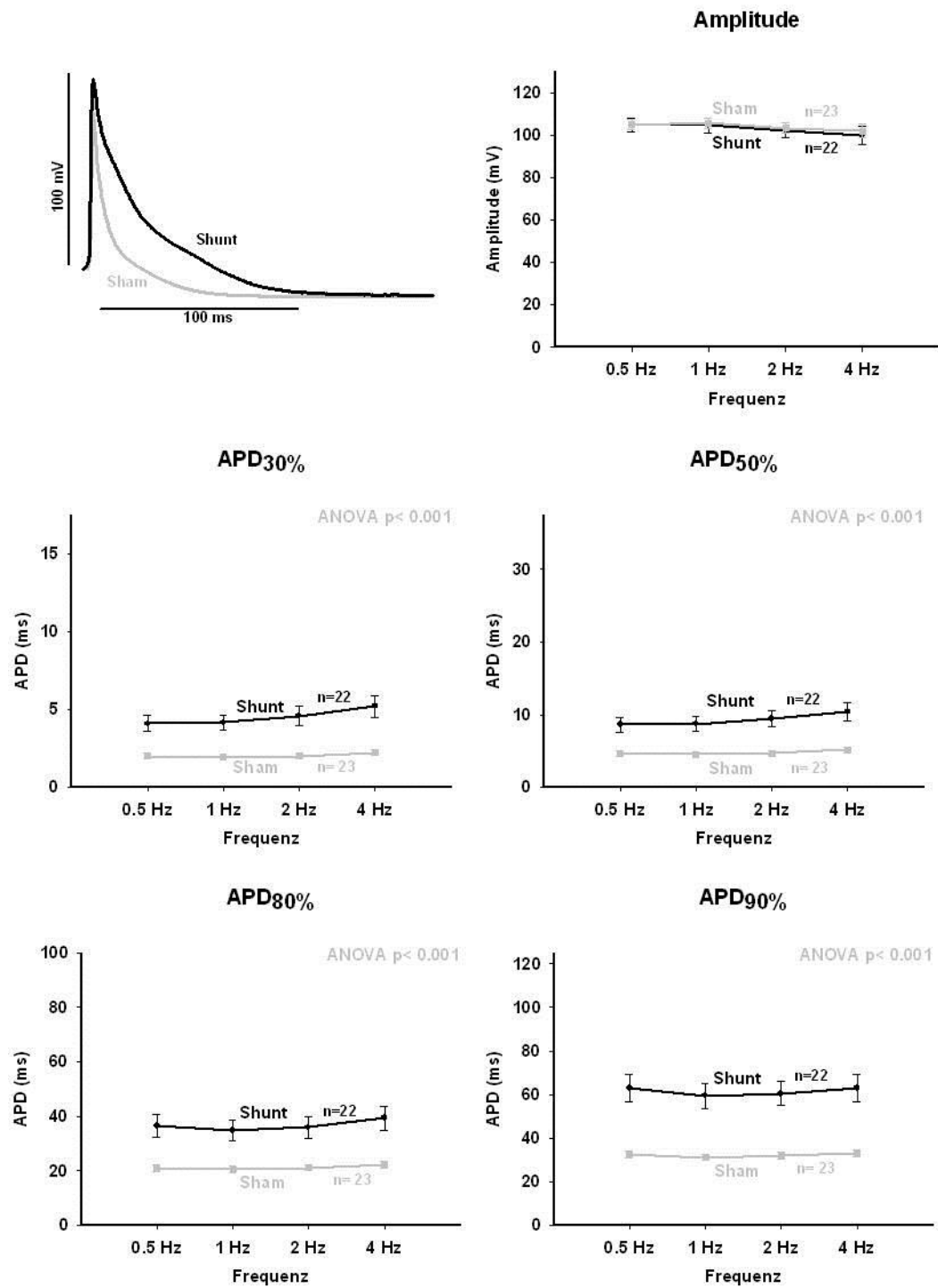
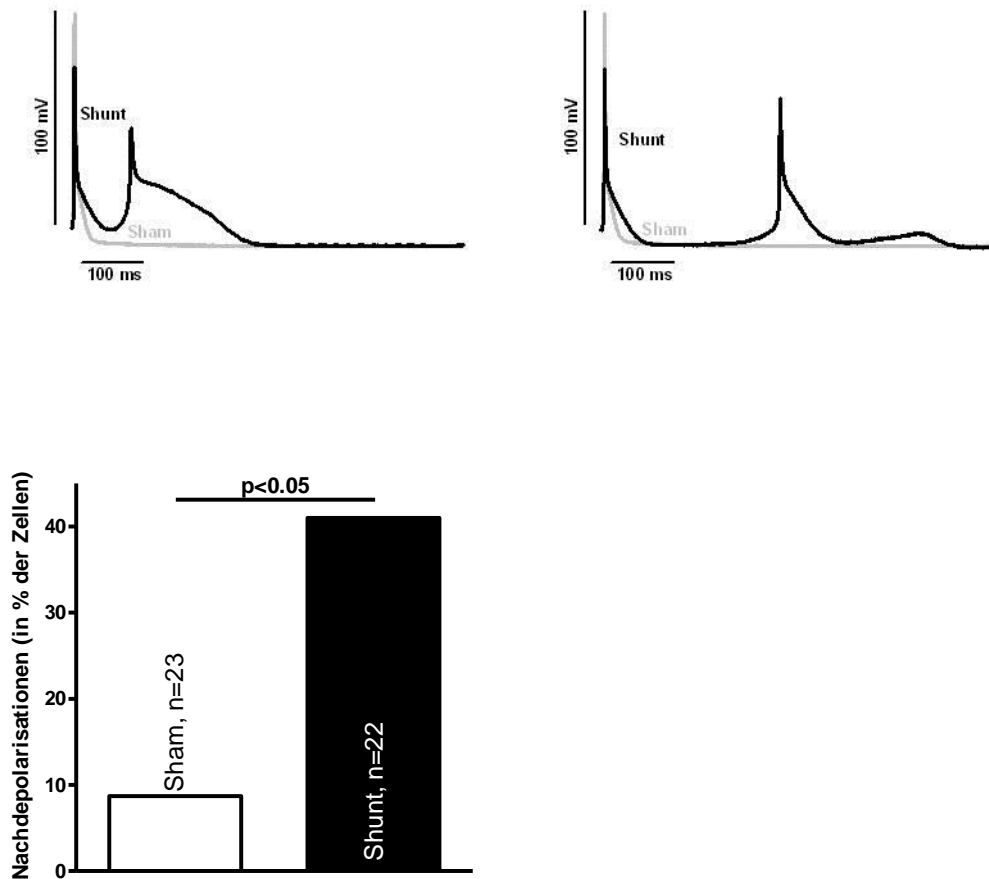


Abb. 3.27 Repräsentative Originalregistrierungen und Auswertung der Mittelwerte 7d post-OP



### 3.4.2 Nachdepolarisationen

Frühe und späte Nachdepolarisationen treten summiert in den Shunt-Zellen signifikant häufiger auf als Sham-Zellen (40,9% vs. 8,7%,  $p < 0,05$ ;  $n = 22$  und  $23$ ). Beispielhafte Originalregistrierungen sind in den Abb 3.28 gezeigt.



**Abb. 3.28** Repräsentative Originalregistrierungen und statistische Auswertung der Nachdepolarisationen 21d post-OP

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals die Zusammenhänge der kardialen Hypertrophie, ausgelöst durch mechanische Last, in Bezug auf die CaMKII-Aktivität und die direkten Auswirkungen auf die Aktionspotentialmorphologie. Dabei zeigt sich eine unterschiedliche Art und Schwere der Hypertrophie, der jeweiligen CaMKII-Aktivität und der resultierenden Auswirkungen auf die AP-Morphologie in den beiden untersuchten Modellen. Es konnte gezeigt werden, dass die elektrophysiologischen Auswirkungen in der TAC-Gruppe, der nachlastinduzierten Hypertrophie, auf einer Erhöhung der CaMKII-Aktivität und Expression beruhen und entsprechend unter spezifischer CaMKII-Inhibition mittels AIP, vollständig auf Kontrollniveau zurückgeführt werden konnten.

Ähnliche Ergebnisse, wie die verlängerte APD oder der erhöhte Kalziumeinstrom konnten bereits an CaMKII $\delta_c$  transgenen Mäusen gezeigt werden (Maier et al. 2003), jedoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der Hypertrophie und CaMKII-Aktivierung auf die AP-Morphologie in einem Modell, welches dem pathophysiologischen Zustand, z.B. bei arteriellem Hypertonus und LV-Hypertrophie, deutlich näher ist als das transgene Modell, welches als Überexpressionsmodell sekundär die Herzinsuffizienz nachstellt.

### 4.1 Die differenzierte Regulierung der Hypertrophie bei verschiedenen Formen der mechanischen Last – erhöhte Vorlast vs. Nachlast

Die verschiedenen Modelle mechanischer Last führen zu jeweils differenzierten Formen der kardialen Hypertrophie. Die Zunahme im Herz- zu Körpergewichtverhältnis ist in beiden Modellen ähnlich stark ausgeprägt. Betrachtet man jedoch die einzelnen Werte, sieht man dass die Herzgewichte im Shunt-Modell 7d post-OP (Anstieg von 24.5% Shunt vs Sham) stärker gestiegen sind als im TAC-Modell (Anstieg von 21.5% TAC vs Sham), was zu einem gewissen Anteil durch das erhöhte Körpergewicht verschleiert wird.

Während im Shunt-Modell die erhöhte Vorlast durch die vermehrte Volumenbelastung zu einer exzentrischen Hypertrophie führt, entsteht im TAC-Modell durch die erhöhte Nachlast zunächst eine konzentrische Hypertrophie, wie in Vorarbeiten unserer Gruppe anhand von Echokardiographiebefunden bereits gezeigt werden konnte (Schmidt et al. 2008, Gupta et al. 2008). Betrachtet man die Ventrikel getrennt voneinander, erkennt man eine weitere spezifische Differenzierung: Während im TAC-Modell die Druckbelastung zu einer isolierten

Hypertrophie im linken Ventrikel führt, wie in Abb 1.7 zu sehen, führt die Volumenbelastung im Shunt-Modell zu einer Hypertrophie und gleichzeitigen Dilatation beider Herzkammern.

Dabei ist im Shunt-Modell die Ventrikeldilatation von Anfang an sichtbar, während sie im TAC-Modell erst deutlich später einsetzt. Jedoch ist auch in diesem Modell eine kontinuierliche Zunahme des Ventrikeldurchmessers nachweisbar (Gupta et al. 2008), was im Sinne einer zunehmenden Dekompensation der Hypertrophie, in Richtung einer manifesten Herzinsuffizienz interpretiert werden kann (Hill und Olson 2008).

In begleitenden proteinbiochemischen Untersuchungen konnte eine unterschiedliche Aktivierung der verschiedenen, an der Hypertrophie beteiligten, Marker gezeigt werden. So sind im TAC-Modell die Proteinkinase D (PKD), die Histondeacetylasen 5 (HDAC5) und die CaMKII sowohl vermehrt exprimiert als auch verstärkt aktiviert, wie am Phosphorylierungsstatus erkenntlich ist. Bei detaillierter Betrachtung der CaMKII-Expressionsmuster zeigt sich, dass die CaMKII lediglich im hypertrophierten linken Ventrikel überexprimiert und –aktiviert ist, während sich die entsprechenden Level im rechten Ventrikel auf Kontrollniveau bewegen (Gupta et al. 2008).

Als weiteres Indiz für die CaMKII-Abhängigkeit der Hypertrophie können die Ergebnisse der Veröffentlichung von Backs et al. (2009) herangezogen werden, die zeigen dass in einem Modell des CaMKII-Knock-Outs keine signifikanten Veränderungen nach TAC-OP auftreten. Diese Hypertrophiewege sind im Shunt-Modell nicht aktiviert, so dass hier ein bisher nicht untersuchter Mechanismus für die Hypertrophie angenommen werden muss (Schmidt et al. 2008).

## **4.2 CaMKII-Aktivität und Elektrophysiologische Veränderungen**

Wie von Ahmed et al. (2000) gezeigt, führt die nachlastinduzierte Hypertrophie zu einem elektrischen Remodeling in der Hinsicht, dass die APD zunimmt. Als einer der Hauptaspekte wurde dabei unterstellt, dass Veränderungen im Kalziumhaushalt der Zelle den Veränderungen zugrundeliegen sollen. In einer 2008 veröffentlichten Arbeit wurde diese These dann bestätigt, indem Wang et al. 2008 zeigten, dass in den TAC-operierten Tieren der Kalziumeinstrom signifikant zunimmt. Es blieb jedoch unbeantwortet, was der auslösende Mechanismus dieser Veränderungen ist und ob diese LTCC Verstärkung einen Einfluss auf APD hat.

Weitere Arbeiten (Zhang et al. 2003) zeigten einen Anstieg der CaMKII-Aktivität im Verlauf nach TAC-OP, ohne jedoch die funktionellen Auswirkungen weiter zu untersuchen.

Vorarbeiten aus unserer Gruppe zeigen erhöhte Kalziumtransienten in den TAC-operierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren, jedoch keine Veränderung in den Shunt-operierten Tieren. Der SR-Kalziumgehalt ist dabei unverändert, jedoch kommt es in den TAC-Tieren

durch die erhöhte CaMKII-Aktivität zu einer Zunahme des Fractional-Release (Schmidt et al. 2008)

Betrachtet man diese Parameter hingegen in den TG-Mäusen mit terminaler Herzinsuffizienz als langfristiges oder chronisches Modell, sieht man eine Kalziumdepletion des SR, unter anderem verursacht durch das diastolische Kalziumleck, wie von Maier (2005) und Kohlhaas et al. (2006) beschrieben. Aber auch hier kommt es durch die erhöhte CaMKII-Aktivität zu einem gesteigerten Fractional-Release, trotz verminderter Speicherung.

Einen Beitrag zu einem erhöhten Fractional-Release kann z.B. auch ein erhöhter Kalziumeinstrom über den L-Typ-Kalziumkanal im Rahmen eines verlängerten APs leisten. Weitere Mechanismen können auch eine erhöhte Aktivität der SERCA sein, durch die es zu einer erhöhten Beladung des SR kommt. Um dies zu eruieren, wurden, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die Aktionspotentiale gemessen.

Wie in Abb 3.6 gezeigt, ist die APD, über alle gemessenen Zeiten und Frequenzen, in den TAC-Zellen im Vergleich zur Kontrolle um mehr als das doppelte erhöht. Aufgrund der Vorarbeiten und der begleitend durchgeführten proteinbiochemischen Untersuchung, die eine deutliche Erhöhung der CaMKII-Aktivität zeigen, lautete die Arbeitshypothese daher, dass die gemessenen Unterschiede in den beiden Gruppen auf die unterschiedliche Aktivität der CaMKII zurückzuführen sein müssen.

Die eindrucksvolle Bestätigung der CaMKII-Abhängigkeit der APD-Verlängerung ergibt sich aus den Versuchen mit CaMKII-Inhibition. Wie die Versuche mit AIP zeigen, lässt sich unter Inhibition der CaMKII, mittels Dialyse der Zellen mit AIP, die APD auf Kontrollniveau zurückführen. Dabei interferiert AIP als spezifischer Peptidinhibitor nicht mit anderen Zielproteinen, wie es z.B. bei organischen Inhibitoren wie KN-93 der Fall ist (u.a. auch durch die 500 fach höhere Potenz als KN-93 (Ishida et al. 1995), die prinzipiell auch Einfluss auf die L-Typ-Ströme nehmen können (Anderson et al. 1998; Li GR und Nattel 1997).

Untersucht man die Experimente auf Unterschiede im zeitlichen Verlauf nach der OP, ergeben sich dabei nur geringe Veränderungen: Die APD nimmt im Verlauf von 7d auf 21d in den TAC-Zellen geringfügig zu, jedoch nicht signifikant. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang jedoch die signifikant verminderte Amplitude. Eine mögliche Erklärung wäre eine Depletion des SR-Kalzium Gehaltes durch das erhöhte SR-Kalzium Leck (Dybkova et al. 2011). Es zeigt sich jedoch auch unter Perfusion mit Ranolazin eine verminderte Amplitude, hier kann eine Inhibition des schnellen Natriumeinstroms als verantwortlich für den Aufstrich des Aktionspotentials vermutet werden. Die Wirkung der CaMKII-Inhibition zeigt sich auch zum späten Zeitpunkt nach 21d, genauso wie zum frühen, die APD wird über alle gemessenen Zeiten und Frequenzen auf Kontrollniveau zurückgeführt.

Paradox muten in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der CaMKII-Inhibitionsversuche in den Sham-Zellen an, in denen es zu einer Verlängerung der APD kommt, wie in Abb. 3.11

gezeigt. Möglicherweise spielen dabei Veränderungen bei der Kalziumelimination (über Phospholamban oder SERCA2) oder Veränderungen von repolarisierenden Strömen eine Rolle, jedoch bleibt diese Frage vorerst unbeantwortet.

### **4.3 Elektrophysiologische Veränderungen durch CaMKII-Zielproteine - Aktionspotentialdauer**

Fließt im Rahmen dieses verlängerten APs nun mehr Kalzium in die Zelle ein (Li SY et al. 2005), kann es durch das calcium-induced-calcium-release (CICR) zu einem verstärkten Austritt von Kalzium aus dem SR kommen und so zu einem gesteigerten intrazellulären Kalziumtransienten führen (Bers et al. 2003). Wie von Kohlhaas et al. 2006 gezeigt wurde, führt in akut CaMKII überexprimierenden Kaninchenmyozyten der erhöhte Einstrom über die L-Typ-Kanäle zu einem Ausgleich des Verlustes aus dem SR, so dass in der Summe ein „normaler“ intrazellulärer Kalziumtransient entsteht.

Um die Beteiligung der L-Typ-Ströme als bekanntes CaMKII-Zielprotein nachzuweisen (Bers 2008; Grueter et al. 2006; Maier 2005; Wu et al. 2002), wurden diese im nächsten Schritt mit Nifedipin, einem Kalziumkanalantagonisten vom Dihydropyridin-Typ, inhibiert. Wie in 3.2.3 und 3.3.3 beschrieben, wurden die Versuche mit Nifedipin als gepaarte Experimente durchgeführt, indem zunächst ein Satz Daten ohne das zu untersuchende Pharmakon erhoben wurde, und erst danach auf die Nifedipin-haltige-Perfusionslösung umgeschaltet wurde, um dadurch einen Vorher-Nachher-Vergleich ziehen zu können. Führt man sich nochmals die Verteilung der Herkunft des Kalziums vor Augen, nämlich, dass nur wenige Prozent des für die Kontraktion benötigten Kalziums bei der Maus aus dem Extrazellulärraum stammt (Bers 2002; Bers 2008; Maier et al. 2000), sieht man in den Sham-Zellen eine geringe, plausible Reduktion der APD um ca. 12% ( $APD_{90\%}$ , 1Hz), die jedoch nicht signifikant ausfällt. Dieser Anteil des Kalziumstromes ist somit auch unter Kontrollbedingungen vorhanden und für die Kontraktion der Zelle essentiell, kann aber dennoch durch Nifedipin inhibiert werden. Es ist auch nicht anzunehmen, dass dieser Anteil bereits CaMKII-abhängig ist, da im vorhergehenden Punkt gezeigt werden konnte, dass die CaMKII-Inhibition in den Sham-Zellen zu einer Verlängerung der APD und nicht, wie hier gesehen, zu einer Verkürzung führt.

Stellt man die Werte der TAC-Zellen dagegen, sieht man eine erhebliche und jetzt signifikante Reduktion der APD um ca. 35% ( $APD_{90\%}$ , 1Hz,  $p < 0,01$  vs. Ausgangswert, Abb. 3.14). Damit ist klar, dass der Kalziumstrom in diesen Zellen bedeutend größer sein muss und dass ferner auch auf eine CaMKII-abhängige Regulierung geschlossen werden kann, da

in den TAC-Zellen die CaMKII-Inhibition sogar zu einer noch stärkeren Reduktion der APD führt. Wang et al. zeigten in ihrer 2008 veröffentlichten Arbeit auch, dass die nachlast-induzierte Hypertrophie über die Erhöhung der CaMKII-Aktivität zu einem verstärkten Kalziumeinfluss über die L-Typ-Kalziumkanäle führt, der durch die Inhibition durch AIP auf Kontrollniveau zurückführbar ist. Jedoch fehlt trotzdem noch etwas bis zum Kontrollniveau. Es zeigt sich, dass die Inhibition des L-Typ-Kalziumstromes nicht ausreicht, um die vollständige Auswirkung der CaMKII-Inhibition auf die APD zu erklären, weshalb die CaMKII auch andere Ströme beeinflussen muss.

Wagner et al. zeigten 2006, dass auch der Natriumstrom durch die CaMKII reguliert wird. So beträgt die Amplitude des späten Anteils des Natriumstromes (late  $I_{Na}$ ) unter Kontrollbedingungen unter 1% des Peak-Stromes, der zur Depolarisation in Phase I des Aktionspotentials führt, aber durch die lange Öffnungszeit, während des gesamten Aktionspotentials, von mehreren hundert Millisekunden kommt es zu einem beträchtlichen Influx von Natriumionen in die Zelle. Unter pathologischen Bedingungen wie z.B. Herzinsuffizienz oder Ischämie kann dieser Anteil auf bis zu 5% der Gesamtamplitude ansteigen (Hasenfuss und Maier 2008), und zu einer erheblichen Natriumüberladung der Zellen führen, die wiederum eine kontraktile Dysfunktion nach sich zieht. Dabei kann es durch die Natriumüberladung der Zelle sogar zu einem Nettoausstrom über den NCX kommen, wodurch die Kalziumelimination weiter behindert wird, da im Reverse-Mode des NCX zusätzlich noch Kalzium in die Zelle einströmt.

Der späte Natriumstrom wurde in der vorliegenden Arbeit mit Ranolazin, einem Piperazinderivat, selektiv inhibiert: Der späte Anteil des Natriumstromes wird dabei mit einer ca. 40fach höheren Selektivität inhibiert als der peak  $I_{Na}$  ( $IC_{50}$  6  $\mu$ mol vs. 250  $\mu$ mol, (Hasenfuss und Maier 2008).

Die Versuche mit Ranolazin wurden, ebenso wie die mit Nifedipin, als gepaarte Experimente durchgeführt um auch hier im Vorher-Nachher-Vergleich die Effekte an derselben Zelle beurteilen zu können. Auch wurden wieder Kontrollmessungen in Sham-Zellen durchgeführt, um die Wirkungen vergleichen zu können. Die Ergebnisse der Versuche mit den Sham-Zellen erscheinen zunächst paradox, da die APD sich nicht verkürzt, sondern sich im Gegenteil, wenn auch nur geringfügig um 5% verlängert. Zieht man jedoch die Tatsache in Betracht, dass Ranolazin auch inhibierend auf repolarisierende auswärtsgerichtete Kaliumströme ( $I_{Kr}$ ) wirkt und somit im EKG zu einer Verlängerung der QT-Zeit führt, ergibt sich eine Erklärungsmöglichkeit, zudem der late  $I_{Na}$  unter Kontrollbedingungen ohnehin nur sehr schwach ausgeprägt ist. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit Ranolazin bei den TAC-Zellen zu einer signifikanten Verkürzung der APD um ca. 19%. Es fällt auf, dass die Verkürzung geringer ausgeprägt ist, als durch die Behandlung mit Nifedipin beobachtet und auch geringer als die Verkürzung nach CaMKII-Inhibition.

Addiert man die Reduktionen der beiden Pharmaka, Nifedipin und Ranolazin, über ihre jeweiligen Einzelkanalblockaden zusammen, erhält man annähernd die Werte, die der durch die globale CaMKII-Inhibition mittels AIP entsprechen (jeweils  $APD_{90\%}$  bei 1Hz): AIP (-55%)  $\approx$  Nifedipin (-36%) + Ranolazin (-19%), so dass hier die beiden Ströme als Hauptursache der untersuchten Veränderungen angenommen werden dürfen.

Im zeitlichen Verlauf zum späten Zeitpunkt 21d post-OP sind die Veränderungen ähnlich wie zum frühen Zeitpunkt nach 7d. Als Kontrollen dienen nicht Sham-Zellen, sondern diesmal „Rundown-Zellen“ mit denen der zeitliche Einfluss auf die Messungen quantifiziert werden soll (Abb 3.23). Es zeigt sich, dass nur die pharmakologische Intervention eine signifikante Reduktion der APD bewirkt.

#### **4.4 Elektrophysiologische Veränderungen durch CaMKII-Zielproteine - Frequency-dependent-acceleration of relaxation (FDAR)**

Die frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation (FDAR) (in der vorliegenden Arbeit anhand der beschleunigten Repolarisation des AP dargestellt) stellt einen wichtigen Mechanismus dar, um auch bei hohen Frequenzen eine adäquate Ventrikelfüllung in der Diastole zu gewährleisten. Hierbei wird das Kalzium beschleunigt aus dem Zytosol eliminiert und der Kontraktionsvorgang somit rascher abgeschlossen. Es wurde vermutet, dass Phospholamban, als Regulatorprotein der SERCA und bekanntes CaMKII-Zielprotein, dabei eine wichtige Rolle spielt (Hagemann et al. 2000). Dabei wirkt Phospholamban (PLB) unter Ruhebedingungen inhibitorisch auf die SERCA. Wird PLB phosphoryliert, wie dies bei hohen Frequenzen durch die CaMKII und die Proteinkinase A (PKA) geschieht, diffundiert der Komplex ab und die SERCA-Inhibition wird aufgehoben, wodurch dann letztlich die beschleunigte Elimination erfolgt.

Folgende Arbeiten zeigten jedoch, dass dieser Effekt auch in PLB-Knock-Out Mäusen nachweisbar war (DeSantiago et al. 2002; Li L et al. 1998) und immer noch sensibel auf CaMKII-Inhibition war.

Aus Abb 3.6 wird ersichtlich, dass in den TAC-Zellen eine kontinuierliche Verkürzung der APD bei steigender Frequenz stattfindet. Es kommt von 0,5 Hz auf 4 Hz zu einer Abnahme der APD um 12% ( $p < 0,05$ ; 0,5 Hz vs. 4 Hz). Ein geringer, wenn auch nicht signifikanter Rückgang ist auch in den Sham-Zellen sichtbar, die Abnahme beträgt hier 6,7% ( $p = n.s.$ ). Diese Wirkung ist nach CaMKII-Inhibition gänzlich aufgehoben, in diesem Fall nimmt die APD bei steigenden Frequenzen sogar um 6% ( $p < 0,05$ ) zu.

Analysiert man die Versuche der pharmakologischen Kanal inhibitionen auf den FDAR Effekt, sieht man, dass dieser nach wie vor prominent ausgeprägt ist, insbesondere nach Inkubation

mit Ranolazin. Dadurch wird die Wirkung des Ranolazin als sog. „Inactivated-state-blocker“ (Sossalla et al. 2008) deutlich: Bei steigenden Frequenzen befinden sich mehr Kanäle im inaktivierten Zustand, so dass Ranolazin eine höhere Effektivität entfaltet (bezogen auf diese Subgruppe: TAC Abnahme um 11,3%, TAC+Ran Abnahme um 18,9%). Zum späten Zeitpunkt nach 21d post-OP ist der Effekt weiterhin nachweisbar, nimmt aber ab.

## **4.5 Elektrophysiologische Veränderungen durch CaMKII-Zielproteine - Nachdepolarisationen**

Nachdepolarisationen stellen Oszillationen vom Membranpotential dar und können als frühe (early afterdepolarization, EAD) in der Repolarisationsphase auftreten oder als späte (delayed afterdepolarization, DAD) nach Abschluss der Repolarisation. Diese Nachdepolarisationen können als Auslöser von potentiell tödlichen Arrhythmien, z.B. Torsade-des-pointes-Arrhythmien in Erscheinung treten (Anderson et al. 1998). Als mögliche Ursache wurden bisher sowohl Kalzium- als auch Natriumströme angeführt. Anderson et al. und Bers (2003) führen die Entstehung von EADs auf eine Reaktivierung des  $I_{Ca}$  zurück, ein Zustand, der im Rahmen eines verlängerten APs begünstigt wird. Die Autoren beschrieben weiterhin, dass die EADs durch Kalziumantagonisten terminiert werden konnten. Ebenso zeigen sie die CaMKII-Abhängigkeit, da die Aktivität in den Herzen mit EADs signifikant ansteigt und dass die EADs durch KN-93 signifikant reduziert werden konnten.

Andere Arbeitsgruppen (Song et al. 2008; Undrovinas et al. 2006) schlagen den späten Natriumstrom als potentielle Ursache für die EADs vor. Als Ursache für die DADs gelten bisher eine spontane Kalziumfreisetzung aus dem SR, in Form von Kalziumsparks und/oder ein dadurch aktivierter NCX, wodurch es wiederum zu einer Ladungsverschiebung kommt.

Wie in Abb 3.8 und 3.21 gezeigt, treten EADs und DADs in den TAC-Zellen signifikant häufiger auf als in der Kontrolle, in der, zu beiden Zeitpunkten, keine Ereignisse registriert wurden. Zum frühen Zeitpunkt treten Nachdepolarisationen in 20 % der TAC-Zellen ( $p < 0,05$  vs. Sham) auf, ein Wert der sich zum späten Zeitpunkt noch auf 31,8% steigert ( $p < 0,05$  vs. Sham). Nach CaMKII-Inhibition mit AIP treten zu beiden Zeitpunkten keine Nachdepolarisationen mehr auf, was auf die zentrale Rolle der CaMKII bei der Arrhythmieentstehung hinweist. Bei den pharmakologischen Inhibitionsversuchen sticht hervor, dass die Inhibition des L-Typ-Kanals die Nachdepolarisationen, unabhängig von ihrer vorhergehenden Morphologie, umgehend terminiert, wie in Abb 3.14 im Vorher-Nachher-Vergleich sichtbar ist. Die Inhibition des late  $I_{Na}$  hat dagegen keine Auswirkung auf das Auftreten von Nachdepolarisationen in der vorliegenden Arbeit gezeigt, im Gegensatz zu der Arbeit von Undrovinas et al. von 2006, die zeigten, dass sie Nachdepolarisationen durch



Ranolazin in ihrer Auftretenshäufigkeit reduzieren konnten, oder von Hiraoka et al., die zeigten, dass nur die kombinierte Inhibition von  $I_{Ca}$  und late  $I_{Na}$  in der Lage ist, die Präsenz von EADs zu terminieren. Möglicherweise hängt die fehlende antiarrhythmische Potenz von Ranolazin in der vorliegenden Arbeit mit der geringen Wirkung auf die APD-Reduktion zusammen.

Ein weiterer möglicher Aspekt der Entstehung von Nachdepolarisationen, der begleitend untersucht wurde, sind Kalziumsparks, spontane Freisetzungen von Kalzium aus dem SR, die vornehmlich als Auslöser von DADs in Erscheinung treten. Wie gezeigt wurde, treten die Sparks in TAC-Zellen signifikant häufiger als in der Kontrolle (Gupta et al. 2008) und können damit zur Erklärung der gesteigerten Zahl von Nachdepolarisationen beitragen.

## 4.6 Elektrophysiologische Veränderungen im Shunt-Modell

Auch im Shunt-Modell kommt es zu signifikanten elektrophysiologischen Veränderungen, die z.T. denen in der TAC-Gruppe recht ähnlich sind, jedoch, wie im Folgenden beschrieben wird, unterschiedlicher Ursache sind. Wie bereits gezeigt, sind die Kalziumtransienten in den Shunt-Zellen unverändert (Schmidt et al. 2008). Ding et al. zeigten in einer 2008 veröffentlichten Arbeit, dass Ratten 10 Wochen post-OP signifikante Veränderungen im Kalziumstoffwechsel, in Form verringerter Kalziumtransienten, hatten, diese Änderung nach 5 Wochen aber noch nicht nachweisbar war. Möglicherweise liegt darin auch die Begründung für die fehlenden Veränderungen in unseren Arbeiten, da diese zu einem Zeitpunkt von 7d post-OP erhoben wurden. Überraschenderweise kommt es aber dennoch zu einer signifikanten Verlängerung der APD in den Shunt-Zellen, wobei diese gegenüber der TAC-Gruppe deutlich schwächer ausgeprägt ist (30% vs 100%), wie in Abb. 4.2 zu erkennen ist. Frequenzabhängige Unterschiede in der Repolarisation, wie in der TAC-Gruppe, lassen sich dabei nicht feststellen, falls überhaupt, kommt es zu einer minimalen Verlängerung der APD bei steigenden Frequenzen. Die Häufigkeit von Nachdepolarisationen ist in den Shunt-Zellen signifikant erhöht, während in der Kontrolle lediglich 8,7% der Zellen Nachdepolarisationen zeigen, beträgt der Wert bei den Shunt-Zellen 40,9% ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle). Da die begleitend durchgeführten Untersuchungen keine Unterschiede bzgl. der CaMKII-Expression oder Aktivität sowie der anderen untersuchten Proteine zeigen, bleibt die Ursache für diese beobachteten Veränderungen vorerst ungeklärt, scheint jedoch CaMKII-unabhängig zu sein.

## 5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich aus der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass die CaMKII eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Hypertrophie und des elektrischen Remodelling bei erhöhter Nachlast spielt. Dabei scheint vor allem die Prolongation des Aktionspotentials eine hervorgehobene Rolle zu spielen. Wie die Ergebnisse der Versuche mit AIP zeigen, sind die elektrophysiologischen Veränderungen bzgl. der APD nach CaMKII-Inhibition vollständig auf Kontrollniveau zurückführbar. Dabei konnten in den anschließend durchgeführten Versuchen der pharmakologischen Inhibition mit dem L-Typ-Kalzium-Kanal und dem sarkolemmalen Natriumkanal, verantwortlich für den späten Natriumstrom, auch 2 Ionenkanäle identifiziert werden, die als CaMKII-Zielproteine anscheinend hauptverantwortlich sind für die beschriebene Prolongation des Aktionspotentials.

Nachdepolarisationen, die als Auslöser potentiell letaler Arrhythmien in Erscheinung treten können, traten unter CaMKII-Inhibition nicht mehr auf. Des Weiteren konnten diese mit Kalziumantagonisten terminiert werden, was auf die zentrale Bedeutung des  $I_{Ca}$  für die Entstehung der Nachdepolarisationen hinweist.

Im 2. Modell der erhöhten Vorlast zeigten die Tiere auch eine Hypertrophie und Verlängerung der APD, jedoch scheint hier ein anderer Mechanismus zugrunde zu liegen, da die proteinbiochemischen Veränderungen bzgl. der CaMKII hier nicht beobachtet wurden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahmed GU, Dong PH, Song G, Ball NA, Xu Y, Walsh RA, Chiamvimonvat N (2000): Changes in Ca(2+) cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in a pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 86: 558-70
- Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Schulman H, Sung RJ (1998): KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca<sup>++</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 287: 996-1006
- Backs, J., Backs, T., Neef, S., Kreusser, M. M., Lehmann, L. H., Patrick, D. M., Hill, J. A. (2009). The  $\delta$  isoform of CaMkinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2342–2347
- Bers DM (1983): Early transient depletion of extracellular Ca during individual cardiac muscle contractions. *Am J Physiol* 244: H462-8
- Bers DM: Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. Kluwer Academic Publishers, (2001)
- Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205
- Bers DM (2008): Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70: 23-49
- Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH (2003): Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> and heart failure: roles of diastolic leak and Ca<sup>2+</sup> transport. *Circ Res* 93: 487-90
- Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E (1993): Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73: 379-85
- Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I (2005): EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J* 39: 13-23
- Braun AP, Schulman H (1995): A non-selective cation current activated via the multifunctional Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase in human epithelial cells. *J Physiol* 488 ( Pt 1): 37-55
- Bronstein JM, Farber DB, Wasterlain CG (1993): Regulation of type-II calmodulin kinase: functional implications. *Brain Res Brain Res Rev* 18: 135-47

- Burashnikov A, Antzelevitch C (2006): Late-phase 3 EAD. A unique mechanism contributing to initiation of atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 29: 290-5
- Colbran RJ, Soderling TR (1990): Calcium/calmodulin-independent autophosphorylation sites of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Studies on the effect of phosphorylation of threonine 305/306 and serine 314 on calmodulin binding using synthetic peptides. *J Biol Chem* 265: 11213-9
- Couchonnal LF, Anderson ME (2008): The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)* 23: 151-9
- 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: 357-66
- 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: 975-84
- Ding YF, Brower GL, Zhong Q, Murray D, Holland M, Janicki JS, Zhong J (2008): Defective intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis contributes to myocyte dysfunction during ventricular remodelling induced by chronic volume overload in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35: 827-35
- Dybkova N, Sedej S, Napolitano C, Neef S, Rokita AG, Hunlich M, Brown JH, Kockskamper J, Priori SG, Pieske B Overexpression of CaMKIIIdelta in RyR2R4496C<sup>+/-</sup> knock-in mice leads to altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling and increased mortality. *J Am Coll Cardiol* 57: 469-79
- Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Corbin JD, Balsler JR, Anderson ME (2002): Cytoskeletal disrupting agents prevent calmodulin kinase, IQ domain and voltage-dependent facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Physiol* 545: 399-406
- Edman CF, Schulman H (1994): Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1221: 89-101
- Erickson JR, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol Rev* 91: 889-915

- Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N (2008): A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133: 462-74
- 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: 469-95
- Grueter CE, Abiria SA, Dzhura I, Wu Y, Ham AJ, Mohler PJ, Anderson ME, Colbran RJ (2006): L-type Ca<sup>2+</sup> channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Mol Cell* 23: 641-50
- Gunther S, Grossman W (1979): Determinants of ventricular function in pressure-overload hypertrophy in man. *Circulation* 59: 679-88
- Gupta et al. ESC Scientific Sessions 2008
- Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP (2000): Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 275: 22532-6
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100
- Hasenfuss G, Maier LS (2008): Mechanism of action of the new anti-ischemia drug ranolazine. *Clin Res Cardiol* 97: 222-6
- Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994): Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75: 434-42
- Hill JA, Olson EN (2008): Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358: 1370-80
- Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (1999): Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 84: 713-21
- Huber D, Grimm J, Koch R, Krayenbuehl HP (1981): Determinants of ejection performance in aortic stenosis. *Circulation* 64: 126-34
- Huke S, Bers DM (2007): Temporal dissociation of frequency-dependent acceleration of relaxation and protein phosphorylation by CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 42: 590-9

- Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164: 1356-65
- 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: 806-12
- Jett MF, Schworer CM, Bass M, Soderling TR (1987): Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Arch Biochem Biophys* 255: 354-60
- Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42: 254-61
- Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM (2006): Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 98: 235-44
- Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH (1991): Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 114: 345-52
- Krayenbuehl HP, Hess OM, Ritter M, Monrad ES, Hoppeler H (1988): Left ventricular systolic function in aortic stenosis. *Eur Heart J* 9 Suppl E: 19-23
- Lai Y, Nairn AC, Greengard P (1986): Autophosphorylation reversibly regulates the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependence of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4253-7
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP (1990): Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322: 1561-6
- Li GR, Nattel S (1997): Properties of human atrial I<sub>Ca</sub> at physiological temperatures and relevance to action potential. *Am J Physiol* 272: H227-35
- Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM (1997): The effect of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol* 501 ( Pt 1): 17-31
- 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: H1335-47

- Li SY, Golden KL, Jiang Y, Wang GJ, Privratsky JR, Zhang X, Eason AR, Culver B, Ren J (2005): Inhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase differentially regulates contractile function in cardiac myocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of Ca<sup>2+</sup> regulatory proteins. *Cell Biochem Biophys* 42: 1-12
- Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H (1986): Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9497-501
- Maier LS (2005): CaMKII $\delta$  overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling. *Braz J Med Biol Res* 38: 1293-302
- Maier LS, Bers DM (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34: 919-39
- Maier LS, Bers DM, Pieske B (2000): Differences in Ca(2+)-handling and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2249-58
- Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res* 92: 904-11
- McMurray JJ, Stewart S (2000): Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83: 596-602
- Miller SG, Kennedy MB (1986): Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch. *Cell* 44: 861-70
- National Research Council: GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS (1996)
- Neher E, Sakmann B (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802
- O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E (1999): Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res* 84: 562-70
- 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: 29-42 3

- Ringer S (1895): Further Observations regarding the antagonism between Calcium Salts and Sodium Potassium and Ammonium Salts. *J Physiol* 18: 425-9
- Schmidt et al. DGK Jahrestagung Mannheim 2008
- Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR (1986): Reversible generation of a Ca<sup>2+</sup>-independent form of Ca<sup>2+</sup>-(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem* 261: 8581-4
- Song Y, Shryock JC, Belardinelli L (2008): An increase of late sodium current induces delayed afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2031-9
- Sossalla S, Wagner S, Rasenack EC, Ruff H, Weber SL, Schondube FA, Tirilomis T, Tenderich G, Hasenfuss G, Belardinelli L (2008): Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts--role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *J Mol Cell Cardiol* 45: 32-43
- Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, Hidaka H (1991): The newly synthesized selective Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 968-75
- Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122: 993-1003
- Uemura A, Okazaki K, Takesue H, Matsubara T, Hidaka H (1995): A novel Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase lacking autophosphorylation activity in the rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 562-9
- Undrovinas AI, Belardinelli L, Undrovinas NA, Sabbah HN (2006): Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17 Suppl 1: S169-S177
- Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH (2006): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J Clin Invest* 116: 3127-38
- Wu Y, Roden DM, Anderson ME (1999): Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res* 84: 906-



- Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ (2002): Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106: 1288-93
- Yuan W, Bers DM (1994): Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 267: H982-93
- Zeng J, Rudy Y (1995): Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. *Biophys J* 68: 949-64
- Zhang T, Brown JH (2004): Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63: 476-86
- Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H (2002): The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277: 1261-7
- Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH (2003): The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92: 912-9

## **Verzeichnis von Publikationen, die sich auf die vorliegende Dissertationsschrift beziehen**

Toischer K, Rokita AG, Unsold 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  
(Preis für bestes Paper 2010)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lars Maier für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung und unentwegte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und der Anfertigung des vorliegenden Manuskriptes.

Ebenfalls großer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Lars Maier. Hier möchte ich insbesondere Herrn Dr. med. Adam G. Rokita für die Betreuung danken, sowie Herrn Dr. med. Stefan Neef für die herausragende Hilfe bei allen technischen Problemen und im Laboralltag sowie Frau Dr. rer. nat. Nataliya Dybkova.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. med. Kathie Schmidt und Herrn Thomas Sowa danken, die vor mir und mit mir die Organisation des Projektes bestritten habe. Ohne ihre Hilfe wäre die Durchführung der vorliegenden Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Selbstverständlich wäre auch ohne die Hilfe meiner Mitdoktoranden ein erfolgreiches Abschließen der Arbeit nicht möglich gewesen, so dass auch Ihnen mein Dank gilt.

## **Lebenslauf**

Am 23. April 1983 wurde ich, Shamindra Nath Gupta, als Sohn von Amarendra Nath Gupta und Sipra Gupta geb. Ray in Bremen geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule Fährer Flur von 1989 bis 1993 und der Orientierungsstufe am Gerhard-Rohlf's-Schulzentrum 1993 bis 1995 wechselte ich an das Gymnasium Vegesack wo ich im Juni 2002 mein Abitur ablegte (Gesamtnote: 1,5).

Meinen Zivildienst leistete ich im Kindergarten der Kinderklinik des Zentralkrankenhauses Bremen-Nord ab.

Zum Wintersemester 2003/2004 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen und schloss dieses im Juni 2010 mit der Gesamtnote 1,83 ab.

Mit der Anfertigung meiner Dissertation begann ich im Herbst 2007 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Lars Maier im Rahmen der DFG-geförderten klinischen Forschergruppe in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie.