

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

---

**Die Hemmung der PI3K verstärkt die Kontraktilität von  
alpha<sub>1</sub>-adrenerg stimuliertem Myokard**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August- Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Swantje Kortlepel

aus

Bremen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter: Schild, Detlev, Prof.Dr.rer.nat, Prof.Dr.med

III. Berichterstatter: Zimmermann, Prof.Dr.med.

IV. Crozier, Thomas, Prof.Dr.med, Prof Dr. rer.nat

Tag der mündlichen Prüfung: 2010-12-08

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	KONTEXT .....	1
1.2	AUFBAU UND FUNKTION DES ARBEITSMYOKARDS .....	1
1.2.1	<i>Aufbau des Arbeitsmyokards</i> .....	1
1.2.2	<i>Myokardialer Kontraktions- und Relaxationszyklus</i> .....	2
1.2.3	<i>Myokardialer Kalziumhaushalt</i> .....	2
1.3	EINFLUSS DES ADRENERGEN SYSTEMS AUF DIE HERZFUNKTION .....	4
1.4	DIE PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE (PI3K) .....	7
1.5	ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....	9
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1	EXPERIMENTE MIT ISOLIERTEN KANINCHENKARDIOMYOZYTEN .....	10
2.1.1	<i>Isolation der Kaninchenkardiomyozyten</i> .....	10
2.1.2	<i>Verkürzungsfraktions- und Kalziumamplitudenmessung</i> .....	11
2.1.3	<i>Versuchsprotokoll</i> .....	15
2.1.4	<i>Material und Messlösungen (isolierte Kardiomyozyten)</i> .....	18
2.2	KONTRAKTILITÄTSMESSUNGEN AN INTAKTEN KANINCHENHERZMUSKELSTREIFEN .....	21
2.2.1	<i>Präparation der Herzmuskelstreifen</i> .....	21
2.2.2	<i>Kraftmessung der Muskelstreifen</i> .....	21
2.2.3	<i>Versuchsprotokoll</i> .....	23
2.2.4	<i>Material und Messlösungen (Herzmuskelstreifen)</i> .....	24
2.3	MESSUNG DER KALZIUMSENSITIVITÄT (SEMI-SKINNED FIBER) .....	25
2.3.1	<i>Präparation der Herzmuskelstreifen</i> .....	25
2.3.2	<i>Semi-Skinned Fiber-Methode</i> .....	25
2.3.3	<i>Skinned Fiber-Messanlage</i> .....	26
2.3.4	<i>Versuchsprotokoll</i> .....	26
2.3.5	<i>Material und Messlösungen (Semi-Skinned Fiber)</i> .....	28
2.4	PROTEINEXPRESSIONS- UND PHOSPHORYLIERUNGSLEVEL (WESTERN BLOT) .....	31
2.4.1	<i>Versuchsprotokoll</i> .....	31
2.4.2	<i>Material und Messlösungen (Western Blot)</i> .....	32
2.5.	STATISTIK .....	34
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3.1	EFFEKT DER PI3K-HEMMUNG AUF DIE KONTRAKTILITÄT $\alpha_1$ -ADRENERG STIMULIERTER ISOLIERTER KARDIOMYOZYTEN .....	35
3.2	EFFEKT DER PI3K-HEMMUNG AUF DIE KONTRAKTILITÄT $\alpha_1$ -ADRENERG-STIMULIERTER MYOKARDSTREIFEN .....	36
3.3	EFFEKT DER PI3K-HEMMUNG AUF DIE INTRAZELLULÄRE KALZIUMKONZENTRATION IN $\alpha_1$ -ADRENERG-STIMULIERTEN, ISOLIERTEN KARDIOMYOZYTEN .....	37
3.4	EFFEKT DER PI3K-HEMMUNG AUF DIE KALZIUMSENSITIVITÄT IN SEMIPERMEABILISIERTEN HERZMUSKELSTREIFEN .....	39
3.5	EFFEKT DER PI3K-HEMMUNG AUF DIE PROTEINEXPRESSION UND AUF DAS PHOSPHORYLIERUNGSLEVEL IN KANINCHENMYOKARD .....	40
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang: Publikation: Inhibition of PI3K improves contractility in <math>\alpha_1</math>-adrenergically stimulated myocardium</b> .....	<b>59</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Kontext**

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen für viele Menschen in Deutschland eine physische und psychische Belastung dar, führen zu Einschränkungen im Alltag und gehen mit einer erheblichen Mortalität einher.

Laut einer Erhebung des Statistischen Bundesamtes starben in Deutschland im Jahre 2007 insgesamt 208.212 der Frauen und 150.472 der Männer an den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2007). Nach der ICD-10 Klassifikation ist 2007 fast jeder zweite (43,4%) Deutsche an einer Erkrankung des Kreislaufsystems gestorben (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2007).

Aktuell wird die Zahl der 80-jährigen und älteren Deutschen, die an einer Herzinsuffizienz erkrankt sind auf circa 141 000 geschätzt (NEUMANN et al., 2009).

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, das Verständnis der Pathophysiologie und die Grundlagen für neue Therapieverfahren der Herzinsuffizienz zu erweitern.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit ist auf die Modulation der Kontraktilität in  $\alpha_1$ -adrenerg stimuliertem Myokard gerichtet.

### **1.2 Aufbau und Funktion des Arbeitsmyokards**

#### **1.2.1 Aufbau des Arbeitsmyokards**

Der isolierte Kardiomyozyt ist zwischen 80-100  $\mu\text{m}$  lang und hat im Durchschnitt einen Durchmesser von 15  $\mu\text{m}$ . Er ist über drei verschiedene Zellverbindungen (Zonula adhaerens, Desmosomen und Gap Junctions) mit seinen Nachbarzellen verbunden, ohne mit ihnen zu einem Synzytium zu verschmelzen, wie es in der Skelettmuskulatur der Fall ist. Der Aufbau des kontraktilen Apparates des Kardiomyozyten gleicht allerdings dem der Skelettmuskulatur. Die kleinste Einheit, das Sarkomer, besteht aus parallel angeordneten Aktin- (1  $\mu\text{m}$  lang, dünnes Filament) und Myosinfilamenten (1,6  $\mu\text{m}$  lang, dickes Filament). Hintereinander liegende Sarkomere bilden eine Myofibrille mit einem Durchmesser von ca. 1-2  $\mu\text{m}$ . Myofibrillen und Mitochondrien füllen 85% des Intrazellularraums aus. Die Aktinfilamente enden an der Zellgrenze in den Zonulae adhaerentes, zentral jedoch frei zwischen den Myosinfilamenten. Etwa 300 Myosinfilamente verdrillen sich zu dem sogenannten dicken Filament. Jedes Myosinfilament hat ein stabförmiges Ende, auf dem ein Köpfchen sitzt, welches aus dem dicken Filament ragt. Durch die Anordnung der dicken Filamente liegt der köpfchenfreie stabförmige Anteil im Zentrum des Sarkomers.

Zwischen den kontraktilen Anteilen der Herzmuskelzelle ist das T-Tubulus-System sowie das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) angeordnet. Diese beiden Systeme kontrollieren den

Kalziumhaushalt der Zelle und nehmen so regulierend Einfluss auf die Kontraktions- und Relaxationsvorgänge der Kardiomyozyten (siehe unter 1.2.3).

Unter dem Lichtmikroskop sind die sogenannten charakteristischen Glanzstreifen (Disci intercalares) zu erkennen. An dieser Stelle sind zwei Zellen durch Verzahnung miteinander verbunden (SCHMIDT et al., 2000; LÖFFLER & PETRIDES, 2003).

### **1.2.2 Myokardialer Kontraktions- und Relaxationszyklus**

Im Kardiomyozyten stellt das gut aufeinander abgestimmte Zusammenspiel der mechanischen Funktion des kontraktiven Apparates, der Regulation des Kalziumhaushaltes und der ATP-Generierung als Energiequelle durch die Mitochondrien die Voraussetzung für den geregelten Ablauf des Kontraktions- und Relaxationsvorganges dar.

Die mechanische Funktion des kontraktiven Apparates der Kardiomyozyten setzt eine Interaktion der Myosinköpfchen mit den Aktinfilamenten voraus. Während der Kontraktion gleiten die Filamente übereinander, so dass sich jedes Sarkomer und damit der Kardiomyozyt verkürzt. Dieser Vorgang basiert auf folgendem Mechanismus:

Im Ruhezustand des Herzmuskels ist die Interaktion zwischen Aktin und Myosinköpfchen durch die Proteine Tropomyosin und Troponin blockiert. Mit dem Anstieg der Kalziumkonzentration in der erregten Zelle steigt auch die Konzentration von kalziumgebundenem Troponin an. Die Komplexbildung von Kalzium, Troponin und Tropomyosin bedingt die Freigabe der Bindungsstelle zwischen dem Aktinfilament und dem Myosinköpfchen, was zur Ausbildung einer Querbrücke zwischen den beiden Filamenten führt. Die Querbrücke bleibt so lange bestehen, bis das Myosinköpfchen ATP bindet. Über die ATPase Eigenschaft des Myosinköpfchens kann dieses ATP zu ADP dephosphorylieren, was die nötige Energie zur Lösung des Myosins vom Aktin bereitstellt. Je nach intrazellulärer Kalziumkonzentration kommt es anschließend zur erneuten Bildung einer Querbrücke zwischen Aktin und Myosin (SCHMIDT et al., 2000; LÖFFLER & PETRIDES, 2003), womit die Filamente weitere 4-17 nm übereinander gleiten (SUGIURA, 1999). Pro Sekunde kann ein Myosinköpfchen diesen Vorgang 2-10 mal wiederholen und dabei eine Kraft zwischen 1,7-6 pN entwickeln (SUGIURA, 1999). Der Kontraktionsvorgang wird durch den Rücktransport der Kalziumionen in das SR beendet. Sobald kein Kalzium mehr zur Komplexbildung zur Verfügung steht, blockiert Tropomyosin die Bindungsstelle zwischen Aktin und Myosin und es kommt zur Relaxation des Kardiomyozyten.

### **1.2.3 Myokardialer Kalziumhaushalt**

Für die Gewährleistung des geregelten Ablaufes der Kontraktion und des Wechsels zwischen Kontraktion und Relaxation ist eine genaue Regulation des intrazellulären Kalziumhaushaltes notwendig. Hierbei ist das SR als Kalziumspeicher von zentraler Bedeutung. Das SR ist ein membrangebundenes in der ganzen Zelle vorhandenes Netzwerk von kalziumspeichernden Zisternen, den so genannten longitudinalen Tubuli (L-Tubuli), welche sich zwischen den Myofibrillen befinden

(BRITTSAN & KRANIAS, 2000). Erregungen des Sarkolemms werden über terminale Zisternen (Ausstülpungen des Sarkolemms, T-Tubuli) an die L-Tubuli weitergeleitet. Innerhalb des SR ist das Kalzium an kalziumbindende Proteine gebunden, so dass die Konzentration an freiem Kalzium im SR bei ungefähr 1 mM liegt (ROSSI & DIRKSEN, 2006).

Die Depolarisation der Zellmembran durch ein Aktionspotential führt zur Öffnung spannungsabhängiger Kalzium-Ionenkanäle (L- und T-Typ) und dadurch zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (BERS & PEREZ-REYES, 1998). Der Kalziumeinstrom wiederum führt zur Öffnung kalziumabhängiger Kalziumkanäle des SR, den Ryanodinrezeptoren (ENDO, 2006; KENTISH et al., 1990). Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von  $10^{-7}$  mol/L auf Werte zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  mol/L ergibt sich aus der selbstverstärkenden Öffnungseigenschaft der Ryanodinrezeptoren (ENDO, 2006). Die Inaktivierung der L- und T-Typ-Kalziumkanäle erfolgt sowohl spannungs- als auch kalziumabhängig.

Die Relaxation des Kardiomyozyten erfolgt durch Rücktransport des Kalziums aus dem Intrazellularraum in den Extrazellularraum und in den intrazellulären Kalziumspeicher, das SR.

Der sekundär aktive Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) ist ein Ionentransportprotein der Plasmamembran. Als reversibler Transporter kann der NCX sowohl Kalzium von intrazellulär nach extrazellulär befördern, als auch von extrazellulär nach intrazellulär. Die hierzu benötigte Energie sowie die Transportrichtung ist abhängig von dem Natrium- und Kalziumkonzentrationsgradienten und dem Membranpotential (BERS, 2001). Die kardiale Isoform, der NCX1, transportiert drei Natriumionen im Austausch mit einem Kalziumion (CRESPO et al., 1990). Die Aktivitätsregulierung des Ionentransportes ist kalziumabhängig. Vereinfacht gesagt, steigt mit der intrazellulären Kalziumkonzentration die Aktivität des Transporters, welcher in diesem Fall Kalzium von intrazellulär nach extrazellulär transportiert, an. Mit steigender intrazellulärer Natriumkonzentration kommt es nach einer vorübergehenden starken Aktivierung des Transporters zu einer Inaktivierung desselben (HILGEMANN et al., 1992a; HILGEMANN et al., 1992b).

Der Kalziumtransport in das SR erfolgt durch einen aktiven, energieverbrauchenden Transport: Membranständige Kalzium-ATPasen (SERCA2A) werden durch hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen aktiviert und transportieren die Kalziumionen gegen das Konzentrationsgefälle in das SR. Die Aktivität der SERCA2A wird durch Phospholamban (PLB) reguliert (TADA et al., 1975; KIRCHBERGER et al., 1974). Die Aktivierung von PLB erfolgt durch Phosphorylierung. Im dephosphorylierten Zustand kann PLB an SERCA2A binden und sie dadurch in ihrer Aktivität hemmen, was zu einem geringeren und langsameren Rücktransport der intrazellulären Kalziumionen in das SR führt (ENDO, 2006; BRITTSAN & KRANIAS, 2000). Geringere Kalziumkonzentrationen im Kalziumspeicher SR führen zu einer Abnahme der myokardialen Kontraktilität. Der verlangsamte Rücktransport der Kalziumionen in das SR hat eine Verlängerung der Relaxationszeit zur Folge. Im phosphorylierten Zustand löst sich die Bindung zwischen PLB und SERCA2A (KIM HW et al., 1990; JAMES et al., 1989; INUI et al., 1986), womit gleichzeitig die

Affinität der SERCA2A für die Kalziumionen zunimmt (ODERMATT et al., 1996; TADA & INUI, 1983). Durch die somit schneller und stärker wieder aufgefüllten Kalziumspeicher verkürzt sich die Relaxationszeit und die myokardiale Kontraktilität steigt. Die Kontraktilität des Myokards hängt somit unmittelbar von der intrazellulären Kalziumkonzentration ab (MAIER & BERS, 2002; BERS & ZIOLO, 2001).

### 1.3 Einfluss des adrenergen Systems auf die Herzfunktion

Die Aktivität des vegetativen Nervensystems beeinflusst entscheidend die Herzfunktion.

Noradrenalin wird als Transmitter des Sympathikus an den Nervenenden des zweiten sympathischen Neurons im Herzen ausgeschüttet. Es leitet den elektrischen Reiz des Nervs als humorales Signal an adrenerge Rezeptoren des Herzens weiter.

Anhand von pharmakologischen Kriterien unterscheidet man zwei Typen von adrenergen Rezeptoren (sowie deren Unterformen) (BARKI-HARRINGTON et al., 2004; NAGA PRASAD et al., 2001):

1.  $\beta$ -Adrenorezeptoren ( $\beta$ -AR), mit der Unterteilung in die Rezeptorsubtypen  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ .
2.  $\alpha$ -Adrenorezeptoren ( $\alpha$ -AR), mit der Unterteilung in die Rezeptorsubtypen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ .

Der adrenerge Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR).

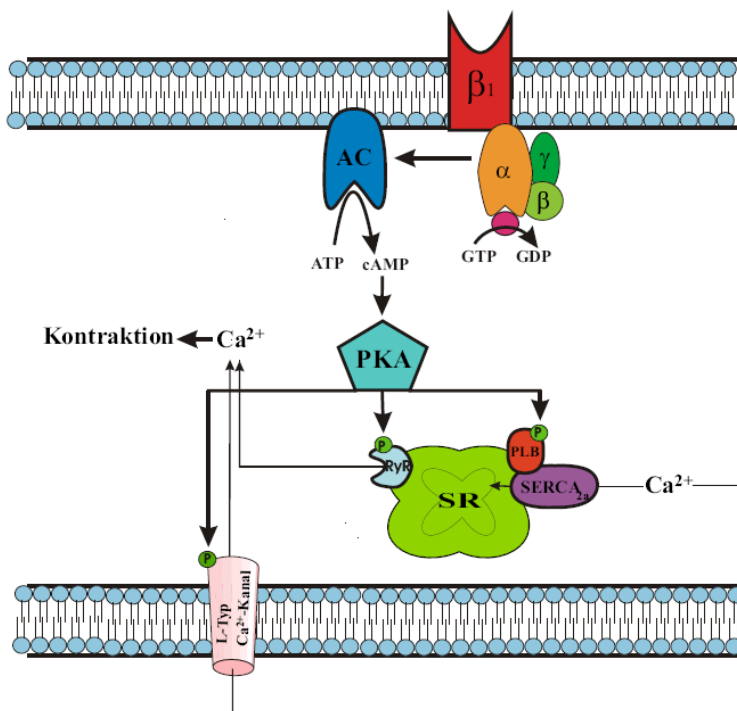
Er besteht aus sieben die Zellmembran durchspannenden Helices. Extra- und intrazellulär befindet sich jeweils eine Endkette (extra- und intrazelluläre Domäne). An die Transmembrandomänen sowie an die extrazelluläre Domäne können Botenstoffe binden und das Signal intrazellulär über sekundäre Botenstoffe weiterleiten. Folge ist die Aktivierung von Translations- und Transkriptionsfaktoren, Ionenkanälen, Enzymen, etc. Im unstimulierten Zustand ist an den intrazellulären Teil des Rezeptors ein Heterotrimer gekoppelt, welches aus einer GDP/GTP bindenden  $G_\alpha$ -Untereinheit und einer  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit aufgebaut ist (SUDGEN & CLERK, 1998). Die Stimulation des Rezeptors durch einen Botenstoff bewirkt den Austausch von GDP zu GTP, was zu einer Konformationsänderung des G-Proteins führt. Aus dem Heterotrimer entsteht das Monomer  $G_\alpha$  und das Heterodimer  $G_{\beta\gamma}$ .

Anhand der Eigenschaften der  $G_\alpha$ -Untereinheit werden drei Formen voneinander unterschieden:  $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_i}$  und  $G_{\alpha_q}$ . Die stimulierenden  $G_{\alpha_s}$ -Proteine und die inhibierenden  $G_{\alpha_i}$ -Proteine modulieren die Adenylatzyklase (AC)-Aktivität und darüber die Konzentration des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Über cAMP kommt es zur Proteinkinase A (PKA)-Aktivierung, welche wichtige Kalziumstoffwechselproteine der elektromechanischen Kopplung phosphoryliert (ENDO, 2006; CRACKOWER et al., 2002; JO et al., 2002), unter anderem den L-Typ-Kalziumkanal, PLB, den Ryanodinrezeptor und Troponin I (ENDO, 2006; CRACKOWER et al., 2002; JO et al., 2002).

Durch die Aktivierung der L-Typ-Kalziumkanäle ist bei einer Membrandepolarisation der Kalziumeinstrom in die Zelle verstärkt. Wie bereits beschrieben steigt mit dem Phosphorylierungsgrad des PLB die SERCA2A-Aktivität, was eine stärkere Füllung der Kalziumspeicher und einen Anstieg der Kalziumtransientenamplitude mit sich bringt. Über den aktivierten Ryanodinrezeptor erfolgt die

schnelle Ausschüttung des Kalziums aus dem SR in den Intrazellularraum (ENDO, 2006; BRITTSAN & KRANIAS, 2000). Die cAMP-vermittelte Phosphorylierung des Troponin I senkt die Kalziumaffinität von Troponin C, was eine Verbesserung der Relaxation bewirkt (positiv lusitrope Wirkung).

$G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren aktivieren die Phospholipase C (PLC), welche die sekundären Botenstoffe Diacylglycerin (DAG) und Inositol 1,4,5-Triphosphat ( $IP_3$ ) aus dem membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) generiert. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche unter anderem den L-Typ-Kalziumkanal phosphoryliert. Über spezifische  $IP_3$ -Rezeptoren bewirkt  $IP_3$  eine Freisetzung von Kalzium aus dem SR ins Zytosol. Der zytosolische Anstieg der Kalziumkonzentration bewirkt ebenfalls die Öffnung von Kalziumkanälen. Über den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt es, wie unter 1.2.2 beschrieben, zur Steigerung der Kontraktilität.



**Abbildung 1: Signalweg von der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor-Aktivierung zur Myozytenkontraktion**

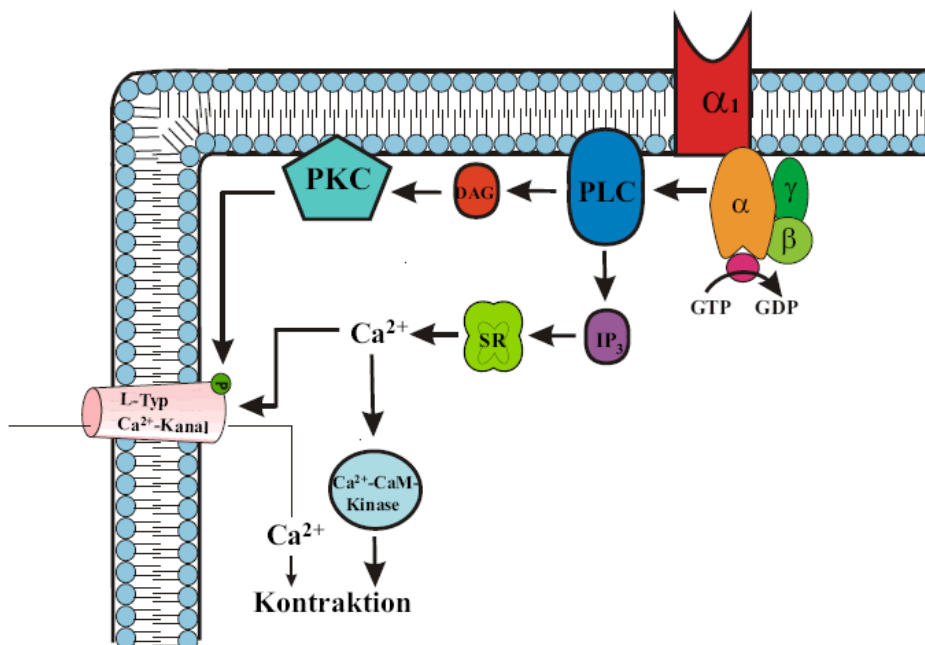
Über eine Kopplung von Rezeptor und Guanylnukleotid bindendem Protein ( $G_{\alpha\beta\gamma}$ ) aktivieren Agonisten an  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren eine membranständige Adenylatcyclase (AC). Dieses Enzym synthetisiert aus Adenosintriphosphat (ATP) cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP bewirkt die Aktivierung der PKA, welche ihrerseits verschiedene Enzyme durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität beeinflusst. Die Phosphorylierung des membranständigen L-Typ-Kalziumkanals führt zu einem Anstieg des Kalziuminflux in die Zelle, die Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors (RyR) zu einer beschleunigten Ausschüttung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ins Zytosol. Die erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration ist die Ursache der positiv inotropen Wirkung einer  $\beta_1$ -adrenergen myokardialen Stimulation. Die Aktivierung der sarkoplasmatischen Kalziumtransport-ATPase (SERCA2A) durch die cAMP-vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) fördert die Aufnahme von Kalzium in das SR und die Phosphorylierung membranständiger Kanalproteine (nicht gezeigt). Dies und die cAMP-vermittelte Phosphorylierung des Troponin I, wodurch die Kalziumaffinität von Troponin C abnimmt (nicht gezeigt), hat eine positiv lusitrope Wirkung.



Der  $\beta_1$ -AR ist ein  $G_{os}$ -Protein-gekoppelter Rezeptor, der  $\beta_2$ -AR liegt sowohl als  $G_{os}$ - als auch als  $G_{oi}$ -gekoppelter Rezeptor vor.

Nach  $\beta_1$ -adrenerger Stimulation des Myokards kommt es über die Aktivierung der AC zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration mit nachfolgender Aktivierung der PKA und dem oben beschriebenen Einfluss auf den Kalziumhaushalt der Zelle. Die  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation hat demnach einen positiv inotropen und positiv lusitropen Effekt am Myokard (ENDO, 2006).

Bei Stimulation der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren kommt es aufgrund des entgegengesetzten Effektes der  $\beta_2$ -adrenergen  $G_{os}$ - und  $G_{oi}$ - Stimulation zu keinem Nettoeffekt auf die myokardiale Kontraktilität (ENDO, 2006).



**Abbildung 2: Signalweg von der  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Aktivierung zur Myozytenkontraktion**

Über eine Kopplung von Rezeptor und Guanylnukleotid bindendem Protein ( $G_{\alpha\beta\gamma}$ ) aktivieren Agonisten an  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren eine membranständige Phospholipase C (PLC). Dieses Enzym synthetisiert Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) aus dem membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ). Über spezifische  $IP_3$ -Rezeptoren bewirkt  $IP_3$  eine Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ins Zytosol. DAG aktiviert eine membranständige Proteinkinase C (PKC). Das Enzym und ein intrazellulärer Kalziumkonzentrationsanstieg ( $Ca^{2+}$ ) bewirken eine Phosphorylierung und Öffnung von membranständigen L-Typ-Kalziumkanälen. Dies führt zu einem weiteren Kalziuminflux in die Zelle. Kalzium löst durch einen weiteren enzymatischen Signalweg die Aktin-Myosinwechselwirkungen aus, die zur Myozytenkontraktion führen.

Nicht gezeigt ist die Kalziumwiederaufnahme in die Kalziumspeicher (über eine sarkoplasmatische Kalziumtransport-ATPase SERCA2A) und der Kalziumtransport in den Extrazellulärraum (über eine zellmembranständige Kalziumtransport-ATPase und einen zellmembranständigen Natrium/Kalzium-Gegentransporter).

Das  $\alpha$ -adrenerge System nimmt ebenfalls über die Aktivierung von GPCR regulierend Einfluss auf die myokardiale Inotropie. Dies erfolgt auf noch nicht vollständig geklärtem Wege zum einen durch Modulation der intrazellulären Kalziumamplitude und zum anderen durch Beeinflussung der Kalziumsensitivität der Myofilamente (ENDO, 2006; BARKI-HARRINGTON et al., 2004; FEDIDA et al., 1993; BLINKS & ENDO, 1986).

Der  $\alpha_1$ -AR ist ein  $G_{\alpha q}$ -gekoppelter Rezeptor, dessen Stimulation zur PLC-bedingten Hydrolyse von Phosphatidylinositol in die sekundären Botenstoffe IP<sub>3</sub> und DAG führt (ENDO, 2006; BARKI-HARRINGTON et al., 2004; ENDO, 1996; PEREZ et al., 1993; ENDO et al., 1991). Die dadurch bedingte Öffnung des L-Typ-Kalziumkanals (PKC- und Kalzium-vermittelt) zeigt sich in einer Zunahme der myokardialen Inotropie (KAMP & HELL, 2000).

Unerwartete Resultate, wie die Reduktion des positiv inotropen Effektes nach gezielter externaler Aktivierung der PKC in Kaninchenherzmuskelzellen und  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation, lassen komplexe Zusammenhänge vermuten (GRIMM et al., 2006). Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, diese zu erklären.

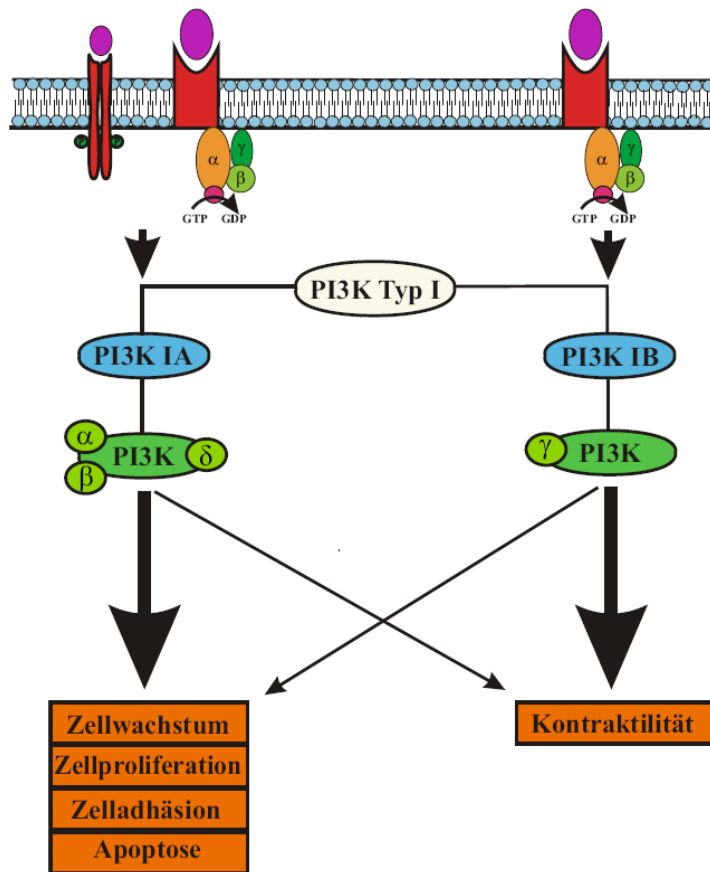
#### **1.4 Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)**

Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) sind eine Familie evolutionär hoch konservierter Lipidkinasen. Sie regulieren wesentliche physiologische Prozesse wie das Zellwachstum, die Zellproliferation, die Zelladhäsion (durch Umorganisation des Zytoskeletts), und die Apoptose. Daher spielen sie sowohl in physiologischen Zellprozessen als auch in pathophysiologischen Vorgängen, wie metabolischen und entzündlichen Erkrankungen, der Tumorentstehung und auch der Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen, eine wichtige Rolle (OUDIT et al., 2004; ALLOATTI et al., 2003; WYMAN et al., 2003; CANTLEY, 2002; CRACKOWER et al., 2002).

Es gibt verschiedene Isoformen der PI3K, welche in drei Hauptgruppen (I-III) eingeteilt werden.

Die PI3K I wird, bedingt durch ihren Aufbau und durch den Mechanismus, über den sie aktiviert wird, nochmals in Typ IA ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) und Typ IB ( $\gamma$ ) unterschieden. Die Aktivierung der PI3K IA erfolgt entweder über den Tyrosinkinase-Rezeptor oder über einen GPCR, die der PI3K IB ausschließlich über GPCR (VANHAESEBROECK & WATERFIELD, 1999).

Im Herzen sind die Isoformen PI3K $\alpha$  und PI3K $\gamma$  von besonderer Bedeutung. Sie sind sowohl am basalen Zellwachstum als auch an der physiologischen (adaptiven) und pathologischen (maladaptiven) Hypertrophie-Entwicklung beteiligt (DeBOSCH et al., 2006; SHIOJIMA et al., 2005; McMULLEN et al., 2004; McMULLEN et al., 2003; MATSUI et al., 2002; SHIOI et al., 2000). Die PI3K beeinflusst weiter den Glucose- und Aminosäurestoffwechsel im Myokard (BELKE et al., 2002; DOENST & TAEGTMEYER, 1999), hat einen zellprotektiven Einfluss bei oxidativem Stress und Ischämie (MURPHY et al., 2003; YAMASHITA et al., 2001; AIKAWA et al., 2000).



**Abbildung 3: PI3K Typ I**

Man unterscheidet zwischen einer PI3K Typ IA und einer PI3K Typ IB.

Alle PI3K sind aus zwei Untereinheiten aufgebaut, aus der Untereinheit p110, welche die katalytischen Funktionen der Kinase übernimmt, und aus einer Adapter Untereinheit.

Im Falle der Typ IA PI3K unterscheidet man drei Subtypen anhand der katalytischen Untereinheiten, p110 $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ , welche jeweils mit einem der sieben bekannten Adapterproteine gekoppelt ist. Die Aktivierung der PI3K IA erfolgt entweder über den Tyrosinkinase-Rezeptor oder über den G-Protein bindenden Rezeptor (GPCR). Die PI3K Typ IB besteht aus der katalytischen Untereinheit p110 $\gamma$  und der Adapteruntereinheit p101. Sie wird über die G $\beta\gamma$ -Untereinheit von GPCR aktiviert. Die PI3K Typ I nehmen Einfluss auf das Zellwachstum, die Zellproliferation, die Zelladhäsion und die Apoptose und sind damit Teil physiologischer als auch pathologischer Zellprozesse.

Darüber hinaus haben verschiedene Studien gezeigt, dass die PI3K eine fundamentale Rolle in der Regulation der Mechanotransduktion und der kardialen Kontraktilität spielt (McMULLEN et al., 2004; BELKE et al., 2002; CRACKOWER et al., 2002; TANAKA et al., 1998). Die Überexpression des herzspezifischen IGF-1 Rezeptors (McMULLEN et al., 2004) oder die IGF-1 Perfusion von Kardiomyozyten (TANAKA et al., 1998) verbessern die kontraktile Funktion von Mäuseherzen, bedingt durch eine Steigerung der PI3K-Aktivität. Übereinstimmend damit kommt es durch einen Insulinrezeptor-„Knockout“ zu einer verschlechterten Kontraktilität des Herzmuskels (BELKE et al., 2002).

Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation kommt es PI3K-vermittelt zu einer Modulation des Kalziumhaushaltes der myokardialen Zellen (LEBLAIS et al., 2004; JO et al., 2002). Die PI3K vermindert den

$\beta$ -adrenerg-vermittelten cAMP- und PKA-Anstieg und hemmt damit den positiv inotropen Effekt einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation (CRACKOWER et al., 2002).

Die  $\alpha$ -adrenerge Stimulation von Kardiomyozyten führt ebenfalls zu einer gesteigerten Aktivität der PI3K. Aus der Herzhypertrophieforschung weiß man, dass dies über die GPCR-vermittelte Aktivierung der PKC erfolgt (WENZEL et al., 2006; PÖNICKE et al., 2001; SCHLÜTER et al., 1998; LaMORTE et al., 1994).

Die Arbeitsgruppe *VJ La Morte* konnte an Rattenmyozyten zeigen, dass es unter  $\alpha$ -adrenerger Stimulation  $G_q$ PCR-vermittelt zu einer Zunahme membrangebundenen Phosphatidylinositol(PtdIns)-bi- und triphosphats kommt. Die makroskopisch zu erkennende Herzhypertrophie konnte durch Hemmung des  $G_q$ PCR reduziert werden, ebenso wie die PtdIns-Formation an der Zellmembran. Die Hemmung anderer GPCR Typen hatte keinen Einfluss auf die Menge membrangebundenen PtdIns (LaMORTE et al., 1994).

Ob es allerdings unter  $\alpha$ -adrenerger Stimulation PI3K-vermittelt zu einer Funktionsbeeinflussung des Herzmuskels kommt, ist bislang nicht geklärt.

## 1.5 Ziele und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Da immer mehr Daten darauf hinweisen, dass die PI3K als Substrat zur medikamentösen Therapie von Herz-Kreislauf-erkrankungen, Tumorerkrankungen und Entzündungen eingesetzt werden könnte, ist es notwendig, die genauen Zusammenhänge zwischen der PI3K, Zellrezeptoren und Effektoren zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit habe ich den Einfluss der PI3K auf die  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelten Effekte hinsichtlich der Inotropie und des intrazellulären Kalziumhaushaltes an Kaninchenkardiomyozyten untersucht.

Die Fragestellung hat sich aus folgenden Beobachtungen ergeben:

Eine  $\alpha$ -adrenerge Stimulation führt zu einer myokardialen Kontraktilitätssteigerung. Der hierzu beschriebene Mechanismus ist eine Aktivierung der PLC/PKC-Signalkaskade.

Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Stimulation kardialer  $\alpha$ -AR durch Aktivierung der PI3K zu einer kardialen Hypertrophie führt.

Obwohl in anderem Zusammenhang auch eine Modulation der Kontraktilität durch die PI3K beschrieben wurde, ist die Bedeutung der PI3K für die Kontraktilitätszunahme unter  $\alpha$ -adrenerger Stimulation bislang nicht bekannt. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, die Kontraktilität  $\alpha_1$ -stimulierter Kardiomyozyten mit und ohne Hemmung der PI3K zu untersuchen. Darüber hinaus soll der Einfluss einer Hemmung der PI3K auf den Kalziumhaushalt  $\alpha_1$ -stimulierter Kardiomyozyten analysiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Experimente mit isolierten Kaninchenkardiomyozyten

#### 2.1.1 Isolation der Kaninchenkardiomyozyten

Die Datenerhebung dieser Arbeit erfolgte unter Zustimmung der Tierschutzbehörde (Tierversuchsanzeige (Aktenzeichen): T8.02, Bezirksregierung: Braunschweig). Die Durchführung erfolgte streng nach den Richtlinien, welche für die experimentelle Arbeit mit Tieren nach dem Tierschutzgesetz (TierSchG) im § 4 Abs.3 festgelegt sind (GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 1996).

Weibliche Kaninchen der Rasse Chinchilla-Bastard, mit einem Körpergewicht von 1,5-2 kg (Charles River Laboratories, Kisslegg), wurden über einen venösen Zugang in der Ohrvene mit 2500IE Heparin heparinisiert und anästhesiert (Thiopental 50 mg/kg Körpergewicht)].

Der ausbleibende Kornealreflex wurde als Narkosenachweis gewählt.

Über das durch einen Bauchschnitt eröffnete Abdomen wurde im Folgenden zügig das Diaphragma durchtrennt und zwei seitliche Rippen eröffnet. Der durch dieses Manöver entstandene Aktionsraum im Thorax ermöglichte mit guter Übersicht, das Perikard zu eröffnen und das Herz anschließend an den Gefäßen stumpf abzusetzen. Hierbei war der verletzungsfreie Erhalt eines langen Stückes der Aorta als Voraussetzung zur weiteren erfolgreichen Präparation zu beachten. Das isolierte Herz wurde kurzzeitig mit Carbogen-gesättigter Tyrode (Kalzium 1 mmol/l, Temperatur: 37°C) gewaschen und anschließend an der Aorta kanüliert. Über eine retrograde Perfusionstechnik (LANGENDORF, 1895) mit kalziumhaltiger Tyrode bei 37°C und 100 % Sauerstoffgehalt begann das Herz wieder zu kontrahieren.

Zur Vorbereitung auf die Kardiomyozytenisolation wurden zuerst die kalziumabhängigen interzellulären Verbindungen (Cadherine, Integrine) mit kalziumfreier Tyrode (12-15 Minuten, 30 mL/min) gelöst. Anschließend erfolgte die Inkubation des Myokards mit kollagenasehaltiger Lösung (12-15 Minuten, 10 ml/min, 37°C) zum sogenannten „Myokardverdau“, welcher mit Hilfe einer albuminhaltigen Stopplösung beendet wurde. Um sicherzustellen, dass das Isolat nur ventrikuläre Kardiomyozyten enthält, wurden Ventrikel und Atrium zuvor in 2,3-Butan-Dion-Monoxim (BDM)-haltiger Stopplösung sauber voneinander getrennt. Über eine Blockierung der Kalziumbindung an Troponin C und an Kalziumkanäle schützt BDM das Gewebe durch elektromechanische Entkopplung vor unerwünschten Kontraktionen. Folglich sinkt der Sauerstoffverbrauch der Zellen. Die vollständige Trennung der Ventrikelzellen voneinander wurde durch vorsichtiges Schwenken der Zelllösung, sieben (200 µm Maschen) und waschen vollendet. Gleichzeitig zum Waschvorgang erfolgte ein schrittweiser Kalziumaufbau in 9 Stufen (0,05 mmol/l bis 1 mmol/l).

Die erreichten Gesamtzahlen an vitalen Kardiomyozyten betragen im Mittel 4,7 Millionen Zellen pro 10 ml. Der Anteil vitaler Zellen lag im Durchschnitt bei 73%.

### 2.1.2 Verkürzungsfractions- und Kalziumamplitudenmessung

Zur Datenerhebung an isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten wurde das inverse Mikroskop der Firma Nikon, Typ eclipse TE 2000-U verwendet (40-fach vergrößerndes Ölimmersionsobjektiv). Die Wahl der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte sowohl die Evaluierung der entwickelten Kraft jeder einzelnen Zelle als auch die damit verbundenen Veränderungen des intrazellulären Kalziumhaushaltes unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Technischer Hintergrund zum inversen Mikroskop (siehe auch Abbildung. 4 und 5):

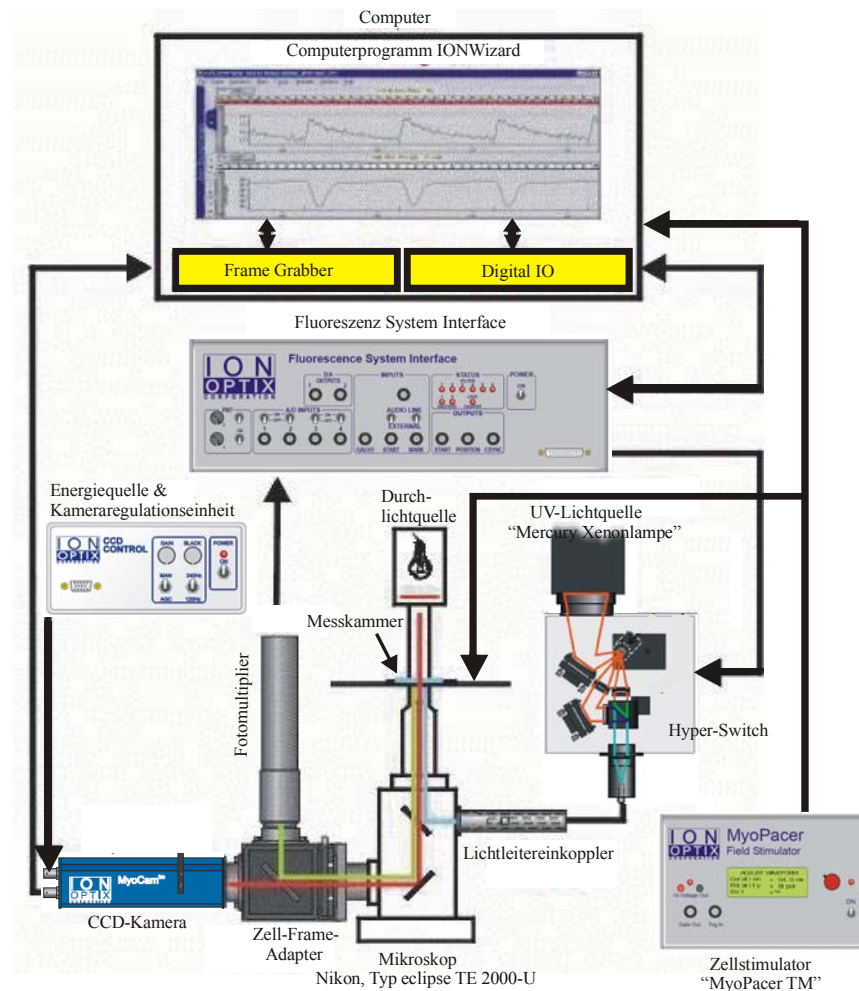


Abbildung 4: Schema des Epifluoreszenz-Setups

Diese Abbildung zeigt schematisch das Fluoreszenz-Setup. Die schwarzen Pfeile deuten die Vernetzung der Geräte untereinander an. Die blauen Linien stellen das Anregungslicht und die grünen Linien das Emissionslicht dar. Die roten Linien stellen das Durchlicht dar, welches von der Kamera aufgenommen wird. Modifizierte Abbildung nach der IonOptix Internet Seite ([www.ionoptix.com](http://www.ionoptix.com)).

Mit einem elektrischen Zellstimulator (MyoPacer TM, IonOptix) wurden die Zellen über eine Stimulationselektrode in einer Feldstimulation (biphasische Impulse, 1 Hz, 12 V) zu rhythmischen Kontraktionen angeregt. Die Temperatureinstellung auf 37°C erfolgte über die kontinuierliche Perfusion (Austauschgeschwindigkeit ~ 3 ml/min) mit kontrolliert temperierter Tyrode. Das zur Anregung des Farbstoffes verwendete Licht (Wellenlänge 360 nm) wurde von einer 75 W Xenonlampe (Ushio, Japan) über einen Anregungsfilter (360±5 nm) produziert.

Mit 40facher Vergrößerung (über ein Ölimmersionsobjektiv) wurde der gewünschte Messbereich (auf der Messkammer) eingestellt. Über Blenden war es möglich, den gewählten Ausschnitt auf eine einzelne Zelle zu begrenzen und somit die Fluoreszenz der gewählten Zelle isoliert zu bestimmen. Der gewählte Messbereich wurde während der Messung nicht mehr verstellt.

Die Ermittlung der Zelllänge sowie der Verkürzungsfraction der ausgewählten Zelle erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera (Philips FTM800NH). Die aufgenommenen Daten wurden in ein „Video Edge-Detection System“ überführt. Das genannte System erkennt die scharfen Kontraste der Zellgrenzen, digitalisiert (Analog-digitaler-Wandler; Digitalisierung: Werte der longitudinalen Zelllänge als Funktion der Zeit mit einer Samplingfrequenz von 240 Hz) diese und leitet sie an einen Computer weiter. Die Datenerfassung, -speicherung und -analyse erfolgte mit dem Programm Labview TM.

Zur Bestimmung der Kalziumkonzentration wurden die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Indo-1 AM) beladenen Zellen mit einer Wellenlänge von 360 nm angeregt. Zwei in den Strahlengang eingeschaltete dichroitische Spiegel spalteten das von der Xenonlampe produzierte Licht in die Wellenlänge des Anregungslichtes und in die der beiden Emissionsmaxima ( 485 nm und 405 nm) des Fluoreszenzfarbstoffes. Dichroitische Spiegel haben eine kritische Wellenlänge. Licht mit einer längeren Wellenlänge als die kritische Wellenlänge kann die Spiegel passieren, solches mit einer kürzeren Wellenlänge wird durch sie reflektiert. Das Anregungslicht gelangt so zum Präparat.

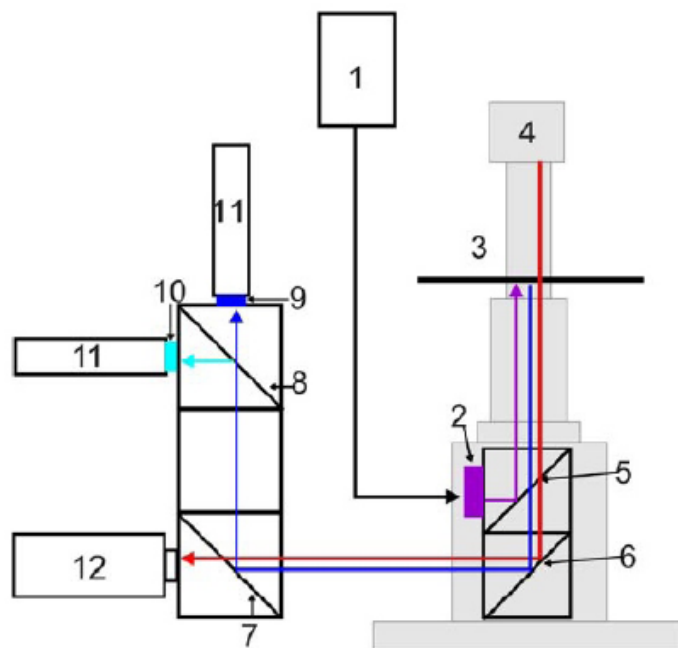
Die kritischen Wellenlängen für die dichroitischen Spiegel liegen bei der Verwendung des Kalziumindikators Indo-1 AM bei 400±5 nm und 480±5 nm. Das Emissionslicht wurde durch Emissionsfilter von Streulicht gereinigt und zur Umwandlung in elektrische Signale bei 405±15 nm und 485±12,5 nm von entsprechenden Photomultiplikatoren (IonOptix, Milton, MA) erfasst. Mit Hilfe des Programms IonWizard der Firma IonOptix wurde die Kalziumkonzentrationen nach Bestimmung des Fluoreszenzquotienten (R) ermittelt. Hierzu musste zunächst die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert werden (siehe Formel 1).

$$R = (F_{405} - F_{\text{Hintergrund } 405}) / (F_{485} - F_{\text{Hintergrund } 485})$$

**Formel 1: Bestimmung der Kalziumkonzentration**

Die Veränderungen der Kalziumkonzentration wurden durch Ermittlung des Fluoreszenzquotienten (R) mit Hilfe des Programms IonWizard (IonOptix) bestimmt. Hierzu wurden die Emissionsmaxima der Lichtwellenlängen 405 nm und 485 nm abzüglich der Hintergrundfluoreszenz ins Verhältnis gesetzt.

Auch die Verkürzungsfraction wurde mit der Software IonWizard der Firma IonOptix ausgewertet. Die ermittelten Rohdaten wurden dann in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel importiert, gespeichert und statistisch ausgewertet.



**Abbildung 5: Strahlengang im Mikroskop bei Messungen mit Indo-1 AM**

1 UV-Lampe, 2 Filter (D365±5 mm), 3 Objektträgertisch mit Messkammer, 4 Rotlichtlampe mit Filter (695 nm long pass), 5 Dichroitischer Spiegel (D380 DCLP), 6 Spiegel, 7 Dichroitischer Spiegel (D685 DCLP), 8 Dichroitischer Spiegel (D440 DCLP), 9 Filter (D485±12,5 mm), 10 Filter (D405±15 mm), 11 PMT, 12 Kamera. (KÖHLHAAS 2006 a; mit freundlicher Genehmigung des Verfassers).

Die oben genannte Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes ermöglichte die Bestimmung einer spezifischen intrazellulären Ionenkonzentration. Die Fluoreszenzfarbstoffe bilden mit spezifischen freien Ionen Chelatkomplexe, deren Fluoreszenzsignal die Eigenfluoreszenz der Zelle deutlich übersteigt. Die Möglichkeit der Bestimmung der Ionenkonzentration ist durch die Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften, welche sich durch die Bildung der Chelatkomplexe verändert, gegeben.

In den Experimenten dieser Arbeit wurde der Farbstoff Indo-1 Acetoxymethylester (AM) (GRYNKIEWICZ et al., 1985; TSIEN et al., 1982; TSIEN, 1980), zur Bestimmung der Kalziumkonzentration eingesetzt, da Indo-1 AM sich durch eine hohe Kalziumselektivität [Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) = 250 nM] (GRYNKIEWICZ et al., 1985) auszeichnet.

Der Kalziumindikator, Indo-1 AM wird aus einem Chelator (BAPTA: 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetic acid) hergestellt. Strukturell besteht Indo-1 AM aus einer Carboxylgruppe, an welche ein Acetoxymethylester gekoppelt ist, worauf die unpolaren Eigenschaften des Farbstoffes beruhen. Die Unpolarität ermöglichen dem Farbstoff, die Zellmembran ins Innere der Zelle zu passieren. Hier werden von unspezifischen Esterasen lipophile Gruppen (Azetat- oder

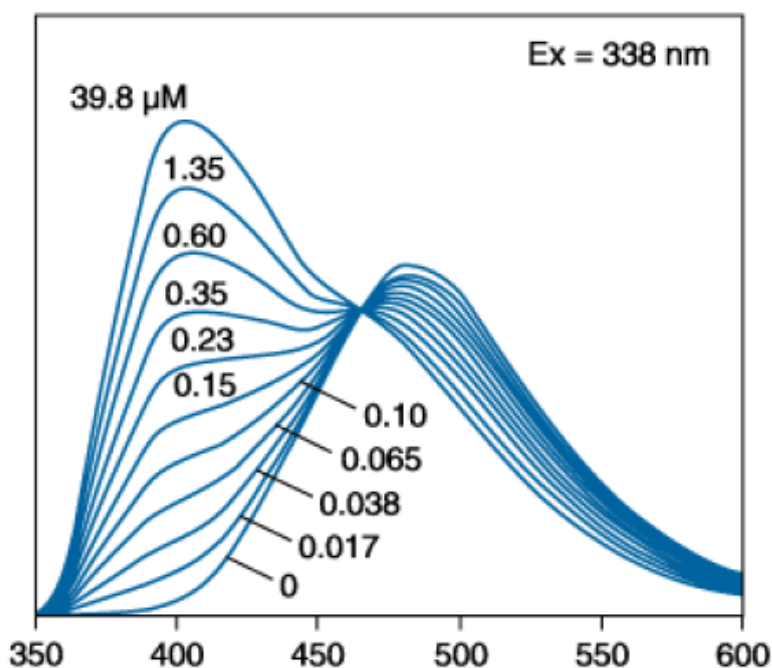


Azetoxy-Methylrest) des Farbstoffes abgespalten. Durch diesen polarisierenden Schritt wird die Membranpassage stark erschwert und der Farbstoff akkumuliert in der Zelle.

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden in zwei Gruppen eingeteilt, die ratiometrischen und die nicht ratiometrischen Farbstoffe. Bei den ratiometrischen Farbstoffen kommt es nach Ionenbindung zu einer Verschiebung der Emissions- und Absorptionsmaxima in kurzwelligere Bereiche. Zu den ratiometrischen Farbstoffen zählt neben Indo-1 AM z.B. Fura-2.

Bei den nicht ratiometrischen Farbstoffen (z.B. Fluo-3; Fluo-4) ändert sich die Intensität der Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von der Bindung an das jeweilige Ion.

Nach Kalziumbindung an Indo-1 AM verschiebt sich bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm die maximale Emissionswellenlänge von 485 nm auf 405 nm bei unverändertem Absorptionsmaximum. Die Fluoreszenzintensität des ermittelten Lichtes im Anregungslicht von 355 nm nimmt daher mit zunehmender Kalziumkonzentration bei 405 nm zu und bei 485 nm ab. Modifikationen des zellulären Kalziumhaushaltes zeigen sich daher in einer Änderung des Emissionslichtes bei 405 nm bzw. 485 nm. Die Fluoreszenzmengeneffizienz von Indo-1 AM ist so hoch, dass sich eine starke Leuchtstärke ergibt. Sowohl Temperaturschwankungen als auch pH-Wert-Verschiebungen haben nur wenig Einfluss auf die Eigenschaften von Indo-1 AM.



**Abbildung 6: Fluoreszenzspektrum von Indo-1 AM**

Auf der X-Achse ist die Wellenlänge in nm aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Intensität der Emission bei 338 nm. Die Diagrammzahlen geben die jeweilige freie Kalziumkonzentration an (THE HANDBOOK (modifiziert), o.J.)

Der Vorteil der Verwendung von ratiometrischen Farbstoffen ist, dass diese quantitative Aussagen über die Ionenkonzentration ermöglichen, da im Falle von Indo-1 AM die Emissionsmaxima in einem festen Verhältnis (Ratio) stehen.

Der Zusammenhang zwischen dem Ratiowert und der Kalziumkonzentration wird von folgender Formel beschrieben (GRYNKIEWICZ et al., 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times ((R - R_{min}) / (R_{max} - R)) \times (S_{f2} / S_{b2})$$

R	berechneter Ratiowert der aufgenommenen Fluoreszenzintensität (z.B. bei $\lambda_{Ex} = 405 \text{ nm}/480 \text{ nm}$ )
$R_{min}$	Ratiowert der aufgenommenen Fluoreszenzintensität im „Kalziumfreien“ Eichpräparat ( $[Ca^{2+}] = 10^{-9} \text{ M}$ )
$R_{max}$	Ratiowert der aufgenommenen Fluoreszenzintensität im „Kalziumgesättigten“ Eichpräparat ( $[Ca^{2+}] > 10^{-4} \text{ M}$ )
$K_d$	Dissoziationskonstante
$S_{f2}$	Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (480 nm) im „Kalziumfreien“ Eichpräparat
$S_{b2}$	Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (480 nm) im „Kalziumgesättigten“ Eichpräparat

#### Formel 2: Zusammenhang zwischen dem Ratiowert und der Kalziumkonzentration

Der in der Formel 2 verwendete Quotient  $S_{f2}/S_{b2}$  beschreibt einen Korrekturfaktor, durch welchen die Beeinflussung des Farbstoffes durch Geräteparameter und die Versuchsbedingungen berücksichtigt wird (GOLLNICK et al., 1992). Hieraus ergibt sich, dass die ermittelten Werte vergleichsweise unabhängig von der Farbstoffkonzentration, dem Farbstoffverlust, dem Ausbleichen des Farbstoffes, von der untersuchten Objektstärke und den möglichen Intensitätsschwankungen der Anregungswellenlänge sind. Grund hierfür ist, dass sich diese Störfaktoren im gleichen Maße auf die Fluoreszenzintensität beider Wellenlängen auswirken, und sich von daher die potentiellen Fehler bei der Division heraus kürzen.

### 2.1.3 Versuchsprotokoll

In den Einzelzellexperimenten wurde der Einfluss der PI3K-Hemmung auf die  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelte Veränderung der Verkürzungsfraction und der Kalziumtransientenamplitude gemessen.

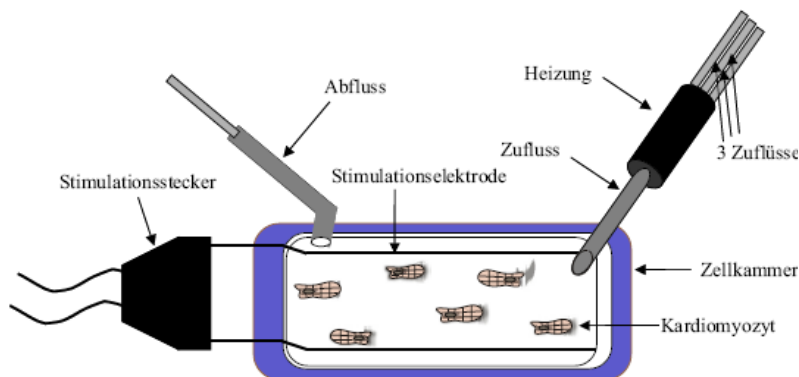
Zur Hemmung der PI3K wurde Wortmannin verwendet, welches ursprünglich von *Penicillium wortmannii* isoliert wurde. Wortmannin zeichnet sich durch ein geringes Molekulargewicht, eine gute Löslichkeit in DMSO (in wässriger Lösung wird Wortmannin nach einigen Stunden instabil) und eine gute Zellgängigkeit aus. In der Zelle bindet Wortmannin kovalent an die katalytische Untereinheit der PI3K und hemmt diese durch Modifikation irreversibel. LY294002 ein anderer synthetisch hergestellter reversibler Hemmstoff der PI3K, welcher an der ATP-Bindungsstelle der PI3K wirkt, beeinflusst im Gegensatz zu Wortmannin Kaliumkanäle, die Aktionspotentialdauer und die Kontraktilität in Kardiomyozyten (SUN et al., 2004; VANHAESEBROECK & WATERFIELD,

1999), weshalb für die Versuche dieser Arbeit die Verwendung von Wortmannin als Hemmstoff der PI3K gewählt wurde.

Zur Adhäsion der Zellen am Boden der Messkammer wurden die Messkammern mit Laminin beschichtet und die Zellsuspension mit Medium M199 für 15 Minuten auf das Laminin gegeben.

Anschließend erfolgte der Austausch des Mediums M199 gegen die Indo-1 AM-Farbstofflösung (Molecular Probes, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) und die 20 minütige Beladung der Zellen bei Raumtemperatur. Je nach Gruppe wurde gleichzeitig mit der Farbstoffbeladung mit DMSO (Sigma,  $\leq 0,1 \text{ ml/L}$ ) oder Wortmannin (Sigma, 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , in DMSO gelöst) inkubiert.

Nach der Inkubation folgte ein Waschvorgang, welcher je nach Gruppe mit oder ohne Wortmannin mit der entsprechenden phenylephrinfreien Tyrode (siehe 2.1.4) über acht Minuten mit einer Flüssigkeitsaustauschgeschwindigkeit von 3 ml/Minute vorgenommen wurde. Durch den Waschvorgang wurde noch veresteter freier Farbstoff entfernt. Die Konzentration der Farbstoffbeladung wurde so gewählt, dass ein gutes Lichtsignal zu erwarten war, jedoch der puffernde Einfluss durch die Ionenbindung keine Auswirkungen auf die Zellfunktion hatte.



**Abbildung 7: Zellkammer zur Einzelzell-Fluoreszenzmessung im inversen Mikroskop (Firma Nikon, Typ eclipse TE 2000-U)**

Auf der Abbildung sieht man eine Myozytenmesskammer. Mit einem elektrischen Zellstimulator (MyoPacer TM, IonOptix) wurden die Zellen über eine Stimulationselektrode in einer Feldstimulation (biphasische Impulse, 1 Hz, 12V) zu rhythmischen Kontraktionen angeregt. Die Temperatureinstellung auf 37°C erfolgte über die kontinuierliche Perfusion (Austauschgeschwindigkeit  $\sim 3 \text{ ml/min}$ ) mit durch eine Heizung kontrolliert temperierter Tyrode. Die Tyroden wurde mit einer aufeinander abgestimmten, definierten Zufluss- und Abflussgeschwindigkeit ausgetauscht.

Über eine Heizung wurde gewährleistet, dass die verwendeten Tyroden während des kompletten Versuches eine Temperatur von 37°C hatten. Die anschließende Messung erfolgte unter einer Stimulation mit 20 mV mit einer Frequenz von 1 Hz (Feldstimulation).

Vor dem Beginn der eigentlichen Messung wurde eine geeignete Zelle anhand visueller Kriterien ausgewählt. Zu diesen zählten: Eine regelmäßige, schnelle, von beiden Zellenden ausgehende, starke

Kontraktion sowie eine gleichmäßige Zellform. Die isolierte Evaluierung der Fluoreszenz der gewählten Zelle wurde durch Abdeckung des Hintergrundes mit Blenden erreicht.

Zum Start der ersten Messung wurde zunächst der Fluoreszenzfilter für 15-20 Kalziumtransienten eingedreht und die Verkürzungsfraction sowie die Kalziumkonzentration der gewählten Zelle ermittelt. Der Filter wurde lediglich für die Messung eingedreht, damit die Ausbleichung des Farbstoffes reduziert werden konnte.

Danach wurde auf die phenylephrinhaltige Tyrode (10  $\mu\text{mol/L}$ , je nach Protokoll mit DMSO oder Wortmannin) umgestellt und wiederum die Verkürzungsfraction und die Kalziumtransienten der gewählten Zelle aufgezeichnet.

Die Inkubation mit dem etablierten  $\alpha$ -Agonisten Phenylephrin gilt als irreversibel, da ein vollständiges Auswaschen von Phenylephrin nicht möglich ist (LAYLAND & KENTISH, 2000; NAGASHIMA et al., 1996; BRUCKNER et al., 1984).

In dem nachfolgenden dritten Schritt wurde ein zellfreier Bereich nahe der gemessenen Zelle eingestellt, um die Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen.

Die angewandte Technik und das Protokoll zu den durchgeführten Messungen (Zellverkürzung und Kalziumtransientenamplitude) wurden anhand der in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise verfasst (KOHLHAAS et al., 2006 b; MAIER et al., 2003).

### 2.1.4 Material und Messlösungen (isolierte Kardiomyozyten)

Die Herstellung sämtlicher Lösungen erfolgte bei einem pH-Wert von 7,54 und bei Raumtemperatur.

#### Tyrode

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Tyrode Ohne Ca<sup>2+</sup></b>	Dest. Wasser	
	NaCl	137 mmol/l
	KCl	5,4 mmol/l
	MgSO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
	HEPES (Sigma#H3375)	20 mmol/l
	Glucose	14,98 mmol/l
	Penicillin (Sigma#P4333)	100 U/ml
	Streptomycin (Sigma#P4333)	0,02 mmol/l
<b>Tyrode mit Ca<sup>2+</sup></b>	CaCl <sub>2</sub>	1 mmol/l

#### Kollagenasehaltige Enzymlösung

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Enzymlösung</b>	Kollagenase Typ II (Biochrom, Lot#MOK4224)	250 U/ml
	Protease Typ XIV(Sigma#P5147)	0,04 mg/ml
	Taurin (Sigma#T9931)	60 mmol/l
	D,L-Glutaminsäure (Sigma#G1126)	8 mmol/l
	D,L-Carnitin (Sigma#9500)	2 mmol/l
	CaCl <sub>2</sub>	0,025 mmol/l

#### Albuminhaltige Stopplösung (2%)

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Albuminhaltige Stopplösung (2%)</b>	Tyrode	100 ml
	Albumin Fraktion V (Sigma#A2513)	2000 mg/dl
	2,3-Butan-Dion-Monoxim (BDM) (Sigma#B0753)	20 mmol/l
	CaCl <sub>2</sub>	0,5 mmol/l

**Modifiziertes Medium M199**

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Modifiziertes M199</b>	M199 Medium (Sigma#M7528)	500 ml
	Taurin (Sigma#T9931)	5 mmol/l
	D,L-Carnitin (Sigma#C9500)	5 mmol/l
	Kreatin (Sigma#0780)	5 mmol/l
	Penicillin (Sigma#P4333)	100 IU/ml
	Streptomycin (Sigma#P4333)	0,1 mg/ml
	L-Glutamin (PAA#M11-004)	2 mmol/l

**M199 Nährmedium**

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Nährmedium M199</b>	M199 Medium (Sigma#M7528)	500 ml
	Taurin (Sigma#T9931)	5 mmol/l
	DL-Carnitin (Sigma#C9500)	5 mmol/l
	Kreatin (Sigma#0780)	65,5 mg/l
	Penicillin (Sigma#P4333)	100 U/ml
	Streptomycin (Sigma#P4333)	0,1 mg/ml
	L-Glutamin (PAA#M11-004)	2 mmol/l

**Hepes (N-(2-hydroxyethyl)piperazine- N'-2-ethanesulfonic acid) Tyrode**

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>mmol/l</i>	<i>MG(g/mol)</i>	<i>1x</i>	<i>10x</i>
<b>Hepes Tyrode</b>	NaCl	140	58,44	8,18 g	81,82 g
	KCl	4	74,56	298,2 mg	2,98 g
	MgCl <sub>2</sub>	1	95,21	95,2 mg	0,95 g
	HEPES	5	238,31	1,19 g	11,92 g
	Glucose	10	180,16	1,8 g	18 g

**Phenylephrin- und Wortmannin- Stocks**

<i>Lösung/ Stock</i>	<i>Molekulargewicht</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Zielkonzentration</i>	<i>Aufbewahrung</i>
<b>Phenylephrin</b>	203,67 g/l	Dest. Wasser	10 mmol/l	-20°C
<b>Wortmannin</b>	428,4 g/l	DMSO	1 mmol/l	-20°C
<b>Wortmannin</b>	428,4 g/l	Hepes Tyrode	0,1 mmol/l	-20°C

**Indo-1 AM cell permanent Stock**

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Basisfluoreszenzlösung</b>	Pluronic acid Lösung (angewärmt)	5µl
	Indo-1 am cell permanent Stock	50µl
	Hepes Tyrode (1 mM Kalzium)	5 ml

**Kalziumfluoreszenzmesslösungen**

<i>Lösung</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Einsatzbereich</i>
<b>Hepes Tyrode</b>	100 ml	Farbstoffauswaschen
<b>DMSO</b>	10 µl	Grundlösung für den Basiswert
<b>Hepes Tyrode</b>	100 ml	Messung im 0,5-1 Minuten Abstand bis zum Stady State
<b>DMSO</b>	10 µl	
<b>Phenylephrin 10 mM</b>	100 µl	
<b>Hepes Tyrode</b>	100 ml	Farbstoffauswaschen
<b>Wortmannin 1 mM</b>	10 µl	Grundlösung für den Basiswert
<b>Hepes Tyrode</b>	100 ml	Messung im 0,5-1 Minuten Abstand bis zum Stady State
<b>Wortmannin 1 mM</b>	10 µl	
<b>Phenylephrin 10 mM</b>	100 µl	

Für die Experimente wurden zwei Lösungsansätze hergestellt:

Im ersten Lösungsansatz wurde die oben aufgeführten Basisfluoreszenzlösungen im Verhältnis 1 ml: 1 µl mit dem 0,1 mM Wortmannin- Stock versehen.

Im zweiten Lösungsansatz wurde volumenidentisch DMSO zugeführt.

## **2.2 Kontraktilitätsmessungen an intakten Kaninchenherzmuskelstreifen**

### **2.2.1 Präparation der Herzmuskelstreifen**

Die Isolierung des Kaninchenherzens erfolgte wie im Abschnitt 2.1.1 beschrieben.

Die Koronarien wurden direkt nach der Trennung aus dem Blutkreislauf mit BDM haltiger Dissektionslösung luftfrei über die Aorta gespült.

Die nachfolgend beschriebene Präparation der Herzmuskelstreifen erfolgte vollständig in BDM-haltiger Dissektionslösung, um Muskelkontraktionen zu vermeiden. Mit Hilfe einer Carbogenbegasung ( 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) während der Präparation wurde zum Gewebeschutz der pH-Wert konstant bei 7,4 gehalten, da Carbogen mit Hydrogencarbonat ein offenes Puffersystem bildet.

Unter Sicht durch ein Binocular, wurde mit einer kleinen Schere und einer Pinzette das Herz so eröffnet, dass die Trabekel und Papillarmuskeln des rechten Ventrikels unbeschädigt begutachtet werden konnten. Die Wahl der rechten Kammer als Hauptquelle für das Material ergab sich aus der hohen Übereinstimmung der Anforderungen an die Muskelstreifen und der physiologischen Beschaffenheit der Muskulatur der rechten Kammer.

Bevorzugt ausgewählt wurden unverzweigte Trabekel oder Papillarmuskeln, da jede Verletzung der Zellgemeinschaft unerwünschte Kontraktionen und Arrhythmien sowie unvorhersehbare Funktionsänderungen begünstigte. Die geeigneten Maße lagen bei einer Länge von ca. 2,5-5,5 mm, einer Breite von 0,6-1 mm und einer Tiefe von 0,45-1 mm. Eine rosige Farbe, welche für den Myoglobin- und Fibrillengehalt und damit indirekt für die Kontraktilität des Muskelgewebes stand, wurde außerdem als Auswahlkriterium mit einbezogen. Es wurde streng darauf geachtet, dass die Streifen eines Versuches vergleichbare Maße hatten.

Die endgültige Präparation des gewählten Herzmuskelstreifens erfolgte unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der Streifen zur Kraftmessung in die Messanlage eingespannt werden mussten. Damit dies optimal ohne Verletzung des sich kontrahierenden Zellverbandes erfolgen konnte, wurde eine spezielle Zuschnittsform der Enden gewählt (ein Ende in Form eines „Muskelwürfels“, das andere im Falle eines Papillarmuskels aus einem Teil des Klappensegels und im Falle eines Trabekels in Form einer „Hantel“).

Im letzten Schritt der Präparation erfolgte die Ausmessung des Muskelstreifens (mit Hilfe einer im Binocular integrierten Messscala) in Länge, Breite und Tiefe.

### **2.2.2 Kraftmessung der Muskelstreifen**

Mit Hilfe eines Kraftaufnehmers (Fa Scientific Instruments, Heidelberg, Typ KG3) wurde die vom Herzmuskelstreifen entwickelte Kraft aufgezeichnet.

Hierzu wurde der Herzmuskelstreifen in eine spezielle Vorrichtung (verbunden mit dem Kraftaufnehmer) der Messanlage eingespannt. Die Aufhängevorrichtung konnte der Länge des Muskelstreifens exakt angepasst werden, um die Übertragung der entwickelten Kraft auf den

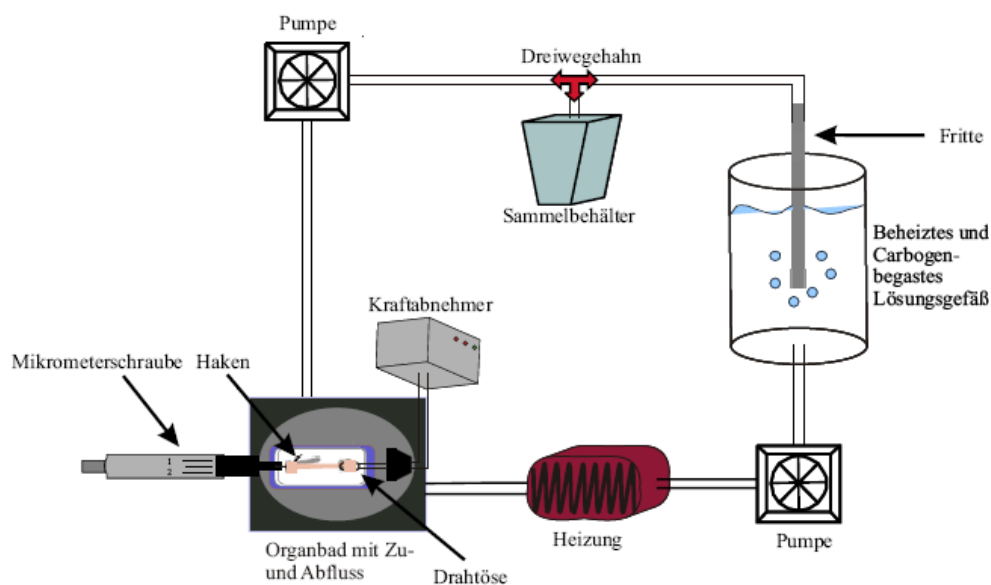


Kraftaufnehmer zu optimieren. Messfehler durch Überstreckung oder Beugung des Muskelstreifens konnten so minimiert werden.

Um das Muskelgewebe mit den gewünschten Messlösungen umspülen zu können, war die Aufhängungsvorrichtung in ein Organbad (eine in Kunststoff gefräste Nut) integriert. Ein Zu- und Ablauf an den entgegengesetzten Enden des Organbades gewährleistete den kontinuierlichen, notwendigen Austausch der Lösungen. Die Messlösung wurde von einem geschlossenen Flüssigkeitskreislauf (doppelwandig mit Wasser gefüllt) mit integrierter Heizung umspült, wodurch die gewünschte Messtemperatur von 37°C konstant gehalten werden konnte. Durch eine zwischengeschaltete Pumpe konnte die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsaustausches kontrolliert und reguliert werden. Die Unterbrechung des Flüssigkeitskreislaufes, zum Zweck des Lösungsaustausches, erfolgte durch Umleitung des Ablaufes in einen Abwurfbehälter.

Die Herzmuskelstreifenkontraktion wurde vom Kraftaufnehmer in Form einer minimalen Auslenkung (quasi-isometrische Kontraktion) registriert. Ein nachgeschalteter Brückenverstärker (Fa. Scientific Instruments) wandelte die Zugspannung in ein proportional-analoges Spannungssignal um, welches an eine analog/digitale Wandlerkarte (Fa. National Instruments, Typ: PCI 1200) des Messcomputers weitergeleitet wurde. Unter Verwendung der Software LabVIEW® konnten die Signale verstärkt und analysiert werden.

Die elektrische Feldstimulation (1 Hz, Amplitude 3 bis 5 V) des Herzmuskelstreifens übernahm ein Stimulator der Firma Scientific Instruments (Heidelberg). In die Plastiknut eingelassene Kontaktdrähte übertrugen die Impulse auf das Organbad und somit auch auf den Muskelstreifen.



**Abbildung 8: Schema der Muskelstreifen-Kraft Messanlage**

Diese Abbildung zeigt schematisch die Muskelstreifen-Kraft Messanlage. Die schwarzen Linien deuten die Vernetzung der Geräte untereinander an.

### 2.2.3 Versuchsprotokoll

In den Myokardstreifenexperimenten wurde der Einfluss der PI3K-Hemmung auf die Kraftsteigerung in  $\alpha_1$ -adrenerg stimuliertem Kaninchenmyokard untersucht.

Hierzu wurde ein gepaartes Studiendesign gewählt: Aus demselben Herzen wurden zwei Muskelstreifen aus derselben Region entnommen und parallel in einer Doppelmessanlage untersucht. Die Wahl dieser abgewandelten Form des gepaarten Versuches erfolgte, da die verwendeten Substanzen das Gewebe irreversibel beeinflussen.

Nach erfolgter Aufhängung der Streifen in die dafür vorgesehene, oben beschriebene Vorrichtung wurden diese für 30 Minuten, in entspanntem Zustand, mit Krebs-Henseleit Lösung (0,25 mM Kalzium) umspült und mit 1 Hz stimuliert.

Danach folgte der Kalziumaufbau, welcher schrittweise (0,25 mM alle 2 Minuten) bis zu einer Endkonzentration von 1,25 mM vorgenommen wurde, um eine Irritation des Herzmuskelgewebes durch zu schnellen Kalziumanstieg zu verhindern.

Es folgte eine „Einschlagphase“ von 30 Minuten bei einer Feldstimulation von 1 Hz, 1,25 mM Kalzium und einem physiologischen pH-Wert. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Streifen auf Werte von 2 mN/mm<sup>2</sup> gedehnt. Grund hierfür ist zum einen die dadurch zu erreichende physiologische Sarkomerlänge und zum anderen wird durch diese Vordehnung die größtmögliche Stabilität für den folgenden Versuch erreicht (KENTISH et al., 1986).

Der Dehnung folgte die Inkubation der Streifen mit 100 nM Wortmannin beziehungsweise 100 nM DMSO (Kontrollstreifen) über einen Zeitraum von 40 Minuten. Die Verdopplung der Inkubationszeit im Vergleich zu den Einzelzellexperimenten wurde aufgrund der größeren Materialdicke (Einzelzelle vs. Muskelstreifen) gewählt. Nach Ermittlung der unter dieser Inkubation entwickelten Kraft wurde die Inkubation mit 10  $\mu$ M Phenylephrin plus Wortmannin (100 nM) beziehungsweise 10  $\mu$ M Phenylephrin plus DMSO (100 nM) vorgenommen und die entwickelte Kraft erneut registriert.

### 2.2.4 Material und Messlösungen (Herzmuskelstreifen)

Die Herstellung sämtlicher Lösungen erfolgte bei einem pH-Wert von 7,54 und bei Raumtemperatur.

#### Dissektionslösung

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Molekulargewicht</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Dissektions- Lösung</b>	Natriumchlorid	116 mM	116,02 mmol/l
	Natriumhydrogencarbonat	20 mM	20,24 mmol/l
	Glucose	10 mM	10 mmol/l
	Kaliumchlorid	5 mM	5 mmol/l
	Natrium-di-Hydrogenphosphat	2 mM	2 mmol/l
	Magnesiumchlorid	1,2 mM	1,2 mmol/l
	Natriumsulfat	1,2 mM	1,2 mmol/l
	Kalziumchlorid 2,3-Butan-Dion-Monoxim (BDM)	0,2 mM 20 mM	0,2 mmol/l 20 mmol/l

#### Krebs-Henseleit Lösung

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Konzentration g/Stock 1L</i>
<b>Krebs-Henseleit Lösung</b>	NaCl	6,78 g/l	67,80
	KCl	0,373 g/l	3,73
	MgCl <sub>2</sub> (6 H <sub>2</sub> O)	0,244 g/l	2,44
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,170 g/l	1,70
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	0,276 g/l	2,76

Vor Versuchsbeginn wurden 100 ml des Stocks durch die unten aufgeführten Substanzen zur Krebs-Henseleit Solution komplettiert.

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Krebs-Henseleit Solution Komplettiert</b>	Glucose	1,8 g
	NaHCO <sub>3</sub>	1,7 g
	2,3-Butan-Dion-Monoxim (BDM)	1,8 g

#### Phenylephrin und Wortmannin- Stocks

siehe unter 2.1.4

## 2.3 Messung der Kalziumsensitivität (Semi-Skinned Fiber)

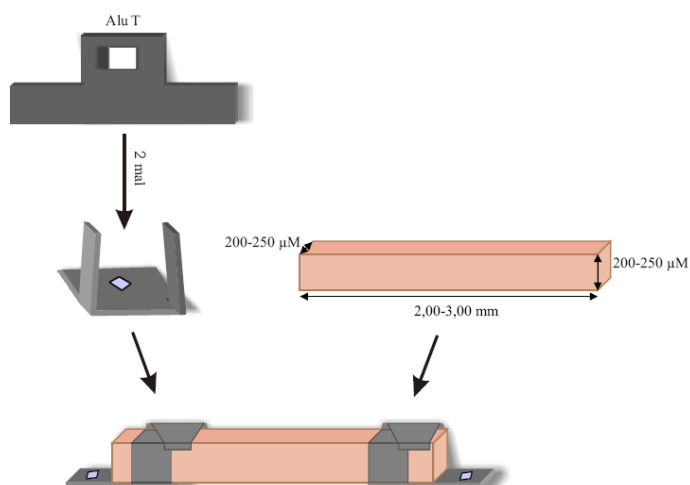
### 2.3.1 Präparation der Herzmuskelstreifen

Zum Vorgehen der Kaninchenherzentnahme sowie der Streifenauswahl und Streifenentnahme siehe unter 2.1.1 und 2.2.1.

Für die Semi-Skinned Fiber-Versuche wurde eine Muskelstreifenlänge von 2 mm bis 5 mm und eine Tiefe zwischen 0,2 bis 0,3 mm angestrebt. Die genannten Maße wurden am ehesten von kurzen, kleinen und unverzweigten Papillarmuskeln erfüllt.

Um die genauen Maße zu erzielen, wurden die Myokardstreifen, wenn nötig, der Länge nach halbiert oder geviertelt sowie gekürzt und anschließend in Relaxationslösung über eine Scala im Binocular ausgemessen.

Im letzten Vorbereitungsschritt wurde an den Enden des Muskelstreifens ein sogenanntes Alu-T befestigt (siehe Abbildung 9). Die Alu-T's ermöglichten das Einhängen des Streifens in die Messanlage.



**Abbildung 9: Befestigung der Herzmuskelstreifen**

Im ersten Schritt faltet man pro Herzmuskelstreifen zwei Alu-T's wie auf der Abbildung gezeigt. Im zweiten Schritt werden die Enden des zugeschnittenen Herzmuskelstreifens mit den Laschen des Alu-T's umschlossen. Mit Hilfe der Alu-T's erfolgt die anschließende Aufhängung des Herzmuskelstreifens in die Messanlage.

### 2.3.2 Semi-Skinned Fiber-Methode

Die Semi-Skinned Fiber-Methode ermöglicht die myokardiale Kalziumsensitivitätsmessung. Durch Permeabilisierung der Zellmembran wird eine für Ionen offene Verbindung zwischen dem Zytosol und dem Extrazellarraum geschaffen, die eine direkte Regulation der intrazellulären Ionenkonzentration ermöglicht. Auf diese Weise gelingt eine Beurteilung der myofilamentären Kraftentwicklung bei definierter Kalziumkonzentration.

Durch eine teilweise Permeabilisierung (Semi-Skinned Fiber) bleibt die Zellmembran teilweise erhalten, so dass Enzyme und Strukturproteine in der Zelle verbleiben und die myofilamentäre Kalziumansprechbarkeit modulieren können.

Zur Semipermeabilisierung wurde  $\beta$ -Escin verwendet.  $\beta$ -Escin, ein Saponinester, der aus der Rosskastanie (*Aesculentum hippocastaneum*) gewonnen wird, löst Cholesterol aus der Zellmembran. Dadurch entstehen Poren in der Größenordnung von 150 kDa (IIZUKA et al., 1994), durch die niedermolekulare Stoffe in den Intrazellularraum gelangen können.

Der Einsatz von  $\beta$ -Escin hat keine Auswirkungen auf die Interaktionen zwischen Rezeptor und Effektor. Damit bleiben die intrazellulären Signalkaskaden funktionell bestehen. Die monomeren G-Proteine, mit einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa, verbleiben somit in der Zelle (SATO et al., 1992).

Über die Dauer der Inkubationszeit und die eingesetzte  $\beta$ -Escin-Konzentration ist die Stärke der Permeabilisierung zu steuern.

Die Permeabilisierung mit  $\beta$ -Escin erfolgte an den eingespannten Gewebepräparaten in der Messapparatur.

### 2.3.3 Skinned Fiber-Messanlage

Die verwendete Messanlage ermöglichte es, den Muskelstreifen schonend aufzuhängen, mit den gewünschten Lösungen in einem Organbad zu inkubieren und die Kraft mit Hilfe von einem sensiblen Kraftdetektor zu messen.

Zum Einhängen des Muskelstreifens standen in dem Organbad der Messanlage zwei Haken zur Verfügung, welche mit einer Mikrometerschraube der Länge des Muskelstreifens angepasst werden konnten. Des Weiteren bestand eine Verbindung zum Kraftabnehmer.

Eine in das Organbad integrierte Nut konnte mit der gewünschten Messlösung gefüllt werden. Der Lösungsaustausch erfolgte manuell mit einer Insulinspritze.

Die Registrierung und Verarbeitung der vom Muskelstreifen entwickelten Kraft gleicht der unter 2.2.1 beschriebenen.

### 2.3.4 Versuchsprotokoll

In den Semi-Skinned Fiber-Experimenten wurde der Einfluss der PI3K-Hemmung auf die Kalziumsensitivität in  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Myokardstreifen untersucht.

Hierzu wurden die Muskelstreifen im ersten Schritt spannungsfrei in Relaxationslösung über die Alu-T's in die Messanlage eingehängt.

Im zweiten Schritt folgte die teilweise Permeabilisierung, indem die Relaxationslösung durch  $\beta$ -Escin ersetzt wurde. Die Inkubation mit 35  $\mu$ M  $\beta$ -Escin bei Zimmertemperatur (Skinning-Vorgang) dauerte 30 Minuten.

Darauf folgte die dreimalige Waschung des Muskelstreifens (in der Aufhängung) mit Relaxationslösung über ca. 30 Minuten.

Vor Beginn der entgeltigen Messungen wurde der Myokardstreifen durch vorsichtige Annäherung der Haken so positioniert, dass von der Messanlage gerade keine Kraft mehr gemessen wurde. Zum Start der Messungen wurde die Relaxationslösung durch die erste Messlösung (2,99E -11M) ersetzt. Darauf folgte die Inkubation des Myokardstreifens mit Messlösungen steigender Kalziumkonzentration bis zur Inkubation mit reiner Aktivierungslösung. Die Dauer der Inkubation mit der jeweiligen Kalziumkonzentration ergab sich aus der Zeit, die der Streifen benötigte, um seine höchst mögliche Kraft zu entwickeln.

Zur Beantwortung der vorliegenden Fragestellung wurde das beschriebene Protokoll für drei verschiedene Gruppen durchgeführt, wozu die Messlösungen mit

DMSO (100 nM)

DMSO (100 nM) plus Phenylephrin (10 µM)

DMSO (100 nM) plus Phenylephrin (10 µM) plus Wortmannin (100 nM)

versehen wurden.

In der dritten Gruppe wurde der Muskelstreifen bereits während des Skinningvorganges mit Wortmannin (100 nM) inkubiert.

	Einhängen des Streifens in Relaxationslösung	β-Escin	Waschen mit Relaxationslösung 30 Minuten			Kalzium Aktivierungslösung								
			1.	2.	3.	2,99E -11M	3,73E -7M	9,94E -7M	1,49E -6M	2,23E -6M	3,46E -6M	5,87E -6M	1,25E -5M	5,15E -5M
1. Gruppe		30 Minuten												
	<b>DMSO</b>													
2. Gruppe														
	<b>DMSO</b>													
3. Gruppe						<b>Phenylephrin</b>								
	<b>DMSO + Wortmannin</b>													
						<b>Phenylephrin</b>								

**Abbildung 10: Tabellarische Darstellung des Semi-Skinned Fiber-Versuchsprotokolls.**

Dem zeitlichen Ablauf des Versuches folgend, zeigt die Tabelle alle Versuchsschritte der Reihenfolge nach auf (für alle drei Gruppen identisch). Zusätzlich ist anhand der farbigen Balken der Zeitpunkt und die Dauer der Inkubation mit DMSO, Phenylephrin und Wortmannin gekennzeichnet. Blau: DMSO (100 nM); Gelb: Phenylephrin (10 µM); Grün: DMSO (100 nM) + Wortmannin (100 nM)

### 2.3.5 Material und Messlösungen (Semi-Skinned Fiber)

Die Herstellung sämtlicher Lösungen erfolgte bei einem pH-Wert von 7,54 und bei Raumtemperatur.

#### **β-Escin-Stock**

<i>Lösung/ Stock</i>	<i>Molekulargewicht</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Zielkonzentration</i>	<i>Aufbewahrung</i>
<b>β-Escin</b>	1101,23 g/l	Methanol	35 nM	-20°C

#### **β-Escin-Skinninglösung**

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>β-Escin-Skinninglösung</b>	β-Escin (35 nM)	2 µl
	Imidazol (20 mM)	1000 µl
	RR	500 µl
	AA	500 µl

#### **Imidazol-Stock (20 mM)**

<i>Lösung/ Stock</i>	<i>Molekulargewicht</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Zielkonzentration</i>	<i>Aufbewahrung</i>
<b>Imidazol</b>	68,08 g/l	aqua dest.	20 mM	-20°C

#### **Phenylephrin-Stock (10 mM) in Imidazol**

Das Ansetzen des 10 mM Phenylephrin-Stocks erfolgte wie unter 2.1.4 aufgeführt.

Die Verdünnung des 10 mM Stocks wurde mit Imidazol im Verhältnis 1:10 vorgenommen, so dass eine 1 mM Lösung entstand.

#### **Wortmannin-Stock (1 mM) in Imidazol**

Das Ansetzen des 1 mM Wortmannin-Stocks erfolgte wie unter 2.1.4 aufgeführt.

Die Verdünnung des 1 mM Stocks wurde mit Imidazol im Verhältnis 1:100 vorgenommen, so dass eine 10 µM Lösung entstand.

**Versuchslösungen**

<i>Lösung</i>	<i>Imidazol</i> 20 mM	<i>DMSO</i>	<i>Phenylephrine in</i> <i>Imidazol- Stock</i> <i>(1 mM)</i>	<i>Wortmannin in</i> <i>Imidazol- Stock</i> <i>(10 µM)</i>
<b>Imidazol + DMSO</b>	490 µl	10 µl	-	-
<b>Imidazol + DMSO</b> <b>+ Phenylephrin</b>	480 µl	10 µl	10 µl	-
<b>Imidazol + Wortmannin</b> <b>+ Phenylephrin</b>	480 µl	-	10 µl	10 µl

**Relaxations-(RR-) Lösung und Aktivierungs- (AA-) Lösung**

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Molekulargewicht</i>	<i>Konzentration</i>	
<b>Relaxations (RR)- Lösung</b>	Imidazol 20 mM	68,08 mM	68,1 mg	
	ATP 10 mM	605,2 mM	605,2 mg	
	Creatininphosphat 10 mM (-20 °C im Kühlraum)	327,2 mM	327,2 mg	
	Und	Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) 5 mM	65,01 mM	32,5 mg
		EGTA 5 mM	380,4 mM	190,2 mg
<b>Aktivierungs (AA)- Lösung</b>	MgCl <sub>2</sub> 12,5 mM	1M Stocklösung	1,25 ml Stocklösung	
	CaCl <sub>2</sub> 5 mM( nur in AA-Lösung)	1M Stocklösung	500 µl Stocklösung	

RR-Lösung = pCa 8,0

AA-Lösung = pCa 4,34

Die Reagenzien wurden mit destilliertem Wasser auf 30 ml aufgefüllt. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit KOH auf einen pH-Wert von 6,7. Darauf folgend wurde der Erlenmeyerkolben bis zur 50 ml Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lösungen wurden bei -20°C in 5 ml Aliquots gelagert.



**Lösungen für den Kalziumaufbau**

<i>Lösung</i>	<i>RR [ml]</i>	<i>AA [ml]</i>	<i>Imidazol [ml] + DMSO [ml]</i>	<i>Imidazol [ml] + DMSO [ml] + Phenylephrin [ml]</i>	<i>Imidazol [ml] + Phenylephrin [ml] + Wortmannin [ml]</i>
<b>R</b>	250	0	250	RR + Imidazol + DMSO	RR + Imidazol + Wortmannin + DMSO
<b>0,2</b>	40	10	50	50	50
<b>0,4</b>	30	20	50	50	50
<b>0,5</b>	25	25	50	50	50
<b>0,6</b>	20	30	50	50	50
<b>0,7</b>	15	35	50	50	50
<b>0,8</b>	10	40	50	50	50
<b>0,9</b>	5	45	50	50	50
<b>A</b>	0	50	50	50	50

## 2.4 Proteinexpressions- und Phosphorylierungslevel (Western Blot)

### 2.4.1 Versuchsprotokoll

Das Verfahren des Western Blots wurde zur Bestimmung der Proteinexpression und des Protein Phosphorylierungslevels gewählt. Die Durchführung erfolgte wie vielfach in der Literatur beschrieben (JACOBSHAGEN et al., 2008). Im Wesentlichen wurden folgende Schritte vorgenommen:

Um die Zellproteine für die Western Blot-Analyse zu gewinnen, mussten zunächst die isolierten Kardiomyozyten (siehe 2.1.1) mechanisch in 200  $\mu$ L Lysepuffer homogenisiert werden, um das Sarkolemm zu zerstören. Zur Vermeidung von unerwünschten Proteinveränderungen erfolgte dieser Vorgang bei 0°C. Die nachfolgende Zentrifugation trennte den Zelldetritus von den Proteinen.

Damit bei der Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Masse im Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)-Gel vergleichbar beladene Gele erzielt werden konnten, musste die Gesamtproteinkonzentration des Überstandes mit Hilfe des Bicinchoninic-Acid-Protein-Assay (BCA<sup>TM</sup>; PIERCE BCA<sup>TM</sup> A No. 23223, B No. 23224) bestimmt werden. Dies ermöglichte die Festlegung des Ladevolumens der Gele.

Im BCA<sup>TM</sup>-Protein-Assay wird durch Peptidbindungen im alkalischen Milieu Kupfer<sup>2+</sup> (Cu<sup>2+</sup>) zu Kupfer (Cu) reduziert. Je höher die Proteinkonzentration ist, desto mehr Cu<sup>2+</sup> wird reduziert. Die Komplexbildung von Cu<sup>2+</sup> und BCA<sup>TM</sup> erscheint bei Tageslicht violett. Die Extinktion gilt als Maß der Proteinkonzentration und kann bei 562 nm mit einem Photometer aufgezeichnet werden.

Danach folgte die Auftragung der Proteine auf die frisch hergestellten Ladegele (4% Polyacrylamid). Zuvor wurden die Proteine mit Hilfe eines Probenpuffers gleichmäßig negativ geladen und blau eingefärbt, um sie erkenntlich zu machen und bei 95°C denaturiert. Auf Eis gelagert, bei 50 mA Gleichstrom erfolgte innerhalb von 3 Stunden die Elektrophorese (Auftrennung der Proteine hinsichtlich ihrer Masse). Ein Laufpuffer stellte hierbei das Leitmedium dar. Der Fortschritt der Elektrophorese wurde durch einen Standardproteinmassenmarker gekennzeichnet. Nach Abschluss der Elektrophorese erfolgte die Übertragung (= Blot) der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe eines Transferpuffers durch Gleichstrom (100 mA, 2 Stunden und 20 Minuten, 0°C). Zur Proteinerkennung wurden die Blots mit SERCA2A und PLB-spezifischen Antikörpern inkubiert. Der Nachweis des Phosphorylierungslevels erfolgte mit Hilfe phosphospezifischer PLN-Ser16- und PLN-Thr17-Antikörper.

Die immunreaktiven Banden wurden durch eine erhöhte Chemilumineszenz dargestellt und mit einem CCD-Kamerasystem registriert.

### 2.4.2 Material und Messlösungen (Western Blot)

Die Herstellung der folgenden Lösungen erfolgte bei einem pH-Wert von 6,8, bei Raumtemperatur in destilliertem Wasser.

#### Lysepuffer

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Lysepuffer</b>	HEPES (Sigma#H3375)	0,05 mmol/l
	HCl	0,5 mmol/l
	DTT	0,001 mmol/l
	PMSF	0,001 mmol/l
	CLAP	1:1000

#### Protein Probenpuffer

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Protein-Probenpuffer</b>	Tris-Base (Roth#4855.2)	60 mmol/l
	Glycerol	10%
	2-Mercaptoethanol (Sigma#6250)	2%
	Bromphenolblau	0,046 mmol/l
	SDS	69,34 mmol/l

#### Ladegel

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Ladegel</b>	Acrylamid (Roth#3029.1)	4%
	Tris-Base (Roth#4855.2)	123,85 mmol/l
	SDS	3,43 mmol/l
	APS	0,06%
	TEMED	13,14 mmol/l

Die Herstellung der folgenden Lösung erfolgte bei einem pH-Wert von 8,8, bei Raumtemperatur in destilliertem Wasser.

#### Trenngel 7,5%

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Trenngel 7,5%</b>	Acrylamid (Roth#3029.1)	7,5%
	Tris-Base (Roth#4855.2)	375,6 mmol/l
	SDS	3,46 mmol/l
	APS	0,033%
	TEMED	4,63 mmol/l

Die Herstellung der folgenden Lösungen erfolgte bei einem pH-Wert von 8,3, bei Raumtemperatur in destilliertem Wasser.

### Laufpuffer

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Laufpuffer</b>	Tris-Base (Roth#4855.2)	24,93 mmol/l
	Glyzin (Roth#3908.3)	191,82 mmol/l
	SDS	3,46 mmol/l

### Transferpuffer

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Transferpuffer</b>	Tris-Base (Roth#4855.2)	32,5 mmol/l
	Glyzin (Roth#3908.3)	191,82 mmol/l
	Methanol	20%

Die Herstellung der folgenden Lösungen erfolgte bei einem pH-Wert von 7,5, bei Raumtemperatur in destilliertem Wasser.

### Waschpuffer

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
<b>Waschpuffer</b>	Tris-Base (Roth#4855.2)	19,98 mmol/l
	NaCl	50 mmol/l
	Tween 20	0,10%

## 2.5. Statistik

Alle in dieser Arbeit verwendeten Ergebnisdaten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler .

$$\text{S.E.M.} = \text{Standard Error of the Mean} = \text{Standardfehler des Mittelwertes} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

**Formel 3: Berechnung des Standardfehlers des Mittelwertes.**

$\sigma$  = Standardabweichung; n = Anzahl der Beobachtungen

Zur Evaluation der statistischen Signifikanz zwischen den unterschiedlichen experimentellen Gruppenergebnissen wurde je nach Design des Experimentes der gepaarte oder ungepaarte Student's t-test angewandt. Die Muskelstreifenexperimente erfolgten nach einem abgewandelten gepaarten Design. Es wurden zwei Präparationen aus demselben Areal desselben Kaninchenherzens entnommen, und gleichzeitig in einer Doppelmessanlage gemessen. Für diese Experimente wurde ein gepaarter t-test zur Evaluation der Ergebnissignifikanz gewählt.

Die EC50-Werte der Dosis-Wirkungs (Kalziumkonzentrations-Kraftentwicklungs)-Kurven der Skinned Fiber-Experimente wurden mit dem extra sum-of-squares F-test ausgewertet.

Zur graphischen Darstellung der Daten in Form von Diagrammen wurde das Programm

“SigmaPlot 8.0” verwendet.

### 3. Ergebnisse

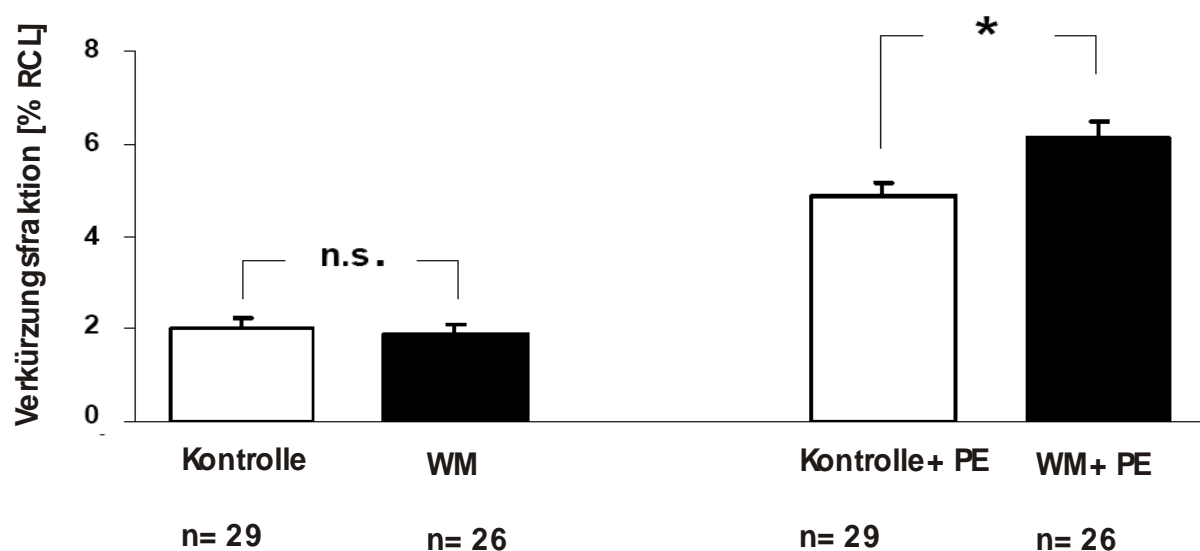
#### 3.1 Effekt der PI3K-Hemmung auf die Kontraktilität $\alpha_1$ -adrenerg stimulierter isolierter Kardiomyozyten

Zur suffizienten Hemmung der PI3K wurden die isolierten Kardiomyozyten über 20 Minuten mit Wortmannin (WM, 0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) inkubiert (Kontrolle entsprechend mit DMSO).

In einer ersten Versuchsreihe erfolgte anschließend unter Feldstimulation (1 Hz, 37 °C) die Messung der Fraktionellen Zellverkürzung.

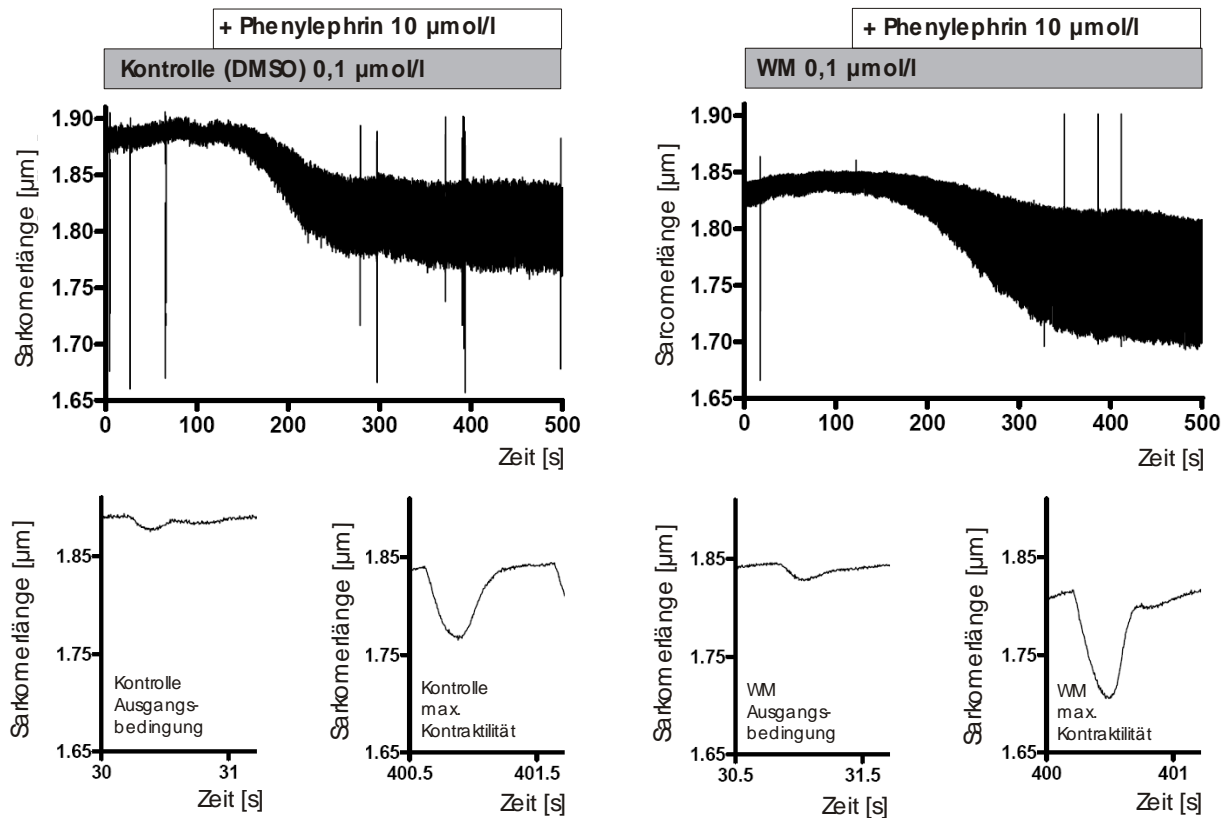
Die Registrierung der Verkürzungsfraction (in % der Ruhezelllänge, RZL) zeigte, dass die Kontraktilität WM-vorbehandelter Zellen sich nicht signifikant von derjenigen der Kontrollzellen unterschied ( $1,91 \pm 0,19\%$ ;  $n=26$  versus  $2,01 \pm 0,21\%$ ;  $n=29$ ). Die mittlere Ruhezelllänge der mit WM inkubierten Zellen betrug  $1,87 \pm 0,01 \mu\text{m}$ , die der Kontrollzellen  $1,85 \pm 0,01 \mu\text{m}$  ( $p=0,33$ ).

In der anschließenden Versuchsreihe folgte auf die 20 minütige WM- beziehungsweise DMSO-Inkubation die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/L}$ ). Wie erwartet konnte in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg der Verkürzungsfraction unter PE verzeichnet werden. Unter WM-Vorbehandlung nahm jedoch die Fraktionelle Zellverkürzung durch PE signifikant stärker zu als unter Kontrollbedingungen (Fraktionelle Zellverkürzung:  $6,14 \pm 0,33\%$ ;  $n=26$  versus  $4,85 \pm 0,33\%$ ;  $n=29$ ,  $p<0,05$ ). Die mittlere Ruhezelllänge war in beiden Gruppen mit  $1,81 \pm 0,01 \mu\text{m}$  vergleichbar ( $p=0,84$ ). (siehe auch Abbildung 11 und 12)



**Abbildung 11: Effekt der PI3K-Hemmung auf die Kontraktilität  $\alpha_1$ -adrenerg-stimulierter, isolierter Kardiomyozyten (Zusammenfassung)**

Dargestellt sind die Mittelwerte der Kontraktilitätsmessung an isolierten Kardiomyozyten jeweils mit und ohne Wortmannin (WM, 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ). Unter Ausgangsbedingungen (links) und nach Phenylephrinstimulation (PE, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) (rechts) wurde die Verkürzungsfraction (in % der Ruhezelllänge, % RCL) gemessen. n: wie angegeben, \* $p<0,05$ , ungepaarter *t*-test.



**Abbildung 12: Effekt der PI3K-Hemmung auf die Kontraktilität  $\alpha_1$ -adrenerg-stimulierter Kardiomyozyten (Originalregistrierung)**

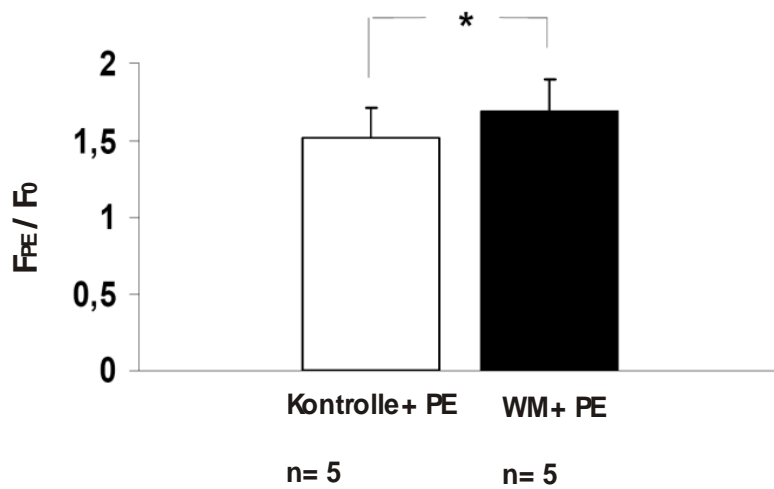
Nach 20 minütiger Inkubation mit Wortmannin (WM, 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) wurden die isolierten Kardiomyozyten mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) stimuliert.

Die Abbildungen zeigen Originalregistrierungen der Myozytenkontraktilität ohne (linke Abbildungen) und mit (rechte Abbildungen) WM. Die Verkürzungsfraction wurde anhand der Sarkomerlängenausmessung (in  $\mu\text{m}$ ) bestimmt. Die oberen Abbildungen zeigen zwei repräsentative vollständige Experimente. Die unteren Abbildungen zeigen jeweils eine einzelne Verkürzung unter Ausgangsbedingung und eine zum Zeitpunkt der stärksten Kontraktilitätsentwicklung nach PE-Stimulation.

### 3.2 Effekt der PI3K-Hemmung auf die Kontraktilität $\alpha_1$ -adrenerg-stimulierter Myokardstreifen

Intakte multizelluläre Myokardstreifenpräparate, die im Vergleich zu Einzelzellen vorgedehnt werden können und isometrisch kontrahieren wurden über 40 Minuten mit WM (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) inkubiert (Kontrolle 40 Minuten DMSO). Die anschließende  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation mit PE (10  $\mu\text{mol/l}$ ) steigerte die Kontraktilität in beiden Gruppen signifikant.

Wie bereits bei den Einzelzellexperimenten beobachtet, steigerte die PI3K-Hemmung auch hier den positiv inotropen PE-Effekt signifikant. Trotz methodisch bedingter Streuung der Ausgangsabsolutwerte, verhalten sich die Experimente sehr ähnlich. Die relativ entwickelte Kraft (dividiert durch die Ausgangskraft ( $F_{\text{PE}}/F_0$ )) nach PE-Gabe betrug bei den WM-behandelten Myokardstreifen  $1,69 \pm 0,21$  im Vergleich zu den Kontrollstreifen  $1,52 \pm 0,20$  ( $p < 0,05$ , gepaarter  $t$ -test). (siehe Abbildung 13)



**Abbildung 13: Effekt der PI3K-Hemmung auf die Kontraktilität paariger  $\alpha_1$ -adrenerg-stimulierter Myokardstreifen (Rechtsventrikuläre Trabekel oder dünne Papillarmuskeln)**

Nach 40 minütiger Inkubation mit Wortmannin (WM, 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ), wurden jeweils ein mit WM inkubierter und ein Kontrollstreifen mit PE (10  $\mu\text{mol/L}$ ) stimuliert.

Dargestellt ist das Verhältnis der entwickelten Kraft nach PE-Stimulation dividiert durch die Ausgangskraft ( $F_{PE}/F_0$ )  $n=5$ , \* $p<0,05$ , gepaarter  $t$ -test.

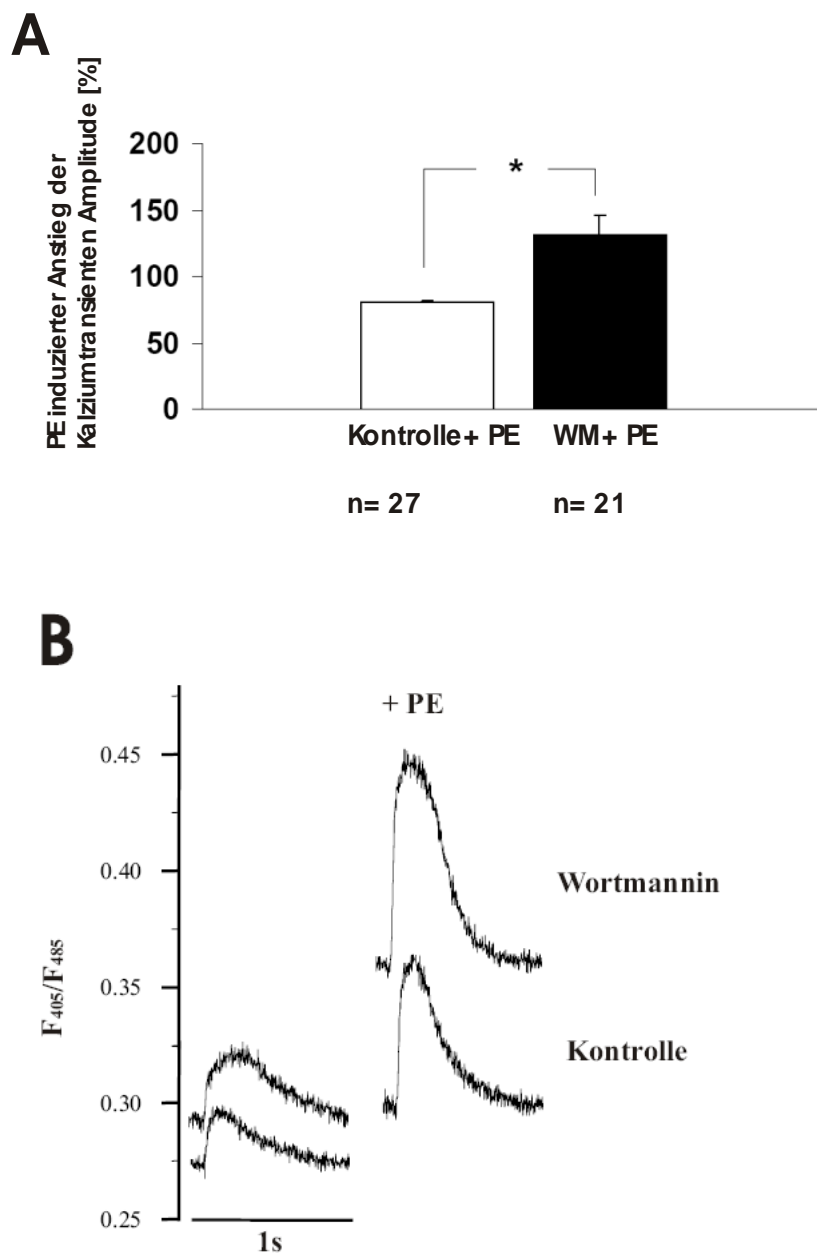
### 3.3 Effekt der PI3K-Hemmung auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in $\alpha_1$ -adrenerg-stimulierten, isolierten Kardiomyozyten

Um den Mechanismus des kontraktilitätssteigernden Effektes der PI3K-Hemmung zu untersuchen, wurde die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Fluoreszenzfarbstoff: Indo-1 AM) einzelner Zellen mit und ohne WM-Inkubation gemessen. Die hierbei aufgezeichnete Kalziumtransientenamplitude zeigt die Kalziumkonzentrationsschwankungen während der Diastole und der Systole auf. Das Verhältnis der Lichtintensität der Wellenlängen 405 und 485 nm (Ratio =  $F_{405}/F_{485}$ ) ist dabei das Maß für die Kalziumkonzentration.

In den Kontrollzellen stieg unter PE der Mittelwert der Kalziumtransientenamplitude um  $80,8 \pm 1,2\%$  ( $n=27$ ). In der WM-Gruppe war ein Anstieg des Mittelwertes um  $131,5 \pm 14,8\%$  ( $n=21$ ) zu verzeichnen.

Abbildung 14 zeigt den Effekt der WM-Inkubation von Kaninchenkardiomyozyten unter  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation.





**Abbildung 14: Effekt der PI3K-Hemmung auf die Kalziumtransientenamplitude in  $\alpha_1$ -adrenerg-stimulierten, isolierten Kardiomyozyten**

Isolierte Kardiomyozyten wurden für 20 Minuten mit Wortmannin (WM, 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) und Messung der Kalziumtransientenamplitude. Verglichen wurden Zellen ohne und mit WM-Inkubation.

A: Gegenüberstellung des relativen Anstieges der Kalziumtransientenamplitude nach PE-Stimulation zwischen der Kontrollgruppe und der WM-behandelten Zellgruppe (in %). n= wie angegeben, \* $p < 0,05$ , ungepaarter *t*-test.

B: Originalaufzeichnung der Kalziumtransientenamplitude beider Gruppen in repräsentativen Experimenten vor und nach PE-Stimulation

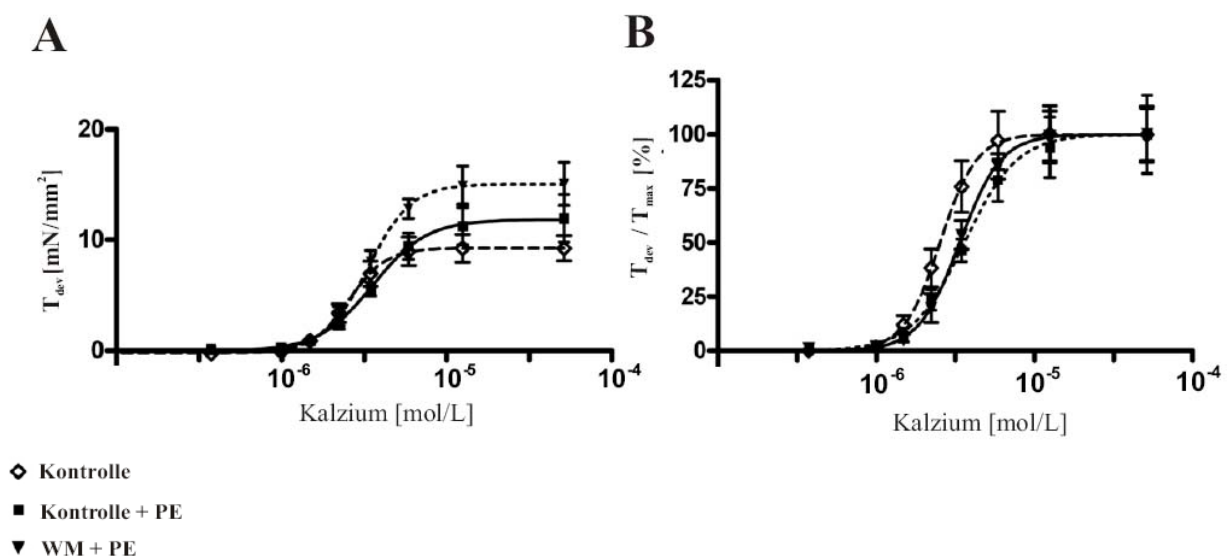
### 3.4 Effekt der PI3K-Hemmung auf die Kalziumsensitivität in semipermeabilisierten Herzmuskelstreifen.

Da eine Zunahme der Kontraktilität auch durch Veränderungen der Kalziumsensitivität bedingt sein kann, wurde der Einfluss der PI3K-Hemmung auf die Kalziumsensitivität in  $\alpha_1$ -adrenerge-stimulierten, semipermeabilisierten (mit Hilfe von  $\beta$ -Escin) Myokardstreifen untersucht.

Durch schrittweise Erhöhung der Kalziumkonzentration wurde zunächst die absolute Kraftentwicklung gemessen. Hierbei zeigten die WM-behandelten Myokardstreifen unter PE Stimulation die größte maximale Kraftentwicklung, die sich jedoch nicht signifikant von den anderen Gruppen unterschied.

Das Maß der Kalziumsensitivität wird durch die Steigung ( $EC_{50}$ ) der im Bezug zur maximalen Kraft normalisierten Kurven beschrieben (Abbildung 15 B).  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation oder die Hemmung der PI3K hatten hiernach keinen signifikanten Einfluss auf die Kalziumsensitivität der Herzmuskelstreifen ( $EC_{50}$  der Kontrollstreifen + PE:  $3.62 \pm 0.18 \mu\text{mol/L}$ ;  $EC_{50}$  der WM-behandelten Myokardstreifen + PE:  $3.37 \pm 0.22 \mu\text{mol/L}$ ; n.s.)

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kontraktilitätssteigerung der PI3K-Hemmung in PE-stimulierten Zellen nicht auf einer Beeinflussung der Kalziumsensitivität basiert.



**Abbildung 15: Effekt der PI3K-Hemmung auf die Kalziumsensitivität in Semi-Skinned Fiber-Experimenten**

Intakte Myokardstreifen wurden mit  $\beta$ -Escin semipermeabilisiert, um die intrazelluläre Kalziumkonzentration, bei Erhalt der membrangebundenen Rezeptoren und intrazellulären Signalwege kontrollieren zu können. Die Semi-Skinned Fiber wurden mit Wortmannin (WM,  $0,1 \mu\text{mol/L}$ ) inkubiert und anschließend mit Phenylephrin (PE,  $10 \mu\text{mol/L}$ ) stimuliert.  $n=5$ .

A: Kalziumkonzentrationsabhängige Kraftentwicklungskurve (Dosis-Wirkungs-Kurve). Absolute Kraftentwicklung ( $\text{mN/mm}^2$ ).

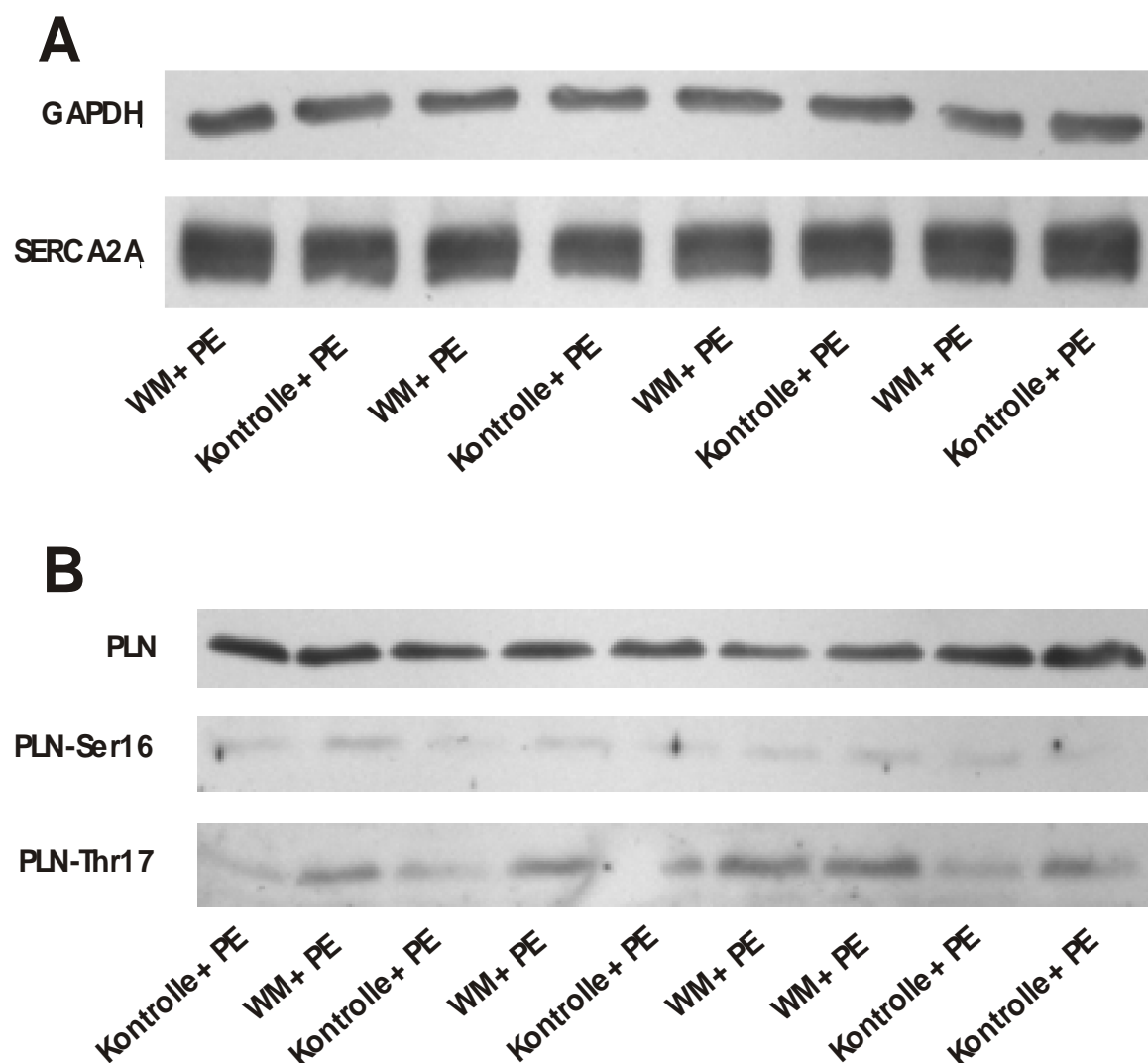
B: Relative Werte der Dosis-Wirkungs-Kurve. Unterschiede der  $EC_{50}$  wurden statistisch mit separaten „sum-of-square“ F-t-tests analysiert.

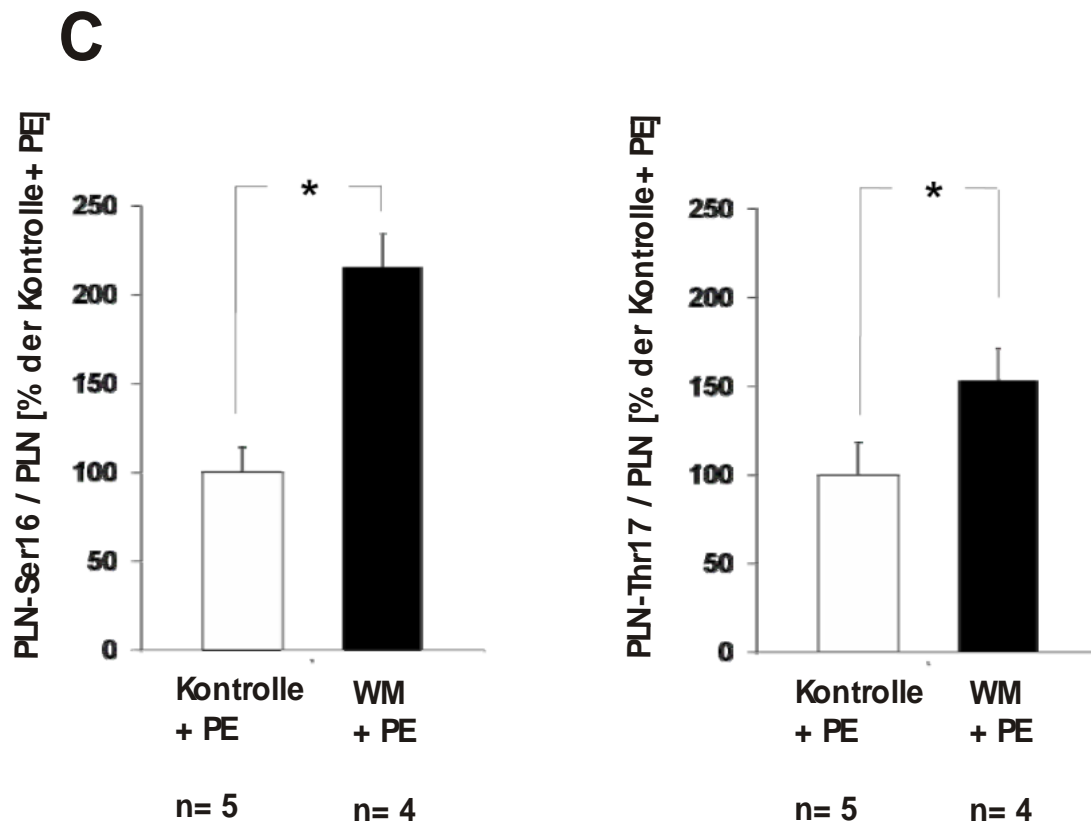
### 3.5 Effekt der PI3K-Hemmung auf die Proteinexpression und auf das Phosphorylierungslevel in Kaninchenmyokard

Um den Mechanismus der gesteigerten Kalziumtransientenamplitude nach Hemmung der PI3K in  $\alpha_1$ -adrenerg-stimulierten Zellen zu untersuchen, wurde die Gesamtproteinexpression der SERCA2A und von PLB sowie der Phosphorylierungsgrad von PLN-Ser16/PLN und PLN-Thr17/PLN mit Hilfe von Western-Blot-Analysen bestimmt.

Die Inkubation mit WM (0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 20 Minuten) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Proteinexpression von SERCA2A und PLB in PE (10  $\mu\text{mol/L}$ )-stimulierten Zellen.

Die Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern zeigte jedoch einen signifikanten Anstieg des PLB-Phosphorylierungslevels unter PI3K-Hemmung. Der PLN-Ser16/PLN- und PLN-Thr17/PLN-Quotient stieg um  $115 \pm 19\%$  ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) bzw.  $53 \pm 19\%$  ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ). Eine Zunahme der Phosphorylierung von PLN führt zu einer Abnahme der SERCA2A-Hemmung und somit zu einer schnelleren Wiederaufnahme von Kalzium in das SR, was mit einem höheren SR-Kalziumgehalt verbunden sein kann (siehe Abbildung 16).





**Abbildung 16: Effekt der PI3K-Hemmung auf die Proteinexpression und den Phosphorylierungsgrad in Kaninchenkardiomyozyten**

Isolierte Kaninchenkardiomyozyten wurden über 20 Minuten mit Wortmannin (WM, 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) inkubiert. Anschließend folgte eine 2 minütige Stimulation der Zellen (mit und ohne WM-Vorinkubation) mit Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/L}$ ).

A: Repräsentativer Original-Western Blot der SERCA-Proteinexpression normalisiert auf GAPDH.

B: Repräsentativer Original-Western Blot der PLN-Expression und des Phosphorylierungslevels (PLN-Ser16; PLN-Thr17). n: wie angegeben, \* $p < 0,05$ , ungepaarter *t*-test.

C: Linke Abbildung: Gegenüberstellung des relativen Anstieges des PLN-Ser16-Phosphorylierungsgrades unter Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/L}$ )-Stimulation mit und ohne Wortmannin (WM, 0,1  $\mu\text{mol/L}$ )-Vorinkubation. n: wie angegeben, \* $p < 0,05$ , ungepaarter *t*-test. Rechte Abbildung: Gegenüberstellung des relativen Anstieges des PLN-Thr17-Phosphorylierungsgrades unter Phenylephrin (PE, 10  $\mu\text{mol/L}$ )-Stimulation mit und ohne Wortmannin (WM, 0,1  $\mu\text{mol/L}$ )-Vorinkubation. n: wie angegeben, \* $p < 0,05$ , ungepaarter *t*-test

#### 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der PI3K auf die Kontraktilität  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Myokards untersucht. Es zeigte sich, dass eine Hemmung der kardialen PI3K zu einer signifikanten Zunahme der positiv inotropen Wirkung einer  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulation mit Phenylephrin führt. Durch Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PI3K zu einer signifikanten Zunahme der intrazellulären Kalziumtransienten in  $\alpha_1$ -stimuliertem Myokard führt. Als Hinweis für eine mögliche Ursache der gesteigerten Kalziumausschüttung konnte eine vermehrte Phosphorylierung von Phospholamban (PLN), einem wichtigen Regulator der sarkoplasmatischen Kalzium-ATPase (SERCA), nachgewiesen werden. Die Kalzium-Sensitivität der Myofilamente wurde nicht signifikant beeinflusst.

Bereits 1988 konnten M. Endoh und J.R. Blinks an Kaninchen zeigen, dass die in-vitro-Stimulation von Herzmuskelgewebe mit  $\alpha$ - sowie mit  $\beta$ -Agonisten einen positiv inotropen Effekt hat (ENDOHO & BLINKS, 1988). Phenylephrin steigert die Maximalkraft und die Maximalarbeit signifikant (LAYLAND & KENTISH, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit gemessene positiv inotrope Wirkung von Phenylephrin (10  $\mu$ M) auf Kaninchenherzmuskelgewebe wurde ebenfalls unter anderem von *X Qiao et al.* beschrieben (QIAO et al., 2000). Sowohl in den von uns durchgeführten Einzelzellexperimenten mit Kaninchenkardiomyozyten als auch in den Kaninchenmyokardstreifenexperimenten zeigte sich eine signifikante Steigerung der Kontraktilität durch  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation mit Phenylephrin. Diese stellte sich bei allen Versuchen nach einer kurzen Latenz ein und war, wie in der Literatur beschrieben, nicht reversibel (LAYLAND & KENTISH, 2000; NAGASHIMA et al., 1996; BRUCKNER et al., 1984). Durch Hemmung der PI3K wurde diese Kontraktilitätszunahme signifikant verstärkt.

Der Einfluss der PI3K auf die myokardiale Kontraktilität wurde bereits in anderem Zusammenhang beschrieben:

*Latronico et al.* zeigten an Kardiomyozyten der Maus eine  $\beta$ -adrenerg (Dobutamin)-induzierte PI3K-Aktivierung mit anschließender PKB/Akt vermittelter Inotropiesteigerung (LATRONICO et al., 2004). Auch durch die Stimulation mit IGF-1 konnte eine PI3K-Aktivitätssteigerung und eine Verstärkung der Myokardkontraktilität nachgewiesen werden. Hier zeigte sich nach PI3K-Hemmung eine Verminderung des positiv inotropen Effektes der IGF-1-Stimulation (McMULLEN et al., 2004; von LEWINSKI et al., 2003; BELKE et al., 2002; TANAKA et al., 1998). Die Stimulation von Herzmuskelgewebe mit ANG II führte ebenfalls über einen gesteigerten Kalziumstrom über die L-Typ-Kalziumkanäle zu einem PI3K-vermittelten positiv inotropen Effekt (JO et al., 2002; MACREZ et al., 2000; VIRAD et al., 1999).

Dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und denen anderer Arbeitsgruppen. So wurde z.B. ein Anstieg der Kontraktilität und Verkürzung der Relaxationszeit von Rattenkardiomyozyten unter  $\beta_2$ -

adrenerger (Zinterol) Stimulation und gleichzeitiger Hemmung der PI3K beschrieben. Mechanistisch konnte eine Erhöhung der Kalziumtransientenamplitude in den Kardiomyozyten nachgewiesen werden (JO et al., 2002).

Es stellt sich also die Frage, wie die gegensätzlichen Beobachtungen zu erklären sind. Eine mögliche Erklärung könnte die Differenzierung der verschiedenen PI3K-Isoformen liefern. Die verschiedenen Isoformen der PI3K werden anhand ihrer katalytischen Untereinheit p110 in die Subtypen PI3K IA [PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$ ] und PI3K IB [PI3K $\gamma$ ] unterschieden (VANHAESEBROECK & WATERFIELD, 1999). Die Subtypen PI3K $\alpha$  und PI3K $\gamma$  sind von besonderer Bedeutung für das Myokard (OUDIT et al., 2004; CRACKOWER et al., 2002).

Die Stimulation myokardialer Tyrosinkinase-Rezeptoren mit Insulin oder IGF-1 aktiviert die PI3K $\alpha$ . Die PI3K $\alpha$  ist unter anderem an der Entstehung der Herzhypertrophie und Regulation des Zellüberlebens beteiligt (WENZEL et al., 2006; CRACKOWER et al., 2002; VANHAESEBROECK & WATERFIELD, 1999; ROCHE et al., 1994).

Der Einfluss der PI3K $\alpha$  auf die Myokardkontraktilität wird kontrovers diskutiert. Es gibt Hinweise dafür, dass die PI3K $\alpha$  über die Beeinflussung des Kalziumhaushaltes einen positiv inotropen Effekt auf das Myokard hat (SUN et al., 2006; LATRONICO et al., 2004; KIM Y-K et al., 2003). In einer Studie an transgenem Mäusemyokard, welches die PI3K $\alpha$  überexprimiert, konnte allerdings kein Einfluss auf die Myokardkontraktilität gezeigt werden (SHIOI et al., 2000).

Die PI3K $\gamma$ -Aktivierung erfolgt über die Stimulation der G $\beta\gamma$ -Untereinheit von GPCR (JO et al., 2002; MACREZ et al., 2001; NAGA PRASAD et al., 1999; STOYANOV et al., 1995). Im Herzen hat die PI3K $\gamma$  einen hemmenden Effekt auf die Myokardkontraktilität (OUDIT et al., 2004; CRACKOWER et al., 2002). Messungen der Verkürzungsfraction an PI3K $\gamma$ -defizienten Herzen (oder Einzelzellen) zeigten einen positiv inotropen Effekt, sowie eine Beschleunigung der Relaxationszeit (OUDIT et al., 2004; CRACKOWER et al., 2002). Ebenso konnte in ischämischem Myokard durch die Aktivierung der PI3K $\gamma$  [durch den Platelet-Activating Factor (PAF)] ein negativ inotroper Effekt erzielt werden, welcher in PI3K $\gamma$ -defizienten Herzen nicht nachgewiesen werden konnte (ALLOATTI et al., 2003).

*Crackower et al.* zeigte erstmalig, dass die PI3K $\gamma$  über die Reduktion der cAMP-Konzentration die Zellkontraktilität vermindert (CRACKOWER et al., 2002). Hierzu kontrolliert die PI3K $\gamma$  die Phosphodiesterase3B (PDE3B)-Aktivität, welche cAMP abbaut (PATRUCCO et al., 2004). Da cAMP die PKA aktiviert, welche Proteine des Kontraktions-Relaxationszykluses phosphoryliert und damit positiv inotrop wirkt, geht mit der verminderten cAMP-Konzentration eine Abnahme der Herzkontraktilität einher (CHIEN et al., 2003; MacLENNAN & KRANIAS, 2003; BERS & ZIOLO, 2001).

Wie oben bereits erwähnt, ist der Zusammenhang zwischen der PI3K und der  $\beta$ -adrenerg-vermittelten Inotropiesteigerung bereits untersucht worden. Auch wenn die Ergebnisse widersprüchlich sind, gibt es einige Hinweise darauf, dass die Hemmung der PI3K die Kontraktilität in  $\beta$ -adrenerg-stimuliertem

Myokard verstärkt: Nach Hemmung der PI3K (Wortmannin, LY294002) führt eine  $\beta_2$ -adrenerge Stimulation des  $G_{\alpha i}$ PCR in Rattenkardiomyozyten zu einem PKA-vermittelten Anstieg des PLB-Phosphorylierungslevels (JO et al., 2002). Ob die PKA-Aktivierung hierbei cAMP-vermittelt ist oder ob es sich um einen cAMP-unabhängigen Vorgang handelt (direkte Dephosphorylierung des PLB durch die PI3K), ist noch unklar (CRACKOWER et al., 2002; JO et al., 2002).

In PI3K $\gamma$ -defizientem Mäusemyokard zeigte sich nach isolierter  $\beta_2$ -adrenerger Stimulation des  $G_{\alpha s}$ PCR ein gesteigerter intrazellulärer cAMP-Anstieg, eine verstärkte PKA-Aktivierung und PLB-Phosphorylierung, resultierend in einem verstärkten Kontraktilitätsanstieg (CRACKOWER et al., 2002).

Auch die  $\beta_1$ -adrenerg-vermittelte Kontraktilitätssteigerung wird durch die Hemmung aller PI3K-Typen (mit LY294002) in Rattenkardiomyozyten signifikant verstärkt. Grundlage der verstärkten Kontraktilität sind in diesem Fall der Anstieg der Kalziumtransientenamplitude und der Kalziumströme über den L-Typ-Kalziumkanal ohne Modulation des PLB-Phosphorylierungslevel (LEBLAIS et al., 2004). Im Gegensatz zur  $\beta_2$ -adrenergen Stimulation von PI3K $\gamma$ -defizientem Mäusemyokard, zeigte sich nach  $\beta_1$ -adrenerger Stimulation keine Änderung der cAMP-Konzentration oder der Zellkontraktilität (CRACKOWER et al., 2002).

Auch die Betrachtung anderer GPCR zeigt, dass die PI3K $\gamma$  den Kalziumhaushalt der Kardiomyozyten beeinflusst:

Über die Stimulation des purinergen P2Y-Rezeptors kommt es zu einer Hemmung der spontanen Kalziumoszillation in neonatalem Rattenmyokard. Die isolierte Hemmung der PI3K $\gamma$  führt hier zu einer Zunahme der Kalziumoszillation (BONY et al., 2001). Außerdem kann die über den Plättchenaktivierenden-Faktor (PAF)-vermittelte Abnahme der kardialen Kontraktilität in PI3K $\gamma$ -defizientem Myokard verhindert werden (ALLOATTI et al., 2003).

Dass es im Herzen einen Zusammenhang zwischen der PI3K und  $\alpha_1$ -adrenergen Signalwegen gibt, ist aus Myokardhypertrophiestudien bekannt (PÖNICKE et al., 2001; SCHLÜTER et al., 1998). Die Aktivierung der PI3K über eine GPCR-Stimulation mit Phenylephrin resultiert hier sowohl im Akut- als auch im Langzeitversuch in einer Zunahme der Herzzellgröße. Der erzielte hypertrophe Effekt war durch die PI3K-Hemmung mit Wortmannin zu unterdrücken, was die Beteiligung der PI3K an diesem Vorgang bestätigte (PÖNICKE et al., 2001; SCHLÜTER et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass die PI3K die  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelte Kontraktilitätssteigerung im Herzen beeinflusst. Die Hemmung der PI3K verstärkte die  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelte Myokardkontraktilität signifikant.

Da der  $\alpha_1$ -AR ein GPCR ist und die Hemmung der PI3K zu einer Verstärkung der Kontraktilität in  $\alpha_1$ -adrenerg-stimuliertem Myokard führt, könnte der beschriebene Effekt durch die PI3K $\gamma$ -Hemmung

vermittelt sein. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hemmung der PI3K mit Wortmannin gewählt. Da Wortmannin alle PI3K gleichermaßen hemmt (VANHAESEBROECK & WATERFIELD, 1999) und es bislang keine Isoform-spezifischen PI3K-Inhibitoren gibt, bestand keine Möglichkeit zwischen den Einflüssen der unterschiedlichen PI3K-Subtypen zu differenzieren.

Unter Ausgangsbedingungen zeigte sich, dass die PI3K-Hemmung an sich keine Änderung der Inotropie des Herzmuskels bewirkt. Die Auswirkungen der PI3K-Hemmung mit Wortmannin auf die Zellfunktion und -morphologie wurde unter anderem auch von *H Sun et al.* und *B Vanhaesebroeck* untersucht. Hiernach hat die alleinige Wortmannininkubation von Mäusekardiomyozyten keinen Einfluss auf deren Vitalität, Funktionalität sowie Aktivität (SUN et al., 2004; VANHAESEBROECK & WATERFIELD, 1999).

Die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation der mit Wortmannin vorbehandelten Kardiomyozyten zeigte einen verstärkten Anstieg der Kontraktilität im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieses kann durch eine gesteigerte PI3K $\gamma$ -Aktivität unter  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation erklärt werden. Der Effekt der  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelten PI3K-Aktivierung auf die Myokardkontraktilität ist vergleichbar mit dem Einfluss der oben beschriebenen  $\beta_2$ -adrenerg-vermittelten PI3K-Aktivierung auf die Myokardkontraktilität. Danach würde die PI3K, den  $\alpha_1$ -AR-vermittelten, dominant positiv inotropen Effekt auf das Myokard hemmen. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, kann über die Hemmung der PI3K mit Wortmannin, der positiv inotrope Effekt der  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulation des Kaninchenmyokards verstärkt werden.

Die Kontraktilität des Myokards kann prinzipiell über Veränderungen des Kalziumhaushaltes oder über die Beeinflussung der Kalziumsensitivität der Zelle reguliert werden. Um den Mechanismus der von uns beobachteten Kontraktilitätszunahme zu erklären, haben wir die Kalziumtransienten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 und die Kalziumsensitivität mit Hilfe der Semi-Skinned Fiber-Methode untersucht. Unsere Experimente zeigten, dass die verstärkte Kontraktilität nach PI3K-Hemmung in  $\alpha_1$ -adrenerg-stimuliertem Myokard auf einem Anstieg der Kalziumtransientenamplitude, nicht aber auf einer signifikanten Veränderung der Kalziumsensitivität beruht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Kalziumsensitivität reihen sich in die Diskussion über den  $\alpha_1$ -adrenergen Einfluss auf die myokardiale Kalziumsensitivität ein.

Es wird allgemein diskutiert, ob die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation die Kalziumsensitivität beeinflusst oder nicht.

*M Endoh und JR Blinks* haben eine Steigerung der Kalziumsensitivität an Kaninchenherzmuskelstreifen nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation beschrieben (ENDOHO & BLINKS, 1988). Selbiges konnten *Puceat et al.* in Messungen an Rattenherzmuskelstreifen feststellen (PUCEAT et al., 1990). Trotz gleicher Messbedingungen konnten *Strang und Moss* keine Veränderung der Kalziumsensitivität an Muskelstreifen aus Rattenherzen datieren (STRANG &



MOSS, 1995). Auch *N. Suematsu et al.* fand nach Stimulation von Hundemuskelstreifen mit Phenylephrin keine Veränderung der Kalziumsensitivität (SUEMATSU et al., 2001).

Die Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse liegt vermutlich vor allem in der nicht einheitlichen Anwendung der (Semi-)Skinned Fiber-Methode und in Spezies-abhängigen Unterschieden.

Jenachdem ob Triton, Saponin oder  $\beta$ -Escin für den Skinningvorgang gewählt wurde, wurden membranständige Enzymkomplexe mehr oder weniger stark beschädigt. Die Art und Weise der Muskelstreifenpräparation und die Aufhängung in den Messanlagen spielen neben der Vitalität der verwendeten Herzmuskelstreifen mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls eine entscheidende Rolle.

Auch die speziesabhängigen Unterschiede, bezogen auf die Ausstattung mit membrangebundenen Enzymkomplexen, die Regulation des zellulären Kalziumhaushaltes und die Reaktion auf eine  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation müssen berücksichtigt werden.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die PI3K-Hemmung keinen Einfluss auf die Kalziumsensitivität von Kaninchenherzmuskelstreifen hat und dass die anschließende (und auch die alleinige) Phenylephrinstimulation ebenfalls keine Veränderung der Kalziumsensitivität ergibt. Damit basiert die Steigerung der positiv inotropen Wirkung von Phenylephrin nach Hemmung der PI3K mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf einer Veränderung der Kalziumsensitivität.

Western-Blot-Analysen zeigten ein verstärktes Phosphorylierungslevel von PLB (am Ser16 und Thr17) und gaben damit einen Hinweis auf den Mechanismus der erhöhten Kalziumtransientenamplitude: Da die PI3K $\gamma$  die cAMP-Konzentration in der Zelle senkt, könnte durch die Hemmung der PI3K mit Wortmannin die beschriebene  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelte verstärkte Inotropie durch ein höheres cAMP-Level bedingt sein. cAMP führt zu einer verstärkten PKA-Aktivität, welche die L-Typ-Kalziumkanäle und PLB (am Ser16) phosphoryliert. Dies führt wie beschrieben zur Erhöhung der Kalziumtransienten, der  $I_{Ca,L}$ - sowie der SERCA-Aktivität (CHIEN et al., 2003; MacLENNAN & KRANIAS, 2003; BERS & ZIOLO, 2001).

Interessanterweise war auch der Phosphorylierungsgrad von PLB-Thr17 erhöht. Die PLB-Phosphorylierung am Thr17 erfolgt durch die Kalzium-Calmodulinkinase II, was auf die Aktivierung eines weiteren Signalweges hinweist. Die Aktivierung der Kalzium-Calmodulinkinase II könnte durch die verstärkten Kalziumflüsse erklärt werden.

Die der  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulation des Myokards zugrundeliegenden Signalwege werden in der Literatur vielfach diskutiert. Das ursprüngliche Modell der  $\alpha_1$ -adrenergen Regulation der Kontraktilität geht von der Aktivierung der PLC durch den  $G_q$ PCR aus, welche die sekundären Botenstoffe IP<sub>3</sub> und DAG generiert. Diese aktivieren die PKC, welche unter anderem Kalziumkanäle ( $I_{Ca,L}$ ) aktiviert, wodurch es zur Kontraktilitätssteigerung kommt (WOO & LEE, 1999; GAUGHAN et

al., 1998; ZHANG et al., 1998; LIU et al., 1994). Bekannt ist des Weiteren eine Verbindung zwischen der PI3K- und PLC- bzw. PKC-Aktivität:

Die Aktivierung von PLC/PKC-Signalwegen ist in verschiedenen Tiermodellen im Zusammenhang mit der GPCR-vermittelten PI3K-Aktivierung oder deren Produkt PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> beschrieben worden (VIRAD et al., 1999; LeGOOD et al., 1998; RAMEH et al., 1998; TOKER & CANTLEY, 1997; MORIYA et al., 1996; TOKER et al., 1994). *N Marcrez et al.* zeigte, dass die Stimulation von Herzmuskelgewebe mit Angiotensin II über eine GqPCR-vermittelte Aktivierung der PI3K $\gamma$  zur PKC-vermittelten Aktivierung der L-Typ-Kalziumkanäle und zur Kontraktilitätssteigerung führte (MACREZ et al., 2001; MACREZ et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten weisen darauf hin, dass der  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelte positiv inotrope Effekt auf komplexen Zusammenhängen basiert und nicht allein durch den PKC-vermittelten verstärkten Kalziumstrom über die L-Typ-Kalziumkanäle erklärt werden kann (ERTL et al., 1991). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach einem  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelten cAMP-Konzentrationsanstieg und einer PKA-Aktivitätssteigerung (ENDO, 2006; ZIMA & BLATTER, 2004; BOGOYEVITCH et al., 1993; FABIATO, 1986; NOSEK et al., 1986; BRODDE et al., 1978; SCHÜMANN et al., 1975). In Studien an Kardiomyozyten vom Menschen und von der Katze konnte als Ursache der  $\alpha_1$ -adrenerg-stimulierten Kontraktiliätssteigerung die Aktivierung cAMP/PKA-abhängiger Signalwege nachgewiesen werden. Hier kam es NO-vermittelt zu einer cGMP-induzierten Hemmung der Phosphodiesterase Typ III. Dies führte zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration und der PKA-Aktivierung. Die Kontraktilitätszunahme erklärte sich aus der PKA-induzierten Aktivierung der L-Typ-Kalziumkanäle und damit einem verstärkten Kalziueinstrom. Die NO-Freisetzung erfolgte zum einen direkt über die  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelte Aktivierung der PI3K und zum anderen indirekt über die IP<sub>3</sub>-vermittelte Steigerung der Kalziumfreisetzung aus dem SR (WANG et al., 2005; WANG et al., 2002; KIRSTEIN et al., 1995)

Aufgrund der Tatsache, dass die Aktivität der PI3K und des  $\alpha$ -adrenergen Systems in insuffizientem menschlichen Herzmuskelgewebe stark gesteigert ist (BABA et al., 2003; ROCKMAN et al., 2002; HAG et al., 2001), stellt sich die Frage, ob die Hemmung der PI3K $\gamma$  die Myokardkontraktilität herzinsuffizienter Patienten durch Modulation des  $\alpha_1$ -adrenergen Systems verbessert.

An diesem Punkt muss kritisch angemerkt werden, dass die Hemmung der PI3K $\gamma$  das cAMP-Level steigert und anhand von Therapieversuchen mit  $\beta$ -AR-Agonisten und Phosphodiesterase-III-Hemmern gezeigt wurde, dass diese nicht zur Langzeittherapie der Herzinsuffizienz geeignet sind. Allerdings sind PI3K $\gamma$ -Knockout-Mäuse vor der Entwicklung einer Herzhypertrophie, -fibrose und -dysfunktion unter Langzeit- $\beta$ -adrenerger Therapie (Isoproterol) geschützt (OUDIT et al., 2004). Daher sollte eine Hemmung der PI3K $\gamma$  als mögliche Therapieoption der Herzinsuffizienz weiter untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde Wortmannin als PI3K-Inhibitor verwendet. Auch wenn Wortmannin in einem Ischämie-Reperfusion-Modell als kardioprotektiv bezeichnet wird, ist es dennoch keine ideale Substanz für *in-vivo* Studien oder zur Applikation an Menschen. An Ratten konnte gezeigt werden, dass Wortmannin toxisch auf Hepatozyten und gastrointestinale Epithelien wirkt (WYMAN et al., 2003). Für spezifische PI3K $\alpha$ -Inhibitoren wurden neben antikanzerogenen Eigenschaften hypertrophe Effekte am Herzen beschrieben (McMULLEN et al., 2007). Aus diesem Grund ist ein spezifischer PI3K $\gamma$ -Inhibitor für *in-vivo* Studien bezüglich der Herzfunktion notwendig.

## 5. Zusammenfassung

Die Bedeutsamkeit der medikamentösen Herzinsuffizienztherapie wird durch die Häufigkeit dieser Erkrankung in der westlichen Bevölkerung begründet. Die langfristige Verbesserung der Herzfunktion durch die medikamentöse Modulation der Aktivität des vegetativen Nervensystems mit  $\beta$ -Blockern stellt einen wesentlichen Bestandteil der Herzinsuffizienztherapie dar. Ob die Beeinflussung des  $\alpha$ -adrenergen Systems einen zusätzlichen Erfolg in der Herzinsuffizienztherapie bewirken kann, ist weniger gut untersucht. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Bedeutung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K),  $\alpha_1$ -adrenergen Signalweges für die Herzfunktion zu beschreiben.

Bekannt ist eine Beteiligung der PI3K an der Regulation der Mechanotransduktion, der kardialen Kontraktilität, an der Entstehung von Herzkreislauferkrankungen und insbesondere an der  $\alpha$ -adrenerg-vermittelten Herzhypertrophie. Unbekannt hingegen ist der Zusammenhang zwischen der PI3K und dem  $\alpha$ -adrenergen Einfluss auf die Herzfunktion. Zur Beantwortung dieser Frage wurde der  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelte Effekt hinsichtlich der Kontraktilität und des intrazellulären Kalziumhaushaltes an isolierten Kaninchenherzmuskelzellen und Kaninchenherzmuskelstreifen mit und ohne Hemmung der PI3K untersucht.

In Einzelzellexperimenten zeigte sich an  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Zellen nach Hemmung der PI3K sowohl ein positiv inotroper Effekt, als auch eine Zunahme der intrazellulären Kalziumtransientenamplitude. Der positiv inotrope Effekt der Einzelzellexperimente konnte in nachfolgenden Myokardstreifenexperimenten bestätigt werden.

Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration könnte Wester-Blot-Analysen zu Folge in einem signifikanten Anstieg des PLB-Phosphorylierungslevels unter PI3K-Hemmung begründet sein. Eine signifikante Beeinflussung der Kalziumsensitivität in  $\alpha_1$ -stimulierten Kaninchenmuskelstreifen mit und ohne zusätzliche PI3K-Hemmung konnte in Semi-Skinned Fiber-Experimenten nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die PI3K-Hemmung als mögliche Therapieoption von Myokarderkrankungen mit verminderter kardialer Kontraktilität in Frage kommen könnte. Weiter zu klären ist die Frage, welche der PI3K-Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) hierbei die entscheidende Rolle spielt.

**6. Literaturverzeichnis**

- Alloatti G**, R Levi, D Malan, L Del Sorbo, O Bosco, L Barberis, A Marcantoni, I Bedendi, C Penna, O Azzolino, F Altruda, M Wymann, E Hirsch, G Montrucchio (2003): Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ - deficient hearts are protected from the PAF- dependent depression of cardiac contractility. *Cardiovasc Res* 60, 242-249
- Aikawa R**, M Nawano, Y Gu, H Katagiri, T Asano, W Zhu, R Nagai, I Komuro (2000): Insulin Prevents Cardiomyocytes From Oxidative Stress-Induced Apoptosis Through Activation of PI3 Kinase/ Akt. *Circulation* 102, 2873-2879
- Baba HB**, J Stypmann, F Grabellus, P Kirchhof, A Sokoll, M Schäfers, A Takeda, MJ Wilhelm, HH Scheld, N Takeda, G Breithardt, B Levkau (2003): Dynamic regulation of MEK/Erks and Akt/GSK-3 $\beta$  in human endstage heart failure after left ventricular mechanical support: myocardial mechanotransduction-sensitivity as a possible molecular mechanism. *Cardiovasc Res* 59, 390-399
- Barki-Harrington L**, C Perrino, HA Rockman (2004): Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 63, 391-402
- Belke DD**, S Betuing, MJ Tuttle, C Graveleau, ME Young, M Pham, D Zhang, R.C. Cooksey, D.A. McClain, S.E. Litwin, H. Taegtmeier, D. Severson, C.R. Kahn, E.D. Abel (2002): Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 109, 629-639
- Bers DM**, E Perez-Reyes (1998): Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 42, 339-360
- Bers DM** (2001): Excitation- Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force; 2. Auflage ; Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands 2001.
- Bers DM**, MT Ziolo (2001): When is cAMP not cAMP?: effects of compartmentalization. *Circ Res* 89, 373-375
- Blinks JR**, M Endoh (1986): Modification of myofibrillar responsiveness to Ca<sup>++</sup> as an inotropic mechanism. *Circulation* 73, III85-98
- Bogoyevitch MA**, SJ Fuller, PH Sugden (1993): cAMP and protein synthesis in isolated adult rat heart preparations. *Am J Physiol Cell Physiol* 265, C1247-C1257
- Bony C**, S Roche, U Shuichi, T Sasaki, MA Crackower, J Penniger, H Mano, M Puceat (2001): A specific role of Phosphatidylinositol 3 Kinase: A Regulation of Autonomic Ca<sup>2+</sup> Oscillation in Cardiac Cells. *J Cell Biol* vol. 152, no. 4, 717-727
- Brittsan AG**, EG Kranias (2000): Phospholamban and Cardiac Contractile Function. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2131-2139
- Brodde OE**, S Motomura, M Endoh, HJ Schumann (1978): Lack of correlation between the positive inotropic effect evoked by  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation and the levels of cyclic AMP and/or cyclic GMP in the isolated ventricle strip of the rabbit. *J Mol Cell Cardiol* 10, 207-219
- Bruckner R**, W Meyer, A Mugge, W Schmitz, H Scholz (1984): Alpha- adrenoceptor-mediated positive inotropic effects of phenylephrine in isolated human ventricular myocardium. *Eur J Pharmacol* 99(4), 345-347

- Cantley LC** (2002): The PI3K Pathway. *Science* 296, 1655-1657
- Chien KR**, J Ross, M Hoshijima (2003): Calcium and heart failure: the cycle game. *Nat Med* 9, 508-509
- Crackower MA**, GY Oudit, I Kozieradzki, R Sarano, H Sun, T Sasaki, E Hirsch, A Suzuki, T Shioi, J Irie- Sasaki, R Sah, H-YM Cheng, VO Rybin, G Lembo, L Fratta, AJ Oliveira-dos-Santanos, JL Benovic, CR Kahn, S Izumo, SF Steinberg, MP Wymann, PH Backx, JM Penninger (2002): Regulation of Myocardial Contractility and Cell Size by Distinct PI3K-PTEN Signaling Pathways. *Cell* 110, 737-749
- Crespo LM**, CJ Grantham, MB Cannell (1990): Kinetics, stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature* 345, 618-621
- DeBosch B**, I Treskov, TS Lupu, C Weinheimer, A Kovacs, M Courtois, AJ Muslin (2006): Akt Is Required for Physiological Cardiac Growth. *Circulation* 113, 2097-2104
- Doenst T**, H Taegtmeyer (1999):  $\alpha$ -adrenergic stimulation mediates glucose uptake through phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. *Circ Res* 84, 467-474
- Endoh M** (1996): Cardiac  $\alpha(1)$ - adrenoreceptors that regulate contractile function: subtypes and subcellular signal transduction mechanisms. *Neurochem Res* 21(2), 217-229
- Endoh M** (2006): Signal Transduction and  $Ca^{2+}$  Signaling in Intact Myocardium. *J Pharmacol Sci* 100, 525-537
- Endoh M**, JR Blinks (1988): Action of sympathomimetic amines on the  $Ca^{2+}$  transient and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to  $Ca^{2+}$  mediated through  $\alpha$ - and  $\beta$ - adrenoreceptors. *Circ Res* 62, 247-265
- Endoh M**, T Hiramoto, A Ishihata, M Takanashi, J Inui (1991): Myocardial  $\alpha$  1- adrenoreceptors mediate positive inotropic effect and changes in phosphatidylinositol metabolism. Species differences in receptor distribution and the intracellular coupling process in mammalian ventricular myocardium. *Circ Res* 68, 1179-1190
- Ertl R**, U Jahnel, H Nawrath, E Carmeliet, J Vereecke J (1991): Differential electrophysiologic and inotropic effects of phenylephrine in atrial and ventricular heart muscle preparations from rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344, 574-581
- Fabiato A** (1986): Inositol(1,4,5)-triphosphate-induced release of  $Ca^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Biophys J* 49, 190a
- Fedida D**, A.P. Braun, W.R. Giles (1993):  $\alpha$ 1- Adrenoreceptors in Myocardium: Functional Aspects and Transmembrane Signaling Mechanisms. *Physiol Rev* 73(2), 469-481
- Gaughan JP**, CA Hefner, SR Houser SR (1998): Electrophysiological properties of neonatal rat ventricular myocytes with  $\alpha$ 1-adrenergic-induced hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275, H577-H590
- Gollnick F**, SY Wang, R Meyer (1992): Effect of experimental parameters on quantitative Fura-2 measurements. *Pflügers Arch* 420, Suppl. 1: R142

- Grimm M**, N Mahnecke, F Soja, A El-Armouche, P Haas, H Treede, H Reichenspurner, T Eschenhagen (2006): The MLCK- mediated  $\alpha 1$ - adrenergic inotropic effect in atrial myocardium is negatively modulated by PKC $\epsilon$  signaling. *Br J Pharmacol* 148, 991-1000
- Grynkiewicz G**, M Poenie, RY Tsien (1985): A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals** (1996): Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council, *National Institute of Health* Publikationsnummer 85-23
- Hag S**, G Choukroun, H Lim, KM Tymitz, F del Monte, J Gwathmey, L Grazette, A Michael, R Hajjar, T Force, JD Molkentin (2001): Differential Activation of Signal Transduction Pathways in Human Hearts With Hypertrophy Versus Advanced Heart Failure. *Circulation* 103, 670-677
- Hilgemann D**, A Collins, S Matsuoka (1992a): Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *J Gen Physiol* 100, 933-961
- Hilgemann D**, S Matsuoka, G Nagel, A Collins (1992b): Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. *J Gen Physiol* 100, 905-666
- Iizuka K**, M Ikebe, AV Somlyo, AP Somlyo (1994): Introduction of high molecular weight (IgG) proteins into receptor coupled, permeabilized smooth muscle. *Cell Calcium* 16, 431-445
- Inui M**, BK Chamberlain, A Saito, S Fleischer (1986): The nature of the modulation of Ca<sup>2+</sup> transport as studied by reconstitution of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261, 1794-1800
- Jacobshagen C**, M Grüber, N Teucher, AG Schmidt, BW Unsöld, K Toischer, VP Nguyen, LS Maier, H Kögler, G Hasenfuss (2008): Celecoxib modulates hypertrophic signalling and prevents load-induced cardiac dysfunction. *Eur J Heart Fail* 10(4), 334-42
- James P**, M Inui, M Tada, M Chiesi, E Carafoli (1989): Nature and site of phospholamban regulation of the Ca<sup>2+</sup> pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 342, 90-92
- Jo S-H**, V Leblais, PH Wang, MT Crow, R-P Xiao (2002): PI3K functionally compartmentalizes the concurrent Gs signaling during  $\beta 2$ - adrenergic stimulation. *Circ Res* 91, 46-53
- Kamp TJ**, JW Hell (2000): Regulation of Cardiac L- Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circ Res* 87, 1095-1102
- Kentish JC**, HE Keurs, L Ricciardi, JJ Bucx, MI Noble, (1986): Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of calcium concentrations on these relations. *Circ Res* 58, 755-768
- Kentish JC**, RJ Barsotti, TJ Lea, IP Mulligan, JR Patel, MA Ferenczi (1990): Calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum induced by photorelease of calcium or Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 258, H610-H615

- Kim HW**, NA Steenaart, DG Ferguson, EG Kranias (1990): Functional reconstitution of cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 265, 1702-1709
- Kim Y-K**, S-J Kim, A Yatani, Y Huang, G Castelli, DE Vatner, J Liu, Q Zhang, G Diaz, R Zieba, J Thaisz, A Drusco, C Croce, J Sadoshima, G Condorelli, SF Vatner (2003): Mechanism of Enhanced Cardiac Function in Mice with Hypertrophy Induced by Overexpressed Akt. *J Biol Chem* 278(48), 47622-47628
- Kirchberger MA**, M Tada, AM Katz (1974): Adenosin 3`5`-monophosphate-dependent protein kinase catalysed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249, 6166-6173
- Kirstein M**, M Rivet-Bastide, S Hatem, A Benardeau, J-J Mercadier, R Fischmeister (1995): Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest* 95, 794-802
- Kohlhaas M**, (2006 a): Die Bedeutung der subzellulären CaMKII $\delta$ -Überexpression auf den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel in Herzmuskelzellen“ Math.-Nat. Diss. Göttingen).
- Kohlhaas M**, T Zhang, T Seidler, D Zibrova, A Stehen, S Wagner, L Chen, J Heller Brown, DM Bers, LS Maier (2006 b): Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 98, 235-244
- LaMorte VJ**, J Thorburn, D Absher, A Spiegel, JH Brown, KR Chien, JR Feramisco, KU Knowlton (1994): Gq- and Ras- dependent Pathways Mediate Hypertrophy of Neonatal Rat Ventricular Myocytes following  $\alpha$ 1- Adrenergic Stimulation. *J Biol Chem* 269(18), 13490- 13496
- Langendorf O** (1895): Untersuchung am überlebenden Säugetierherzen. *Arch Physiol* 61, 291-332
- Latronico MVG**, S Constinean, ML Lavitrano, C Peschle, G Condorelli (2004): Regulation of Cell Size and Contractile Function by AKT in Cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci* 1015, 250-260
- Layland J**, JC Kentish (2000): Effects of  $\alpha$ 1- or  $\beta$ - adrenoceptor stimulation on work- loop and isometric contractions of isolated rat cardiac trabeculae. *J Physiol* 524.1, 205-219
- Leblais V**, J Su-Hyun, K Chakir, V Maltsev, M Zheng, MT Crow, W Wang, EG Lakatta, R-P Xiao (2004): Phosphatidylinositol 3- Kinase Offsets cAMP- Mediated Positive Inotropic Effect via Inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  Influx in Cardiomyocytes. *Circ Res* 95, 1183-1190
- Le Good JA**, WH Ziegler, DB Parekh, DR Alessi, P Cohen, PJ Parker (1998): Protein Kinase C Isoforms Controlled by Phosphoinositide 3- Kinase Through the Protein Kinase PDK1. *Science* 281(5385), 2042-2045
- Liu QY**, E Karpinski, PK Pang (1994): The L-type calcium channel current is increased by  $\alpha$ -1 adrenoceptor activation in neonatal rat ventricular cells. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 271, 935-943
- Löffler G**, PE Petrides (2003): Biochemie & Pathobiochemie (7. Auflage). Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2003



- MacLennan DH**, EG Kranias: Phospholamban (2003): a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 566-577
- Macrez N**, J-L Morel, F Kalkbrenner, P Viard, G Schultz, J Mironneau (2000): A  $\beta\gamma$  dimer derived from G13 transduces the angiotensin AT1 receptor signal to stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat vein myocytes. *J Biol Chem* 272, 23180-23185
- Macrez N**, Ch Mironneau, V Carricaburu, J-F Quignard, A Babich, C Czupalla, B Nürnberg, J Mironneau (2001): Phosphoinositide 3- Kinase Isoforms Selectively Couple Receptors to Vascular L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. *Circ Res* 89, 692-699
- Maier LS**, DM Bers (2002): Calcium, calmodulin and calcium/calmodulin kinase II-Heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939
- Maier LS**, T Zhang, L Chen, J DeSantiago, JH Brown, DM Bers (2003): Transgenic CaMKII  $\{\delta\}$  overexpression uniquely alters cardiac myocyte  $\text{Ca}^{2+}$  handling: reduced SR  $\text{Ca}^{2+}$  load and activated SR  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Circ Res* 92, 904-911
- Matsui T**, L Li, JC Wu, SA Cook, T Nagoshi, MH Picard, R Liao, A Rosenzweig (2002): Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem* 277, 22896-22901
- McMullen JR**, T Shioi, L Zhang, O Tarnavski, MC Sherwood, PM Kang, S Izumo (2003): Phosphoinositide 3-kinase(p110 $\alpha$ ) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci* 100(21), 12355-12360
- McMullen JR**, T Shioi, WY Huang, L Zhang, O Tarnavski, E Bisping, M Schinke, S Kong, MC Sherwood, J Brown, L Riggi, PM Kang, S Izumo (2004): The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110 $\{\alpha\}$ ) pathway. *J Biol Chem* 279, 4782-4793
- McMullen JR**, F Amirahmadi, EA Woodcock, M Schinke-Braun, RD Bouwman, KA Hewitt, JP Mollica, L Zhang, Y Zhang, T Shioi, A Buerger, S Izumo, PY Jay, GL Jennings (2007): Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110 $\alpha$ ) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci* 104(2), 612-617
- Moriya S**, A Kazlauskas, K Akimoto, S-I Hirai, K Mizuno, T Takenawa, Y Fukui, Y Watanabe, S Ozaki, S Ohno (1996): Platelet- derived growth factor activates protein kinase C $\epsilon$  through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C $\gamma$  or phosphatidylinositol 3- kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 151-155
- Murphy E**, H Tong, C Steenbergen (2003): Preconditioning: is the Akt-ion in the PI3K pathway? *J Mol Cell Cardiol* 35, 1021-1025
- Naga Prasad SV**, G Esposito, L Mao, WJ Koch, HA Rockman (1999): Referenz G $\beta\gamma$ -dependent Phosphoinositide 3-Kinase Activation in Hearts with *in Vivo* Pressure Overload Hypertrophy. *J Biol Chem* 275(7), 4693-4698
- Naga Prasad SV**, J Nienaber, HA Rockman (2001):  $\beta$ -adrenergic axis and heart disease. *Trends Gen* 17(10), 44-49
- Nagashima M**, Y Hattori, Y Akaishi, N Tohse, I Sakuma, A Kitabatake, M Kanno (1996): Alpha 1- adrenoceptor subtypes mediating inotropic and electrophysiological effects in mammalian myocardium. *Am J Physiol* 271, H1423-1432

- Neumann T**, J Biermann, A Neumann, J Wasem, G Ertl, R Dietz, R Erbel (2009): Herzinsuffizienz: Häufigster Grund für Krankenhausaufenthalte – Medizinische und ökonomische Aspekte. *Dtsch Arztebl Int* 106(16): 269-75
- Nosek TM**, M Williams, ST Ziegler, RE Godt (1986): Inositol-trisphosphate enhances calcium release in skinned cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 250, C807–C811
- Odermatt A**, K Kurzdowski, DH MacLennan (1996): The  $V_{\max}$  of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban. *J Biol Chem* 271, 14206-14213
- Oudit GY**, H Sun, BG Kerfant, MA Crackower, JM Penninger, PH Backx (2004): The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 37, 449-471
- Patrucco E**, A Notte, L Barberis, G Selvetella, A Maffei, M Brancaccio, S Marengo, G Russo, O Azzolino, SD Rybalkin, L Silengo, F Altruda, R Wetzker, MP Wymann, G Lembo, E Hirsch (2004): PI3K $\gamma$  modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118, 375-387
- Perez DM**, MB DeYoung, RM Graham (1993): Coupling of Expressed  $\alpha 1\text{B}$ - and  $\alpha 1\text{D}$ -Adrenergic Receptors to Multiple Signaling Pathways Is Both G Protein and Cell Typ Specific. *Mol Pharmacol* 44, 784-795
- Pönicke K**, K-D Schlüter, I Heinroth-Hoffmann, T Seyfarth, M Goldberg, B Osten, HM Piper, O-E Brodde (2001): Noradrenalin induced increase in Protein Synthesis in adult rat cardiomyocytes involvement of only alpha 1A –adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364, 444-453
- Puceat M**, O Clement, P Lechene, JM Pelosin, R Ventura-Clapier, G Vassort (1990): Neurohormonal control of calcium sensitivity of myofilaments in rat single heart cells. *Circ Res* 67, 517–524
- Qiao X**, I Norota, M Endoh (2000): Pharmacological Characteristics of Inhibitory Action of the Selective  $\alpha 1$ - Antagonist JTH 610 on the Positive Inotropic Effect Mediated by  $\alpha 1$ -Adrenoceptors in Isolated Rabbit Papillary Muscle. *Jpn J Pharmacol* 84, 301-309
- Rameh LE**, S Goo Rhee, K Spokes, A Kazlauskas, LC Cantley, LG Cantley (1998): Phosphoinositide 3- Kinase Regulates Phospholipase C $\gamma$ - mediated Calcium Signaling. *J Biol Chem* 273(37), 23750-23757
- Roche S**, M Koegl, SA Courtneidge (1994): The phosphoinositol 3- kinase  $\alpha$  is required for DNA synthesis induced by some, but not all, growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9185-9189
- Rockman HA**, WJ Koch, RJ Lefkowitz (2002): Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415, 206-212
- Rossi AE**, RT Dirksen (2006): Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve* 33, 715–731

- Satoh S**, A Steusloff, G Pfister (1992) The loss of the Ca<sup>2+</sup> sensitizing effect of GTP $\gamma$ S in Triton-skinned smooth muscle is associated with the loss of small GTP-binding proteins. *J Muscle Res Cell Motil* 13, 253
- Schlüter K-D**, Y Goldberg, G Taimor, M Schäfer, HM Piper (1998): Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes. *Circ Res* 40, 174-181
- Schmidt RF**, Thews G, Lange F (28. Auflage): Physiologie des Menschen. *Springer Verlag* Berlin Heidelberg New York 2000
- Schümann HJ**, M Endoh, O-E Brodde (1975): The time course of the effects of  $\beta$ - and  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation by isoprenaline and methoxamine on the contractile force and cAMP levels of the isolated papillary muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 289, 291-302
- Shioi T**, PM Kang, PS Douglas, J Hampe, CM Yballe, J Lawitts, LC Cantley, Szuzumo (2000): The conserved phosphoinositide 3- kinase pathway determines heart size in mice. *Eur Mol Biol Org J* 19(11), 2537-2548
- Shiojima I**, K Sato, Y Izumiya, S Schiekofe, M Ito, R Liao, WS Colucci, K Walsh (2005): Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 115, 2108-2118
- Statistisches Bundesamt** (Fachserie 12 Reihe 4 Artikelnummer 2120400077004): Todesursachen in Deutschland. *Statistisches Bundesamt* Wiesbaden 2009
- Stoyanov B**, S Volinia, T Hanck, I Rubio, M Loubtchenkov, D Malek, S Stoyanova, B Vanhaesebroeck, R Dhand, B Nurnberg, et al. (1995): Cloning and characterization of a G protein- activated human phosphoinositide- 3 Kinase. *Science* 269(5224), 690-693
- Strang KT**, RL Moss (1995):  $\alpha$ 1-Adrenergic receptor stimulation decreases maximum shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats. *Circ Res* 77, 114-120
- Sudgen PH**, A Clerk (1998): Cellulare mechanisms of hypertrophy. *J Mol Med* 76, 725-746
- Suematsu N**, S Satoh, S Kinugawa, H Tsutsui, S Hayashidani, R Nakamura, K Egashira, N Makino, A Takeshita (2001):  $\alpha$ 1-Adrenoceptor-Gq-RhoA signaling is upregulated to increase myofibrillar Ca<sup>2+</sup> sensitivity in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H637-H646
- Sugiura S** (1999): Actin- myosin interaction. *Cardiovasc Res* 44, 266-273
- Sun H**, GY Oudit, RJ Ramirez, D Constantini, PH Backx (2004): The phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002 enhances cardiac myocyte contractility via direct inhibition of I<sub>k,s</sub> slow currents. *Cardiovasc Res* 62, 509-520
- Sun H**, BG Kerfant, D Zhao, MG Trivieri, GY Oudit, JM Penninger, PH Backx (2006): Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> currents via increased PI3K{ $\alpha$ }/PKB signaling. *Circ Res* 98, 1390-1397
- Tada M**, M Inui (1983): Regulation of the calcium transport by the ATPase-pospholamban system. *J Mol Cell cardiol* 15, 565-575

- Tada M**, MA Kirchberger, AM Katz (1975): Phosphorylation of the 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosin 3`5`-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 250, 2640-2647
- Tada M**, M Yamada, M Kadoma, M Inui, F Ohmori (1982): Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Mol Cell Biochem* 46, 93-95
- Tanaka N**, T Ryoke, M Hongo, L Mao, HA Rockman, RG Clark, J Ross (1998): Effects of growth hormone and IGF-I on cardiac hypertrophy and gene expression in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275, H393-H399
- The Handbook** (10. Auflage, Section 19.2): A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies- Fluorescent Ca<sup>2+</sup> Indicators Excited with UV Light. *Mol Probes* o.J. [www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html)
- Tsien RY** (1980): New Calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis and properties of prototype structure. *Biochem* 19, 2396-2404
- Tsien RY**, T Pozzan, TJ Rink (1982): Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 94, 325-354
- Toker A**, M Meyer, KK Reddy, JR Falck, R Aneja, S Aneja, A Parra, DJ Burns, LM Ballas, LC Cantley (1994): Activation of Protein Kinase C Family Members by the Novel Phosphoinositides PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> and PtdIns- 3,4,5-P<sub>3</sub>. *J Biol Chem* 269(51), 32358-32367
- Toker A**, LC Cantley (1997): Signalling through the lipid products of phosphoinositide- 3-OH kinase. *Nature* 387, 673-676
- Vanhaesebroeck B**, MD Waterfield (1999): Signaling by Distinct classes of PI3K. *Exp Cell Res* 253, 239-254
- Virad P**, T Exner, U Maier, J Mironneau, B Nürnberg, N Macrez (1999): Gβγ dimers stimulate vascular L- Type Ca<sup>2+</sup> channels via phosphoinositide 3- kinase. *Fed Am Soc Exp Biol J* 13, 685-694
- von Lewinski D**, K Voß, S Hülsmann, H Kögler, B Pieske (2003): Insulin- like growth factor- 1 Exerts Ca<sup>2+</sup>- dependent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circ Res* 92, 169-176
- Wang YG**, EN Dedkova, SF Steinberg, LA Blatter, SL Lipsius (2002): β<sub>2</sub>-Adrenergic receptor signaling acts via NO release to mediate ACh-induced activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in cat atrial myocytes. *J Gen Physiol* 119, 69–82
- Wang YG**, EN Dedkova, X Ji, LA Blatter, SL Lipsius (2005): Phenylephrine acts via IP<sub>3</sub>-dependent intracellular NO release to stimulate L- type Ca<sup>2+</sup> current in cat atrial myocytes. *J Physiol* 567, 143-157
- Wenzel S**, Y Abdallah, S Helmig, C Schäfer, AM Piper, K-D Schlüter (2006): Contribution of PI3K isoforms to angiotensin II- and α- adrenoceptor- mediated signalling pathways in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 71, 352-362

- Woo SH**, CO Lee (1999): Role of PKC in the effects of  $\alpha$ 1-adrenergic stimulation on Ca<sup>2+</sup> transients, contraction, and Ca<sup>2+</sup> current in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 437, 335–344
- Wymann MP**, M Zvelebil, M Laffargue (2003): Phosphoinositide 3-kinase signaling - which way to target? *Trends Pharmacol Sci* 24, 366-376
- Yamashita K**, J Kajstura, DJ Discher, BJ Wasserlauf, NH Bishopric, P Anversa, KA Webster (2001): Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1. *Circ Res* 88, 609-614
- Zhang S**, M Hiraoka, Y Hirano (1998): Effects of alpha1-adrenergic stimulation on L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1955–1965.
- Zima AV**, LA Blatter (2004): Inositol-1,4,5-trisphosphatedependent Ca<sup>2+</sup> signaling in cat atrial excitation–contraction coupling and arrhythmias. *J Physiol* 555, 607–615

[Frontiers in Bioscience 13, 6841-6849, May 1, 2008]

### Inhibition of PI3K improves contractility in $\alpha_1$ -adrenergically stimulated myocardium

Claudius Jacobshagen<sup>1</sup>, Swantje Kortlepel<sup>1</sup>, Bernhard W. Unsoeld<sup>1</sup>, Thomas Sowa<sup>1</sup>, Harald Koegler<sup>1</sup>, Gerd Hasenfuss<sup>1</sup>, Lars S. Maier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiology and Pneumology, Heart Center, Georg-August-University Goettingen, Robert-Koch-Strasse 40, 37075 Goettingen, Germany

#### TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Methods and materials
  - 3.1. Isolation and primary culture of rabbit ventricular myocytes
  - 3.2. Single myocyte shortening and intracellular  $Ca^{2+}$  measurements
  - 3.3. Preparation and contractile testing of intact muscle strips
  - 3.4. Myofilament  $Ca^{2+}$  responsiveness in semi-skinned muscle fibres
  - 3.5. Protein expression and phosphorylation level
  - 3.6. Statistical analysis
4. Results
  - 4.1. Effect of PI3K inhibition on  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated single myocytes
  - 4.2. Effect of PI3K inhibition on  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated intact muscle strips
  - 4.3. Effect of PI3K inhibition on  $Ca^{2+}$  transients
  - 4.4. Effect of PI3K inhibition on  $Ca^{2+}$  sensitivity in semi-skinned fibres
  - 4.5. Effect of PI3K inhibition on protein expression and phosphorylation level
5. Discussion
6. Acknowledgements
7. References

## 1. ABSTRACT

Recent studies have demonstrated that phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) play a fundamental role in regulating myocardial contractility. However, even though  $\alpha_1$ -adrenergic receptor stimulation is known to activate PI3Ks, the impact of this pathway on the inotropic effects of  $\alpha_1$ -stimulation is unclear. Isolated rabbit ventricular myocytes were preincubated with the PI3K inhibitor wortmannin (WM, 0.1  $\mu$ mol/L). The  $\alpha_1$  agonist phenylephrine (PE, 10  $\mu$ mol/L) induced a significantly stronger increase in contractility in WM-treated versus control myocytes (Fractional shortening in % of resting cell length: 6.14 $\pm$ 0.33%; n=26 versus 4.85 $\pm$ 0.33%; n=26,  $P < 0.05$ ). Furthermore, pretreatment with WM significantly increased the positive inotropic effect of PE in intact muscle strips from rabbit hearts. Mechanistically, we demonstrate that in WM-treated myocytes PE increased phospholamban (PLN) phosphorylation and intracellular  $Ca^{2+}$  transients to a significantly greater extent than in control myocytes. In summary, this is the first study to demonstrate that inhibition of PI3K by increasing PLN phosphorylation and  $Ca^{2+}$  transients significantly improves contractility in  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated myocardium. This may have clinical implications for the treatment of decreased cardiac function in acute heart failure.

## 2. INTRODUCTION

Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) are a family of evolutionarily conserved lipid kinases that play a central role in the control of cell growth, proliferation, metabolism, apoptosis, membrane transport, and cell motility. Thus, PI3Ks regulate several physiological processes and are involved in the pathology of cancer, metabolic, inflammatory, and cardiovascular diseases (1-3). In myocardium, PI3K activity is essential for both basal cell growth as well as adaptive (physiologic) and maladaptive (pathologic) hypertrophy (4-9). In this regard, the intensity and duration of Akt activation, a well characterized downstream target of PI3K, appear to determine the character of hypertrophy (8-10).

Furthermore, PI3Ks control glucose and amino acid metabolism in the heart (11,12). By inhibiting apoptosis, activation of PI3Ks plays a crucial role in cardiac myocyte survival. PI3K activation decreases infarct size after transient ischemia and prevents cardiac myocytes from oxidative stress-induced apoptosis (13-15).

Moreover, recent studies have demonstrated that PI3Ks play a fundamental role in regulating mechanotransduction and myocardial contractility (5,11,16,17). Cardiac-specific overexpression of IGF-1

## Inhibition of PI3K improves contractility

receptor or IGF-1 infusion improve contractile function in mouse hearts by increasing PI3K activity (5,16). Consistently, knockout of insulin receptor results in reduced contractility (11). On the other hand, PI3Ks reduce beta-adrenergically mediated elevation in cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and protein kinase A (PKA) activity, thereby counteracting the positive inotropic effects of beta-adrenergic signaling (17). Thus, modulating cardiac contractility by PI3Ks following insulin/IGF-1 and beta-adrenergic receptor stimulation has been described. In this regard, there is now growing evidence that the effect of PI3K on contractility depends on the specific PI3K isoform. PI3K $\alpha$  and PI3K $\gamma$  are the two main isoforms expressed in cardiac myocytes. PI3K $\alpha$  predominantly regulates heart growth, but also exerts positive inotropic effects, whereas PI3K $\gamma$  negatively influences cardiac contractility (2,17-20).

However, although  $\alpha_1$ -adrenergic agonists are also known to increase PI3K activity the impact of PI3Ks on the inotropic effects of  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation is unclear (21). In the present study we investigate the effects of PI3Ks on contractile function and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  handling in  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated myocardium. Since growing evidence indicates that PI3Ks might qualify as drug targets for the treatment of cardiovascular diseases, cancer, and inflammation, exact knowledge of the coupling between the different cell-surface receptors, PI3Ks, and effectors is essential to predict how PI3K inhibitors could ameliorate disease and whether they might interfere with vital processes.

## 3. MATERIALS AND METHODS

### 3.1. Isolation and primary culture of rabbit ventricular myocytes

This study was designed and carried out in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Female chinchilla bastard rabbits (1.5–2 kg, Charles River Laboratories, Kisslegg, Germany) were heparinized and anaesthetized with thiopental sodium (50 mg·kg<sup>-1</sup> i.v.). Hearts were rapidly removed, mounted in a Langendorff perfusion setup, and perfused with Tyrode solution containing (in mmol/L): NaCl 137, KCl 5.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2, HEPES 20, glucose 15, CaCl<sub>2</sub> 1, oxygenated with 100% O<sub>2</sub> for 5–8 min. Perfusion was then switched to nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode solution for 12–15 min (30 mL/min) and digestion was performed by perfusion for 12–15 min (10 mL/min) with Tyrode-enzyme solution containing 250 U/mL collagenase type II (Biochrom), 0.04 mg/mL protease type XIV (Sigma-Aldrich) and (in mmol/L)  $\text{Ca}^{2+}$  0.025, taurine 60, *D*, *L*-glutamic acid 8, and *D*, *L*-carnitine 2. Digestion was stopped by perfusion with 100 mL Tyrode solution containing 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 2% fatty acid-free type V albumin, and 20 mmol/L 2,3-butanedione monoxime (BDM). Atria were cut off and the ventricles were immersed in Tyrode solution containing 20 mmol/L BDM, and 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ . The heart was cut into chunks and myocytes were released by four rounds of mincing and gentle manual agitation. The myocytes were filtered through sterile nylon gauze (200  $\mu\text{m}$  meshes) and

progressively exposed to increasing  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in Tyrode solution. The final suspension was laid on top of a 6% albumin/M199 medium (1.75 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ ) supplemented with 5 mmol/L *D*, *L*-carnitine, 5 mmol/L taurine, 5 mmol/L creatine, 100 IU/mL penicillin and 70  $\mu\text{mol/L}$  streptomycin. Myocytes viability was assessed using the Trypan-blue exclusion method. Cells were counted and plated at a density  $\sim 4.2 \times 10^3$  rod-shaped cells/cm<sup>2</sup> on culture dishes (55 mm) and incubated in supplemented M199 tissue culture medium (Sigma-Aldrich).

### 3.2. Single myocyte shortening and intracellular $\text{Ca}^{2+}$ measurements

To inhibit PI3Ks, myocytes were preincubated with wortmannin (WM, Sigma-Aldrich, 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), a well established and widely used PI3K inhibitor, for 20 min. Since WM was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich), control myocytes were incubated with DMSO (highest final concentration of DMSO in all experiments: 0.1 mL/L). Both groups of myocytes (WM and control) were stimulated with the  $\alpha_1$  agonist phenylephrine (PE, 10  $\mu\text{mol/L}$ ). Shortening and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  measurements were performed as reported previously (22,23). Briefly, myocytes were loaded with the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye indo-1/AM (10  $\mu\text{mol/L}$ , Molecular Probes) to measure  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Fluorescence was excited at 360 $\pm$ 5 nm using a 75 W xenon arc lamp (Ushio, Japan) on the stage of a Nikon Eclipse TE200-U inverted microscope. Emitted fluorescence was measured using photomultipliers (at 405 $\pm$ 15 nm and 485 $\pm$ 12.5 nm; IonOptix Corp., Milton, MA). From the raw fluorescence, the indo-1 ratio was calculated (405 nm/485 nm) after subtraction of autofluorescence. Myocytes were electrically field-stimulated (voltage 25% above threshold) at 1 Hz and 37°C until myocyte shortening reached a steady state.

### 3.3 Preparation and contractile testing of intact muscle strips

Rabbits were heparinized and anesthetized as described above. Hearts were rapidly excised and retrogradely perfused with a modified Krebs-Henseleit buffer solution containing (in mmol/L): Na<sup>+</sup> 140.5, K<sup>+</sup> 5.1, Mg<sup>2+</sup> 1.2,  $\text{Ca}^{2+}$  0.25, Cl<sup>-</sup> 124.9, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1.2, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 2.0, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 20, glucose 10, and BDM 20, equilibrated with carbogen (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>), pH 7.4. Right ventricular trabeculae and intact papillary muscles were isolated from the free wall and mounted in a superfusion bath (37°C) between a force transducer (Scientific Instruments, Heidelberg, Germany) and a hook connected to a micromanipulator for length adjustment. Preparations were superfused with BDM-free Krebs-Henseleit solution, starting with 0.25 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ . The  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration was raised stepwise (0.25 mmol/L every 2 min) up to 1.25 mmol/L. Isometric contractions were elicited using electrical field stimulation (1 Hz, amplitude 3 to 5 V; stimulator Stim1, Scientific Instruments). The force transducer signals were amplified and analyzed using software custom-made on the LabVIEW<sup>®</sup> platform (National Instruments, U.S.A.). After a stabilization phase (30 min), muscle strips were carefully stretched until diastolic resting tension reached a level of 2 mN/mm<sup>2</sup>. This

## Inhibition of PI3K improves contractility

reflects a physiological sarcomere length below  $L_{max}$  (sarcomere length at which developed force is maximum) and produces the most stable long-time performance of a preparation (24).

To inhibit PI3Ks, the bath solution was supplemented with WM (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) or DMSO solution without WM. After 40 min of preincubation with WM, both groups of muscle strips (WM and control) were  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated with PE (10  $\mu\text{mol/L}$ ). Reaching a new steady state, developed forces were measured and normalized to the baseline forces before PE-stimulation (relative developed tension,  $F_{dev}/F_0$ ).

### 3.4. Myofilament $\text{Ca}^{2+}$ responsiveness in semi-skinned muscle fibres

Right ventricular papillary muscles and trabeculae were excised as described above. The muscle strips were split longitudinally in sections measuring about 200-300  $\mu\text{m}$  in width and thickness and 2-4 mm in length. The muscle strips were semi-permeabilized by incubation with 35  $\mu\text{mol/L}$  beta-escin (Sigma-Aldrich) in relaxation solution for 30 min. This technique allows the control of intracellular ion concentrations but maintains sarcolemmal receptors and leaves subcellular signaling mechanisms intact. The muscle strips were mounted for isometric force measurement using aluminum T-clips and stretched to the length at which passive tension just began to increase. Measurements were carried out at room temperature. Relaxation solution contained (in mmol/L): imidazole 20, adenosine triphosphate 10, phosphocreatine 10,  $\text{NaN}_3$  5, ethylene glycol-bis-(beta-aminoethyl ether)- $\text{N,N,N',N'}$ -tetraacetic acid (EGTA) 5,  $\text{MgCl}_2$  12.5. Activation solution additionally contained  $\text{CaCl}_2$  at a nominal concentration of 5 mmol/L. The pH of both solutions was adjusted to 6.7 by addition of KOH. Differences in ionic strength between activation and relaxation solutions resulting from different amounts of KOH needed to adjust pH to 6.7 were corrected by adding KCl. Intermediate levels of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  were obtained by mixing appropriate amounts of relaxation and activation solutions. The free  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was calculated using the computer program WinMAXC (25) (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>). The study protocol was adapted to the experiments performed with single myocytes and intact muscle strips. Semi-skinned fibers were preincubated with WM (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) or DMSO for 30 min, respectively. Concentration-response curves for  $\text{Ca}^{2+}$  (tension- $\text{Ca}^{2+}$  relationship) were obtained in PE-stimulated semi-skinned muscle strips, either with or without WM pretreatment.

### 3.5. Protein expression and phosphorylation level

Western blot analysis were performed as described previously (22,23). Briefly, cardiac myocytes were homogenized mechanically in 200  $\mu\text{L}$  ice cold lysis buffer (containing 1% nonidet P 40, 10% glycerol, 137 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, pH 7.4, 20 mmol/L NaF, 1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mmol/L  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 50 mmol/L  $\beta$ -glycerophosphate, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1 mmol/L EGTA, pH 7.0, 1 mmol/L phenylmethyl-sulfonyl-fluoride (PMSF), 4  $\mu\text{g/mL}$  aprotinin, 4  $\mu\text{g/mL}$  leupeptin, 4  $\mu\text{g/mL}$  pepstatin). After elimination of the cell debris by centrifugation, protein concentrations in the supernatant were determined by the

bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce, Bonn, Germany). Proteins were subjected to SDS-PAGE and electroblotted to nitrocellulose membranes. Blots were probed with antibodies against SERCA 2a (Affinity BioReagents, Golden, USA) or phospholamban (PLN, Upstate, Lake Placid, USA) and normalized to glycerol aldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH, Biotrend Chemikalien, Cologne, Germany). Phosphorylation levels were detected with phosphospecific antibodies against PLN-Ser16 and PLN-Thr17 (Badrilla, Leeds, UK). Immunoreactive bands were visualized using enhanced chemiluminescence (Pierce) and quantified by two-dimensional scans using a CCD camera system (Multi-Imager, AlphaInnotech Inc., San Leandro, USA).

### 3.6. Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Differences between experimental groups were evaluated for statistical significance by use of paired or unpaired Student's *t*-test where appropriate. Every muscle strip experiment followed a paired design with two preparations first dissected from immediately adjacent areas of the same rabbit heart and then examined in parallel in a dual-chamber superfusion system. Therefore, a paired *t*-test was considered appropriate to assess the level of statistical significance in this data set.  $\text{EC}_{50}$  values of concentration-response curves for  $\text{Ca}^{2+}$  in semi-skinned fibers were compared with extra sum-of-squares *F* test. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## 4. RESULTS

### 4.1. Effect of PI3K inhibition on $\alpha_1$ -adrenergically stimulated single myocytes

In order to sufficiently inhibit PI3K activity, isolated cardiac myocytes were preincubated with WM (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) or solvent (DMSO), respectively, for 20 min. Subsequently, electrical field stimulation (1 Hz, 37°C) was started and contractility parameters were analyzed. Basal twitch contraction amplitude (in % of resting cell length) was not significantly altered in WM-treated versus control myocytes (1.91 $\pm$ 0.19%;  $n=26$  versus 2.01 $\pm$ 0.21%;  $n=29$ ; Figure 1). The mean resting cell length were 1.87 $\pm$ 0.01  $\mu\text{m}$  in WM-treated versus 1.85 $\pm$ 0.01  $\mu\text{m}$  in control myocytes ( $P=0.33$ ).

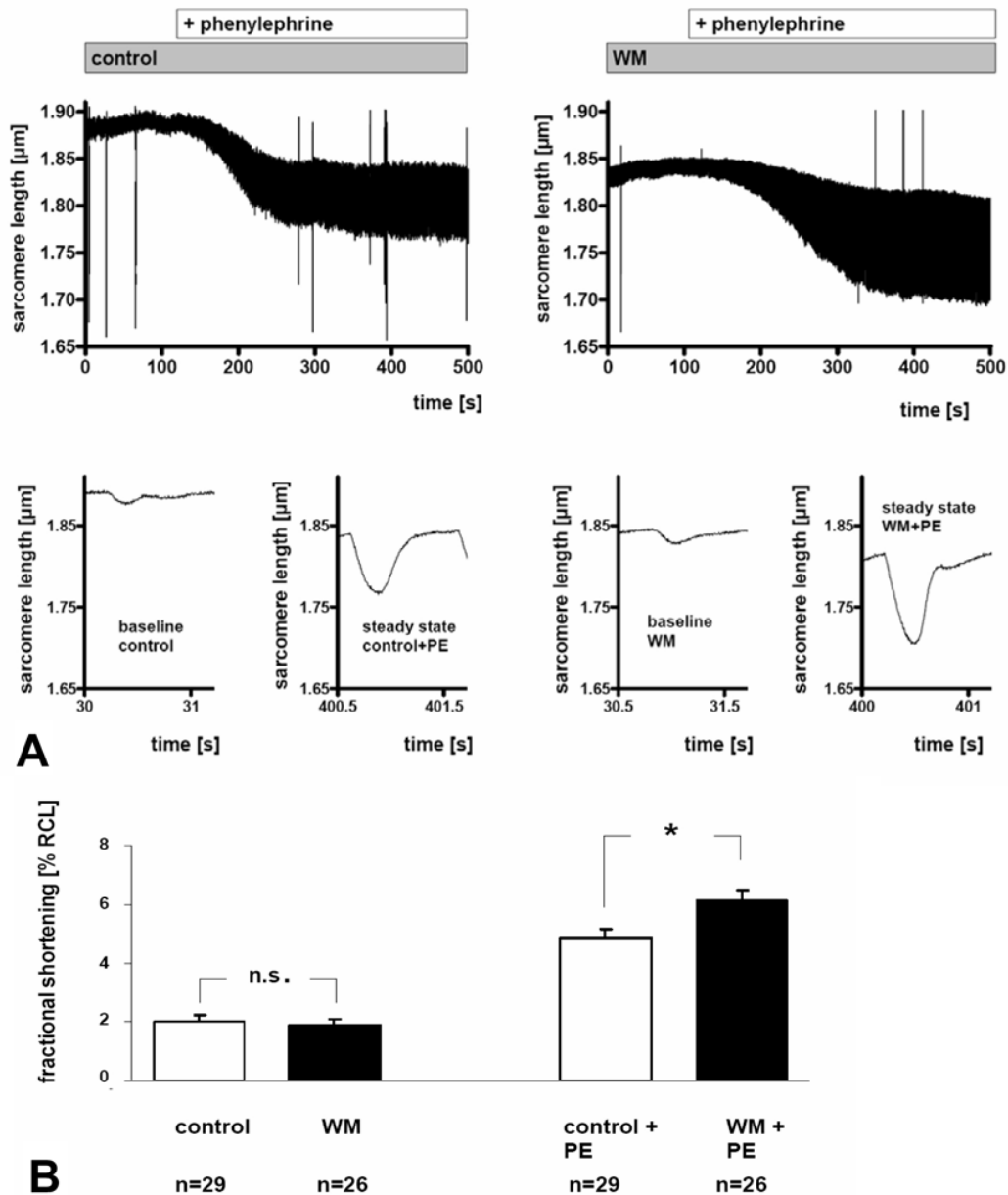
After 20 min of incubation with WM, cardiac myocytes were  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated with PE (10  $\mu\text{mol/L}$ ). As expected, both WM-treated and control myocytes exhibited a significant increase in contractility (Figure 1A). However, in WM-treated myocytes, PE induced a significantly stronger increase in contractility compared to untreated myocytes (6.14 $\pm$ 0.33%;  $n=26$  versus 4.85 $\pm$ 0.33%;  $n=29$ ,  $P < 0.05$ ; Figure 1A-B). The mean resting cell length of PE-stimulated myocytes were 1.81 $\pm$ 0.01  $\mu\text{m}$  in WM-treated versus 1.81 $\pm$ 0.01 in untreated myocytes ( $P=0.84$ ).

### 4.2. Effect of PI3K inhibition on $\alpha_1$ -adrenergically stimulated intact muscle strips

Intact multicellular muscle strips were preincubated with WM for 40 min. Compared to the single myocyte experiments the incubation time was doubled to



## Inhibition of PI3K improves contractility



**Figure 1.** Effect of PI3K inhibition on fractional shortening in  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated single myocytes. After 20 min of incubation with wortmannin (WM, 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) isolated cardiac myocytes were stimulated with phenylephrine (PE, 10  $\mu\text{mol/L}$ ). A. Original registrations of myocyte shortening in representative experiments with (right panels) and without (left panels) WM. Fractional shortening was measured by sarcomere-length detection (in  $\mu\text{m}$ ). The upper panels are original recordings demonstrating one whole experiment, respectively. The lower panels show representative single twitches under baseline conditions and after reaching a shortening steady state with PE-stimulation. B. Corresponding summary, demonstrating the impact of PI3K inhibition under baseline conditions (left side) and with  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation (right side). Fractional shortening (in % of resting cell length). n: as indicated. \* $P < 0.05$ , unpaired *t*-test.

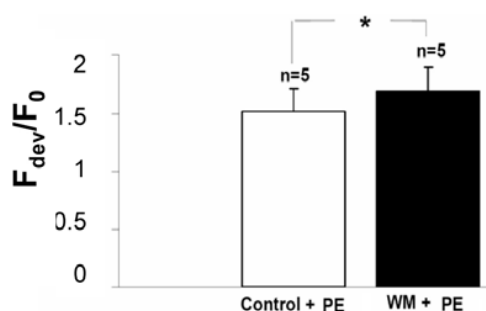
account for the higher tissue thickness.  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation by PE (10  $\mu\text{mol/L}$ ) induced a significant increase in contractility in both groups. Consistent with the findings in single myocytes inhibition of PI3K with WM significantly increased the positive inotropic effect of PE. Relative developed tension ( $F_{\text{dev}}/F_0$ ) was  $1.69 \pm 0.21$  in

WM-treated muscle strips versus  $1.52 \pm 0.20$  in control muscle strips ( $n=5$  each,  $P < 0.05$ ; Figure 2).

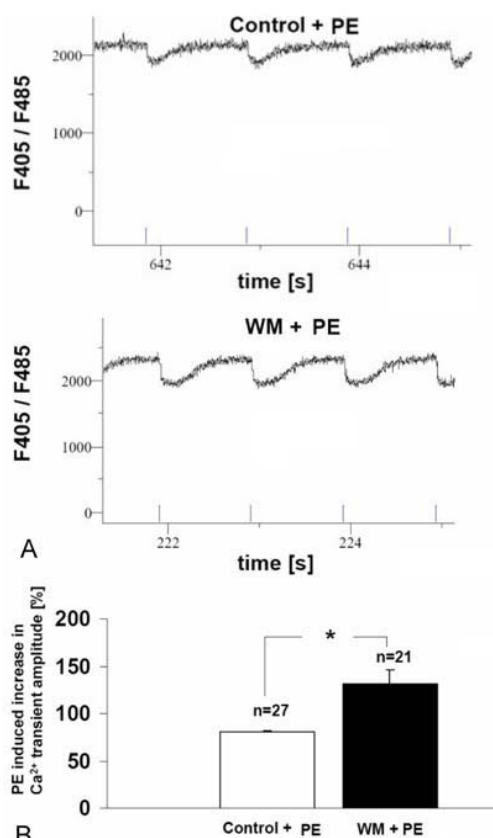
### 4.3. Effect of PI3K inhibition on $\text{Ca}^{2+}$ transients

To elucidate the mechanism of the increased contractility in PI3K-inhibited myocardium we analyzed

## Inhibition of PI3K improves contractility



**Figure 2.** Effect of PI3K inhibition on  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated intact muscle strips (right ventricular trabeculae and thin papillary muscles). After 40 min of incubation with WM (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), both groups of muscle strips (WM and control) were stimulated with PE (10  $\mu\text{mol/L}$ ). Reaching a steady-state, developed forces were measured and normalized to the baseline forces before PE-stimulation (relative developed tension,  $F_{\text{dev}}/F_0$ ).  $n=5$ , each,  $*P<0.05$ , paired  $t$ -test.



**Figure 3.** Effect of PI3K inhibition on  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitudes (indo-1). Isolated cardiac myocytes were incubated with WM (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 20 min.  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitudes of WM-treated and control myocytes were compared after  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation with PE (10  $\mu\text{mol/L}$ ). A. Original registrations of representative experiments. Upper panel: PE-stimulation of a control myocyte. Lower panel: PE-stimulation of a WM-treated myocyte. B. Relative increase in  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitudes in WM-treated and control myocytes after PE stimulation (in %).  $n$ : as indicated.  $*P<0.05$ , unpaired  $t$ -test.

$\text{Ca}^{2+}$  transient amplitudes (indo-1) in PE-stimulated myocytes with and without WM pretreatment. In control myocytes, PE increased the  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude by  $80.8\pm 1.2\%$  ( $n=27$ ), whereas in WM treated myocytes PE raised the  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude by  $131.5\pm 14.8\%$  ( $n=21$ ,  $P<0.05$ ). Figure 3 demonstrates the significantly higher  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitudes in WM-treated versus control myocytes.

### 4.4. Effect of PI3K inhibition on $\text{Ca}^{2+}$ sensitivity in semi-skinned fibres

To analyze the influence of PI3K inhibition on  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated myocardium, muscle strips were semi-permeabilized with beta-escin. Figure 4A demonstrates that in  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated muscle strips the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity was not affected by inhibition of PI3K. In PE-stimulated muscle strips the  $\text{EC}_{50}$  was  $3.37\pm 0.22$   $\mu\text{mol/L}$  following WM pretreatment versus  $3.62\pm 0.18$  in control fibers ( $n=5$ , n.s.). The maximal calcium-activated force was slightly but not significantly increased in WM-treated versus control semi-skinned fibres (Figure 4B). Thus, increased contractility by PI3K inhibition is not caused by changes in myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity.

### 4.5. Effect of PI3K inhibition on protein expression and phosphorylation level

Since inhibition of PI3K increased  $\text{Ca}^{2+}$  transients in  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated myocytes we investigated its effect on sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) and phospholamban (PLN). Incubation with WM (0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 20 min) had no effect on protein expression of SERCA and PLN when normalized to GAPDH in PE-stimulated cardiac myocytes (10  $\mu\text{mol/L}$ , 2 min, Figure 5). However, Western blot analysis with phosphospecific antibodies revealed a significantly increased phosphorylation level of PLN in WM treated myocytes. PLN-Ser16/PLN and PLN-Thr17/PLN ratio increased by  $115\pm 19\%$  ( $n=5$ ,  $P<0.05$ ) and  $53\pm 19\%$  ( $n=5$ ,  $P<0.05$ ), respectively (Figure 5), indicating higher SERCA activity.

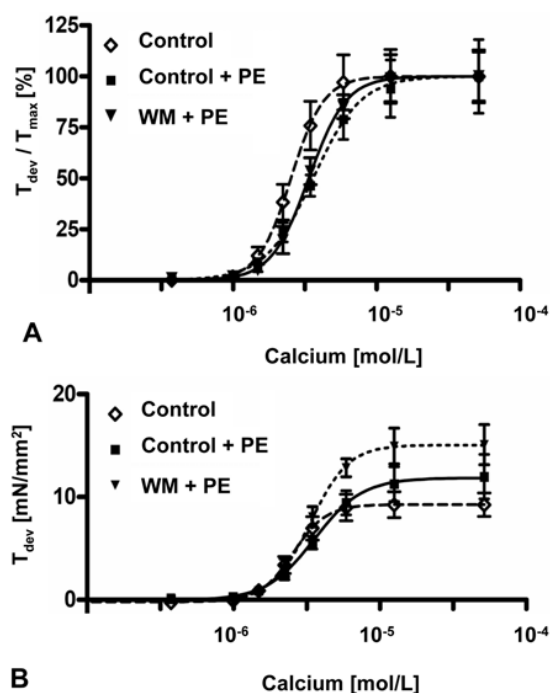
## 5. DISCUSSION

In the present study we demonstrate for the first time that inhibition of PI3Ks significantly improves contractility in  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated myocardium of rabbit hearts and that this effect is mediated by increasing PLN phosphorylation leading to higher intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients.

These findings are contradictory to studies demonstrating that activation of PI3Ks by overexpression of IGF-1 receptor or IGF-1 infusion has positive inotropic effects and that decreasing PI3K activity by knockout of insulin receptor reduces myocardial contractility (5,11,16).

Differentiating the effects of the distinct isoforms of PI3Ks may help to explain these conflicting results. Four different type I PI3Ks have been described. They are characterized by a 110 kDa catalytic subunit (p110) and are divided into the subclasses IA (PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ ,

## Inhibition of PI3K improves contractility



**Figure 4.** Effect of PI3K inhibition on Ca<sup>2+</sup> sensitivity in alpha<sub>1</sub>-adrenergically stimulated semi-skinned fibres. Intact muscle strips were semi-permeabilized with beta-escin to control the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration but maintain sarcolemmal receptors and subcellular signaling mechanisms. Semi-skinned fibres were stimulated with PE (10 μmol/L) in the presence and absence of WM (0.1 μmol/L). n=5. A. Concentration-response curves for Ca<sup>2+</sup> (tension- Ca<sup>2+</sup> relationship). Tensions (mN/mm<sup>2</sup>) were normalized to maximal tension that could be activated by saturating Ca<sup>2+</sup> concentration. Differences in EC<sub>50</sub> were statistically analyzed by extra sum-of-square F test. B. Concentration-response curves for Ca<sup>2+</sup> (tension- Ca<sup>2+</sup> relationship). Absolute tensions (mN/mm<sup>2</sup>).

PI3Kdelta) and IB (PI3Kgamma). The isoforms PI3Kalpha and PI3Kgamma are of particular importance for the heart (2,17). Stimulation of receptor tyrosine kinases (RTK) by IGF-1 or insulin activates the PI3K isoform alpha that is a crucial regulator of cardiac cell size, but also exerts positive inotropic effects due to enhanced Ca<sup>2+</sup> cycling (18-20).

On the other hand, PI3K isoform gamma is activated by beta/gamma subunits of G-Proteins and acts downstream of G protein-coupled receptors (GPCRs) as a negative regulator of cardiac contractility (2,17). PI3Kgamma-knockout mice display a marked enhancement in contractility as assessed by increased fractional shortening and peak aortic outflow velocity (17). Mechanistically, Crackower, Oudit *et al.* were the first demonstrating in an elegant study that PI3Kgamma decreases cardiac contractility by reducing cAMP levels (17). PI3Kgamma independently of its kinase activity controls PDE3B phosphodiesterase-mediated cAMP

destruction (26). Since cAMP activates PKA which in turn mediates positive chronotropic, inotropic and lusitropic effects via phosphorylation of a variety of target proteins involved in excitation-contraction coupling, reduced cAMP levels result in reduced contractility (27-29).

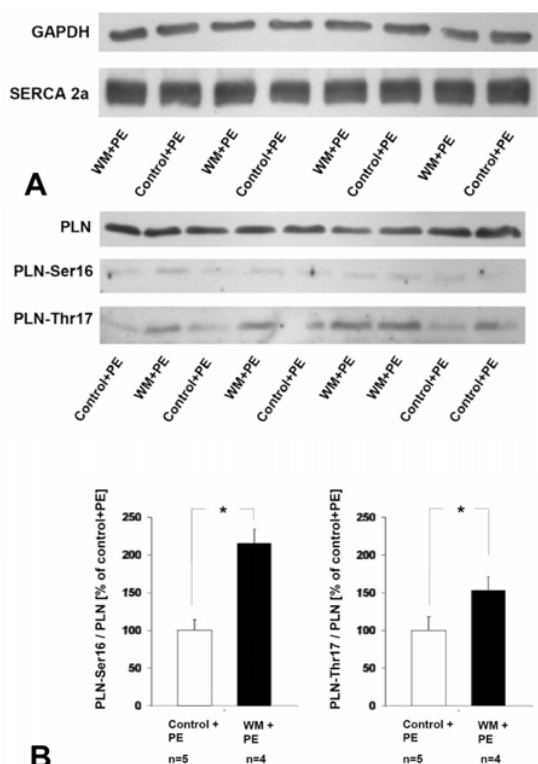
In beta-adrenergically stimulated myocardium, it has been shown that PI3Kgamma modulates particularly beta<sub>2</sub>-signaling. Beta<sub>2</sub>-adrenergic receptors (AR) are coupled to both G<sub>alpha/s</sub> and G<sub>alpha/i</sub> G-proteins and thereby either increase (via G<sub>alpha/s</sub>) or decrease (via G<sub>alpha/i</sub>) cAMP levels and contractility. The opposing effects of these 2 G-protein subunits neutralize each other, resulting in no global net effect on cAMP levels and cardiac contractility upon receptor stimulation. However, when cardiac myocytes of PI3Kgamma knockout mice are stimulated with a specific beta<sub>2</sub>-AR agonist, increases in cAMP levels and contractility are observed. In contrast, selective beta<sub>1</sub>-AR stimulation does not differentially regulate cAMP levels and contractility in PI3Kgamma null hearts (17).

Regarding other GPCRs, it has been shown that activation of purinergic receptors (P2 receptor) diminishes Ca<sup>2+</sup> oscillations via PI3Kgamma in neonatal cardiac myocytes while the depression of cardiac function observed in response to platelet-activating factor (PAF), a GPCR agonist released during ischemia, is prevented in PI3Kgamma-null hearts (30-31).

In the present study, we demonstrate for the first time that also alpha<sub>1</sub>-AR signaling is modulated by PI3K. Since alpha<sub>1</sub>-AR are GPCRs and inhibition of PI3K increases contractility in alpha<sub>1</sub>-adrenergically stimulated myocardium, the observed effect might be caused by inhibition of PI3K isoform gamma. As a limitation of the present study, wortmannin, the PI3K inhibitor used here, is an unspecific PI3K inhibitor and does not allow us to discriminate between the different isoforms of PI3K.

Under baseline conditions, we found no effect of PI3K inhibition on cardiac contractility. However, with alpha<sub>1</sub>-AR stimulation inhibition of PI3K exerts positive inotropic effects. This could be explained by higher PI3Kgamma activity under alpha<sub>1</sub>-AR stimulation. Comparable to the effects on beta<sub>2</sub>-signaling described above, PI3K activation by alpha<sub>1</sub>-GPCR stimulation counteracts the dominating positive inotropic effect of alpha<sub>1</sub>-signaling. This positive inotropic effect is enhanced by inhibition of PI3K. Mechanistically, we show that in alpha<sub>1</sub>-adrenergically stimulated myocardium PI3K inhibition leads to increased phosphorylation of PLN and higher Ca<sup>2+</sup> transient amplitudes whereas Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the myofilaments is not influenced. Since PI3Kgamma is known to reduce cAMP levels, inhibition of PI3K by wortmannin might increase contractility in alpha<sub>1</sub>-stimulated myocardium by increasing cAMP levels with subsequent higher PKA activity. PKA enhances Ca<sup>2+</sup> transients by phosphorylation of L-type Ca<sup>2+</sup>-channels and PLN (at Ser16) thereby increasing I<sub>Ca,L</sub> and SERCA activity, effectively enhancing contractility (27-29). Interestingly, phosphorylation of PLN-Thr17 (CaMKII site) also seems to be increased slightly which may be explained

## Inhibition of PI3K improves contractility



**Figure 5.** Effect of PI3K inhibition on expression and phosphorylation level of  $Ca^{2+}$  handling proteins. Isolated cardiac myocytes were incubated with and without WM (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 20 min, followed by PE stimulation for 2 min (10  $\mu\text{mol/L}$ ). A. Western blot analysis of SERCA protein expression. B. Western blot analysis of PLN expression and phosphorylation level (PLN-Ser16; PLN-Thr17). n: as indicated. \* $P < 0.05$ , unpaired *t*-test.

by a secondary effect of increased intracellular  $Ca^{2+}$  cycling and hence increased CaMKII activation.

Since in human heart failure both the PI3K and the adrenergic signaling system are highly activated, it might be speculated whether inhibition of PI3K could improve cardiac function in heart-failure patients by modulating  $\alpha_1$ -adrenergic signaling (32-34). In this regard, it must be critically marked that inhibition of PI3K increases cAMP signaling as seen with  $\beta$ -AR agonists and PDE III inhibitors which have proven to be unsuccessful long-term therapies in patients with heart failure (35). Intriguingly, PI3K knockout mice are protected from hypertrophy, fibrosis and cardiac dysfunction caused by long-term exposure to the  $\beta$ -AR agonist isoproterenol, suggesting that inhibition of PI3K may represent a therapeutic option for the treatment of decreased cardiac function in heart failure (36).

Although wortmannin, the PI3K inhibitor used in our study, has proven to be cardioprotective in a myocardial ischemia-reperfusion model (37), it is not an

ideal compound for *in vivo* studies or for application in humans since it is also known to be toxic to rats, affecting mainly hepatocytes and the epithelial lining of the gastrointestinal tract (1). Furthermore, PI3K inhibitors have been considered as anti-cancer agents, but such inhibitors may have adverse effects in the heart (38). Therefore, a more compatible, isoform- and tissue-specific PI3K inhibitor is required for *in vivo* studies addressing treatment of heart failure.

In conclusion, this is the first study to demonstrate that inhibition of PI3K improves contractility in  $\alpha_1$ -adrenergically stimulated myocardium by increasing PLN phosphorylation and  $Ca^{2+}$ -transients. This may have clinical implications for the treatment of decreased cardiac function in heart failure.

## 6. ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by EU FP6 grant LSHM-CT-2005-018833, EUGeneHeart and by a grant through the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Klin. Forschergruppe (KO 1873/2-1). Dr. Maier was funded by the DFG through a Heisenberg grant (MA 1982/3-1), an Emmy Noether-grant (MA 1982/1-5), and by a grant through the Klin. Forschergruppe (MA 1982/2-1).

## 7. REFERENCES

1. M. P. Wymann, M. Zvelebil, M. Laffargue: Phosphoinositide 3-kinase signaling - which way to target? *Trends Pharmacol Sci* 24, 366-376 (2003)
2. G. Y. Oudit, H. Sun, B. G. Kerfant, M. A. Crackower, J. M. Penninger, P. H. Backx: The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 37, 449-471 (2004)
3. L. C. Cantley: The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657 (2002)
4. J. R. McMullen, T. Shioi, L. Zhang, O. Tarnavski, M. C. Sherwood, P. M. Kang, S. Izumo: Phosphoinositide 3-kinase(p110 $\alpha$ ) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Soc USA* 100, 12355-12360 (2003)
5. J. R. McMullen, T. Shioi, W. Y. Huang, L. Zhang, O. Tarnavski, E. Bisping, M. Schinke, S. Kong, M. C. Sherwood, J. Brown, L. Riggi, P. M. Kang, S. Izumo: The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110 $\alpha$ ) pathway. *J Biol Chem* 279, 4782-4793 (2004)
6. T. Shioi, P. M. Kang, P. S. Douglas, J. Hampe, C. M. Yballe, J. Lawitts, L. C. Cantley, S. Izumo: The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J* 19, 2537-2548 (2000)
7. B. DeBosch, I. Treskov, T. S. Lupu, C. Weinheimer, A. Kovacs, M. Courtois, A. J. Muslin. Akt1 is required for

**Curriculum vitae**

Am 25. Dezember 1981 wurde ich, Swantje Kortlepel, als Tochter von Christian Franz Robert Erwin Kortlepel und Mechtild-Maria Sieverding-Kortlepel, geb. Sieverding, in Bremen geboren.

In Bremen besuchte ich von 1988 bis 1992 die Grundschule an der Parsevalstraße und anschließend bis 1998 das Gymnasium am SZ Sebaldsbrück. Im August 1998 wechselte ich auf die Sekundarstufe II an der Kurt-Schumacher-Allee, auf der ich im Juni 2001 meine Schulzeit mit dem Abitur beendete.

Im Oktober 2001 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Dort legte ich im März 2003 die ärztlich Vorprüfung (Physikum) ab.

Von Februar 2007 bis Januar 2008 absolvierte ich das Praktische Jahr im Inselspital in Bern (Schweiz), im Tappeinerkrankenhaus in Meran (Südtirol/ Italien), im DIAKO in Bremen und im Universitätsklinikum Göttingen. Im Mai 2008 beendete ich das Studium der Humanmedizin mit dem Staatsexamen in Göttingen.

Seit dem 15. Oktober 2008 bin ich im DIAKO-Bremen in der Viszeral- und Thoraxchirurgischen Abteilung als Assistenzärztin tätig.

Die Untersuchungen für diese Arbeit habe ich vom Frühjahr 2005 bis zum Herbst 2006 in der Abteilung Kardiologie unter der Leitung von Prof. Dr. L Maier und Dr. C Jacobshagen durchgeführt.