

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

**Einfluss der Calstabin2-Mutante FKBP12.6<sup>D37S</sup> in gesunden Mauskardiomyozyten und  
in einem transgenen Herzinsuffizienzmodell, das die Kalzium/Calmodulin-abhängige  
Proteinkinase II $\delta_c$  überexprimiert**

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Kristian Hellenkamp  
aus  
Koblenz

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1	Die Anatomie der Herzmuskelzelle.....	9
1.2	Die Physiologie der Herzmuskelzelle: der Erregungs-Kontraktions-Relaxations-Ablauf.....	9
1.2.1	Die Erregung .....	10
1.2.2	Die elektromechanische Kopplung .....	11
1.2.3	Die Relaxation: SERCA, NCX und andere Kalziumtransportmechanismen....	12
1.3	Die Pathophysiologie der Herzmuskelzelle: Herzinsuffizienz und Arrhythmien .....	14
1.3.1	Die Herzinsuffizienz .....	14
1.3.2	Arrhythmogenese im Rahmen der Herzinsuffizienz .....	17
1.3.3	Die Bedeutung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$ (CaMKII $\delta_c$ ) für die Entstehung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien .....	20
1.4	FKBP, die D37S-Mutante und der kardiale Ryanodinrezeptor (RyR2) .....	26
1.4.1	FKBP und die Genregulation .....	26
1.4.2	Regulation des kardialen Ryanodinrezeptors durch FKBP12.6, PKA und CaMKII $\delta_c$ .....	28
1.5	Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit.....	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.1	Genetische Veränderungen an Kardiomyozyten und deren Gewinnung.....	34
2.1.1	Transgene Mäuse .....	34
2.1.2	Isolation von Mauskardiomyozyten .....	34
2.2	Fluoreszenzmikroskopische Messungen .....	37
2.2.1	Prinzip der Fluoreszenz.....	37
2.2.2	Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-3 und Fluo-4 .....	38
2.2.3	Epifluoreszenzmikroskopie .....	42
2.2.4	Konfokale Laserscanmikroskopie .....	48
2.3	Lösungen und Chemikalien .....	51
2.4	Statistik .....	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
3.1	Einfluss von CaMKII $\delta_c$ -, FKBP12.6 <sup>D37S</sup> - und simultaner Überexpression beider Proteine auf die Biometrie der Mäuse.....	55

<b>3.2</b>	<b>Einfluss von CaMKII<math>\delta_c</math>, FKBP12.6<sup>D37S</sup> - und simultaner Überexpression beider Proteine auf Kalziumhaushalt und Kontraktilität der Kardiomyozyten .....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Die Diastolische SR-Kalzium-Freisetzung: Kalziumsparks .....	55
3.2.2	Der SR-Kalzium-Gehalt .....	62
3.2.3	Die Funktion der SR-Kalzium-ATPase (SERCA) .....	64
3.2.4	Die Aktivität des Natrium-Kalzium-Austauschers (NCX) .....	69
3.2.5	Die Post-Pausen-Beziehung der Kardiomyozyten: dynamische Änderungen des SR-Kalziumgehaltes .....	70
3.2.6	Die Kraft-Frequenz-Beziehung, intrazelluläre Kalziumtransienten und Kontraktilität .....	72
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Herzphänotypischer Einfluss von CaMKII<math>\delta_c</math> und FKBP12.6<sup>D37S</sup> .....</b>	<b>76</b>
<b>4.2</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung der Kardiomyozyten der transgenen Mäuse .....</b>	<b>79</b>
4.2.1	Der Ryanodinrezeptor unter Einfluss von CaMKII $\delta_c$ und FKBP12.6 <sup>D37S</sup> : Diastolische Kalziumfreisetzungseignisse .....	79
4.2.2	SR-Kalzium, intrazelluläre Kalziumtransienten und Kontraktilität unter Einfluss von CaMKII $\delta_c$ und FKBP12.6 <sup>D37S</sup> .....	83
4.2.3	Die Funktion der Kalziumtransportproteine SERCA und NCX bei Überexpression von CaMKII $\delta_c$ und FKBP12.6 <sup>D37S</sup> .....	86
<b>4.3</b>	<b>Die Bedeutung von CaMKII<math>\delta_c</math> und FKBP12.6 für Pathogenese und Therapie von Herzinsuffizienz und Arrhythmien: Einschränkungen und Ausblicke ...</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Anhang: Publikation .....</b>	<b>111</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aktionspotential der ventrikulären Herzmuskelzelle .....	11
Abbildung 1.2: Die elektromechanische Kopplung in der Herzmuskelzelle .....	14
Abbildung 1.3: Prinzip der Entstehung kreisender Erregungen .....	18
Abbildung 1.4: Veränderungen bei Herzinsuffizienz .....	20
Abbildung 1.5: Struktur und Aktivierung der CaMKII .....	21
Abbildung 1.6: Einfluss der CaMKII $\delta_c$ auf die Genexpression der Herzmuskelzelle .....	22
Abbildung 1.7: Einfluss der CaMKII $\delta_c$ auf die Herzmuskelzelle .....	25
Abbildung 1.8: Genregulation durch FKBP. ....	27
Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des RyR .....	28
Abbildung 2.1: Langendorff-Perfusionsanlage zur Myozytenisolation .....	36
Abbildung 2.2: Typische Mauskardiomyozyte im Durchlicht .....	37
Abbildung 2.3: Prinzip der Fluoreszenz .....	38
Abbildung 2.4: Absorptions- und Emissionsspektren von Fluo-3 und Fluo-4 im Vergleich .....	39
Abbildung 2.5: Fluoreszenzemissionsspektren von Fluo-3 und Fluo-4 im Vergleich .....	40
Abbildung 2.6: Epifluoreszenzanlage .....	43
Abbildung 2.7: Fluo-3-Fluoreszenzsignal und simultane Verkürzung über die Zeit .....	46
Abbildung 2.8: Beispiel eines koffeininduzierten Transienten .....	48
Abbildung 2.9: Prinzip der Konfokalen Laserscanmikroskopie .....	49
Abbildung 3.1: Altersverteilung zum Messzeitpunkt in Abhängigkeit vom Genotyp. ....	54
Abbildung 3.2: Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht in Abhängigkeit vom Genotyp. ....	55
Abbildung 3.3: Originalregistrierungen Linienrasterverfahren .....	56
Abbildung 3.4: Anteil sparkender Zellen in den vier Untersuchungsgruppen. ....	57
Abbildung 3.5: Sparkfrequenz in den verschiedenen Untersuchungsgruppen. ....	58
Abbildung 3.6: Sparkamplitude in den verschiedenen Untersuchungsgruppen. ....	59
Abbildung 3.7: Rückgangszeit 50% und Sparkdauer in Abhängigkeit vom Genotyp. ....	60
Abbildung 3.8: Sparkbreite in Abhängigkeit vom Genotyp. ....	61
Abbildung 3.9: Kalkuliertes diastolisches Kalziumleck aus dem SR. ....	62
Abbildung 3.10: Beispielhafte Originalregistrierungen der koffeininduzierten Transienten. ..	63
Abbildung 3.11: Kalziumtransienten nach Koffeinapplikation. ....	63
Abbildung 3.12: Sparkfrequenz pro $\mu\text{mol/l}$ SR-Kalzium. ....	64
Abbildung 3.13: Beispielhafter Rückgangsverlauf von Kalziumtransienten. ....	65

Abbildung 3.14: RT 50% der Kalziumtransienten. ....	66
Abbildung 3.15: RT 80% und RT 90% der Kalziumtransienten. ....	67
Abbildung 3.16: tau-Werte der Kalziumtransienten bei 1 Hz. ....	68
Abbildung 3.17: Relaxationszeit 80% der stimulierten Zellverkürzungen. ....	69
Abbildung 3.19: Originalregistrierung zur Untersuchung der Post-Pausen-Beziehung. ....	71
Abbildung 3.20: Kalziumtransienten nach Stimulationspause. ....	72
Abbildung 3.21: Kraft-Frequenz-Beziehung: Kalziumtransientenamplituden. ....	73
Abbildung 3.22: Originalregistrierungen von Kalziumtransienten. ....	74
Abbildung 3.23: Kraft-Frequenz-Beziehung: Zellverkürzungen. ....	75
Abbildung 4.1: Histologie und Myozytendurchmesser in Abhängigkeit vom Genotyp. ....	77
Abbildung 4.2: Echokardiographische Untersuchung der vier Genotypen. ....	78
Abbildung 4.3: Fractional Shortening (FS) in vivo. ....	85
Abbildung 4.4: Zelluläre Substrate von Arrhythmien. ....	90

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Stimulationsprotokoll am Epifluoreszenzmikroskop.....	44
Tabelle 2.2: Isolationstyrode.....	51
Tabelle 2.3: Stopp-Tyrode.....	51
Tabelle 2.4: Enzym-Tyrode.....	52
Tabelle 2.5: Tyroden für den Kalziumaufbau.....	52
Tabelle 2.6: Messtyrode.....	52
Tabelle 2.7: Koffeinlösung.....	52
Tabelle 2.8: Fluoreszenzfarbstoffe.....	53

## Formelverzeichnis

Formel 2.1: Berechnung der intrazellulären Kalziumkonzentration.....	40
Formel 2.2: Berechnung der Fluoreszenzamplitude.....	45
Formel 2.3: Berechnung der fraktionellen Myozytenverkürzung.....	45
Formel 2.4: Angenäherte exponentielle Abfallfunktion.....	46
Formel 2.5: Tau $\tau$ .....	46

## Abkürzungsverzeichnis

Berücksichtigt wurden vor allem fachsprachliche Abkürzungen. Gebräuchliche allgemeinsprachliche Abkürzungen sind dagegen nicht enthalten. Bei gängigen englischen fachsprachlichen Abkürzungen wurde zum Teil die englische Abkürzung beibehalten, auch wenn in der ausgeschriebenen Variante die deutsche Übersetzung verwendet wurde.

AP	Aktionspotential
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CaM	Calmodulin
CaMKII $\delta_c$	zytosolische Isoform der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta$

CaMKII $\delta_B$	nukleäre Isoform der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta$
CaMK/FKBP12.6	Genotyp mit simultaner transgener Überexpression der CaMKII $\delta_c$ und von FKBP12.6 <sup>D37S</sup>
CICR	<i>calcium-induced calcium release</i> , kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung
CPVT	Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie
CSQ	Calsequestrin
DAD(s)	<i>delayed afterdepolarization(s)</i> , Späte Nachdepolarisation(en) des Aktionspotentials
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DT	doppelt transgen, Genotyp mit simultaner transgener Überexpression der CaMKII $\delta_c$ und von FKBP12.6 <sup>D37S</sup>
EAD(s)	<i>early afterdepolarization(s)</i> , Frühe Nachdepolarisation(en) des Aktionspotentials
EDD	<i>enddiastolic diameter</i> , Enddiastolischer Durchmesser
EDV	<i>enddiastolic volume</i> , Enddiastolisches Volumen
ESD	<i>endsystolic diameter</i> , Endsystolischer Durchmesser
esNSE	<i>early-spike nonstimulated event</i> , frühes nicht-stimuliertes Ereignis, zelluläres Arrhythmiesubstrat
F <sub>0</sub>	Baseline (diastolische) Fluoreszenzintensität
FK-506	Tacrolimus, Makrolid, das an FKBP bindet
FKBP	FK-506-Bindeprotein, auch Calstabin
FKBP12.0	12,0 kDa schwere Isoform des FKBP
FKBP12.6	12,6 kDa schwere Isoform des FKBP, mit hoher Bindeaffinität am kardialen Ryanodinrezeptor
FKBP12.6 <sup>D37S</sup>	Mutante der FKBP12.6-Isoform, bei der ein Aspartat an Position 37 gegen ein Serin ausgetauscht wurde
FS	<i>fractional shortening</i> , Kontraktilität
HRC	Histidinreiches Kalziumbindeprotein
I <sub>Ca</sub>	Sarkolemmaler Kalziumeinwärtsstrom über L-Typ Kalziumkanäle
I <sub>Kur</sub> , I <sub>Kr</sub> , I <sub>Ks</sub>	auswärtsgerichtete Kaliumströme durch verzögernde gleichgerichtete Kaliumkanäle
I <sub>Na/Ca</sub>	sarkolemmaler Ionenaustauschstrom über den NCX



$I_{ti}$	transienter Kationeneinwärtsstrom am ehesten über den NCX, der späte Nachdepolarisationen bewirken kann
$I_{to}$	transienter auswärtsgerichteter Kaliumstrom, der eine frühe Phase der Repolarisation des AP bewirkt
IsNSE	<i>late-spike nonstimulated event</i> , spätes nicht-stimuliertes Ereignis, zelluläres Arrhythmiesubstrat
LVEDD	Linksventrikulärer Enddiastolischer Diameter
LVESD	Linksventrikulärer Endsystolischer Diameter
LVPW	Linksventrikuläre Posteriore Wanddicke
$Na^+/K^+$ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NCX	sarkolemmaler Natrium-Kalzium-Austauscher, transportiert 3 $Na^+$ -Ionen im Austausch gegen ein $Ca^{2+}$ -Ion
NFAT	<i>nuclear factor of activated t-cells</i> , Transkriptionsfaktoren, die durch Calcineurin dephosphoryliert werden
n.s.	nicht signifikant
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	Kalzium-Phospholipid-abhängige Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
RT X%	(auch $RT_{x\%}$ ), Rückgangszeit der Kalziumtransienten bzw. Relaxationszeit der Zellverkürzungen, $RT_{x\%}$ gibt die Zeit an, die der Kalziumtransient bzw. die Zellverkürzung benötigt, um wieder um x Prozent des Maximalwertes abzufallen. Verwendet als RT 50%, RT 80% oder RT 90%.
RyR	Ryanodinrezeptor, Kalziumfreisetzungskanal des SR
RyR1	skelettmuskelspezifische Isoform des RyR
RyR2	herzmuskelspezifische Isoform des RyR
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
Ser-2808/09	Serin an Aminosäureposition 2808 bzw. 2809 des RyR, die durch die PKA und ggf. die $CaMKII\delta_c$ phosphoryliert wird.
Ser-2814/15	Serin an Aminosäureposition 2814 bzw. 2815 des RyR, die durch die $CaMKII\delta_c$ phosphoryliert wird.
SERCA2a	Sarkoplasmatische Kalzium-ATPase der Herzmuskelzelle
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSS	<i>Steady-State-Status</i> , Gleichgewichtsbedingungen

SW	<i>septal wall thickness</i> , Septumdicke
TAC	<i>transaortic constriction</i> , operative Verengung der Aorta zur Provokation einer Nachlast-induzierten Herzhypertrophie
$\tau$	tau, Abfallkonstante einer exponentiellen Zerfallfunktion
Thr-286	Threonin an Aminosäureposition 286 der CaMKII $\delta_c$ , Autophosphorylierungsstelle
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Anatomie der Herzmuskelzelle

Der Herzmuskel besteht aus quergestreiften Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), die über Kontaktstrukturen, sogenannte Disci intercalares oder Glanzstreifen, miteinander verknüpft sind. Im Bereich dieser Kontaktstrukturen liegen Gap Junctions, die die Kardiomyozyten elektrisch miteinander koppeln und zu einem funktionellen Synzytium machen. Sie ermöglichen die gerichtete Erregungsweiterleitung, die für den koordinierten Kontraktionsablauf des Herzens von Nöten ist. Jede einzelne Herzmuskelzelle wird durch das Sarkolemm begrenzt. Dieses bildet überwiegend transversal verlaufende Einstülpungen aus, die als T-Tubuli bezeichnet werden und eine besonders hohe Dichte an L-Typ-Kalziumkanälen aufweisen. Weitere Ionenkanäle und -pumpen der Zellmembran sind in Abschnitt 1.2.1 dargestellt. Innerhalb der Kardiomyozyten stellt das mehrheitlich longitudinal angeordnete Sarkoplasmatische Retikulum (SR) den Kalziumspeicher dar. Dieses weist zum Teil erweiterte Zisternen auf, die an den Kontaktstellen mit den T-Tubuli sogenannte Diaden bilden.

Ein Hauptbestandteil der Kardiomyozyten ist der kontraktile Apparat (Myofilamente), der zirka 45-60% des Zellvolumens ausmacht (Bers 2001). Der Aufbau der Myofilamente in hintereinander liegenden Sarkomeren ist für die typische Querstreifung der Herzmuskelzellen (im elektronenmikroskopischen Bild) verantwortlich und entspricht weitgehend dem der Skelettmuskulatur.

Zwischen den fibrillären Strukturen sind große cristareiche Mitochondrien, Glykogen, Peroxisomen sowie weitere Zellorganellen und Elemente des Zytoskelettes eingelagert (Bers 2001).

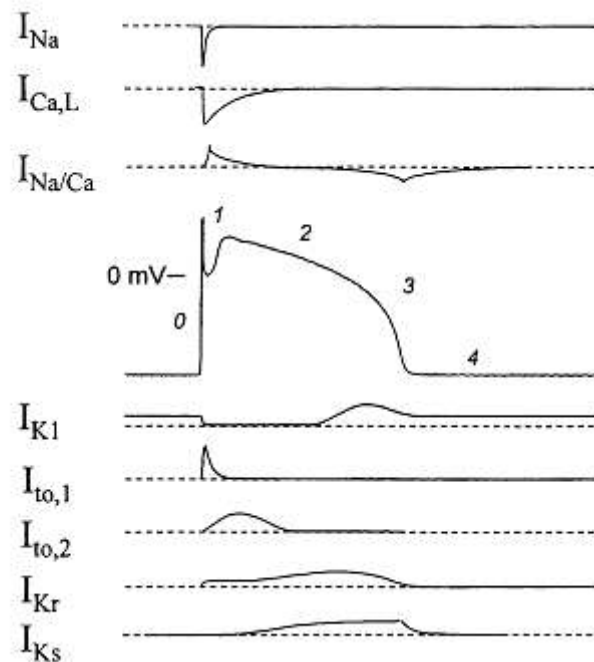
## 1.2 Die Physiologie der Herzmuskelzelle: der Erregungs-Kontraktions-Relaxations-Ablauf

Um der Pumpfunktion des Herzens gerecht zu werden, müssen die einzelnen Herzmuskelzellen einen koordinierten Kontraktions-Relaxations-Ablauf vollführen. Die Koordination erfolgt dabei mit Hilfe von elektrischen Signalen, die physiologischerweise im Sinusknoten generiert werden und dann über das spezifische Reizleitungssystem die Ventrikel erreichen. Hier erfolgt die Weiterleitung dann von Muskelzelle zu Muskelzelle via Gap

Junctions, bis schließlich das komplette Ventrikelmyokard erregt ist (Klinke und Silbernagl 1996).

### 1.2.1 Die Erregung

Triebkräfte für Ionenströme zwischen Intra- und Extrazellulärraum sind einerseits transmembranöse Konzentrationsdifferenzen und andererseits elektrische Potentialdifferenzen, die durch die Ladungen der Ionen hervorgerufen werden. Die vorherrschenden Konzentrationsdifferenzen werden dabei durch aktive Transportsysteme, insbesondere die Natrium-Kalium-Ionenpumpe ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), aufrecht gehalten. Diese befördert pro Molekül ATP drei Natriumionen nach außen und zwei Kaliumionen ins Zellinnere. Es handelt sich also um einen elektrogenen Transport, der das in ventrikulären Kardiomyozyten vorherrschende Ruhemembranpotential von zirka -85 mV bewirkt. Auf einen Reiz, der die Membran auf ein Schwellenpotential von zirka -65 mV depolarisiert, reagieren sie mit einem Aktionspotential. Dieses wird durch zeit- und potentialabhängige Veränderungen der Membranleitfähigkeit für Ionen hervorgerufen und kann in vier Phasen unterteilt werden (Birkeland et al. 2005). In der Phase 0 kommt es zu einer schnellen Depolarisation bis hin zu einer Umpolarisierung der Membran auf positive Werte um +35 bis +50 mV („Overshoot“), die durch das Öffnen spannungsabhängiger Natriumkanäle und den raschen Einstrom von Natriumionen ins Zellinnere hervorgerufen wird. Im Anschluss daran kommt es zu einer Deaktivierung der schnellen Natriumkanäle. Sie können erst wieder geöffnet werden, nachdem das Membranpotential Werte um zirka -60 mV erreicht hat. Gleichzeitig werden auswärtsgerichtete Kaliumkanäle aktiviert ( $I_{\text{to}}$ ), die eine frühe Phase der Repolarisation (Phase 1) bewirken. In der nun folgenden Plateauphase (Phase 2) ist das Membranpotential relativ stabil, da sich ein einwärtsgerichteter Kalziumstrom durch die L-Typ-Kalziumkanäle und auswärtsgerichtete Kaliumströme durch verzögernde gleichgerichtete Kaliumkanäle ( $I_{\text{Kur}}$ ,  $I_{\text{Kr}}$ ,  $I_{\text{Ks}}$ ) elektrisch die Balance halten. Einschränkend muss gesagt werden, dass bei der Maus die Expression des transienten auswärtsgerichteten Kaliumkanals ( $I_{\text{to}}$ ) verstärkt ist (Bers 2001), so dass die frühe Repolarisation hier stärker ausgeprägt ist und keine so ausgeprägte Plateauphase wie bei humanen Kardiomyozyten besteht. Im Anschluss an die Plateauphase folgt die Phase der späten Repolarisation (Phase 3), die durch eine weitere Zunahme der Kaliumauswärtsströme hervorgerufen wird. Der Repolarisation entgegengesetzt ist in dieser Phase ein elektrogener Natriumeinwärts- und Kalziumauswärtsstrom durch den  $3\text{Na}^+/\text{1Ca}^{2+}$ -Antiporter.



**Abbildung 1.1: Aktionspotential der ventrikulären Herzmuskelzelle.** Eingezeichnet sind die 5 Phasen des Aktionspotentials: Phase 0: schneller Aufstrich, Phase 1: frühe Repolarisation, Phase 2: Plateauphase, Phase 3: Depolarisation, Phase 4: Ruhemembranpotential. Oberhalb und unterhalb des Aktionspotentials sind einzelne Ionenströme dargestellt, denen das AP zugrunde liegt. Kurvenläufe unterhalb der gestrichelten Linien stellen Einwärtsströme dar, oberhalb der gestrichelten Linien sind Auswärtsströme dargestellt. Einwärtsstrom bedeutet dabei Nettoeinstrom positiver Ladungen. Die Dauer des ventrikulären Aktionspotentials ist frequenz- und speziesabhängig und beträgt beim Menschen zirka 400 ms. (Modifiziert nach Haverkamp et al. 2000, S. 222)

## 1.2.2 Die elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung beschreibt den Prozess, der den elektrischen Impuls Aktionspotential (siehe oben) in mechanische Kraftentwicklung umsetzt. Schon 1883 konnte Ringer zeigen, dass dafür Kalzium essentiell ist: er zeigte am isolierten Froschherz, dass es in Abwesenheit von Kalzium, anders als am Skelettmuskel, zu keiner Kontraktion kommt (Ringer 1883). Die Erforschung der genauen Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, gelang erst wesentlich später. So entwickelte Huxley die Gleitfilamenttheorie, die die Rolle von Kalzium bei der Kontraktion entschlüsselt (Huxley und Hanson 1954, Huxley 1967, Huxley 1969).

### 1.2.2.1 Das sarkoplasmatische Retikulum, der kardiale Ryanodinrezeptor und die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) stellt den intrazellulären Kalziumspeicher der Herzmuskelzelle dar. Sein Kalziumfreisetzungskanal ist der Ryanodinrezeptor 2 (RyR2), der

seine Öffnungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit hoher Kalziumkonzentrationen steigert und sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den größtenteils in den T-Tubuli lokalisierten L-Typ-Kalziumkanälen befindet. Eine Einheit aus T-Tubuli mit L-Typ-Kalziumkanälen und Sarkoplasmatischem Retikulum mit RyR2 wird als Diade bezeichnet, der zytosolische Raum dazwischen als diadischer Spalt. Somit triggert der Kalziumeinstrom in der Phase 2 des Aktionspotentials (siehe Abschnitt 1.2.1) eine Kalziumfreisetzung aus dem SR über den RyR2 (Fabiato und Fabiato 1975). Dieser Mechanismus wird kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung (CICR) genannt und führt zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration von zirka  $0,1 \mu\text{m}$  in der Diastole auf über  $1,0 \mu\text{m}$  in der Systole (Blinks und Endoh 1986). Diese Kalziumkonzentrationssteigerung ist essentiell für die Zellkontraktion.

### **1.2.2.2 Die Zellkontraktion**

Der Mechanismus, durch den eine Kalziumkonzentrationssteigerung zur Zellkontraktion führt, wird als Gleitfilamenttheorie bezeichnet (Huxley und Hanson 1954). Danach gleiten in den kontraktile Elementen der Muskelzelle Myosin- und Aktinfilamente ineinander. Dem Aktinfilament aufgelagert ist dabei ein Troponinkomplex. Durch Bindung von Kalzium an Troponin C erfährt dieses eine Konfigurationsänderung, die letztlich dazu führt, dass am Aktinfilament eine Bindungsstelle für Myosin zugänglich wird und sich eine Querbrücke ausbilden kann. Anschließend kommt es durch Bindung und Hydrolyse von ATP am Myosin zu einem Abknicken des Myosinköpfchens gegenüber dem Aktinfilament und dadurch zu einem Ineinandergleiten der beiden Filamente um zirka 4-10 nm (Molloy et al. 1995, Tyska et al. 1999). Durch erneute Bindung von ATP an Myosin kann sich die Querbrücke wieder lösen und der Gleitmechanismus wiederholen bis die Gesamtverkürzung des Muskels erreicht ist.

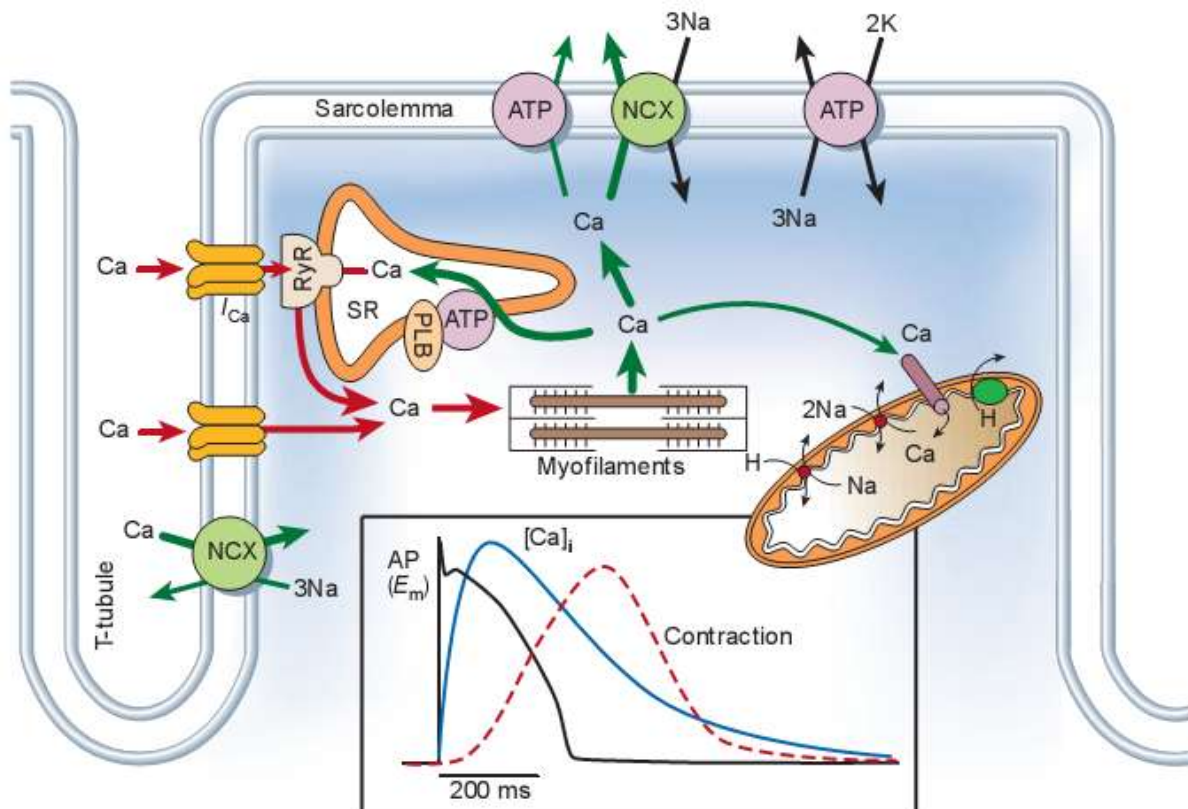
### **1.2.3 Die Relaxation: SERCA, NCX und andere Kalziumtransportmechanismen**

Wie oben beschrieben ist Kalzium essentiell für die Kontraktion der Myozyten. Analog wird die Relaxation erreicht, indem die Konzentration an zytoplasmatischem Kalzium von  $1,0 \mu\text{m}$  systolisch auf  $0,1 \mu\text{m}$  diastolisch (Blinks und Endoh 1986) reduziert wird. Mit der Phase 3 des Aktionspotentials kommt es zu einer Inaktivierung der spannungsabhängigen L-Typ-Kalzium-Kanäle und durch die konsekutive Reduktion der Kalziumkonzentration im diadischen Spalt auch zum Sistieren des Kalziumausstroms aus dem SR über den RyR2. Darüber hinaus existieren mehrere Transportsysteme, die je nach Spezies und Herzfrequenz unterschiedlichen Anteil an der Kalziumelimination haben. Ein großer Teil des für die

Kontraktion benötigten Kalziums stammt aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Entsprechend muss in der Diastole Kalzium zurück in das SR gepumpt werden. Dieser energieabhängige Prozess wird durch die Sarkoplasmatische Kalzium-ATPase (SERCA2a) übernommen (Tada et al. 1982). Ihr Anteil an der diastolischen Kalziumelimination macht beim Menschen über 60% (Pieske et al. 1999) und bei der Maus sogar zirka 90% (Li L et al. 1998) aus und kann frequenzabhängig variiert werden (Maier et al. 2000). Sie unterliegt der Regulation durch Phospholamban (PLB, Tada und Katz 1982), wobei PLB im dephosphorylierten Zustand mit der SERCA assoziiert ist und eine hemmende Wirkung auf sie ausübt. Durch Phosphorylierung von PLB kommt es zu Abdissoziation und dadurch zum Wegfall der Inhibition. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass PLB von verschiedenen Proteinkinasen wie der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (Kirchberger et al. 1974, Tada et al. 1974), der Kalzium-Phospholipid-abhängigen Proteinkinase C (Iwasa und Hosey 1984; Movsesian et al. 1984) und der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta$ c (CaMKII $\delta$ c) (Le Peuch et al. 1979) an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert werden kann und somit die SERCA indirekt vielfältigen Regulationsmechanismen unterliegt. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass es an der SERCA2a auch eine eigene Phosphorylierungsstelle für die CaMKII $\delta$ c gibt und letztere darüber aktivierende Einflüsse ausübt (Xu et al. 1993).

Der zweite wichtige Mechanismus, der zur Relaxation beiträgt, ist der sarkolemmale Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX). Sein Anteil an der Kalziumelimination macht beim Menschen zirka 37% (Pieske et al. 1999) und bei Ratte und Maus 7 bis 9% (Bassani JW et al. 1994; Li L et al. 1998) aus. Es handelt sich um einen sekundär-aktiven elektrogenen Transportmechanismus, der ein Kalziumion im Austausch gegen drei Natriumionen transportiert (Reuter und Seitz 1968). Den Hauptmotor stellt dabei der große Konzentrationsunterschied zwischen intra- und extrazellulärem Natrium dar. Andersherum kann der NCX bei entsprechenden elektrochemischen Gradienten auch Kalzium in die Zelle einschleusen und Natrium eliminieren („reverse-mode“). Dies ist in der Phase 2 des Aktionspotentials der Fall (siehe Abschnitt 1.2.1).

Weitere Kalziumeliminationssysteme sind die Sarkolemmale Kalzium-ATPase sowie der Mitochondriale Kalziumuniporter. Ihr Anteil an der Relaxation ist mit 1-2% in Mensch und Maus (Pieske et al. 1999; Li L et al. 1998) allerdings vernachlässigbar gering.



**Abbildung 1.2: Die elektromechanische Kopplung in der Herzmuskelzelle:** In der Phase 2 des Aktionspotentials kommt es zu einem Kalziumeinstrom ( $I_{Ca}$ ) über L-Typ-Kalziumkanäle, der eine Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den Ryanodinrezeptor (RyR) triggert (kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung). Durch Bindung von Kalzium an die Myofilamente kommt es zur Kontraktion der Kardiomyozyte (systolische Kontraktionsphase, rote Pfeile). Anschließend wird das Kalzium durch die SR-Kalzium-ATPase und den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) aus dem Zytoplasma eliminiert und so die Relaxation ermöglicht (diastolische Relaxationsphase, grüne Pfeile). Im schwarzen Kasten ist der zeitliche Zusammenhang zwischen Aktionspotential (AP), sarkoplasmatischer Kalziumkonzentration ( $[Ca]_i$ ) und Kontraktion dargestellt. (Aus Bers 2002, S. 198)

## 1.3 Die Pathophysiologie der Herzmuskelzelle: Herzinsuffizienz und Arrhythmien

### 1.3.1 Die Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz bezeichnet die Unfähigkeit des Herzmuskels, eine für die Bedürfnisse ausreichende Sauerstoffversorgung der Organe zu gewährleisten. Dabei handelt es sich nicht um eine eigenständige Krankheit, sondern um ein Syndrom, dass durch viele unterschiedliche Ursachen hervorgerufen werden kann (Libby et al. 2007).

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz nimmt mit dem Alter zu. So liegt die Gesamtprävalenz der klinisch identifizierten Herzinsuffizienzerkrankungen bei 0,3-2%, im Kollektiv der über 65-



Jährigen liegt sie dagegen bei über 10% (McMurray und Stewart 2000). Die 5-Jahres-Mortalität der Herzinsuffizienz liegt bei nahezu 60% (McMurray und Stewart 2000) und in der Todesursachenstatistik 2008 für Deutschland wird die Herzinsuffizienz an dritter Stelle aufgeführt (Statistisches Bundesamt 2010).

Es existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Einteilungen und Klassifikationen der Herzinsuffizienz. So kann man funktionell zwischen systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz, anatomisch zwischen Links-, Rechts- und Globalherzinsuffizienz, zeitlich zwischen Akuter und Chronischer Herzinsuffizienz, pathophysiologisch zwischen Low- und High-Output-Failure und klinisch nach Schweregrad (NYHA-Klassifikation, AHA-Klassifikation) unterscheiden.

Interessanterweise findet sich trotz der Mannigfaltigkeit der Manifestationsformen und Ätiologien auch eine Vielzahl pathophysiologischer Gemeinsamkeiten. So kommt es im Rahmen der Herzinsuffizienz zu einer Vielzahl an Gegenregulationsmechanismen, die zwar zunächst eine kurzfristige Stabilisierung der Myokardfunktion erlauben, im Verlauf jedoch zur Progression (Maladaptation) beitragen (Weil und Schunkert 2006). Ein Beispiel dafür ist die neurohumorale Aktivierung, die mit erhöhten Spiegel von Katecholaminen, Angiotensin-II, Aldosteron, Endothelin-1 und BNP einhergeht. Der erhöhte Katecholaminspiegel führt durch positive Chrono-, Dromo-, Ino- und Bathmotropie zunächst zu einer Erhöhung des Herzzeitvolumens und kann insofern als kompensatorisch eingestuft werden. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu einer Herunterregulation der kardialen Betarezeptoren (Bristow et al. 1986) und somit zu einem Wirkverlust am Herzen. Gleichzeitig bewirken Katecholamine durch Vasokonstriktion eine Nachlaststeigerung und somit eine Druckbelastung für das Herz. Durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) kommt es ebenfalls zu einer Druckbelastung durch Vasokonstriktion und zusätzlich zu vermehrter Flüssigkeitsretention mit konsekutiver Vorlastserhöhung. Letzteres ist auch insofern von besonderer Bedeutung, als dass im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz eine Verminderung der positiven (Vor-)dehnungs-Kraft-Beziehung (Frank-Starling-Mechanismus) beobachtet wurde (Schwinger et al. 1994).

Nach dem LaPlace-Gesetz (Myokardiale Wandspannung = Intrakardialer Druck  $\times$  Ventrikellinnenradius /  $2 \times$  Ventrikelwanddicke) zieht eine Drucksteigerung eine Erhöhung der myokardialen Wandspannung mit sich. Dies führt zu einer kompensatorischen Ventrikelhypertrophie, die nach Erreichen eines kritischen Herzgewichtes zu einer relativen Koronarinsuffizienz führen kann. Bei überwiegender Volumenbelastung steigt die Wandspannung zunächst insbesondere in der Diastole an und führt dadurch zu einer Zunahme

der Kardiomyozytenlänge und somit zu einer Dilatation (Zunahme des Ventrikelinnenradius). Dies führt wiederum zu einer Steigerung der Wandspannung (Weil und Schunkert 2006). Unabhängig von der Ursache führt eine Erhöhung der myokardialen Wandspannung stets zu einer Widerstandserhöhung in den Koronargefäßen und nach dem Ohmschen Gesetz so zu einer Reduktion der Koronarperfusion.

Ein weiterer Aspekt des kardialen Remodelings ist eine zunehmende Fibrosierung (Hirzel et al. 1985, Weber und Brilla, 1991) und zwar insbesondere eine Steigerung des myokardialen Kollagengehaltes. Dies bewirkt eine Störung der diastolischen Relaxation und der Ventrikelcompliance. Zusätzlich kommt es im Rahmen des Remodelings durch unterschiedliche Mechanismen zu einem Zellverlust durch Apoptose beziehungsweise Nekrose. Dabei scheint neben Sauerstoffmangel und ventrikulärer Spannungserhöhung auch die Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Cheng et al. 1995, Ide et al. 2000) eine Rolle zu spielen.

Entscheidende Bedeutung bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz kommt offenbar auch dem myokardialen Kalziumhaushalt (Gwathmey et al. 1987) zu. Durch veränderte Expression der kalziumregulierenden Proteine kommt es hier zu erheblichen Alterationen. So findet man erniedrigte Level der SERCA-Expression (Suko et al. 1970, Hasenfuss et al. 1994) bei gleichzeitig bestehender Erhöhung der (diastolischen) Öffnungswahrscheinlichkeit des kardialen Ryanodinrezeptors (Marx et al. 2000). Dadurch kommt es zu einer Reduktion des SR-Kalziumgehaltes (Denvir et al. 1995, Pieske et al. 1999) und durch vermehrte Expression und Funktion des NCX (Studer et al. 1994, Reinecke et al. 1996, Hasenfuss et al. 1999) zu einer transsarkolemmalen Kalziumelimination und damit zu einem Verlust von Kalzium aus der Zelle. Dabei ist die vermehrte Expression des NCX möglicherweise als Kompensationsmechanismus einzustufen, da die Reduktion der SERCA-Aktivität eine Störung der Relaxation nach sich zieht und dies einerseits die diastolische Füllung und andererseits die Koronarperfusion beeinträchtigt. Letztlich bewirken all diese Mechanismen jedoch eine Abnahme der Kalziumtransientenamplitude und folglich der Kontraktilität. Insbesondere der erhöhten diastolischen Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors scheint darüber hinaus auch eine besondere Bedeutung bei der Arrhythmogenese im Rahmen der Herzinsuffizienz zuzukommen (Pogwizd et al. 2001, siehe unten). Zusätzlich kommt es durch Verringerung des  $I_{K1}$  (Beuckelmann et al. 1993, Pogwizd et al. 2001) zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer (Beuckelmann et al. 1992, 1993), was Nachdepolarisationen und dadurch ebenfalls die Entstehung von Arrhythmien begünstigt.

### 1.3.2 Arrhythmogenese im Rahmen der Herzinsuffizienz

Unter Herzrhythmusstörung versteht man die Abweichung der zeitlichen Folge oder der Regelmäßigkeit der Herzaktionen von der normalen Herzfrequenz (Pschyrembel 2010).

Herzrhythmusstörungen sind für zirka 40% der Todesfälle im Rahmen der Herzinsuffizienz verantwortlich (Packer 1985) und stellen damit eine häufige und schwerwiegende Komplikation dar.

Grundsätzlich unterscheidet man bradykarde von tachykarden Herzrhythmusstörungen. Ursachen für bradykarde Arrhythmien sind vor allem Störungen der Erregungsbildung und der Erregungsweiterleitung. Als elektrophysiologische Pathomechanismen, die zur Entstehung von tachykarden Herzrhythmusstörungen führen, kommen 1.) eine abnorme Automatie, 2.) kreisförmige (Reentry-) Erregungen und 3.) eine getriggerte Aktivität in Frage (Zipes 2003), wobei fokale Mechanismen (d.h. abnorme Automatie und getriggerte Aktivität) für die Entstehung von zirka 50% der tachykarden ventrikulären Arrhythmien bei Patienten mit Ischämischer Herzinsuffizienz und sogar für nahezu alle tachykarden ventrikulären Arrhythmien bei Patienten mit Nicht-Ischämischer Herzinsuffizienz verantwortlich sind (Pogwizd et al. 1992, 1998). Der abnorm gesteigerten Automatie liegt dabei ein Anstieg des Ruhemembranpotentials eines Kardiomyozyten auf weniger negative Werte und somit eine Annäherung an das Schwellenpotential zugrunde. Ursache dafür kann im Rahmen der Herzinsuffizienz unter anderem die Reduktion repolarisierender Kaliumströme ( $I_{K1}$ ) sein (Beuckelmann et al. 1993; siehe Abschnitt 1.3.1). Reentry-Mechanismen spielen zwar nur eine geringe Rolle bei der Entstehung von Arrhythmien im Rahmen der Nicht-Ischämischen Herzinsuffizienz, andererseits stellen sie aber den wesentlichen Pathomechanismus für ihre Weiterleitung dar (Bers 2001). Wenn ein Erregungsimpuls auf ein nicht erregbares Areal (Narbe, Blutgefäß) trifft, verläuft die Erregung beidseits um das Hindernis herum. Durch die relativ lange Refraktärzeit des kardialen Myozyten und die schnelle Erregungsausbreitung kann physiologischerweise verhindert werden, dass es zu einer frühzeitigen Wiedererregung kommt, wenn die beiden Erregungsfronten aufeinander treffen. Liegen aber unterschiedliche Leitungseigenschaften (Leitungsblock, Verkürzung der AP-Dauer) in den betroffenen Myokardarealen vor, so kann die eine Erregungsfront auf wieder erregbares Areal treffen und so eine kreisende Erregung auslösen (vgl. Abbildung 1.3).

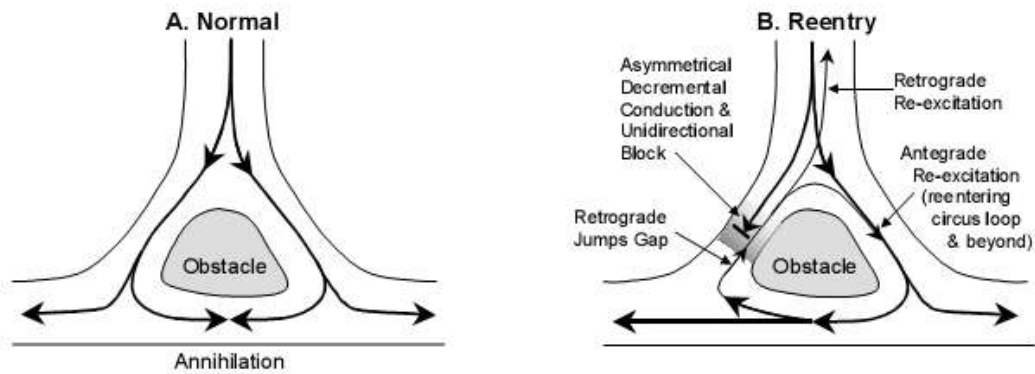


Abbildung 1.3: Prinzip der Entstehung kreisender Erregungen. (Aus Bers 2001, S. 100)

Wie oben erwähnt, stellt die getriggerte Aktivität den häufigsten Mechanismus, der zur Entstehung tachykarder ventrikulärer Arrhythmien bei Herzinsuffizienz führt, dar. Im Unterschied zur abnormen Automatie ist bei der getriggerten Aktivität ein vorangehendes Aktionspotential zur Entstehung von Nöten (Zipes 2003). Es kommt zu depolarisierenden Schwankungen der Membranspannung, die nach dem zeitlichen Bezug zum Aktionspotential in frühe (*early afterdepolarizations*, EADs) und späte Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarizations*, DADs) unterteilt werden (Cranefield 1977). Frühe Nachdepolarisationen treten entweder während der Plateau- oder während der Repolarisationsphase des Aktionspotentials auf und werden durch eine Verlängerung des Aktionspotentials begünstigt. Dies kann zum Beispiel durch eine Verminderung repolarisierender Kaliumströme oder durch eine Verstärkung depolarisierender Natriumströme, wie man sie bei angeborenen Störungen der Ionenkanäle (kongenitale Long-QT-Syndrome) oder nach Einnahme einiger Medikamente beobachten kann, hervorgerufen werden. Auch bei chronischer Herzinsuffizienz kommt es durch Reduktion repolarisierender Kaliumströme ( $I_{to}$ ,  $I_{k1}$ ,  $I_{ks}$ ) zu einer Verlängerung des Aktionspotentials (Beuckelmann et al. 1992, 1993; Kääb et al. 1996, Borchard und Hafner 2000). Durch Verlängerung des Aktionspotentials können Nachdepolarisationen durch Reaktivierung des L-Typ-Kalzium-Einstroms generiert werden (January und Riddle 1989). EADs, die in der späten Phase der Repolarisation erfolgen, sind dagegen nicht durch einen L-Typ-Kalziumeinstrom verursacht, da die L-Typ-Kalziumkanäle unterhalb von minus 40 mV refraktär sind. Ursache für diese Form der EADs ist möglicherweise ein Kationeneinstrom, der von anderen Kalziumtransportern ( $I_{Na/Ca}$ ,  $I_{ns(Ca)}$ ?) vermittelt wird oder auch kalziumunabhängige Ionenströme (Nuss et al. 1999).

Späte Nachdepolarisationen treten erst nach erfolgter Repolarisation des vorangegangenen Aktionspotentials auf. Sie basieren auf einer intrazellulären Kalziumüberladung vor allem des SR (Cranefield 1977, Zipes 2003). Diese zieht eine transmembranale Kalziumelimination

nach sich, die über den elektrogenen NCX erfolgt und so durch einen transienten (Kationen)einwärtsstrom ( $I_{ti}$ ) zu Nachdepolarisation führen kann. Begünstigend für späte Nachdepolarisationen ist die Tatsache, dass bei Herzinsuffizienz die Funktion des NCX verstärkt ist (siehe Abschnitt 1.3.1) und somit ein stärkerer Natriumeinstrom für eine gegebene intrazelluläre Kalziumkonzentration erfolgt. So konnten Pogwizd und Kollegen zeigen, dass die Menge an SR-Kalziumfreisetzung, die benötigt wird, um ein Aktionspotential zu triggern, bei Herzinsuffizienz um zirka 50% reduziert ist (Pogwizd et al. 2001). Zusätzlich ist bekannt, dass bei Herzinsuffizienz die Häufigkeit diastolischer Kalziumfreisetzungseignisse erhöht ist (Marx et al. 2000, Maier et al. 2003, Ai et al. 2005). Des Weiteren führt die Verminderung des  $I_{K1}$ , die im Rahmen der Herzinsuffizienz beobachtet werden kann, zu einem Verlust membranstabilisierender Kaliumausströme und somit zu einer weiteren Verstärkung der Depolarisation bei Natriumeinstrom über den NCX (Pogwizd et al. 2001). Wie in Abschnitt 1.3.1 beschrieben geht die fortgeschrittene Herzinsuffizienz allerdings üblicherweise mit einer Erniedrigung des SR-Kalziumgehaltes einher. Zu DADs im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es daher insbesondere in Kombination mit anderen Faktoren, die eine (akute) Erhöhung der sarkoplasmatischen bzw. der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirken. Hierfür kommen einerseits Intoxikationen mit Digitalisglykosiden in Frage, die über eine Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase zunächst zu einer Natriumüberladung und nachfolgend zu einer NCX vermittelten Kalziumüberladung führen (Ferrier und Moe 1973, Lechat und Grosogeat 1983) und andererseits erhöhte Katecholaminspiegel, die sowohl L-Typ-Kalziumeinstrom als auch die SR-Kalziumaufnahme verstärken (Osterrieder et al. 1982, Wegener et al. 1989) und so eine Kalziumüberladung bewirken. Spontane diastolische SR-Kalziumfreisetzungseignisse können dann einen transienten Einwärtsstrom ( $I_{ti}$ ) nach sich ziehen. Diese pathomechanistische Vorstellung findet eine statistische Bestätigung in der Tatsache, dass plötzlicher (arrhythmogener) Herztod vor allem bei Patienten mit mittleren Schweregraden der Herzinsuffizienz auftritt (wo noch eine erhaltene Betarezeptorsensitivität vorhanden ist), wohingegen Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz und herabgesetzter Betarezeptorsensitivität häufiger an Pumpversagen versterben (Kjekshus 1990, Fowler et al. 1986, Pogwizd et al. 2001).

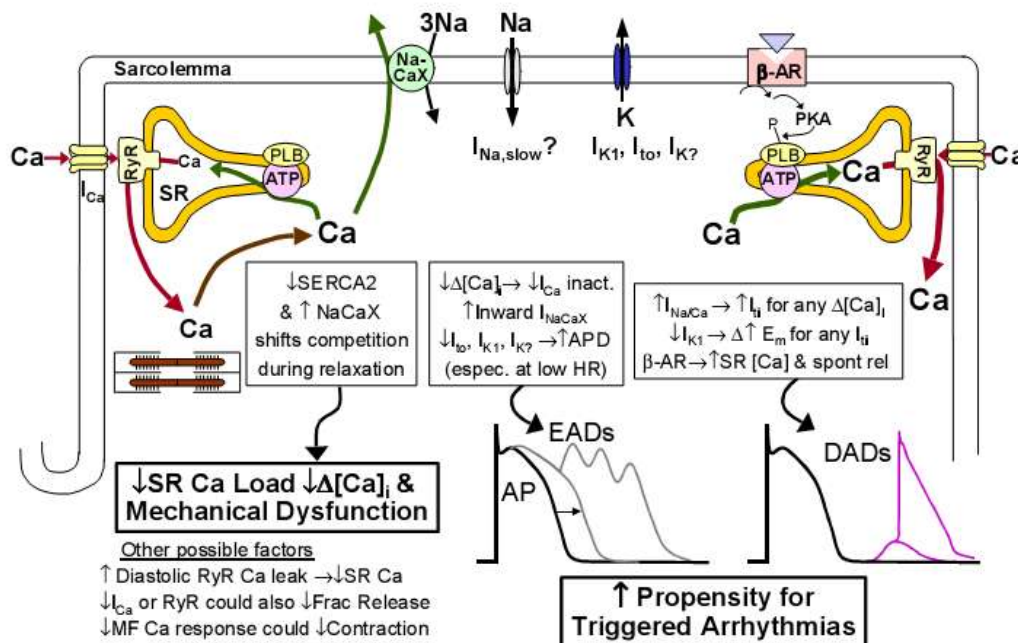


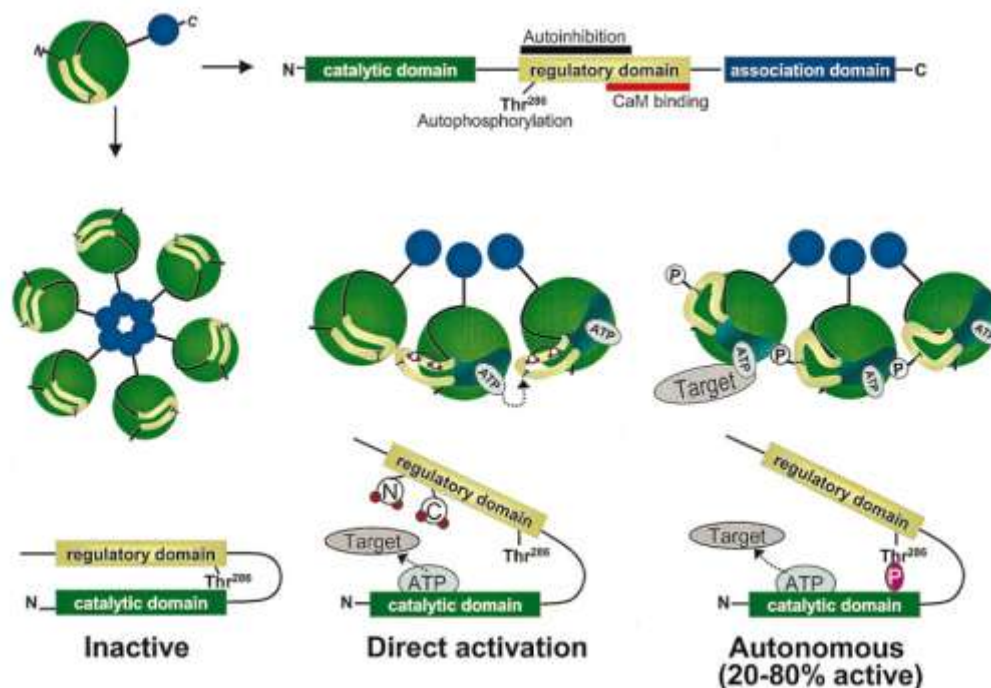
Abbildung 1.4: Veränderungen bei Herzinsuffizienz bewirken mechanische Dysfunktion und getriggerte Aktivität. (Aus Bers 2001, S. 322)

### 1.3.3 Die Bedeutung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$ (CaMKII $\delta_c$ ) für die Entstehung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien

Bei den Kalzium/Calmodulin-Kinasen handelt es sich um eine Gruppe multifunktioneller Serin/Threonin-Proteinkinasen, die ubiquitär vorkommen und nach Aktivierung durch kalziumgebundenes Calmodulin diverse intrazelluläre Zielproteine phosphorylieren (Braun und Schulman 1995). Es existieren verschiedene Isoformen und Subtypen, von denen die CaMKII $\delta$  die vorherrschende Variante im Kardiomyozyten darstellt (Jett et al. 1987). Von dieser sind die Splicevarianten  $\delta_b$  und  $\delta_c$  bekannt, wobei sich die CaMKII $\delta_b$  strukturell lediglich durch eine elf Aminosäuren lange Kernlokalisationssequenz von der CaMKII $\delta_c$  unterscheidet, die dazu führt, dass sie ausschließlich intranukleär vorkommt (Zhang und Brown 2004). Entsprechend übt diese nukleäre Form ausschließlich Einflüsse auf die Genexpression der Herzmuskelzelle aus, wohingegen die zytosolische CaMKII $\delta_c$ , die im Rahmen der vorliegenden Arbeit überexprimiert wurde, zusätzlich maßgeblich an der Regulation des myozytären Kalziumstoffwechsels (Zhang et al. 2007; siehe unten) und nach neueren Untersuchungen auch an der Regulation anderer Ionentransportsysteme (Natriumkanäle, I<sub>to</sub>; Wagner et al. 2006, Wagner et al. 2009; siehe unten) beteiligt ist.

### 1.3.3.1 Struktur und Aktivierung der CaMKII $\delta_c$

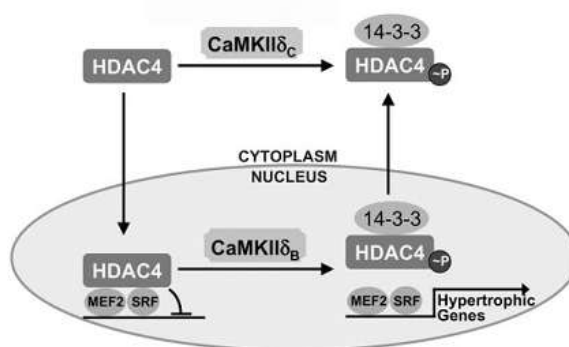
Bei der CaMKII $\delta_c$  handelt es sich um ein Holoenzym, das aus 6-12 Untereinheiten aufgebaut ist, die in einer Ringstruktur angeordnet sind (siehe Abbildung 1.5). Jede dieser Untereinheiten besteht aus drei unterschiedlichen Domänen: einer katalytischen Domäne, einer (auto-)regulatorischen Domäne und einer Assoziationsdomäne, die die Oligomerisierung der Kinase bewirkt. Die (auto-)regulatorische Domäne beinhaltet ein autoinhibitorisches Segment. Durch Bindung von Kalzium/Calmodulin an dieses inhibitorische Segment kommt es zu einer Konformationsänderung die dazu führt, dass das aktive Zentrum der katalytischen Domäne Zugang zu den Zielproteinen bekommt. Ein derart aktiviertes CaMKII-Monomer kann seinerseits benachbarte Monomere durch Phosphorylierung im Bereich der autoregulatorischen Domäne aktivieren. Dadurch kann die Enzymaktivität im Sinne eines Gedächtnisses auch noch nach Abfall der Kalziumkonzentration und somit nach Beendigung der Kalzium/Calmodulin-Wirkung weitgehend erhalten bleiben (Maier und Bers 2002).



**Abbildung 1.5: Struktur und Aktivierung der CaMKII.** Im oberen Teil der Abbildung sind die drei Domänen des CaMKII-Monomers dargestellt. 6-12 dieser Monomere (hier 6) verbinden sich radförmig und bilden das komplette CaMKII-Holoenzym. Durch Bindung von Kalzium/Calmodulin an die regulatorische Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung und nachfolgender Aktivierung der CaMKII. Im unteren und mittleren rechten Bild ist die Autophosphorylierung durch Nachbarmonomere dargestellt, die an Thr-286 erfolgt und dazu führt, dass die CaMKII auch nach Abdissoziation von Calmodulin 20-80% ihrer Aktivität behalten kann. (Aus Maier und Bers 2002, S. 924)

### 1.3.3.2 Einfluss der CaMKII $\delta_c$ auf die Genexpression des Kardiomyozyten

Obwohl die zytosolische Isoform der Kalzium/Calmodulin abhängigen Proteinkinase II $\delta$  nicht im Zellkern vorkommt, übt sie dennoch Einflüsse auf die Genexpression des Kardiomyozyten aus. So konnte gezeigt werden, dass es durch Überexpression der CaMKII $\delta_c$  zu einem veränderten Genexpressionsmuster und konsekutiver Hypertrophie kommt (Zhang et al. 2003, Maier et al. 2003, Zhang et al. 2007). Der vermutete Mechanismus hierfür ist in Abbildung 1.6 dargestellt und erläutert.



**Abbildung 1.6: Einfluss der CaMKII $\delta_c$  auf die Genexpression der Herzmuskelzelle.** Möglicherweise bewirkt die zytosolische Phosphorylierung des HDAC4/14-3-3-Komplexes durch die CaMKII $\delta_c$ , dass dieses nicht zurück in den Zellkern gelangen kann. Dadurch entfallen dessen hemmende Einflüsse auf die Expression verschiedener nachgeschalteter Transkriptionsfaktoren, wodurch es letztlich zur Induktion von Hypertrophiegenen kommt. (Modifiziert nach Zhang et al. 2007, S. 35085)

### 1.3.3.3 Einfluss der CaMKII $\delta_c$ auf den Ionenfluss und insbesondere den Kalziumstoffwechsel des Kardiomyozyten

Durch Phosphorylierung verschiedener Zielproteine übt die CaMKII $\delta_c$  eine Vielzahl von Einflüssen auf den kardiomyozytären Kalziumstoffwechsel aus. So phosphoryliert sie den spannungsabhängigen Kalziumkanal und bewirkt so eine Verstärkung des L-Typ-Kalziumeinstroms (Anderson et al. 1994, Yuan und Bers 1994, Maier et al. 2003) und über den Mechanismus der kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung (siehe Abschnitt 1.2.2) auch des Kalziumausstroms aus dem SR. Darüber hinaus wird die SR-Kalziumfreisetzung aber auch durch direkte Phosphorylierung des kardialen Ryanodinrezeptors (RyR2) an Ser-2809 (Witcher et al. 1991) (bzw. speziesabhängig auch Ser-2808) und/oder Ser-2814/15 (Huke und



Bers 2008, Wehrens et al. 2004) verstärkt. Dies bewirkt eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR (Wehrens et al. 2004) und somit eine Verstärkung der SR-Kalziumfreisetzung während der Elektromechanischen Kopplung. Pathophysiologisch bedeutsamer scheint aber vor allem eine Erhöhung der Frequenz diastolischer SR-Kalziumfreisetzungseignisse (Maier et al. 2003) zu sein, da es zu einem so genannten Kalzium Leck aus dem SR kommt.

Auch an der Regulation der Kalziumaufnahme in das SR ist die CaMKII $\delta_c$  beteiligt. So phosphoryliert sie Phospholamban (PLB) an Threonin-17, was dazu führt, dass dieses von der SERCA abdissoziiert und seine inhibitorische Wirkung verliert (LePeuch et al. 1979, Davis et al. 1983). Darüber hinaus wird auch eine Aktivierung der SERCA durch direkte Phosphorylierung durch die CaMKII $\delta_c$  diskutiert (Xu et al. 1993, Toyofuku et al. 1994, Desantiago et al. 2002). Insgesamt scheint aber der Einfluss auf den Ryanodinrezeptor und somit auf den Kalziumverlust aus dem SR gegenüber dem Einfluss auf die Kalziumaufnahme in das SR zu überwiegen, so dass es durch die CaMKII $\delta_c$  zu einer Verminderung des sarkoplasmatischen Kalziumgehaltes kommt (Maier et al. 2003).

Nach neueren Befunden hat die CaMKII $\delta_c$  darüber hinaus auch direkten Einfluss auf andere Ionentransportssysteme wie die kardialen Natriumkanäle (Wagner et al. 2006) sowie Kaliumkanäle, die für den transienten Auswärtsstrom ( $I_{to}$ ) verantwortlich sind (Wagner et al. 2009, Tessier et al. 1999).

#### **1.3.3.4 CaMKII $\delta_c$ , Herzinsuffizienz- und Arrhythmieentstehung**

Schon 1999 konnten Kirchhefer et al. zeigen, dass am insuffizienten menschlichen Myokard erhöhte Aktivitätslevel der CaMKII $\delta_c$  auftreten. Da diese positiv mit der hämodynamischen Funktion der Herzen (gemessen als LV-EF und CI) korrelierten, vermuteten die Autoren zunächst, dass es sich dabei um einen Kompensationsmechanismus handelt.

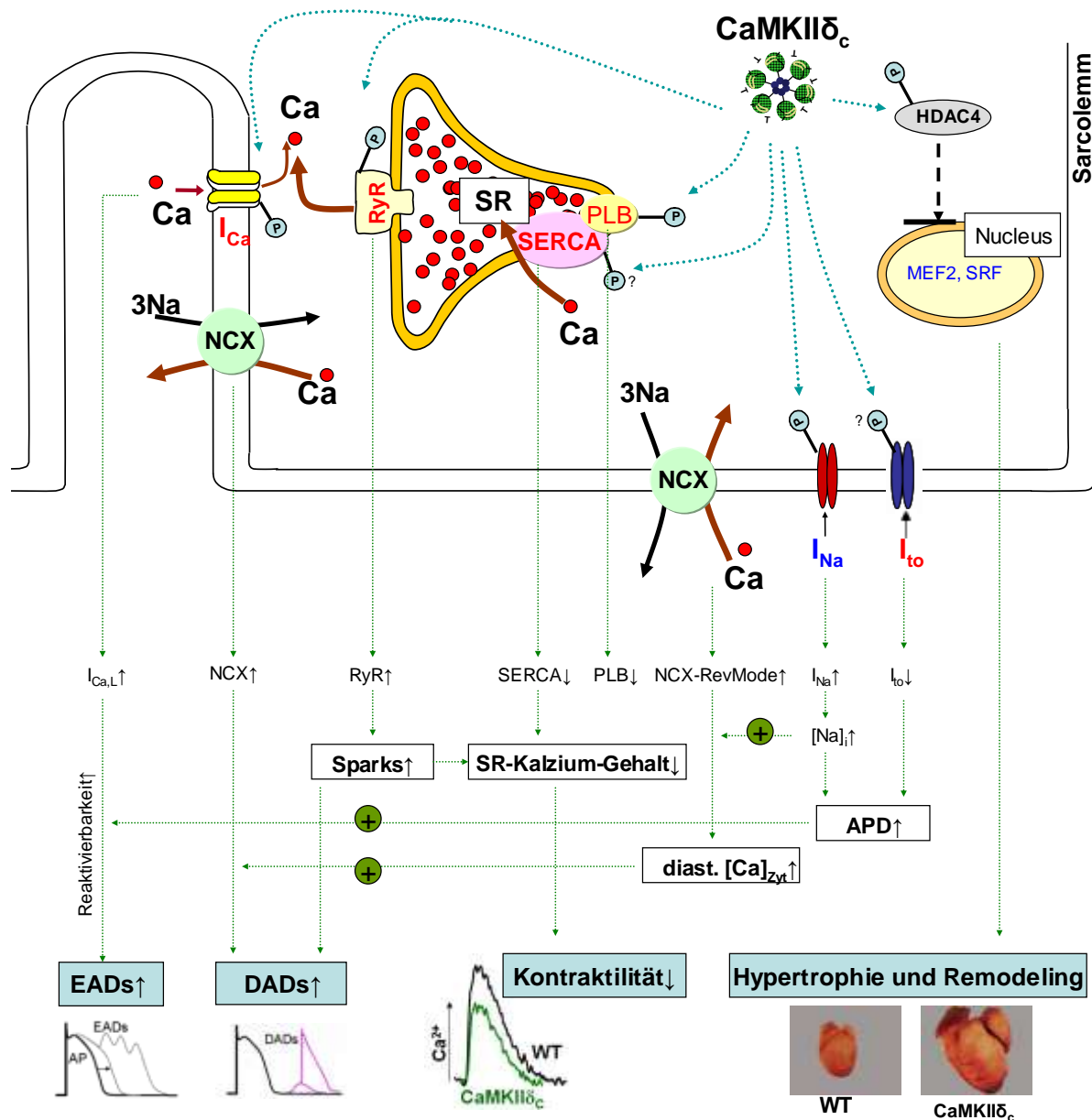
Da bereits bekannt war, dass die CaMKII $\delta_c$  Phospholamban phosphoryliert (siehe Abschnitt 1.3.3.3), vermuteten sie, dass durch die verstärkte diastolische SR-Kalziumaufnahme die Relaxation verbessert werde. Des Weiteren war bereits bekannt, dass die CaMKII auch den kardialen RyR phosphoryliert (siehe Abschnitt 1.3.3.3). Daher spekulierte die Gruppe um Kirchhefer, dass durch Erhöhung der RyR-Offenwahrscheinlichkeit in der Systole vermehrt Kalzium zur Verfügung gestellt werde und so die Kontraktilität verbessert werde.

Doch 2003 konnten Maier et al. und Zhang et al. im gleichen transgenen Mausmodell zeigen, dass eine erhöhte CaMKII $\delta_c$ -Aktivität Hypertrophie und Herzinsuffizienz verursacht. So fanden diese Autorenguppen bei Mäusen die eine dreifache Überexpression der CaMKII $\delta_c$

aufwiesen eine Verdopplung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht, sowie eine Verdopplung des Myozytenvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auf mRNA-Ebene wiesen Zhang et al. ein verändertes Genexpressionsmuster mit vermehrter Expression typischer Hypertrophiemarker (ANF,  $\beta$ -MHC, u.a.) in den CaMKII-überexprimierenden Kardiomyozyten nach. Sowohl echokardiographisch (Zhang et al. 2003) als auch auf zellulärer Ebene (Maier et al. 2003) fand sich eine signifikante Reduktion der Kontraktilität, die auf eine Verminderung des SR-Kalziumgehaltes zurückgeführt werden konnte. Letztere basiert auf einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR und somit einer Erhöhung der Frequenz diastolischer SR-Kalziumfreisetzungseignisse (Maier et al. 2003). Über den NCX, dessen Funktion um 30% gesteigert ist (Maier et al. 2003), wird dieses diastolisch freigesetzte Kalzium eliminiert und steht somit nicht mehr für die nachfolgende Kontraktion zur Verfügung. Ferner kann es zur Entstehung von DADs und so zur Arrhythmogenese beitragen (vgl. Abschnitt 1.3.2).

Des Weiteren zeigten Maier et al., dass die Kalziumaufnahme in das SR bei CaMKII $\delta_c$ -Überexpression ebenfalls reduziert ist, obwohl die oben beschriebene Phosphorylierung von PLB zum Wegfall der SERCA-Inhibition führt.

Diesen funktionellen Befund konnten die Autoren durch das veränderte Proteinexpressionsmuster der CaMKII $\delta_c$ -überexprimierenden Kardiomyozyten erklären: Sie fanden eine verminderte Expression von SERCA und PLB, wobei jedoch die Verminderung der PLB-Expression weniger ausgeprägt war, so dass daraus insgesamt eine stärkere Inhibition der SERCA mit einer leichten Reduktion der Funktion resultierte. Dies entspricht dem typischen Proteinmuster bei Herzinsuffizienz. Abbildung 1.7 fasst die vielfältigen Phosphorylierungsstellen sowie Wirkungen der Kalzium-Calmodulin abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$  in der Herzmuskelzelle zusammen.



**Abbildung 1.7: Einfluss der CaMKII $\delta_c$  auf die Herzmuskelzelle.** Blau gestrichelte Pfeile zeigen die Phosphorylierungsstellen der CaMKII $\delta_c$  in der Herzmuskelzelle an. Im Schaubild rot geschriebene Proteine werden bei Herzinsuffizienz vermindert, blau geschriebene Proteine vermehrt exprimiert. Die grün gestrichelten Pfeile zeigen die funktionellen Auswirkungen der CaMKII $\delta_c$  an.

(Modifiziert nach Maier und Bers 2007, S. 632, Bers 2001, S. 322, Zhang et al. 2003, S. 915)

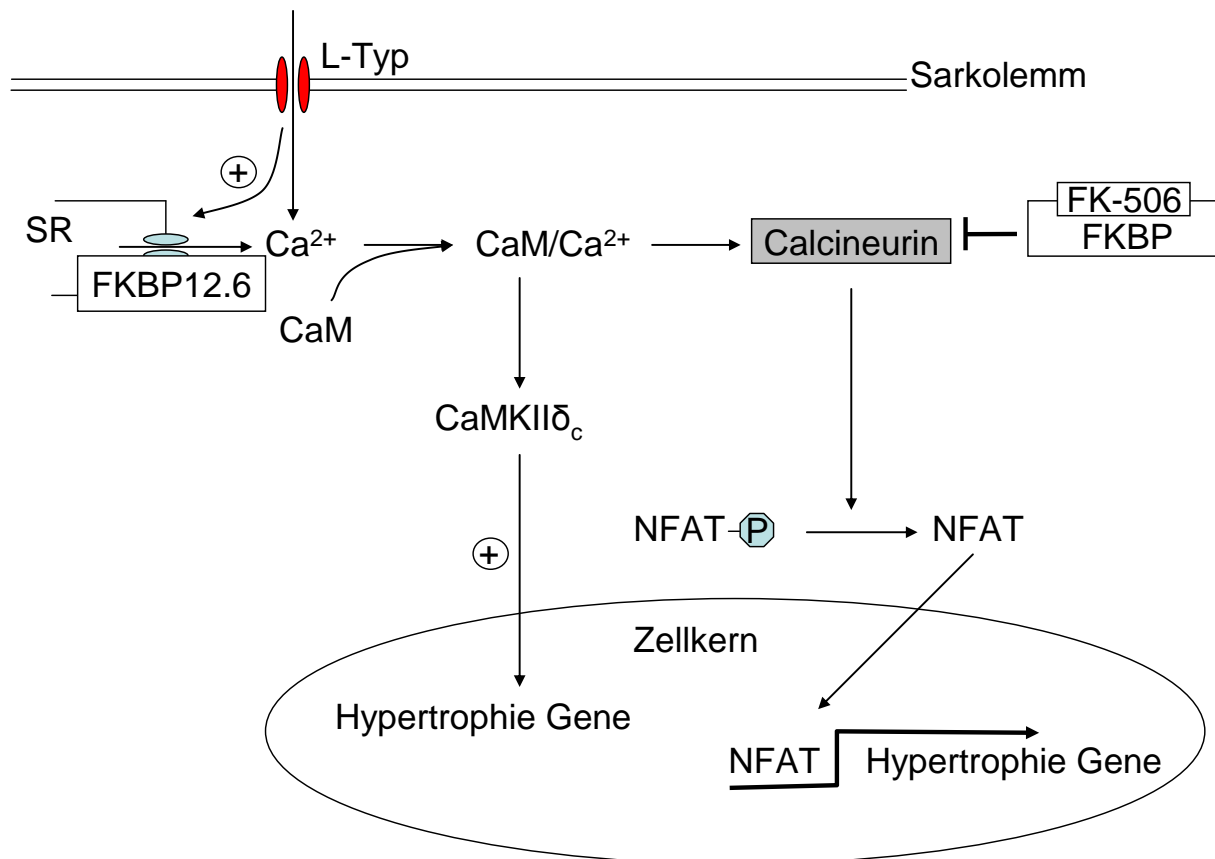
## 1.4 FKBP, die D37S-Mutante und der kardiale Ryanodinrezeptor (RyR2)

### 1.4.1 FKBP und die Genregulation

Die FK-506-Binde-Proteine (FKBP) gehören zur Gruppe der Immunophilinen. Dabei handelt es sich um lösliche Rezeptoren für das Makrolidantibiotikum Tacrolimus (FK-506), die 1990 von Sigal et al. erstbeschrieben wurden (Sigal et al. 1990). Der Komplex aus FKBP und Tacrolimus bindet und inhibiert die Kalzium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin (Liu et al. 1991) und verhindert dadurch die Translokation von NFAT (nuclear factor of activated t-lymphocytes) in den Zellkern. Dadurch kommt es zur Modifikation der Genexpression. Dieser Wirkmechanismus wurde zunächst in T-Lymphozyten entdeckt und hemmt deren Aktivierung (Flanagan et al. 1991). Aber auch in anderen Zellen scheint diese Signalkaskade eine Rolle bei der Genregulation zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass transgene Überexpression von Calcineurin oder NFAT-3 in Kardiomyozyten zu Hypertrophie und Herzinsuffizienz führt (Molkentin et al. 1998, Sussman et al. 1998). Ein FKBP12.0-Knockout Mausmodell wies eine deutlich erhöhte prä- und perinatale Sterblichkeit, schwere Dilatative Kardiomyopathien (DCM) und Zeichen der Noncompaction-Kardiomyopathie mit strukturellen Defekten (VSD, fehlende Verdichtung mit fortbestehenden Recessus) auf (Shou et al. 1998).

In der Herzmuskelzelle ist auch das verwandte Protein FKBP12.6 bedeutsam (siehe auch Abschnitt 1.4.2). Interessanterweise führt ein Knockout dieser FKBP Variante in männlichen Mäusen zu Hypertrophie und Herzinsuffizienz, während weibliche Mäuse dagegen geschützt sind (Xin et al. 2002). Da weibliche 12.6-Knockout Mäuse nach Einnahme des Östrogenantagonisten Tamoxifen ebenfalls kardiale Hypertrophien entwickelten, schloss die Arbeitsgruppe um Xin daraus, dass Östrogen in diesen Mäusen wohl protektiv wirkt. Die genauen Mechanismen der Hypertrophieentwicklung (bzw. der Protektion durch Östrogen) konnten allerdings nicht endgültig geklärt werden: Neben Calcineurin-vermittelten Effekten (siehe oben) kommen auch Einflüsse auf die Genregulation durch FKBP12.6-Knockout vermittelte Änderungen im Kalziumhaushalt in Frage (siehe Abschnitt 1.4.2 und Abbildung 1.8, Molkentin 1998). Weiterhin ergaben Untersuchungen, dass männliche FKBP12.6-K.O. Tiere im Gegensatz zu weiblichen Mäusen einen erhöhten Blutdruck aufwiesen. Somit kann auch eine sekundäre hypertonievermittelte Hypertrophieentwicklung nicht ausgeschlossen werden. Leider machen Xin und Kollegen keine Angabe zum Blutdruck in weiblichen

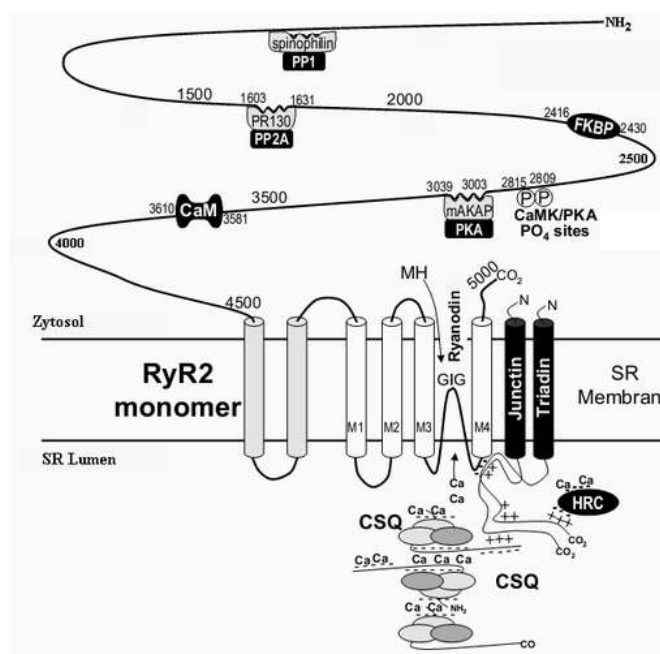
Tamoxifen-behandelten FKBP12.6-Knockout Weibchen. Interessanterweise fanden Wehrens und Kollegen bei anderen FKBP12.6-Knockout Mäusen (mit anderem genetischen Hintergrund) keine strukturellen Unterschiede am Herzen verglichen mit Wildtypkontrollmäusen (Wehrens et al. 2003, siehe Abschnitt 1.4.2).



**Abbildung 1.8: Genregulation durch FKBP.** Der Komplex aus FKBP und FK-506 inhibiert Calcineurin und verhindert dadurch die Dephosphorylierung von NFAT. Da phosphoryliertes NFAT nicht in den Zellkern gelangt, wird so die Induktion von Hypertrophie-Genen verhindert. Weiterhin bindet FKBP12.6 den kardialen Ryanodinrezeptor und spielt somit eine Rolle bei der Regulation des Kalziumhaushaltes der Herzmuskelzelle (siehe Abschnitt 1.4.2). Dadurch kann möglicherweise eine Aktivierung der CaMKIIδ<sub>c</sub> und durch die in Abschnitt 1.3.3.2 beschriebenen Mechanismen wiederum eine Induktion von Hypertrophie-Genen verhindert werden.

### 1.4.2 Regulation des kardialen Ryanodinrezeptors durch FKBP12.6, PKA und CaMKII $\delta_c$

Offenbar unabhängig von diesem Einfluss auf die Genexpression ist FKBP auch mit dem Ryanodinrezeptor assoziiert (Collins 1991, Jayaraman et al. 1992) und reguliert dessen Funktion. Der Ryanodinrezeptor ist ein tetramerisch aufgebauter Makromolekülkomplex mit einem Molekulargewicht von ~ 2260 kDa und Assoziation zu FKBP, dem PKA Ankerprotein mAKAP und den zwei Phosphatasen PP1 und PP2A (Marx et al. 2000). Hinzu kommen Interaktionen mit Calmodulin, Junctin und Triadin (Bers 2004). Dabei bindet ein FKBP-Molekül pro RyR-Monomer (Timerman et al. 1993, 1995, 1996).



**Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des RyR** und seiner Bindungsstellen. Der RyR2 weist zumindest vier (möglicherweise sechs oder mehr) Transmembrandomänen M1-M4 auf (Takeshima et al. 1989). Im Transmembranbereich besteht Assoziation zu Junctin und Triadin, im SR Lumen zu Calsequestrin (CSQ) und zum Histidin-reichen Calcium-Bindeprotein (HRC). Der Anteil des RyR der in das Zytosol ragt, interagiert mit den zwei Phosphatasen PP1 und PP2A und ihren Ankerproteinen, ferner mit FKBP und Calmodulin (CaM). Außerdem sind die Phosphorylierungsstellen der CaMKII und der PKA, sowie das PKA Ankerprotein mAKAP eingezeichnet. Anders als in der Skelettmuskelzelle ist in der Kardiomyozyte keine direkte physikalische (wohl aber eine funktionelle) Interaktion zwischen RyR und L-Typ-Kalziumkanälen bekannt. Weiterhin soll Sorcin mit DHPR und RyR assoziiert sein. Auch hier ist keine Interaktionsstelle bekannt und deshalb nicht eingezeichnet. (Modifiziert nach Bers 2004, S. 420)

Die vorherrschende Isoform der FK-506-Bindeproteine ist das FKBP12.0, das ubiquitär vorkommt und in der Skelettmuskulatur mit dem RyR1 assoziiert ist (Siekierka et al. 1990, Jayaraman et al. 1992). Am RyR2 der Herzmuskelzelle hat FKBP12.6 dagegen eine (speziesabhängig) 8-500 fach höhere Affinität und spielt deshalb die entscheidende Rolle bei dessen Regulation (Timerman et al. 1996, Jeyakumar et al. 2001). Diese kardiale Isoform wurde 1994 erstbeschrieben und unterscheidet sich in 18 von 108 Aminosäuren vom ubiquitären FKBP12.0 (Timerman et al. 1995, Sewell et al. 1994, Lam et al. 1995). 1994 konnten Brillantes et al. zeigen, dass FKBP12.0 die Öffnungswahrscheinlichkeit und -dauer des RyR1 reduziert (Brillantes et al. 1994). Nachfolgende Untersuchungen belegten, dass FKBP12.6 die gleiche Funktion am kardialen RyR2 erfüllt und das Rapamycin (ein Analogon von FK-506) zur Abdissoziation von FKBP führt und dadurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors erhöht (Kaftan et al. 1996). Übereinstimmend mit diesen Befunden ergaben funktionelle Untersuchungen an Kaninchen- und Rattenkardiomyozyten bei denen durch adenoviralen Gentransfer FKBP12.6 akut überexprimiert wurde, dass dadurch das diastolische SR Kalziumleck reduziert werden kann und in der Folge der SR Kalziumgehalt und die Kontraktilität zunehmen (Prestle et al. 2001, Loughrey et al. 2004, Gomez et al. 2004). Auch in Experimenten mit einem transgenen Mausmodell das FKBP12.6 überexprimiert wurde eine Abnahme der Kalziumsparkfrequenz beschrieben (Gellen et al. 2008). Weiterhin konnten Marx et al. zunächst für den RyR1 und später auch für kardiale Ryanodinrezeptoren zeigen, dass FKBP für die Vermittlung des sogenannten „coupled gating“, das heißt für die Koordination von Öffnung und Schluss mehrerer Ryanodinrezeptoreinheiten, verantwortlich ist (Marx et al. 1998, 2001). Dieser Prozess ist von entscheidender Bedeutung für die Synchronisation der kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung und damit für die Stärke der elektromechanischen Kopplung. Im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Verminderung des Verhältnisses von FKBP zu Ryanodinrezeptoren von zirka 4:1 auf zirka 1,6:1 (Yano et al. 2000). Wie oben beschrieben zieht dies eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 und eine Verminderung des „coupled gating“ nach sich (zu den funktionellen Konsequenzen siehe auch Abschnitt 1.3.1 und 1.3.2).

Im Jahr 2000 zeigten Marks und Kollegen, dass Phosphorylierung des RyR2 an Ser-2809 durch die Proteinkinase A (PKA) zur Abdissoziation von FKBP führt. Sie stellten die Hypothese auf, dass dieser Mechanismus auch im Rahmen der Herzinsuffizienz verantwortlich für die verminderte Assoziation von FKBP an den RyR ist. Interessanterweise ergaben ihre Untersuchungen auch, dass Phosphorylierung des RyR2 an Serin-2809 durch die

CaMKII $\delta_c$  kein Abdissoziieren von FKBP bewirkt (Marx et al. 2000). Nachfolgend wurden diese Hypothesen sehr kontrovers diskutiert. So bestätigten Untersuchungen von George et al., dass es durch  $\beta$ -Adenorezeptor-Stimulation zur Hyperphosphorylierung des RyR2 und zur Abdissoziation von FKBP12.6 kommt (George et al. 2003). Im gleichen Jahr konnten Yano und Kollegen durch Zugabe von JTV-519 in einem Herzinsuffizienzmodell erreichen, dass sich Kontraktilität und Phänotyp wieder besserten. Ihre Untersuchungen ergaben – in Einklang mit der Hypothese von Marx und Kollegen –, dass JTV-519 das bei Herzinsuffizienz erhöhte PKA-Phosphorylierungsniveau des RyR2 nahezu auf Kontrollniveau zurückführt und so eine stärkere Assoziation von FKBP12.6 zum RyR2 erreicht wird (Yano et al. 2003). Wiederum zeigte die Arbeitsgruppe um A. Marks, dass es in einem FKBP12.6-Knockout Mausmodell bei Belastung zu PKA-Hyperphosphorylierung des RyR und konsekutiv zu späten Nachdepolarisationen (DADs), Arrhythmien und plötzlichem Herztod kommt. Die gleichen Resultate fanden die Autoren auch für verschiedene Mutationen im RyR2, die die Affinität des Ryanodinrezeptors zu FKBP reduzieren und mit Katecholaminerger Polymorpher Ventrikulärer Tachykardie (CPVT) assoziiert sind (Wehrens et al. 2003). Immunoblot Versuche und Lipid-Bilayer Untersuchungen an isolierten Ryanodinrezeptoren ergaben wiederum, dass 1.) Ryanodinrezeptoren nach PKA Phosphorylierung eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit aufweisen und 2.) FKBP12.6 nicht an PKA phosphorylierte RyR bindet. Die Arbeitsgruppe generierte daraufhin eine Calstabin-Mutante, in der ein negativ geladenes Aspartat an Position 37 durch ein Serin ausgetauscht wurde (FKBP12.6<sup>D37S</sup>). Diese Aminosäureposition liegt in unmittelbarer Umgebung einer hydrophoben Bindungstasche, die bei der Bindung von FKBP12 an den TGF- $\beta$  Rezeptor 1 involviert ist (Huse et al. 1999). Die Autorengruppe spekulierte daher, dass das negativ geladene Aspartat ebenfalls bei der Dissoziation von FKBP12.6 vom PKA phosphorylierten Ryanodinrezeptor 2 involviert ist, da durch die Phosphorylierung ebenfalls eine Übertragung negativer Ladung erfolgt. Weitere Immunoblot und Lipidbilayer Versuche der Arbeitsgruppe ergaben tatsächlich, dass diese Mutante 1.) den PKA phosphorylierten Ryanodinrezeptor zu binden vermag und dadurch 2.) dessen Offenwahrscheinlichkeit reduziert wird (Wehrens et al. 2003). Mittels einer nachfolgend generierten transgenen Mauslinie, in der eine ähnliche Calstabin2-Mutante (FKBP12.6<sup>D37V</sup>, Austausch von Aspartat gegen Valin) überexprimiert wurde, konnte die Arbeitsgruppe von A. Marks in vivo die Herzfunktion nach Myokardinfarkt gegenüber Wildtypmäusen verbessern (Huang et al. 2006).

Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Marks und Kollegen ergaben Studien von Jiang et al. und von Xiao et al., dass FKBP an den Ryanodinrezeptor binden kann, unabhängig davon,



ob dieser an Ser-2809 phosphoryliert ist oder nicht (Jiang et al. 2002, Xiao et al. 2004). Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die zu beobachtende Erhöhung der Sparkfrequenz nach cAMP-Stimulation nicht direkt auf PKA-abhängige Phosphorylierung des RyR2, sondern indirekt auf eine Erhöhung des SR-Kalziumgehaltes durch Phosphorylierung von PLB zurückzuführen seien (Li Y et al. 2002). Auch in Versuchen mit Mäusen die eine RyR-Mutante exprimierten die kein Ser-2808 (entspricht in Kaninchen Ser-2809) aufwies (RyR-Ser-2808A), fand sich keine geringere Zunahme der Sparkfrequenz nach Provokation mit cAMP gegenüber Kontrollzellen die ebenfalls cAMP ausgesetzt waren (Benkusky et al. 2007). Die Autorengruppe schloss daraus, dass PKA-Effekte in der Herzmuskelzelle im Wesentlichen nicht auf Phosphorylierung an Ser-2808 beruhen. 2006 ergaben weitere Untersuchungen von Xiao et al., dass Ser-2030 und nicht Ser-2809 die wichtigere PKA-Phosphorylierungsstelle am RyR2 sei (Xiao et al. 2006). Dieses Resultat wurde von einer Untersuchung von Huke und Bers jedoch nicht bestätigt (Huke und Bers 2008). Auch bezüglich der Phosphorylierungsstelle(n) der CaMKII $\delta_c$  am RyR2 gibt es widersprüchliche Angaben. Während Witcher 1991 Ser-2809 als einzige Phosphorylierungsstelle der CaMK am RyR identifizierte (Witcher et al. 1991), ergaben Untersuchungen von Rodriguez et al., dass die CaMK zwar tatsächlich an Ser-2809 phosphoryliert, jedoch darüber hinaus mindestens vier weitere Phosphorylierungsstellen am Ryanodinrezeptor hat (Rodriguez et al. 2003). In nachfolgenden Versuchen konnte Ser-2815 als eine Phosphorylierungsstelle der CaMKII $\delta_c$  identifiziert werden. In dieser Untersuchung kam es durch Phosphorylierung an Ser-2815 zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des RyR, ohne dass jedoch eine Abdissoziation von FKBP12.6 erfolgte (Wehrens et al. 2004). Im Jahr 2005 versuchte eine Arbeitsgruppe zu ermitteln, welcher Anteil der Proteinkinase A bzw. der CaMKII am diastolischen SR-Kalziumleck bei Herzinsuffizienz zukommt. In einem Herzinsuffizienzmodell fanden sie eine verstärkte Phosphorylierung sowohl an Ser-2809, als auch an Ser-2815. Allerdings fiel die Zunahme des Phosphorylierungsgrades an Ser-2815 deutlich höher aus als an Ser-2809 (+105% vs. +30%) und das diastolische SR-Kalziumleck war durch Inhibierung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$ , nicht aber durch Inhibierung der PKA, rückführbar. Die Autorengruppe kam deshalb zu dem Schluss, dass im Rahmen der Herzinsuffizienz die CaMKII einen entscheidenden Anteil an der Aktivierung des RyR hat. In der gleichen Untersuchung fand sich auch eine verminderte Assoziation von RyR2 und FKBP12.6, wobei jedoch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob dieser Befund auf eine stärkere Reduktion der FKBP-Expression bei Herzinsuffizienz, oder auf eine verstärkte Phosphorylierung des RyR zurückzuführen ist (Ai et al. 2005).

Da bisher sehr widersprüchliche Ergebnisse vorliegen wo und an wie vielen Stellen die CaMKII $\delta_c$  den Ryanodinrezeptor phosphoryliert und ob es dadurch zur Abdissoziation von Calstabin2 kommt oder nicht, sind sicherlich weitere Arbeiten nötig. Die überwiegende Mehrzahl funktioneller Studien auf diesem Gebiet zeigt jedoch, dass es durch CaMKII $\delta_c$ -Überexpression zu einem verstärkten SR Kalziumleck kommt und dass dies zu reduzierter Kontraktilität (Maier et al. 2003, Kohlhaas et al. 2006) und zur Arrhythmogenese (Sag et al. 2009) beiträgt. Deshalb sind die funktionellen Aspekte einer gleichzeitigen Überexpression von FKBP12.6<sup>D37S</sup> von besonderem Interesse und Thema dieser Arbeit.

## 1.5 Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, welchen Einfluss eine FKBP12.6-Mutante, die auch den phosphorylierten Ryanodinrezeptor zu binden vermag, auf den kardiomyozytären Kalziumhaushalt hat und welche Auswirkungen auf Funktion und Phänotyp der Herzmuskelzellen dies nach sich zieht.

Da erhöhte Expressionslevel der CaMKII $\delta_c$ , wie sie im Rahmen der Herzinsuffizienz gefunden werden, mit einer Verstärkung des diastolischen Kalziumverlustes aus dem SR und konsekutiv mit einer Verminderung des SR-Kalziumgehaltes und der Kontraktilität einhergehen, ist eine Stabilisierung des Ryanodinrezeptors unter solchen pathophysiologischen Bedingungen von besonderem Interesse. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, inwieweit sich Effekte der CaMKII $\delta_c$  durch FKBP12.6<sup>D37S</sup> zurückführen lassen.

Im Einzelnen liegen dieser Arbeit folgende Fragestellungen zugrunde:

- 1.) a) Führt eine Überexpression von FKBP12.6<sup>D37S</sup> zu Veränderungen des Phänotyps der Herzmuskelzelle?
  - b) Können phänotypische Veränderungen, wie sie im Rahmen der chronischen CaMKII $\delta_c$ -Überexpression beobachtet werden können und die den phänotypischen Veränderungen bei Herzinsuffizienz entsprechen, durch FKBP12.6<sup>D37S</sup> verbessert werden?
- 2.) a) Lässt sich durch Überexpression von FKBP12.6<sup>D37S</sup> eine Reduktion des diastolischen Kalziumverlustes aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum erreichen?
  - b) Gelingt dies vor allem auch bei pathologischer Erhöhung des diastolischen SR-Kalziumlecks durch chronische Einwirkung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$ ?
- 3.) Wenn durch FKBP12.6<sup>D37S</sup> eine Reduktion des diastolischen SR-Kalziumverlustes erreicht werden kann, stellt sich darüber hinaus die Frage, welche funktionellen Auswirkungen dies nach sich zieht.
  - a) Kann dann eine Zunahme des Kalziumgehaltes des Sarkoplasmatischen Retikulums erreicht werden und führt dies zur Verbesserung der Kontraktilität?
  - b) Gelingt dies nicht nur unter physiologischen Bedingungen, sondern auch unter den Bedingungen einer Überexpression der CaMKII $\delta_c$ ?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Genetische Veränderungen an Kardiomyozyten und deren Gewinnung

#### 2.1.1 Transgene Mäuse

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse benutzt, die die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase  $\text{II}\delta_c$  herzspezifisch überexprimieren (Zhang et al. 2003). Die verwendeten Tiere weisen eine 3-fache Zunahme an aktivierter CaMKII gegenüber Wildtyptieren auf und erreichen damit vergleichbare Werte wie Mäuse nach Entwicklung einer lastinduzierten Hypertrophie (TAC) (Zhang et al. 2003) oder Menschen mit Idiopathischer Dilatativer Kardiomyopathie im Stadium NYHA IV (Kirchhefer et al. 1999). Darüber hinaus wurden Mäuse verwendet, die die Calstabin2-Mutante FKBP12.6<sup>D37S</sup> (über)exprimieren (Seidler et al, 2011). Das Proteinlevel dieser Mutante wurde in Relation gesetzt zum FKBP Proteinlevel in Wildtyp Herzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tiere benutzt, die eine 5-fache Expressionszunahme aufwiesen. Ferner wurden doppeltransgene Mäuse durch Kreuzung von CaMKII $\delta_c$ - und FKBP12.6<sup>D37S</sup>-transgenen Mäusen gewonnen und untersucht (CaMK/FKBP12.6<sup>D37S</sup>). Als Kontrolltiere wurden die Wildtypgeschwistertiere verwendet, die bei diesen Kreuzungen geboren wurden. Genutzt wurden Mäuse beider Geschlechter, die zum Messzeitpunkt zwischen 8 und 17 Wochen alt waren.

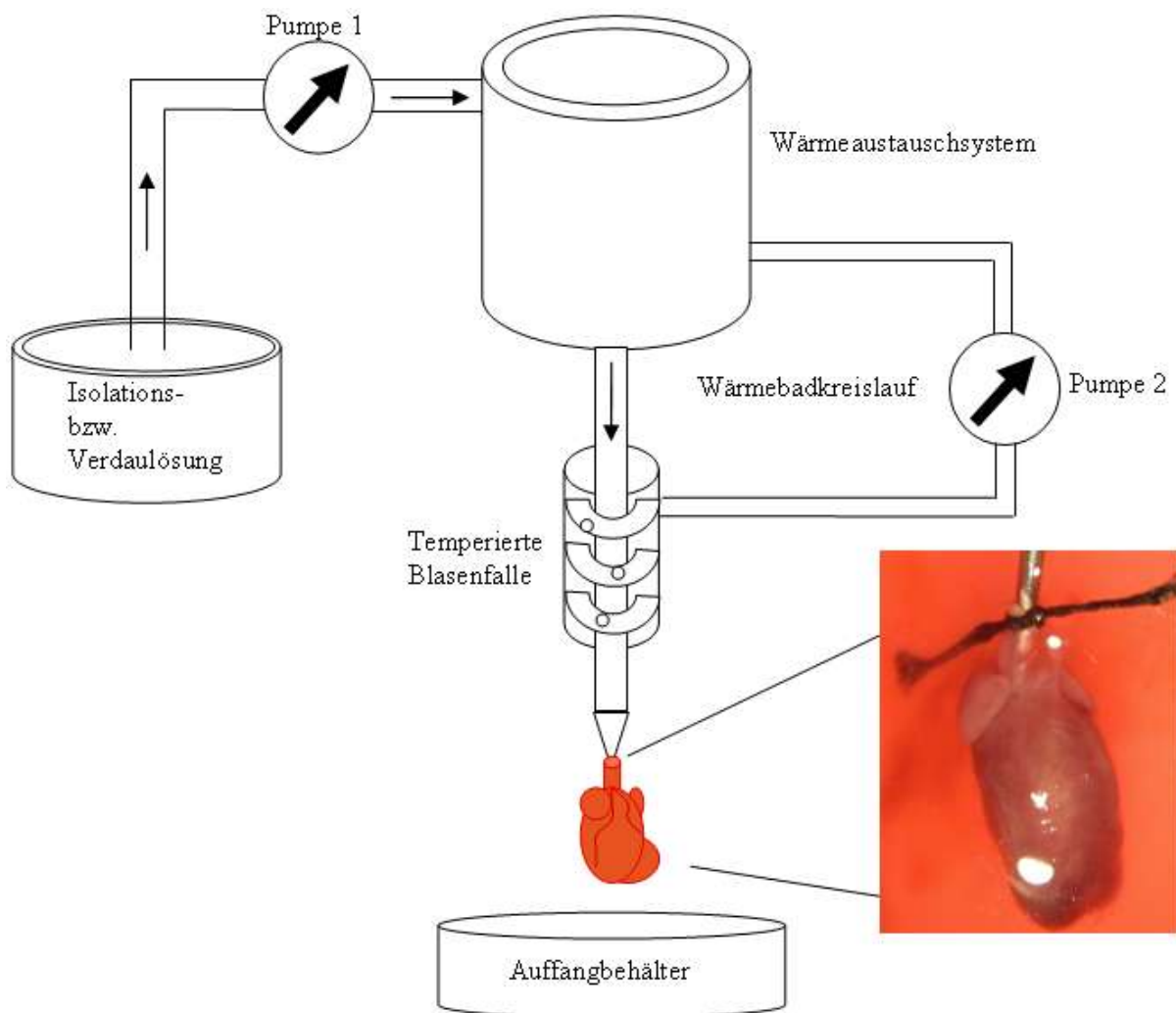
Alle Tierexperimente sind von der örtlichen Ethikkommission genehmigt worden (Tötungsanzeige August 2006 für die „Tötungen von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß § 4 TierSchG, Aktenzeichen T 15.06, Bezirksregierung Braunschweig, Anzeigender Prof. Dr. Lars Maier) und wurden unter Berücksichtigung des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (NIH Publikationsnummer 85-23, 1996 überarbeitet) durchgeführt.

#### 2.1.2 Isolation von Mauskardiomyozyten

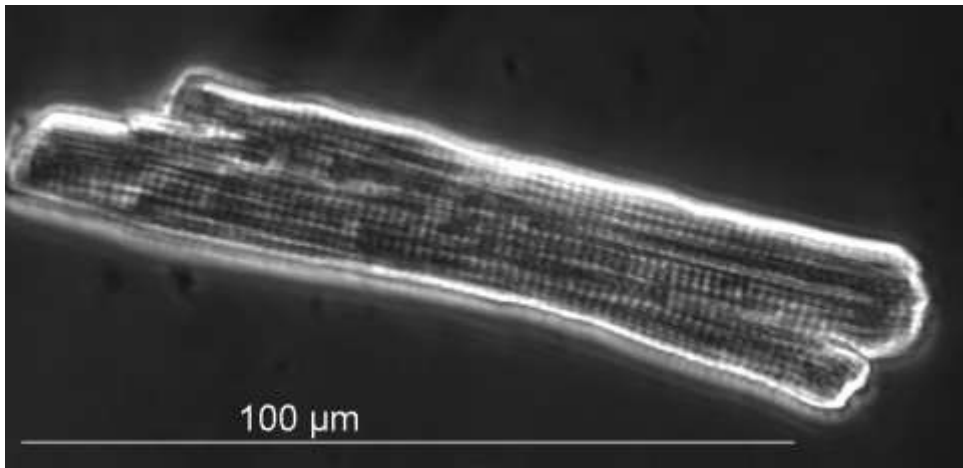
Die verwendeten Mäuse wurden zunächst mittels Isofluran in einem Inkubator narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Isofluran ist ein volatiles Narkosegas, das einen schnellen Wirkeintritt aufweist (Lüllmann 2006) und nur geringe Effekte auf die kardiale Kontraktilität hat (Takuma et al. 2001). Unmittelbar nach Genickbruch wurden die Mäuse gewogen. Zur Herzpräparation wurde ein Abdominalschnitt durchgeführt und anschließend

das Zwerchfell durchtrennt. Um besseren Zugang zum Herzen zu erhalten, wurden Abdomen und Thorax zusätzlich beidseitig in der vorderen Axillarlinie aufgeschnitten. Zur Vermeidung einer Thrombenbildung wurde als Nächstes eine Bolusinjektion von 50 I. E. Heparin in den linken Ventrikel durchgeführt.

Nach der Eröffnung des Perikards wurde das Herz mitsamt dem Aortenstumpf entnommen, in gekühlte Perfusionstyrode (vgl. Abschnitt 2.3) gelegt, dort von Blut- und Lungenresten gereinigt und anschließend mittels Feinwaage (Sartorius) gewogen. Danach wurde das Herz am belassenen Aortenstumpf auf einer 18G Kanüle mittels Seidenfaden und Klemme fixiert. Nun wurden die Koronarien mit Hilfe einer Spritze (Omnican 40, 1mL, B. Braun Petzold GmbH Melsungen) mit einem Milliliter kalter Perfusionstyrode gespült. Dadurch kann eine gute koronare Gefäßdurchgängigkeit für den nachfolgenden Enzymverdau gewährleistet werden. Anschließend wurde das kanülierte Herz an ein Langendorff-Perfusionssystem angeschlossen (siehe Abbildung 2.1) und dort zunächst bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min und bei konstanter Temperatur von zirka 36,8°C für 4 min mit Isolationstyrode und anschließend für zirka 3-4 min mit Verdaulösung (vgl. Abschnitt 2.3) gespült. Durch die kalziumfreie Isolationstyrode wird das Koronarsystem des Herzens gespült und das Herz angewärmt. So kann einem Koronarspasmus durch die nachfolgende Verdaulösung vorgebeugt werden. Des Weiteren wird durch den Kalziumentzug eine elektromechanische Entkopplung erreicht, so dass die Herzmuskelzellen Energie einsparen können. Beim anschließenden Enzymverdau wird eine Aufspaltung des Zellsynzytiums erreicht. Dafür wurde der Isolationstyrode das Enzymgemisch Liberase® Blendzyme 1 der Firma Roche zugesetzt. Nachdem das Herz milchglasartig verfärbt ist, werden die Ventrikel abgetrennt und in Isolationstyrode weiter mit einer Schere zerkleinert. Anschließend wird durch Zugabe einer Stopplösung eine Enzyminaktivierung erreicht und die Herzmuskelzellen vor weiterem Verdau geschützt. Zur Trennung der isolierten Muskelzellen von nicht gespaltenen Zellverbänden und von interstitiellen Gewebeanteilen wird die Zelllösung durch einen Filter (Porendurchmesser 200 µm) in ein Falconröhrchen überführt. Um eine Kalziumüberladung der Zellen zu verhindern werden die Kardiomyozyten anschließend schrittweise in Lösungen mit ansteigenden Kalziumkonzentrationen (0,1 mM, 0,2 mM, 0,6 mM, 1,0 mM) überführt, so dass eine langsame Auffüllung des Sarkoplasmatischen Retikulums gewährleistet werden konnte. Die derart isolierten Herzmuskelzellen (vgl. Abbildung 2.2) wurden nun direkt für die Messungen verwendet.



**Abbildung 2.1: Langendorff-Perfusionsanlage zur Myozytenisolation.** Die Aorta des isolierten Herzens wird kanüliert und mittels eines Bindfadens fixiert. Nun wird zunächst für 4 min Isolationstyrode und anschließend für zirka 3 min Enzymlösung durch das Koronarsystem gepumpt. Durch einen Wärmebadkreislauf werden die Tyroden auf zirka 37°C angewärmt. Eine Blasenfalle verhindert Luftembolien im Koronarsystem. Modifiziert nach Med. Diss. Göttingen 2010: Wadsack D, S. 34 und Med. Diss. Göttingen 2008: Sag CM, S.26.

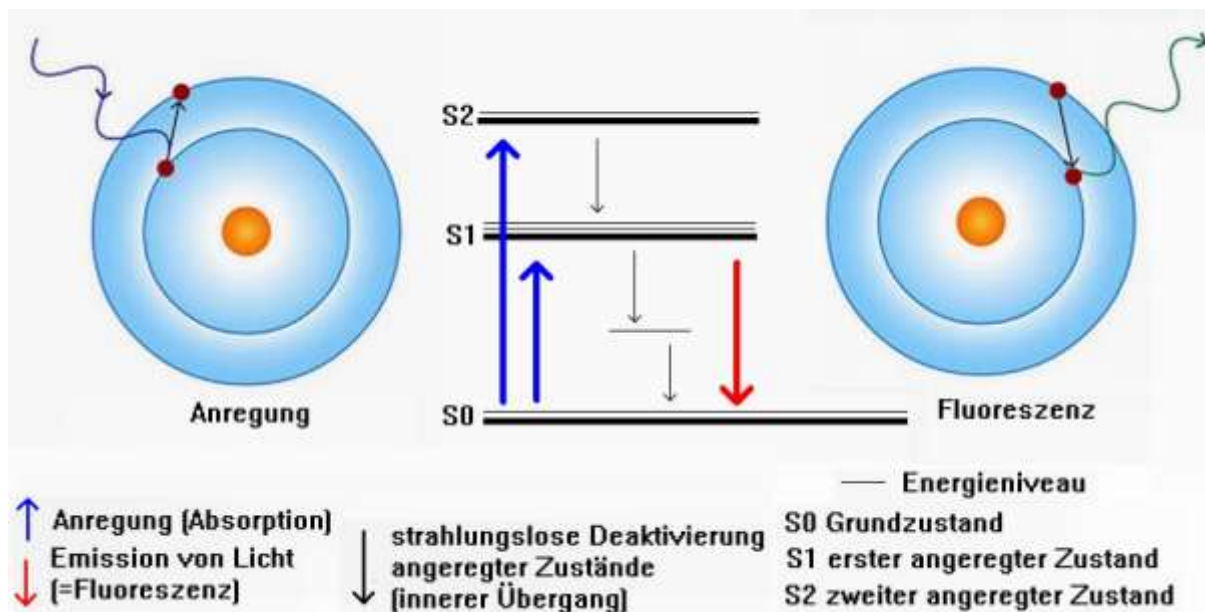


**Abbildung 2.2: Typische Mauscardiomyozyte im Durchlicht.** Vergrößerung 40x. Gut zu erkennen ist die Querstreifung, die durch die regelmäßige Anordnung der Myofibrillen zustande kommt.

## 2.2 Fluoreszenzmikroskopische Messungen

### 2.2.1 Prinzip der Fluoreszenz

Als Fluoreszenz wird die spontane Emission von Licht bezeichnet, die beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems zurück in einen Zustand niedrigerer Energie auftritt. Dies geschieht, wenn Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungswellenlänge) zum Beispiel auf ein Molekül trifft. Dabei werden Photonen absorbiert und Elektronen des Moleküls in ein energetisch höheres Orbital gehoben, also angeregt. Fallen sie von dort auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, wird die freiwerdende Energie als Wärme und Photonen (Fluoreszenzlicht) abgegeben (Volgger 2008; siehe Abbildung 2.3).



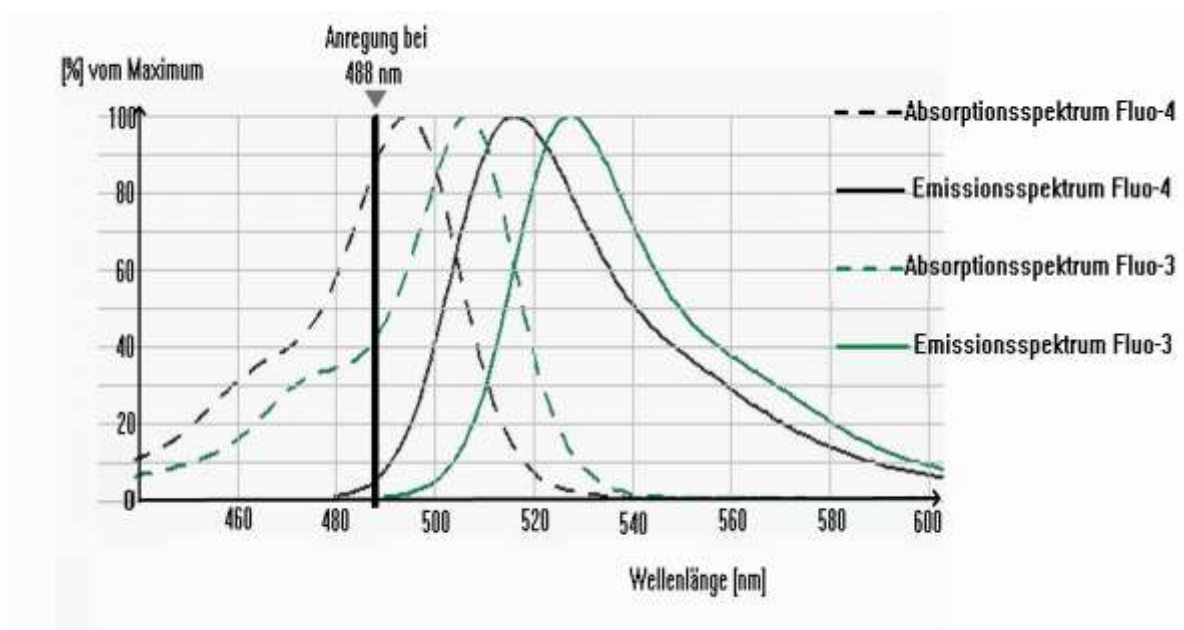
**Abbildung 2.3: Prinzip der Fluoreszenz:** Durch Absorption eines Anregungsphotons wird ein Elektron von seinem Grundzustand S0 in einen Zustand höherer Energie (S1 oder S2) gehoben (blaue Pfeile). Aus dem oberen angeregten Zustand S2 ist ein Übergang zu einem niedrigeren angeregten Zustand S1 möglich, ohne dass dabei ein Photon emittiert wird, aber beim Übergang in den Grundzustand S0 (roter Pfeil) wird die freiwerdende Energie in Form eines Fluoreszenzphotons emittiert. Dabei ist zu beachten, dass die Energie des freiwerdenden Photons stets niedriger ist als die Energie des absorbierten Photons, da zusätzlich Energie in Form von Wärme verbraucht wird (Stoke'sche Regel). Da sich Energie und Wellenlänge von Licht umgekehrt proportional verhalten, ist die Wellenlänge des emittierten Lichts stets größer als die des Anregungslichtes. (Jablonsky-Diagramm, modifiziert nach Volgger 2008, S. 120)

## 2.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-3 und Fluo-4

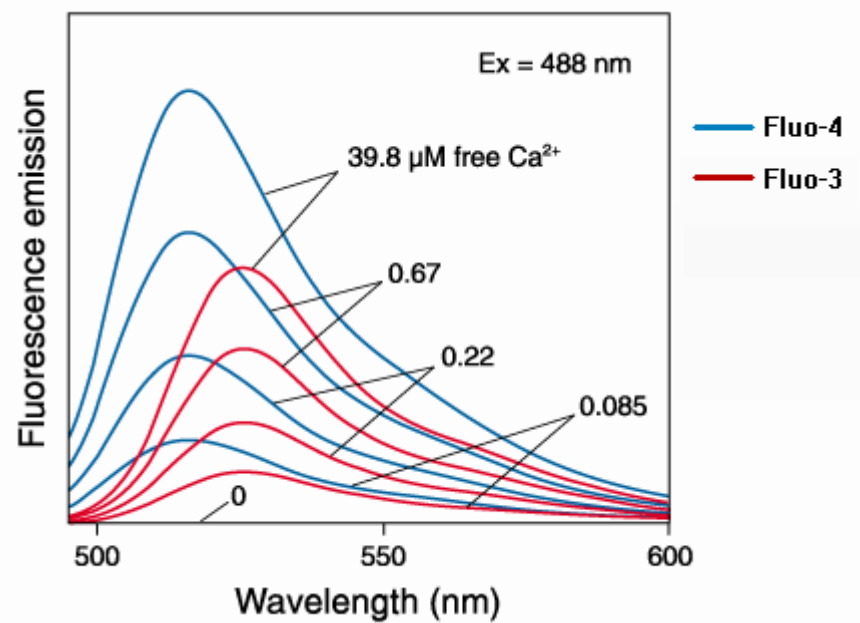
Fluorochrome sind Moleküle, die nach dem oben beschriebenen Prinzip Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und einen Teil des absorbierten Lichtes als längerwellige Strahlung wieder abgeben. Fluorochrome, die in der Lage sind selektiv bestimmte Zielstrukturen zu binden, finden Verwendung als Fluoreszenzfarbstoffe. Jeder Farbstoff hat dabei charakteristische Zielstrukturen, Anregungs- und Emissionswellenlängen. Im Rahmen dieser Arbeit fanden die kalziumbindenden Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-3 AM (Minta et al. 1989) und Fluo-4 AM (Gee et al. 2000, beide Molecular Probes) Verwendung. Der Zusatz „AM“ bedeutet, dass die Farbstoffe in veresterter Form mit einem Acetoxymethylrest vorliegen. Der Vorteil dieser Form gegenüber den herkömmlichen Fluo-Varianten ist, dass sie aufgrund der lipophilen Eigenschaften leicht in die Zellen gelangen kann. Erst intrazellulär wird der Farbstoff durch zytosolische Esterasen freigesetzt und verbleibt dann aufgrund seiner Ladung auch im Zellinneren. So kann eine unspezifische



Farbstoffbindung zum Beispiel an Zellmembranen vermieden werden. Fluo-3 AM hat ein Absorptionsmaximum von 506 nm und ein Emissionsmaximum von 526 nm (siehe Abbildung 2.4). Nach Bindung an Kalziumionen führt es zu einer hundertfachen Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Harkins et al. 1993, Molecular Probes The Handbook). Bei Fluo-4 AM liegt das Absorptionsmaximum bei 494 nm und das Emissionsmaximum bei 516 nm (siehe Abbildung 2.4). Dies führt zu einer gegenüber Fluo-3 gesteigerten Fluoreszenz-Anregung bei 488 nm und folglich zu erhöhten Signallevels (siehe Abbildung 2.5). Diese Eigenschaft macht es besonders geeignet für eine Anwendung im Bereich der konfokalen Laserscanmikroskopie, da hier – nach Anregung mit einem 488 nm Argon-Laser – subzelluläre und entsprechend niedrige Kalziumkonzentrationsänderungen registriert werden sollen und es zudem zu einem relativ hohen Verlust der Fluoreszenzintensität an der Lochblende (siehe unten) kommt.



**Abbildung 2.4: Absorptions- und Emissionsspektren von Fluo-3 und Fluo-4 im Vergleich:** Gegenüber Fluo-3 ist das Absorptionsmaximum von Fluo-4 12 nm ins Blaue verschoben, so dass es sich der verwendeten Anregungswellenlänge von 488 nm annähert. (Modifiziert nach Invitrogen Fluorescence Spectra Viewer, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>)



**Abbildung 2.5: Fluoreszenzemissionsspektren von Fluo-3 und Fluo-4 im Vergleich:** verwendet wurden jeweils gleiche Konzentrationen der Farbstoffe in Lösungen mit 0 bis 39,8 μM freiem Kalzium (aus Molecular Probes The Handbook, S. 1123).

Sowohl bei Fluo-3 als auch bei Fluo-4 handelt es sich um sogenannte nicht-ratiometrische (=Einwellenlängen-) Farbstoffe. Im Gegensatz zu ratiometrischen Farbstoffen (z. B. Fura-2, Indo-1) ändern sie bei Bindung des Liganden nicht ihr jeweiliges Absorptions- bzw. Emissionsspektrum. Dadurch ist eine direkte Unterscheidung zwischen kalziumgebundener und kalziumungebundener Form nicht möglich und somit auch keine direkte quantitative Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte daher eine semiquantitative Bestimmung der Kalziumkonzentrationen. Dies wird möglich, wenn man zur Kalibrierung Zellen zunächst mit einem ratiometrischen kalzium-bindenden Farbstoff, der eine quantitative Kalziumbestimmung zulässt, belädt und so die diastolischen Kalziumkonzentrationen in den Kardiomyozyten der unterschiedlichen Genotypen ermittelt. Die Kalziumkonzentrationen berechnen sich dann wie folgt:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (F/F_0) / (K_d / [\text{Ca}^{2+}]_{i\text{-rest}} + 1 - F/F_0)$$

**Formel 2.1: Berechnung der intrazellulären Kalziumkonzentration.**

$[Ca^{2+}]_i$  = intrazelluläre Kalziumkonzentration

$K_d$  = Dissoziationskonstante in vivo = 1100 nmol/L (Harkins et al. 1993)

F = Maximal(=Peak)wert des Kalziumtransienten

$F_0$  = Baselinewert des Kalziumtransienten

$[Ca^{2+}]_{i-rest}$  = durchschnittliche diastolische Kalziumkonzentration (abhängig von Genotyp, Spezies und ggf. pathophysiologischen Prozessen und somit spezifisch für jede der vier Untersuchungsgruppen):

$$[Ca^{2+}]_{i-rest} \text{ (Wildtyp-Mäusekardiomyozyten)} = 142.6 \pm 4.2 \text{ nmol/l (n=15)}$$

$$[Ca^{2+}]_{i-rest} \text{ (FKBP12.6}^{D37S}\text{-überexprimierende Mäusekardiomyozyten)} = 136.5 \pm 3.3 \text{ nmol/l (n=24)}$$

$$[Ca^{2+}]_{i-rest} \text{ (CaMKII}\delta_c\text{-überexprimierende Mäusekardiomyozyten)} = 81.1 \pm 3.9 \text{ nmol/l (n=35)}$$

$$[Ca^{2+}]_{i-rest} \text{ (CaMKII}\delta_c\text{+FKBP12.6}^{D37S}\text{-überexprimierende Mäusekardiomyozyten)} = 80.7 \pm 3.5 \text{ nmol/l (n=27).}$$

Die verwendeten  $[Ca^{2+}]_{i-rest}$  Werte der einzelnen Genotypen wurden im kardiologischen Labor Prof. Dr. Lars Maier durch vorangegangene Messungen mit den ratiometrischen Farbstoffen Indo-1 und Fura-2 ermittelt.

Zusätzlich wird die Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen dadurch erschwert, dass die Fluoreszenzintensität von einer Reihe anderer Faktoren, wie der verwendeten Farbstoffkonzentration und der Intensität der Anregungsquelle, abhängig ist. Angaben zu berechneten Kalziumkonzentrationen werden daher in dieser Arbeit stets als Kalziumratio (F/F<sub>0</sub>), das heißt als Verhältnis zwischen Peak- und Baseline-Kalzium, gemacht. So kann erreicht werden, dass sich Störfaktoren bei der Berechnung der Kalziumkonzentrationen (siehe oben) herauskürzen, da sie sich gleichermaßen auf Peak- und Baselinewerte auswirken.

Vorteile der verwendeten Farbstoffe sind ein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis, Absorptionswellenlängen im Bereich von sichtbarem Licht und hohe Kalziumsensitivität.

Zusätzlich erlaubt die Anwendung im Bereich der konfokalen Laserscannmikroskopie nur die Benutzung von Einwellenlängenfarbstoffen, da der schnelle Wechsel zweier Anregungswellenlängen, wie er bei Anwendung von Zweiwellenlängenfarbstoffen nötig wäre, technisch nicht realisiert ist.

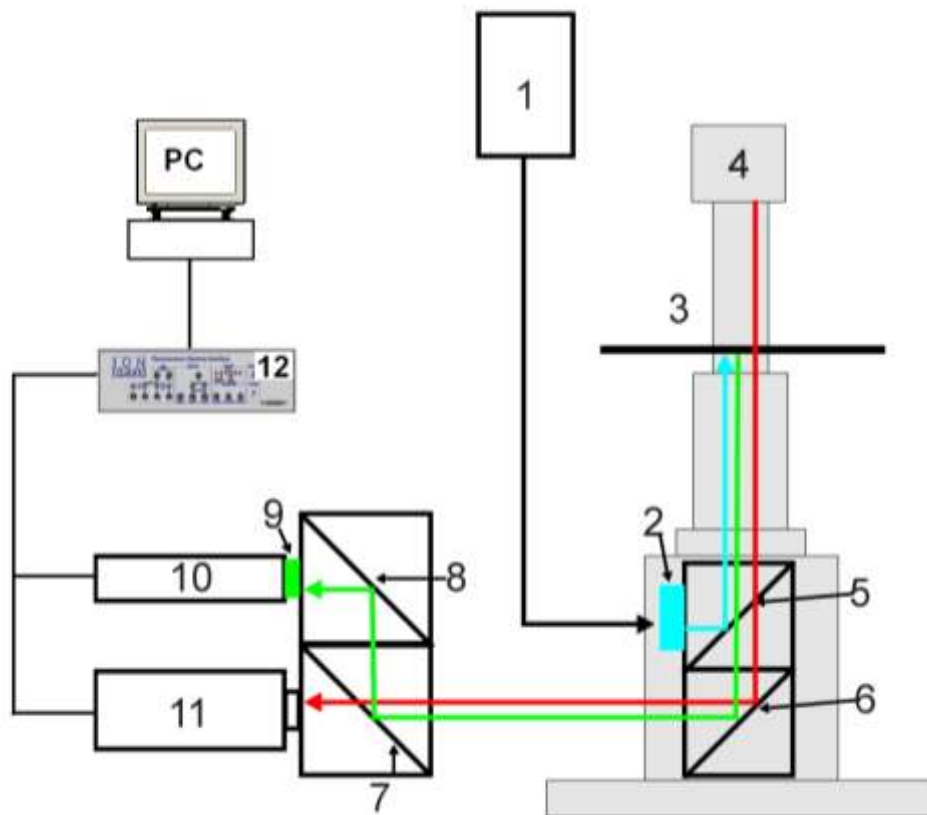
### **2.2.3 Epifluoreszenzmikroskopie**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden isolierte Kardiomyozyten mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Dadurch konnten Aussagen über Kontraktilität und Kalziumhaushalt der Zellen getroffen werden.

#### **2.2.3.1 Aufbau und Funktionsprinzip des Epifluoreszenzmikroskops**

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde ein invertiertes Mikroskop der Firma Nikon (Modell: Eclipse TE2000-U) mit einem 40x Ölimmersionsobjektiv (CF Fluor, Nikon) verwendet. Zur besseren Veranschaulichung siehe auch Abbildung 2.6. Das zur Farbstoffanregung benötigte Licht wurde mit Hilfe eines Anregungsfilters ( $D\ 480\pm 15\text{nm}$ ) aus dem Weißlicht einer Xenon Lampe (XENON SHORT ARC Lamp Typ UXL-75XE von USHIO Inc., Japan) herausgefiltert und mittels dichroischem Spiegel (D505DC long pass) auf das Präparat gelenkt. Ein dichroischer Spiegel reflektiert nur einen Teil des Lichtspektrums und lässt den Rest passieren. Die Auftrennung des Lichtes erfolgt in Abhängigkeit von der Wellenlänge: im Falle des verwendeten Langpass-Spiegels wird Licht unterhalb einer kritischen Wellenlänge reflektiert, während Licht oberhalb dieser Wellenlänge den Spiegel ohne Ablenkung passiert. Durch die Verwendung eines dichroischen Spiegels mit einer kritischen Wellenlänge die zwischen der Anregungs- und der Fluoreszenzwellenlänge von Fluo-3 liegt, konnte eine Auftrennung der beiden Strahlengänge erreicht werden. Um zu gewährleisten, dass tatsächlich eine klare Trennung erfolgt, wurde die Anregungswellenlänge mit  $480\pm 15\text{nm}$  etwas unterhalb des Absorptionsmaximums von Fluo-3 (506 nm siehe oben) gewählt. Das Fluoreszenzlicht mit einem Emissionsmaximum von 526 nm wurde nach Passage des dichroischen Spiegels durch Reflektion an weiteren Spiegeln zu einem Signalverstärker (Photomultiplier, PMT, electron tubes limited, USA) geleitet, hier verstärkt, in Spannung umgewandelt und vom Computer (Fluoreszenz System Interface ION OPTIX und Software IONWizard Acquire Version 4.4) verarbeitet.

Da im Rahmen dieser Arbeit simultan zur Messung der Kalziumtransienten auch die Kontraktilität der Zellen untersucht werden sollte, wurden die Myozyten von einer zweiten Lichtquelle durchstrahlt. Um Interferenzen mit der Fluoreszenzmessung zu vermeiden wurde dabei als Lichtquelle eine Rotlichtlampe gewählt, deren Licht mit einer Wellenlänge  $>650\text{ nm}$  deutlich oberhalb der Anregungs- und Emissionswellenlänge von Fluo-3 liegt. Nach Durchleuchtung des Präparates wurde dieses Licht zu einer Kamera geleitet und mittels eines Analog-Digital-Wandlers in Bilddaten umgewandelt. Anhand der Signalabschwächung die an den Sarkomerbanden auftritt, konnte computertechnisch die Sarkomerlänge und durch Darstellung über die Zeit die Sarkomerverkürzung (=Kontraktilität) bestimmt werden.



**Abbildung 2.6: Epifluoreszenzanlage.**

1. Xenon-Lampe (XENON SHORT ARC Lamp Typ UXL-75XE von USHIO Inc., Japan) 2. Filter D480±15 nm 3. Untersuchungsobjekt 4. Rotlichtlampe mit Filter 695 nm long pass 5. Dichroischer Spiegel D505 DC long pass 6. Spiegel 7. Dichroischer Spiegel D635 DC long pass 8. Spiegel 9. Filter D535±20nm 10. Photomultiplier (PMT electron tubes limited, USA) 11. Kamera (IONOPTIX MyoCam™) 12. Fluoreszenz System Interface ION OPTIX; (aus Mathematisch-naturwissenschaftl. Diss. Göttingen, 2006: Kohlhaas Michael, S. 66)

### 2.2.3.2 Messdurchführung am Epifluoreszenzmikroskop und Datenauswertung

Um Rückschlüsse zu erhalten welchen Einfluss die verschiedenen untersuchten Proteine ausüben und wie sie miteinander wechselwirken, wurden alle Messungen an vier unterschiedlichen Zellgruppen durchgeführt: 1. Wildtyp-Zellen, 2. FKBP12.6<sup>D37S</sup>-, 3. CaMKII $\delta_c$ -, 4. CaMKII $\delta_c$ +FKBP12.6<sup>D37S</sup>-überexprimierende Herzmuskelzellen.

Zur Messdurchführung wurde folgendermaßen vorgegangen: Zur Adhärenz der Kardiomyozyten auf dem Glasboden der Messkammern wurde dieser zunächst mit einem  $\mu\text{l}$  Laminin (Sigma, #L2020) bestrichen. Anschließend wurden 500  $\mu\text{l}$  der gemäß dem unter Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Verfahren vorbereiteten Zellsuspension auf der Messkammer

ausplattiert. Nach einer Ruhezeit von 15 Minuten im Inkubator (37°C bei 5% CO<sub>2</sub>) waren die Zellen ausreichend adhärent, so dass der Überstand abpipettiert und die verbliebenen Zellen mit 200 µl Fluo-3 AM (10 µM) beladen werden konnten. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 Minuten in Dunkelheit und bei Raumtemperatur wurde die so vorbereitete Messkammer in die Mikroskophalterung eingespannt. In der Messkammer wurden ein beheizter Zulauf für die Messtyrode, eine Absaugvorrichtung, eine Platinstimulationselektrode (25 V) sowie ein Temperatursensor installiert. Es wurden ein konstanter Fluss von zirka 3 ml/min und eine konstante Kammertemperatur von zirka 36,8°C etabliert und der überschüssige Farbstoff, der die Zellmembranen nicht permeiert hat, für zirka 5 Minuten heraus gewaschen. Nachfolgend wurden die Myozyten nach einem festen Stimulationsprotokoll (siehe Tabelle 2.1) stimuliert und dabei Kalziumtransienten und Sarkomerverkürzungen simultan registriert. Bei der Auswahl der Herzmuskelzellen, die für die Messungen verwendet wurden, wurde darauf geachtet, dass sie eine intakte stabförmige Form und eine klare Querstreifung aufwiesen (siehe Abbildung 2.2). Weiterhin wurden keine Zellen verwendet, die bereits der initialen Stimulation mit einem Hertz nicht folgten oder dabei Extraktionen zeigten.

Einschlagen + Farbstoffauswaschen	1 Hertz für 5 min.
<b>Kraft-Frequenz-Beziehung</b>	0,1 Hertz bis SSS
	0,5 Hertz bis SSS
	1,0 Hertz bis SSS
	2,0 Hertz bis SSS
	4,0 Hertz bis SSS
<b>Post-Pausen-Beziehung</b>	Stimulation bei einem Hertz bis SSS, dann 10 Sekunden Pause und erneute Stimulation. Vergleich des 1. Transienten nach der Stimulationspause mit den Transienten davor.
	Stimulation bei einem Hertz bis SSS, dann 30 Sekunden Pause und erneute Stimulation. Vergleich des 1. Transienten nach der Stimulationspause mit den Transienten davor.
<b>Koffeininduzierter Transient</b>	Stimulation bei einem Hertz bis SSS, dann Stopp der Stimulation und Koffeinapplikation.
Messung der Hintergrundfluoreszenz in einem Bereich in unmittelbarer Nähe der untersuchten Zelle.	

**Tabelle 2.1: Stimulationsprotokoll am Epifluoreszenzmikroskop.**

Die Abkürzung SSS steht für Steady-State-Status. Erläuterungen zu den einzelnen Protokollabschnitten finden sich im Text.

Die Stimulation bei den einzelnen untersuchten Frequenzen wurde dabei jeweils solange durchgeführt bis Gleichgewichtsbedingungen (Steady-State) erreicht waren, das heißt keine wesentlichen Änderungen der Kontraktilität mehr aufgetreten sind. Um das Ausbleichen des Farbstoffs so gering wie möglich zu halten wurde das Fenster für die Anregungswellenlänge erst geöffnet nachdem Gleichgewichtsbedingungen erreicht waren und dann einige Kalziumtransienten simultan zur Myozytenverkürzung aufgezeichnet. Anschließend wurden der basale diastolische Kalziumspiegel (Baseline  $F_0$ ), der systolische Maximalwert (Peak  $F_{\max}$ ), die Transientenamplitude ( $\Delta F/F_0$ ) sowie der zeitliche Verlauf der Transienten betrachtet (siehe Formel 2.2 und Abbildung 2.7). Analog wurden bei den registrierten Zellverkürzungen Ausgangslänge und maximale Verkürzung bestimmt. Der zeitliche Rückgang des Transienten vom Peak zur Baseline wurde anhand der Relaxations-/Rückgangszeiten ( $RT_{50\%}$ ,  $RT_{80\%}$ ,  $RT_{90\%}$ ) objektiviert, wobei die  $RT_{x\%}$  die Zeit angibt, die der Kalziumtransient benötigt um wieder um x Prozent seines Maximalwertes abzufallen. Zusätzlich wurde dem Transientenabfall mit Hilfe des Computerprogramms Ion Wizard Analyze 5.0 (Ion Optix) eine exponentielle Abfallfunktion angenähert und die Abfallkonstante Tau ( $\tau$ ) bestimmt (Erläuterungen siehe Abbildung 2.7 und Formel 2.5).

Anhand der Rückgangszeiten (RT) und des Tauwertes ( $\tau$ ) der stimulierten Kalziumtransienten ist es möglich, die Funktion der SR-Kalzium-ATPase (SERCA) abzuschätzen, da in der normalen Mauskardiomyozyte die SERCA für zirka 90% der diastolischen Kalziumelimination verantwortlich ist (Li L et al. 1998). Entsprechend stehen eine lange Rückgangszeit und hohe Tauwerte für eine geringe SERCA-Aktivität und umgekehrt.

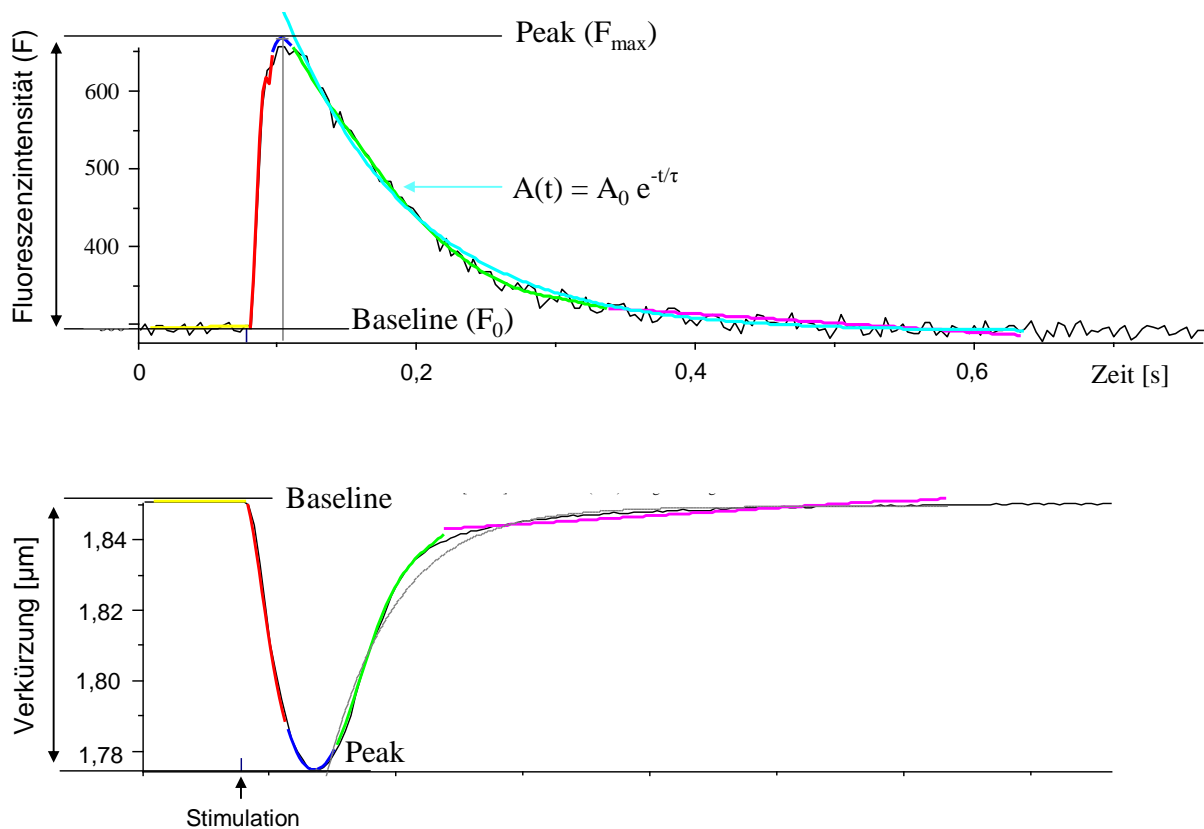
$$\Delta F/F_0 = \frac{(\text{Systolische Fluoreszenz (F)} - \text{Hintergrundfluoreszenz})}{(\text{Diastolische Fluoreszenz (F}_0) - \text{Hintergrundfluoreszenz})}$$

**Formel 2.2: Berechnung der Fluoreszenzamplitude.**

$$\text{Myozytenverkürzung [\%]} = \frac{(\text{diast. Sarkomerlänge} - \text{syst. Sarkomerlänge})}{\text{diastol. Sarkomerlänge}} \times 100$$

**Formel 2.3: Berechnung der fraktionellen Myozytenverkürzung.**

Myozytenverkürzung in [%] der diastolischen Ruhezelllänge.



**Abbildung 2.7: Fluo-3-Fluoreszenzsignal und simultane Verkürzung über die Zeit.** Dargestellt sind ein Fluoreszenzsignal sowie die simultan registrierte Sarkomerverkürzung, die bei einer Stimulationsfrequenz von einem Hertz registriert wurden. Mit Hilfe der Formel 2.2 lässt sich das  $\Delta F/F_0$  bestimmen, das mittels Formel 2.1 in die Kalziumtransientenamplitude umgerechnet werden kann. Die türkisfarbene Linie entspricht der vom Computerprogramm Ion Wizard angenäherten exponentiellen Abfallfunktion (siehe Formel 2.4). Spezifisch für jede exponentielle Abfallfunktion ist eine Abfallkonstante tau ( $\tau$ ), die ebenfalls bestimmt wurde und vergleichbar zu den RTs Auskunft über die SERCA Funktion geben kann. Weitere Erläuterungen siehe Text.

$$A(t) = A_0 e^{-t/\tau}$$

**Formel 2.4: Angenäherte exponentielle Abfallfunktion.**

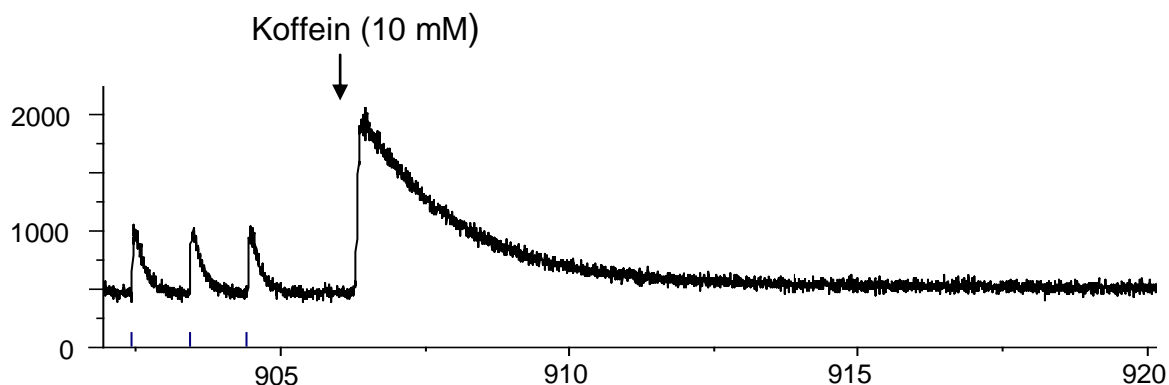
$A_0$  entspricht dem Fluoreszenzintensitätswert am Peak,  $e$ : Euler'sche Zahl,  $t$  Zeit [ms],  $\tau$  tau [ms] Abfallkonstante. Da man mit  $\tau$  keine unmittelbare anschauliche Vorstellung verbindet ist in Formel 2.5 zusätzlich die Beziehung zwischen  $\tau$  und der RT50% der Exponentialfunktion gegeben (Aus Burg K, Haf H, Wille F 2008).

$$\tau \text{ [ms]} = \frac{\text{RT 50\% [ms]}}{\ln 2}$$

**Formel 2.5: Tau  $\tau$ .**



Bei der Untersuchung der Post-Pausen-Beziehungen wurden die Zellen vor der Pause mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert bis Gleichgewichtsbedingungen (steady-state) erreicht waren, anschließend die Stimulation für 10 bzw. 30 Sekunden gestoppt und dann der erste Transient nach der Pause registriert. Nachfolgend wurde die prozentuale Änderung der Kalziumtransientenamplitude zwischen 1 Hz Gleichgewichtstransienten vor der Pause und dem ersten Transienten nach der Pause ermittelt. Durch die artifizielle Verlängerung der Diastole gewinnen diastolische Kalziumtransportmechanismen (RyR, SERCA, NCX) an Bedeutung und dynamische Änderungen im Kalziumhaushalt können beurteilt werden (siehe Abschnitt 3.2.5). Zur Bestimmung des Kalziumgehaltes des Sarkoplasmatischen Retikulums sowie zur Abschätzung der NCX-Funktion wurde folgendermaßen vorgegangen: zusätzlich zu den oben beschriebenen Geräten wurde ein Zulauf in die Messkammer eingebracht, über den auf Knopfdruck ein Tropfen einer 10 mM Koffeinelösung (siehe Abschnitt 2.3) verabreicht werden konnte. Als Spitze des Zulaufs wurde eine dünne Kanüle gewählt, die in unmittelbarer Umgebung der untersuchten Zelle so installiert wurde, dass die Zelle in Flussrichtung lag. Die Zelle wurde unter Verwendung von Normaltyrode bei  $\sim 36-37^{\circ}\text{C}$  mit einem Hertz stimuliert bis Steady-State-Bedingungen erreicht waren. Anschließend wurde die Stimulation gestoppt und die Koffeinelösung rasch appliziert. Koffein bewirkt eine sofortige komplette aber reversible Öffnung des Ryanodinrezeptors (Bassani JW et al. 1992, Bers 2001). Dadurch kommt es zu einer vollständigen Entladung des SR. Registriert man den auftretenden Kalziumtransienten (siehe Abbildung 2.8) nach Zugabe der Koffeinelösung kann man so auf den SR-Kalziumgehalt rückschließen. Da die Kalziumionen die von der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) zurück in das SR gepumpt werden, so gleich wieder über die geöffneten Ryanodinrezeptoren in das Zytoplasma gelangen, trägt fast ausschließlich der NCX zur Kalziumelimination aus dem Zytoplasma bei. Andere Kalziumtransportmechanismen wie der Mitochondriale Kalziumuniporter und die Sarkolemmale Kalzium-ATPase machen unter physiologischen Bedingungen nur zirka 1% und auch nach Koffeinapplikation nur zirka 9% der Kalziumelimination aus (Bassani JW et al. 1994, Bers 2001) und sind daher vernachlässigbar. Somit kann die Rückgangszeit des Koffeintransienten als Maß für die NCX-Funktion verwendet werden, wobei eine lange Rückgangszeit auf eine geringe Funktion hinweist und umgekehrt.



**Abbildung 2.8: Beispiel eines koffeininduzierten Transienten:** Auf der y-Achse ist die registrierte Fluoreszenzintensität dargestellt, auf der x-Achse die Zeit in Sekunden seit Beginn der Messung. Vor dem koffeininduzierten Transienten sind drei Transienten zu sehen, die durch einen elektrischen Impuls mit einem Hertz induziert wurden. Danach wurde die Stimulation gestoppt und Koffein appliziert. Neben der im Vergleich zu den 1-Hertz-Transienten deutlich höheren Amplitude des koffeininduzierten Transienten ist auch zu sehen, dass der Transientenrückgang flacher verläuft. Dies beruht darauf, dass lediglich der Natrium-Kalzium-Austauscher zur Kalziumelimination beiträgt (siehe Text).

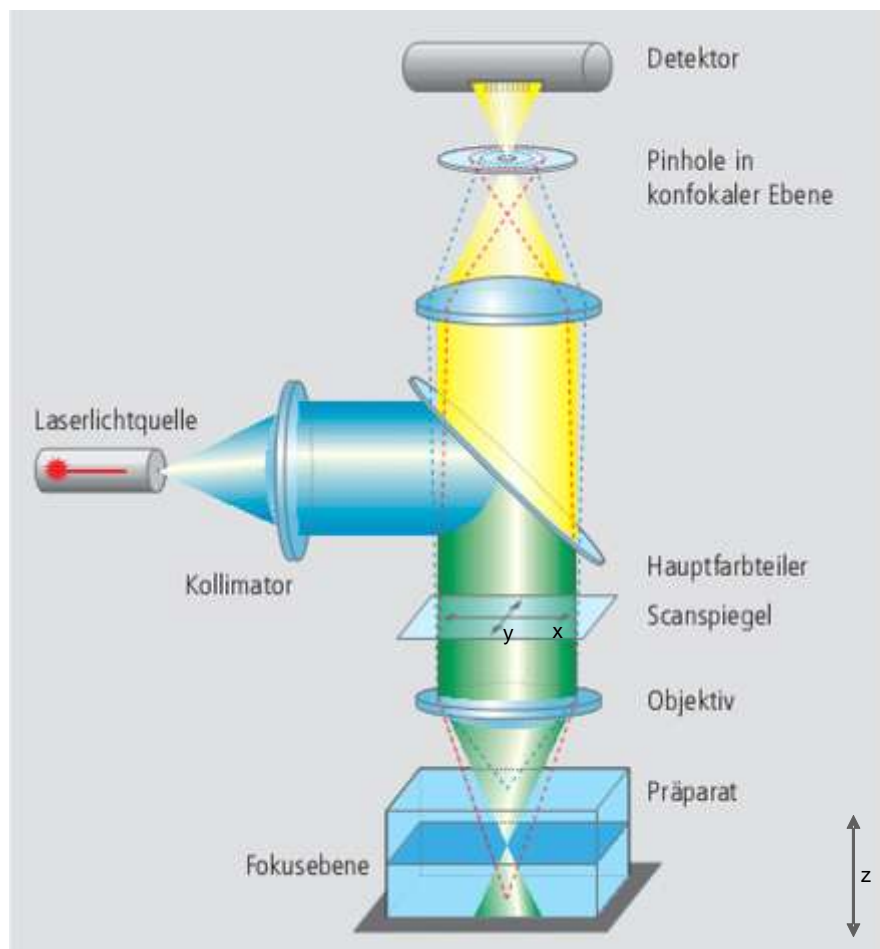
## 2.2.4 Konfokale Laserscanmikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden subzelluläre Kalziumkonzentrationsänderungen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie untersucht. Dadurch konnten Aussagen über die diastolische Offenwahrscheinlichkeit des kardialen Ryanodinrezeptors, das heißt über den diastolischen Kalziumverlust aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum in den verschiedenen Untersuchungsgruppen getroffen werden.

### 2.2.4.1 Aufbau und Funktionsprinzip des konfokalen Laserscanmikroskops

Im Gegensatz zu der in Abschnitt 2.3 beschriebenen Epifluoreszenzmikroskopie findet bei der Konfokalen Laserscanmikroskopie ein monochromatischer Laser (im Rahmen dieser Arbeit ein 488 nm Argonlaser) als Anregungsquelle Verwendung. Dadurch wird erreicht, dass ein wesentlich kleinerer Bereich des Präparates angeregt werden kann. Das aus diesem Bereich emittierte Fluoreszenzlicht muss zusätzlich eine Lochblende (so genanntes Pinhole) passieren bevor es zum Photomultiplier gelangt. Dieses Prinzip erlaubt es Streustrahlen weitgehend auszublenden, so dass letztlich nur noch das Signal, das exakt auf der Fokusebene des Präparates stammt, detektiert und als Bildpunkt registriert wird. So kann eine erheblich höhere Auflösung erreicht werden als in der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie. Das komplette Bild wird dann erzeugt, indem das Präparat Punkt für Punkt abgerastert wird und

die einzelnen Bildpunkte computertechnisch zusammengefügt werden. Das Abrastern des Präparates erfolgt durch verstellbare Spiegel, die den Laserstrahl über das Objekt bewegen. Durch Abrastern in x- und y-Richtung kann so ein zweidimensionales Bild erzeugt werden. Wird das Anregungslicht durch einen Motor zusätzlich in z-Richtung über das Präparat geführt, so können dreidimensionale Bilder erzeugt werden.



**Abbildung 2.9: Prinzip der Konfokalen Laserscanmikroskopie:** Monochromatisches Licht eines Lasers (Argon-Laser, 488 nm) wird zu einem dichroischen Spiegel (Hauptfarbteiler, HFT 505) geleitet und von dort auf das Präparat gelenkt. Zwischengeschaltete Scanspiegel ermöglichen es den Strahlengang über das Präparat zu bewegen und so das Präparat abzurastern. Durch das Objektiv wird das Anregungslicht auf einen Punkt in der Probe fokussiert. Das von dort emittierte höherwellige Fluoreszenzlicht passiert den Hauptfarbteiler ohne Ablenkung, wird dann mit Hilfe einer Linse gebündelt und nach Passage der Lochblende vom Detektor registriert. Der Punkt der größten Fluoreszenzanregung liegt dabei in der Fokusebene (hier an der Spitze der grünen Pyramide). Die Anregungsintensität reicht jedoch aus auch Bereiche oberhalb und unterhalb der Fokusebene anzuregen. Emittiertes Licht aus diesen Bereichen (blau- bzw. rot-gestrichelte Linie) wird jedoch durch die Lochblende weitgehend zurückgehalten. (Anregungslicht blau dargestellt, Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene gelb, die grüne Darstellung im unteren Bereich der Zeichnung demonstriert die Überlagerung von anregendem und emittiertem Licht). (Modifiziert nach Zeiss: LSM 5 Familie Laser Scanning Mikroskope, ohne Jahresangabe, S. 4).

#### **2.2.4.2 Messdurchführung am konfokalen Laserscannmikroskop und Datenauswertung**

Die Messvorbereitung erfolgte analog zu dem in Abschnitt 2.2.3.2 beschriebenen Verfahren mit dem Unterschied, dass als Farbstoff bei den Messungen am Konfokalmikroskop Fluo-4 AM Verwendung fand. Die Vorteile von Fluo-4 gegenüber Fluo-3 für die Messungen am Laserscannmikroskop sind in Abschnitt 2.2.2 dargestellt. Die Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte durchgehend mit 0,5 Hertz. Zunächst wurde eine Zelle im Durchlichtmodus des Mikroskops zentriert und anschließend im 2d-Modus abgerastert. Nachdem so eine zweidimensionale Darstellung der Zelle erfolgt war, wurde die eigentliche Messung im Linienrasterverfahren (Line-Scan-Modus) durchgeführt: hierbei wird durch den Laserstrahl eine nur wenige  $\mu\text{m}$  dünne Linie abgerastert und angeregt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräteeinstellungen verwendet: 512 Pixel pro Linie, Pixelgröße  $0,07 \times 0,07 \mu\text{m}$ , resultierende Scan(linien)breite  $35,84 \mu\text{m}$ , Pixelzeit  $0,64 \mu\text{s}$ , Pixeltiefe 12 bit. Die Linien, die durch den Laser abgerastert wurden, wurden dabei so gelegt, dass sie parallel zur Längsachse der Myozyten lagen und – zur Messung der Hintergrundfluoreszenz – wenige  $\mu\text{m}$  aus der Zelle herausragten. Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Erfassung eines größeren 2- oder 3- dimensionalen Bildes ist eine deutlich höhere zeitliche Auflösung. So konnten Schwankungen des Fluoreszenzsignals, die ja die Schwankungen der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration widerspiegeln, im zeitlichen Verlauf registriert werden. Aufgrund des hohen Auflösungsvermögens des konfokalen Laserscannmikroskops können – neben der generalisierten Zunahme des Fluoreszenzsignals im Rahmen der Systole – auch und insbesondere lokale unstimulierte Kalziumfreisetzungseignisse (sogenannte Kalziumsparks) während der Diastole registriert werden. Die Auswertung der Sparkfrequenz erfolgte zunächst visuell in den Bilddateien die mit Hilfe der Zeiss LSM 5 Pascal Software erhoben wurden. In den einzelnen Gruppen wurde der Anteil an Scans bestimmt der Kalziumsparks aufwies. In allen Zellen in denen Sparks registriert wurden, wurde nun die Messbreite, die im Bereich der Zelle lag (entspricht Scanbreite minus Bereich der für die Hintergrundmessung außerhalb der Zelle gelegt wurde), bestimmt und dann die Sparkfrequenz pro Mikrometer Messbreite pro Sekunde Messdauer berechnet. Weiterhin konnte mittels der LSM 5 Pascal Software die Sparkbreite gemessen werden. Die gemessenen Fluoreszenzintensitätswerte über die Zeit wurden exportiert und zur weiteren Auswertung in Excel eingelesen. Anhand dieser Fluoreszenzintensitätswerte wurden in Excel Fluoreszenzkurven über die Zeit erstellt und hinsichtlich der diastolischen Baseline Fluoreszenz, des Sparkpeaks, der Sparkdauer und der Sparkrückgangszeit 50% (RT 50%)

analysiert. Analog zur Auswertung der Epifluoreszenzdaten (Abschnitt 2.2.3.2) wurde auch hier die Hintergrundfluoreszenz gemessen und vor Berechnung der Sparkamplitude von Peak- und Baselinefluoreszenz abgezogen (vgl. Formel 2.2).

## 2.3 Lösungen und Chemikalien

Bei der Myozytenisolation fanden folgende Lösungen Verwendung (vgl. Abschnitt 2.1.2):

1. Isolations-Tyrode
2. Stopp-Tyrode
3. Enzym-Tyrode
4. Tyroden zum Kalziumaufbau

Die Zusammensetzungen sind den nachstehenden Tabellen zu entnehmen.

Lösung	Inhaltstoffe	Konzentration	Anmerkungen
Isolations-Tyrode	NaCl	120 mmol/l	Gelöst in ddH <sub>2</sub> O; pH eingestellt auf 7,54 mittels NaOH bei RT.
	KCl	4,7 mmol/l	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 mmol/l	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,6 mmol/l	
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,2 mmol/l	
	NaHCO <sub>3</sub>	12 mmol/l	
	KHCO <sub>3</sub>	10 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
	Taurine	30 mmol/l	
	Glucose	5,5 mmol/l	
Phenol-Rot	0,032 mmol/l		

**Tabelle 2.2: Isolationstyrode.**

Lösung	Inhaltstoffe	Konzentration	Anmerkungen
Stopp-Tyrode	BCS	10%	Gelöst in Isolations- tyrode; eingestellt auf pH 7,54 bei RT.
	CaCl <sub>2</sub>	12,5 µM	

**Tabelle 2.3: Stopp-Tyrode.**

Lösung	Inhaltstoffe	Konzentration	Anmerkungen
Enzym-Tyrode	Liberase <sup>®</sup>	7.5 mg/ml	Gelöst in Isolations-tyrode; eingestellt auf pH 7,54 bei RT.
	Blendzyme 1		
	Trypsin (10x)	0.6%	
	CaCl <sub>2</sub>	12,5 µM	

**Tabelle 2.4: Enzym-Tyrode.**

Lösung	Inhaltstoffe	Konzentration	Anmerkungen
Tyroden zum Kalziumaufbau (I, II, III, IV)	BCS	5%	Gelöst in Isolations-tyrode; eingestellt auf pH 7,54 bei RT.
	CaCl <sub>2</sub>	I: 125 µM II: 250 µM III: 500 µM IV: 900 µM	

**Tabelle 2.5: Tyroden für den Kalziumaufbau.**

Für die Messungen am Konfokal- und Epifluoreszenzmikroskop wurden folgende Chemikalien, Farbstoffe und Lösungen verwendet:

Lösung	Inhaltstoffe	Konzentration	Anmerkungen
Messtyrode	NaCl	140 mM	Gelöst in ddH <sub>2</sub> O; pH 7,4 mit NaOH bei 37°C
	KCl	4 mM	
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 mM	
	Glukose	10 mM	
	HEPES	5 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM	

**Tabelle 2.6: Messtyrode.**

Lösung	Inhaltstoffe	Konzentration	Anmerkungen
Koffeinlösung	Koffein	10 mM	Gelöst in Messtyrode; pH 7,4 mit NaOH bei 37°C

**Tabelle 2.7: Koffeinlösung.**

Lösung	Inhaltstoffe	Konzentration/Menge	Anmerkungen
Epifluoreszenzfarbstoff (Stocklösung)	Fluo-3 AM (TefLabs)	1 mM	Gelöst in DMSO, bei -20°C lagern
Epifluoreszenzfarbstoff	Fluo-3 AM Stock	50 µl	Im Dunkeln ansetzen
	Pluronic 20%	5 µl	
	Messtyrode	5 ml	
Konfokalfarbstoff (Stocklösung)	Fluo-4 AM (TefLabs)	1 mM	Gelöst in DMSO, bei -20°C lagern
Konfokalfarbstoff	Fluo-4 AM Stock	45,6 µl	Im Dunkeln ansetzen
	Pluronic 20%	4,56 µl	
	Messtyrode	4,56 ml	

**Tabelle 2.8: Fluoreszenzfarbstoffe.**

## 2.4 Statistik

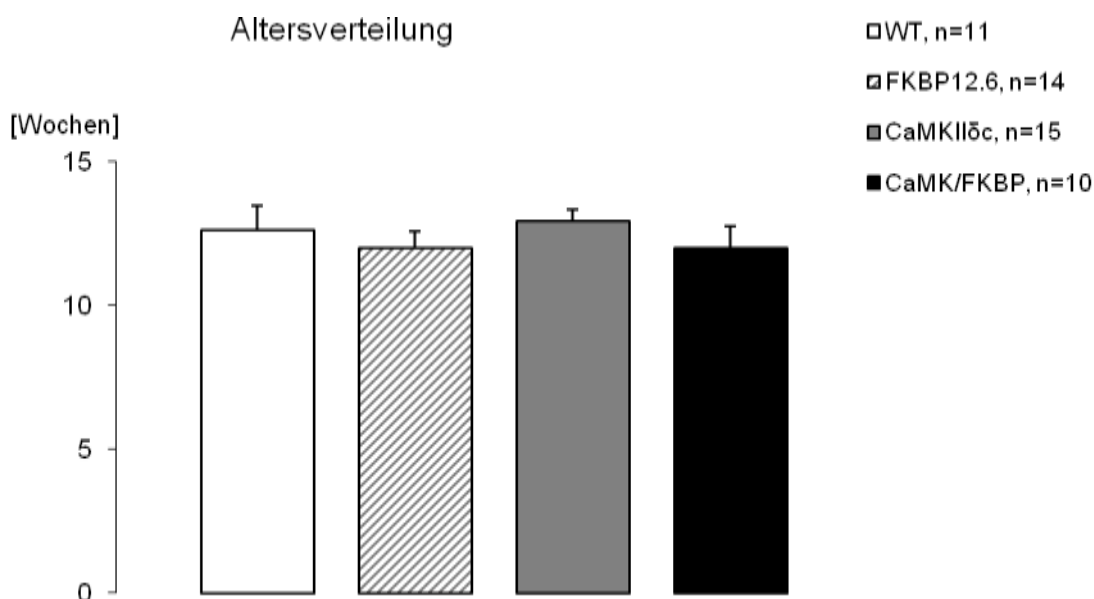
Die erhobenen Daten werden als Mittelwert  $\pm$ SEM angezeigt. Statistische Auswertungen erfolgten mittels T-Test bzw. mittels Zwei-Wege-Varianz-Analyse (ANOVA) beim Vergleich longitudinaler Daten mit anschließendem Bonferroni Post-Hoc Test. Dafür wurden die Programme MS Excel<sup>®</sup>, Graph Pad<sup>™</sup> Prism und SigmaStat<sup>®</sup> verwendet. Ein P-Wert von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

Die Versuche wurden an vier verschiedenen Untersuchungsgruppen durchgeführt:

- 1.) Wildtyp-Kardiomyozyten (WT)
- 2.) FKBP12.6<sup>D37S</sup>-transgene Kardiomyozyten (FKBP<sup>D37S</sup> oder FKBP12.6)
- 3.) Kardiomyozyten mit CaMKII $\delta_c$  Überexpression (CaMKII $\delta_c$ )
- 4.) CaMKII $\delta_c$ +FKBP12.6<sup>D37S</sup>-transgene Kardiomyozyten (CaMK/FKBP<sup>D37S</sup> oder CaMK/FKBP oder DT).

Für alle Versuche wurden Kardiomyozyten aus Mäusen im Alter von 2 bis 4 Monaten verwendet. Die Versuchstiere wurden dabei so ausgewählt, dass zum Messzeitpunkt kein (signifikanter) Altersunterschied zwischen den Gruppen bestand (siehe Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Altersverteilung zum Messzeitpunkt in Abhängigkeit vom Genotyp.** n gibt die Anzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe an. Zwischen den Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede.



### 3.1 Einfluss von CaMKII $\delta_c$ -, FKBP12.6<sup>D37S</sup>- und simultaner Überexpression beider Proteine auf die Biometrie der Mäuse

Sowohl in der Gruppe mit Überexpression der Kalzium-Calmodulin abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$  als auch in der Gruppe mit simultaner Überexpression von CaMKII und FKBP12.6<sup>D37S</sup> fand sich eine gegenüber Wildtyp signifikante Zunahme des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht. FKBP12.6<sup>D37S</sup> alleine zeigte dagegen keinen Einfluss (siehe Abbildung 3.2).

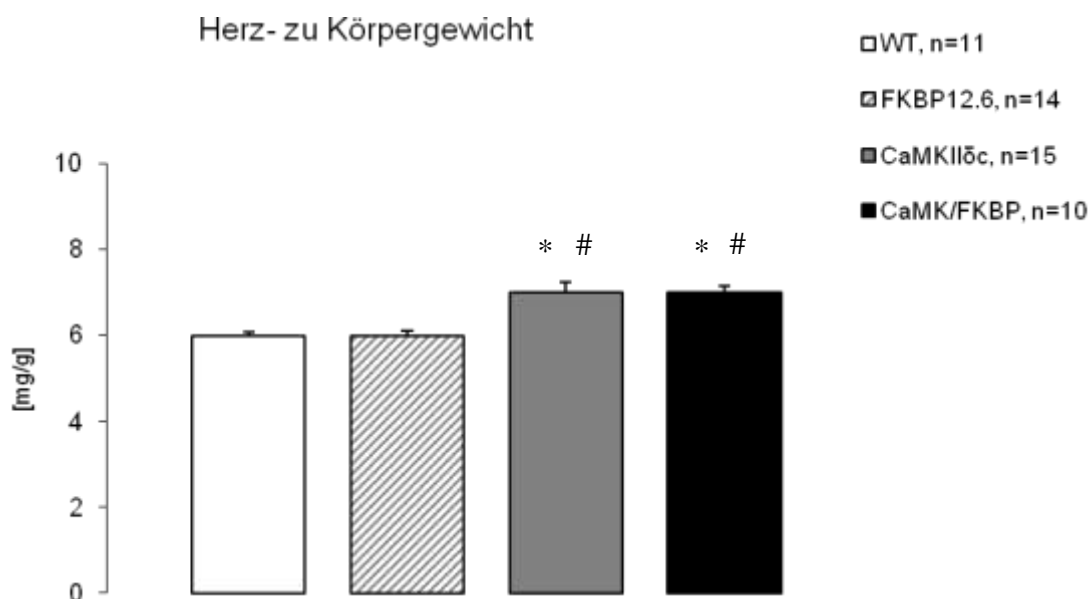


Abbildung 3.2: Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht in Abhängigkeit vom Genotyp.

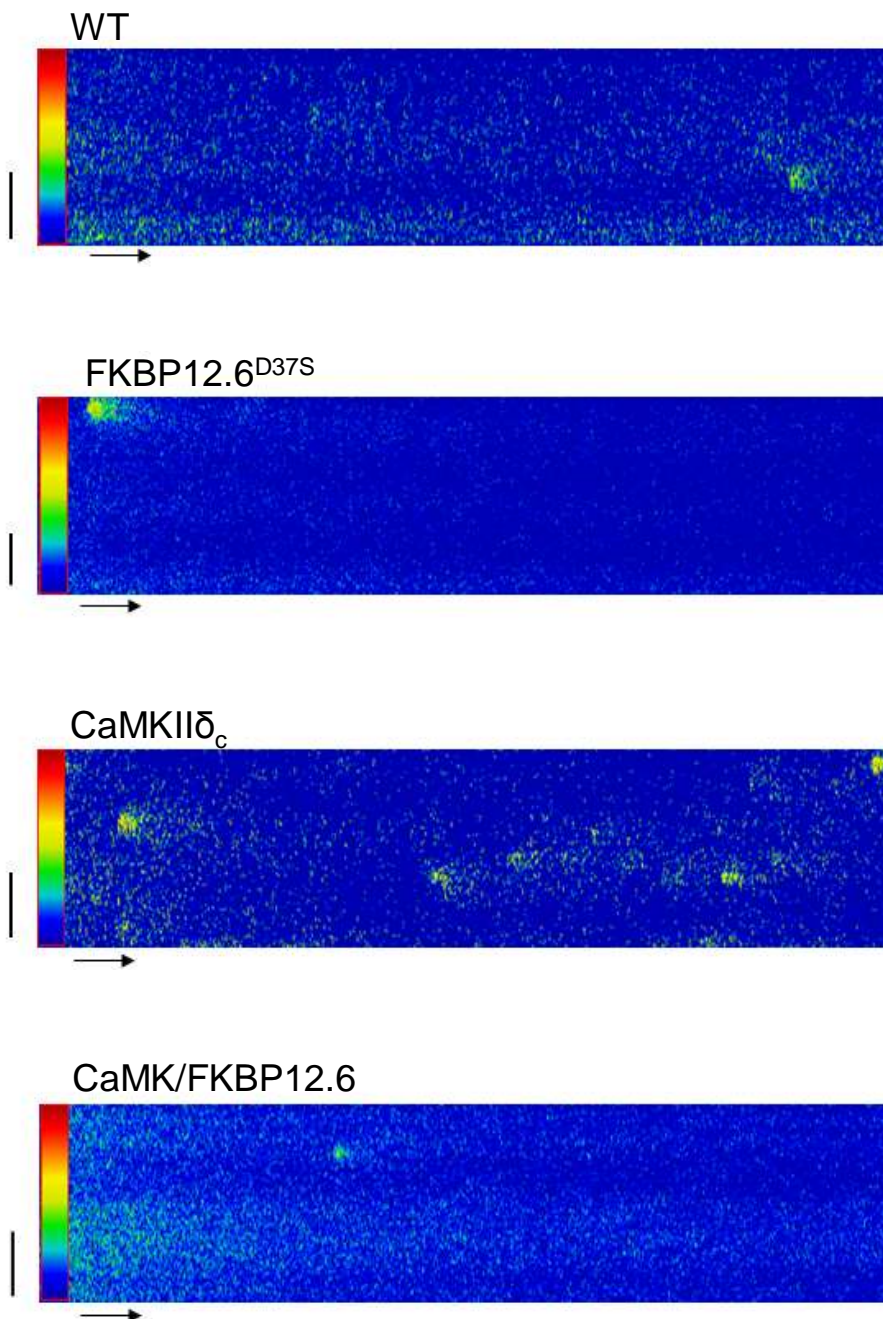
\* signifikant verschieden gegenüber Wildtyp, # signifikant verschieden gegenüber FKBP12.6<sup>D37S</sup>. n gibt die Anzahl der verwendeten Tiere und Herzen in den unterschiedlichen Gruppen an.

### 3.2 Einfluss von CaMKII $\delta_c$ -, FKBP12.6<sup>D37S</sup>- und simultaner Überexpression beider Proteine auf Kalziumhaushalt und Kontraktilität der Kardiomyozyten

#### 3.2.1 Die Diastolische SR-Kalzium-Freisetzung: Kalziumsparks

Der subzelluläre Kalziumhaushalt der Kardiomyozyten wurde hinsichtlich des Auftretens, der Häufigkeit und der Charakteristik diastolischer Kalziumfreisetzungseignisse aus dem

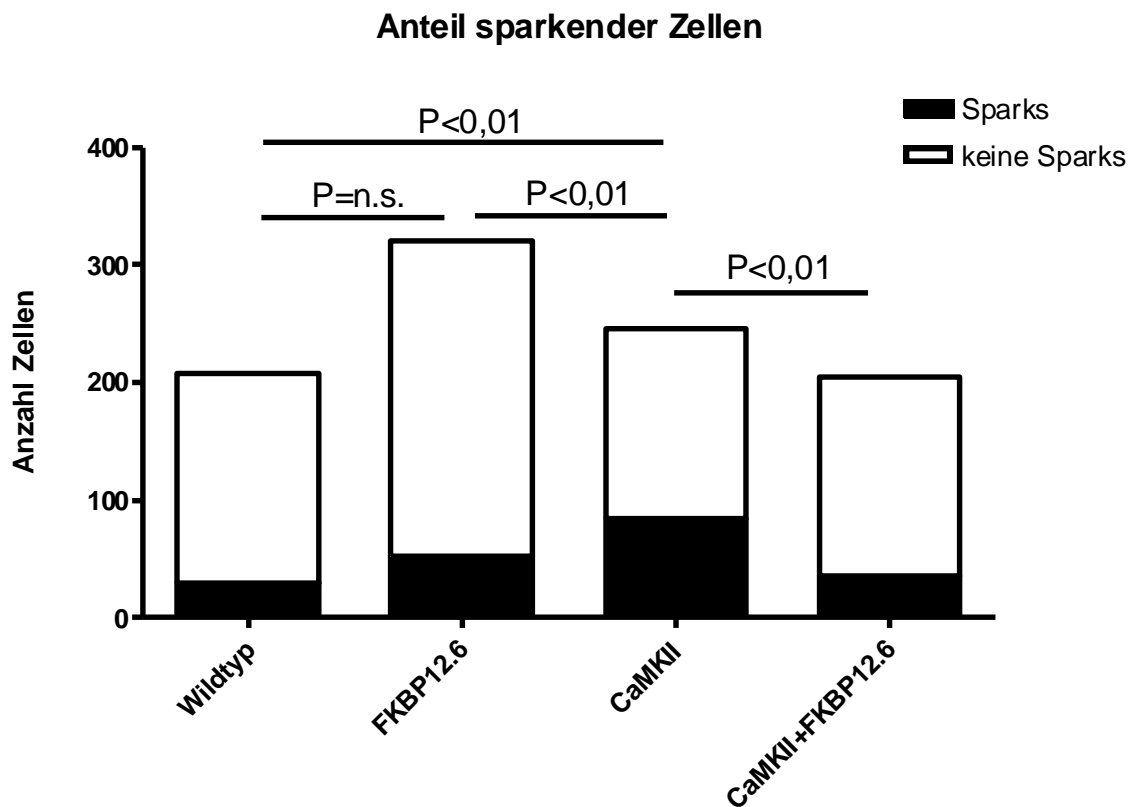
Sarkoplasmatisches Retikulum untersucht und wie erhebliche Unterschiede in den verschiedenen Gruppen auf. Abbildung 3.3 zeigt beispielhafte Originalregistrierungen aus den vier Untersuchungsgruppen.



**Abbildung 3.3: Originalregistrierungen Linienrasterverfahren in den 4 Untersuchungsgruppen.**

Von oben nach unten: 1.) Wildtyp, 2.) FKBP12.6<sup>D37S</sup>, 3.) CaMKIIδ<sub>c</sub>, 4.) CaMKIIδ<sub>c</sub>+FKBP12.6<sup>D37S</sup>. Balken auf der y-Achse markieren 10 µm, Pfeile auf der x-Achse entsprechen 100 ms.

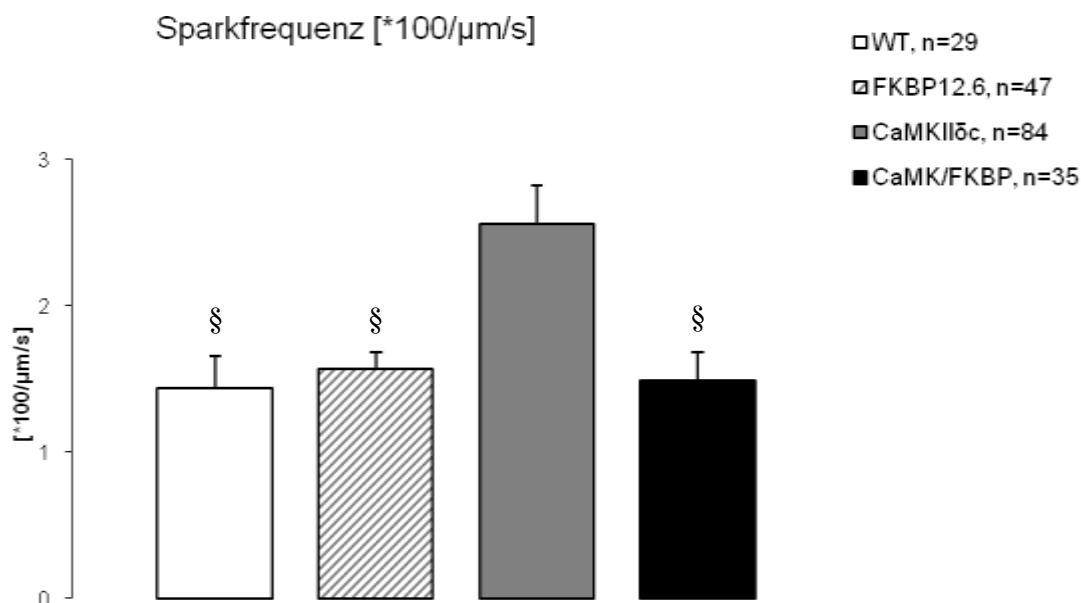
In der Gruppe der Zellen, die die CaMKII $\delta_c$  überexprimierten traten in 34,15% der Zellen Kalziumsparks während der Messung auf. Der Anteil sparkender Zellen war damit in der CaMKII-Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöht. In der Wildtypkontrollgruppe fanden sich in 14,00% der Zellen Kalziumsparks. Ähnliche Anteile wurden auch in den FKBP12.6<sup>D37S</sup> (16,20%) überexprimierenden Kardiomyozyten, sowie in den doppeltransgenen Zellen gefunden (17,65%). Die anderen drei Untersuchungsgruppen wiesen damit keine Unterschiede in der Häufigkeit auf mit der Sparks in Zellen auftraten. Abbildung 3.4 stellt den Anteil sparkender Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl gemessener Zellen dar.



**Abbildung 3.4: Anteil sparkender Zellen in den vier Untersuchungsgruppen.** Die angezeigten Signifikanztestungen erfolgten mittels Chi-Quadrat-Test mit dem Programm GraphPad Prism 4.

Wenn in einer Zelle diastolische Kalziumfreisetzungseignisse registriert wurden, so wurde deren Anzahl bestimmt und durch Messung der Scanbreite [ $\mu\text{m}$ ] und -dauer [s] die Sparkfrequenz pro Mikrometer pro Sekunde ermittelt. Um übersichtlichere Zahlen zu erhalten wurde die Sparkfrequenz in allen Gruppen mit 100 multipliziert und dann in der Einheit

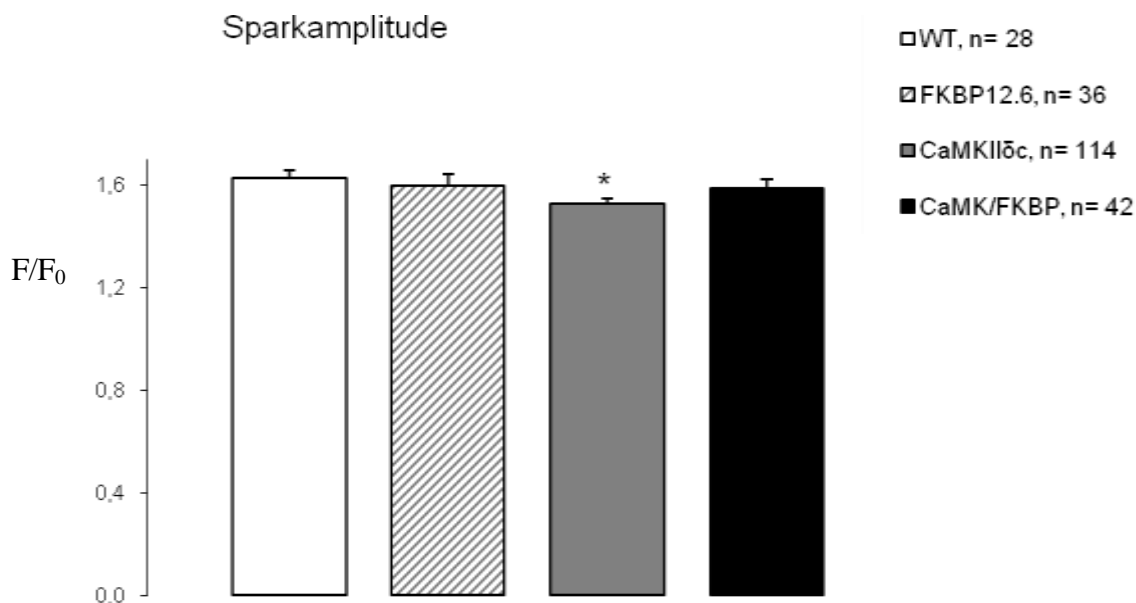
[\*100/ $\mu\text{m/s}$ ] angegeben. Zwischen den Wildtypzellen ( $1,44 \pm 0,22$  [\*100/ $\mu\text{m/s}$ ],  $n=29$ ), den Zellen die FKBP12.6<sup>D37S</sup> überexprimierten ( $1,57 \pm 0,12$  [\*100/ $\mu\text{m/s}$ ],  $n=47$ ) und den doppeltransgenen Zellen ( $1,49 \pm 0,19$  [\*100/ $\mu\text{m/s}$ ],  $n=35$ ) fanden sich dabei keine Unterschiede. Die CaMKII $\delta_c$ -Gruppe ( $2,56 \pm 0,27$  [\*100/ $\mu\text{m/s}$ ],  $n=84$ ) wies dagegen eine gegenüber allen anderen Gruppen signifikante Erhöhung der Sparkfrequenz auf (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5: Sparkfrequenz in den verschiedenen Untersuchungsgruppen.**

§ signifikant verschieden gegenüber CaMKII $\delta_c$ . n-Zahlen geben die Anzahl der Zellen in denen Sparks aufgetreten sind an.

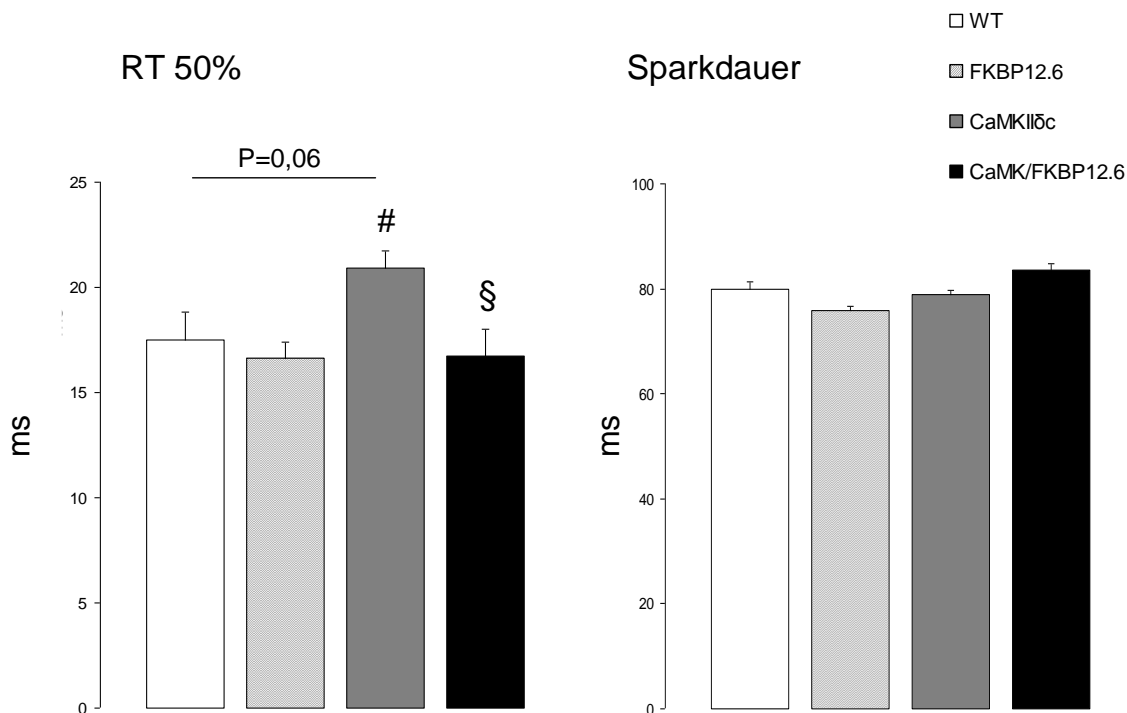
Neben der Sparkfrequenz wurden weitere Charakteristika der diastolischen Kalziumfreisetzungseignisse bestimmt, die ebenfalls Einfluss auf das diastolische Kalziumleck haben. Bei der Auswertung der Sparkamplitude fand sich in der Gruppe der Zellen mit Überexpression der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$  ( $1,53 \pm 0,02$ ,  $n=114$ ) eine signifikante Reduktion verglichen mit Wildtyp ( $1,63 \pm 0,03$ ,  $n=28$ ). Gegenüber FKBP<sup>D37S</sup> ( $1,60 \pm 0,04$ ,  $n=36$ ) und den Kardiomyozyten die CaMKII $\delta_c$  und FKBP12.6<sup>D37S</sup> simultan überexprimierten ( $1,59 \pm 0,03$ ,  $n=42$ ) zeigte sich lediglich eine Tendenz zur Reduktion, die das Signifikanzniveau jedoch nicht erreichte (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Sparkamplitude in den verschiedenen Untersuchungsgruppen.**

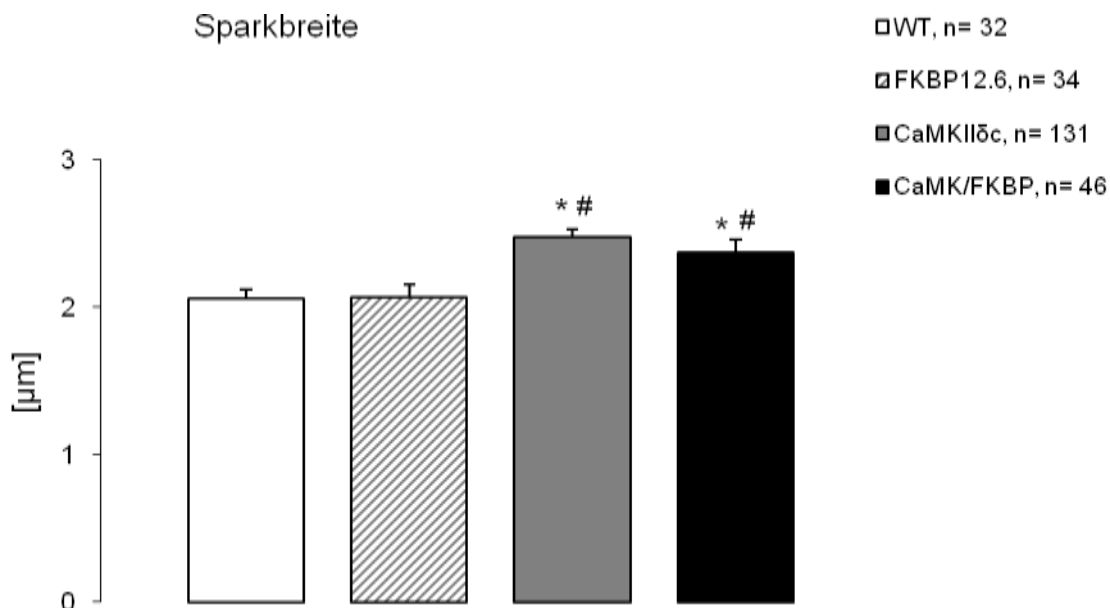
\* signifikant verschieden gegenüber Wildtyp. n-Zahlen geben die Anzahlen Sparks an, die für die F/F<sub>0</sub>-Auswertung verwendet wurden.

Als zeitliche Verlaufparameter wurden die Rückgangszeit 50% (RT 50%), das heißt die Zeit bis das Fluoreszenzsignal vom Peakwert zurück auf 50% des Peakwertes gefallen ist, sowie die Dauer der Kalziumsparks bestimmt. In den Herzmuskelzellen mit CaMKIIδ<sub>c</sub> Überexpression (20,92 ±0,81 ms, n=197) fand sich eine gegenüber FKBP<sup>D37S</sup> (16,62 ±0,78 ms, n=86) und gegenüber den doppeltransgenen Zellen (16,73 ±1,26 ms, n=52) signifikant verlängerte RT 50%. Der Unterschied zwischen den Wildtypzellen (17,48 ±1,35 ms, n=45) und den Zellen mit Überexpression der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II lag mit P=0,06 geringfügig oberhalb des festgelegten Signifikanzniveaus. Bei der Sparkdauer fanden sich dagegen keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 3.7).



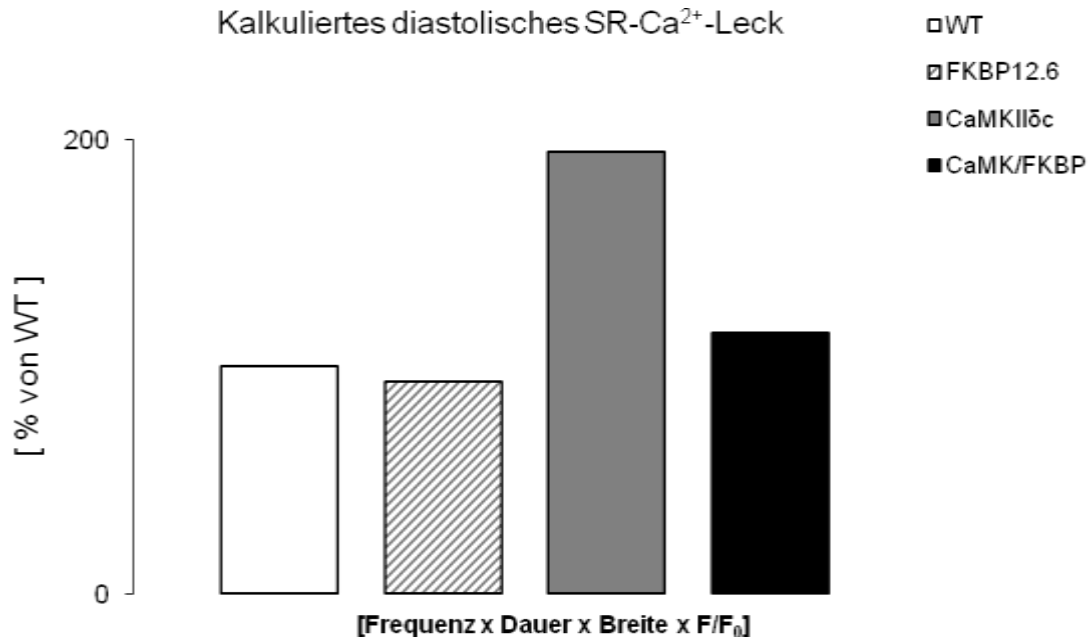
**Abbildung 3.7: Rückgangszeit 50% und Sparkdauer in Abhängigkeit vom Genotyp.** # signifikant verschieden gegenüber FKBP<sup>D37S</sup>, § signifikant verschieden gegenüber CaMKIIδc. Anzahlen: Wildtyp n=45 für RT 50% und n=43 für Sparkdauer, FKBP<sup>D37S</sup> n=86 und n=78, CaMKII n=197 bzw. 188, CaMK/FKBP<sup>D37S</sup> n=52 bzw. n=49.

Ferner wurde die Breite der Kalziumsparks vermessen und ausgewertet. Dafür wurde die Breite jeweils an der Stelle der maximalen Sparkausdehnung bestimmt. Die Herzmuskelzellen von CaMKII-transgenen Mäusen wiesen signifikant breitere Kalziumsparks ( $2,48 \pm 0,05 \mu\text{m}$ , n=131) auf, als Wildtyp- ( $2,06 \pm 0,07 \mu\text{m}$ , n=32) und FKBP<sup>D37S</sup>-transgene ( $2,06 \pm 0,09 \mu\text{m}$ , n=34) Kardiomyozyten. Die Sparkbreite in den Zellen mit doppeltransgener Überexpression ( $2,35 \pm 0,08 \mu\text{m}$ , n=46) war ebenfalls gegenüber Wildtyp und gegenüber FKBP12.6 signifikant erhöht (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: Sparkbreite in Abhängigkeit vom Genotyp.** \* signifikant verschieden gegenüber Wildtyp, # signifikant verschieden gegenüber FKBP12.6<sup>D37S</sup>.

Der diastolische Kalziumverlust aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum wurde durch Multiplikation der Mittelwerte der Parameter Sparkfrequenz [ $*100/\mu\text{m/s}$ ], Amplitude  $F/F_0$ , Sparkdauer [ms] sowie Sparkbreite [ $\mu\text{m}$ ] abgeschätzt und zur besseren Veranschaulichung auf den errechneten Wildtypwert normalisiert. Das so kalkulierte SR Kalziumleck ermöglicht somit keine Signifikanztestungen und verfügt über keinen Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Zwischen Wildtypzellen und Zellen mit FKBP12.6<sup>D37S</sup> Überexpression fanden sich keine Unterschiede. In den Kardiomyozyten mit Überexpression der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II war das errechnete diastolische SR Kalzium Leck mit 197% des Wildtyp-Wertes deutlich erhöht. Durch simultane Überexpression von FKBP12.6<sup>D37S</sup> konnte dieses Leck deutlich reduziert werden, erreichte mit 120% allerdings nicht ganz den Wildtypkontrollwert (siehe Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9: Kalkuliertes diastolisches Kalziumleck aus dem SR.**

Alle Werte sind in Prozent vom Wildtypwert angegeben. Das diastolische Kalziumleck ergibt sich aus der Ereignishäufigkeit und der Menge an freigesetztem Kalzium pro Freisetzungseignis. Letztere wird durch das Integral der Sparktransienten determiniert. Die Bestimmung des Integrals ist jedoch unpraktikabel, da sich die Fluoreszenzkurve des Sparks nicht nur als Amplitude über die Zeit darstellen lässt, sondern zusätzlich von der (variablen) Sparkbreite als dritte Dimension abhängig ist. Daher wurde hier, um dennoch zumindest eine Abschätzung des diastolischen Kalziumverlustes aus dem SR zu erhalten, eine simple Multiplikation der Einzelfaktoren vorgenommen. Der beschriebene schätzende Charakter der Kalkulation lässt deshalb lediglich Rückschlüsse bei größeren Unterschieden zu.

### 3.2.2 Der SR-Kalzium-Gehalt

Da in den vier Untersuchungsgruppen Unterschiede in Frequenz und Charakteristik der Kalziumsparks gefunden wurden (siehe Abschnitt 3.2.1), wurde in einem nächsten Schritt geprüft, ob dies auch mit Veränderungen im Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums einhergeht. Um diesen zu bestimmen wurden Messungen mit einer Koffeinlösung durchgeführt wie im Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben. Die Amplitude der koffeininduzierten Transienten gilt dann als Maß für den SR-Kalziumgehalt. In den Kardiomyozyten die die CaMKII $\delta$ c überexprimierten fand sich eine signifikante Reduktion des SR-Kalziumgehaltes ( $196,2 \pm 17,2$  mmol/l, n=36) gegenüber der Wildtypgruppe ( $555,9 \pm 59,8$  mmol/l, n=16) und gegenüber der FKBP12.6<sup>D37S</sup>-überexprimierenden Gruppe ( $755,9 \pm 75,2$  mmol/l, n=32). Obwohl FKBP12.6<sup>D37S</sup> alleine eine signifikante Erhöhung des SR-Kalziumgehaltes gegenüber



Wildtyp bewirkt hat, verfehlte der Unterschied zwischen den CaMKII $\delta_c$  überexprimierenden und den doppeltransgenen Zellen ( $247,5 \pm 21,5$  nmol/l, n=21) knapp das Signifikanzniveau ( $P=0,07$ ). Abbildung 3.10 zeigt beispielhaft Originaltransienten der vier Untersuchungsgruppen nach Koffeinapplikation. In Abbildung 3.11 sind die Mittelwerte der koffeininduzierten Transienten zusammengefasst.

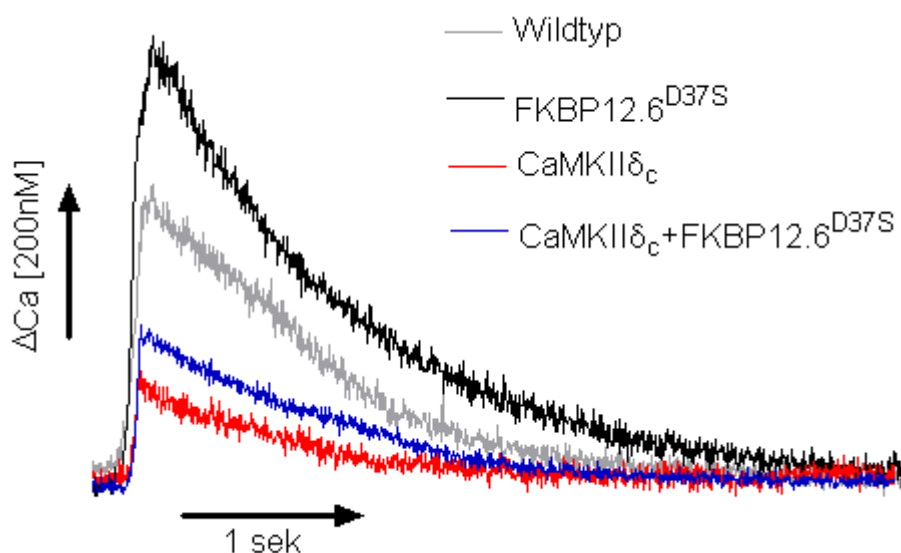


Abbildung 3.10: Beispielhafte Originalregistrierungen der koffeininduzierten Transienten.

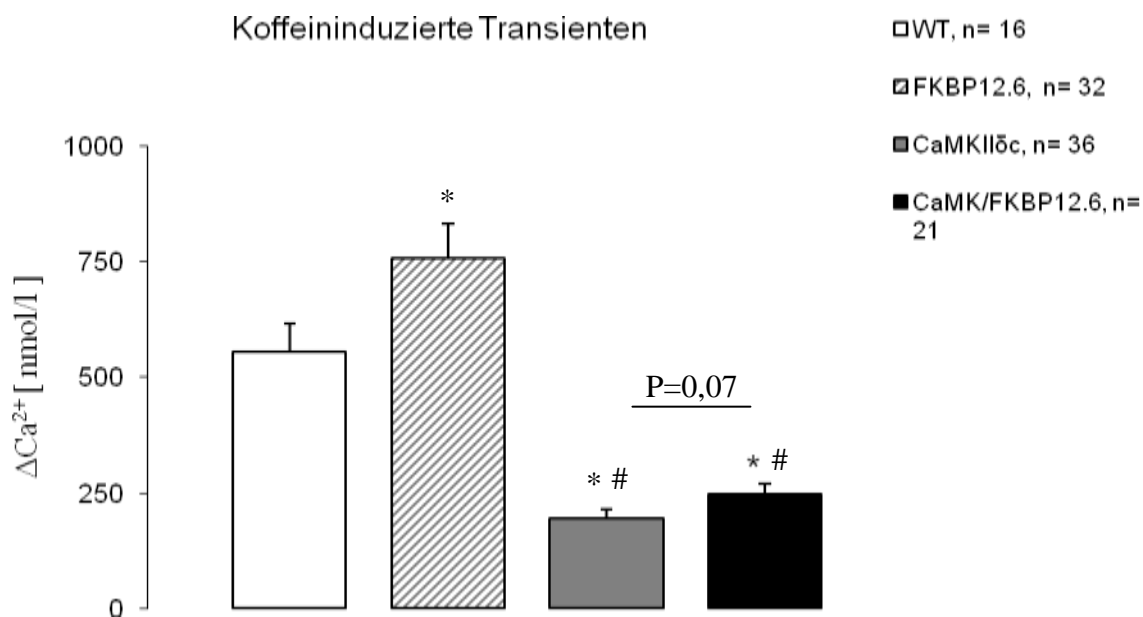
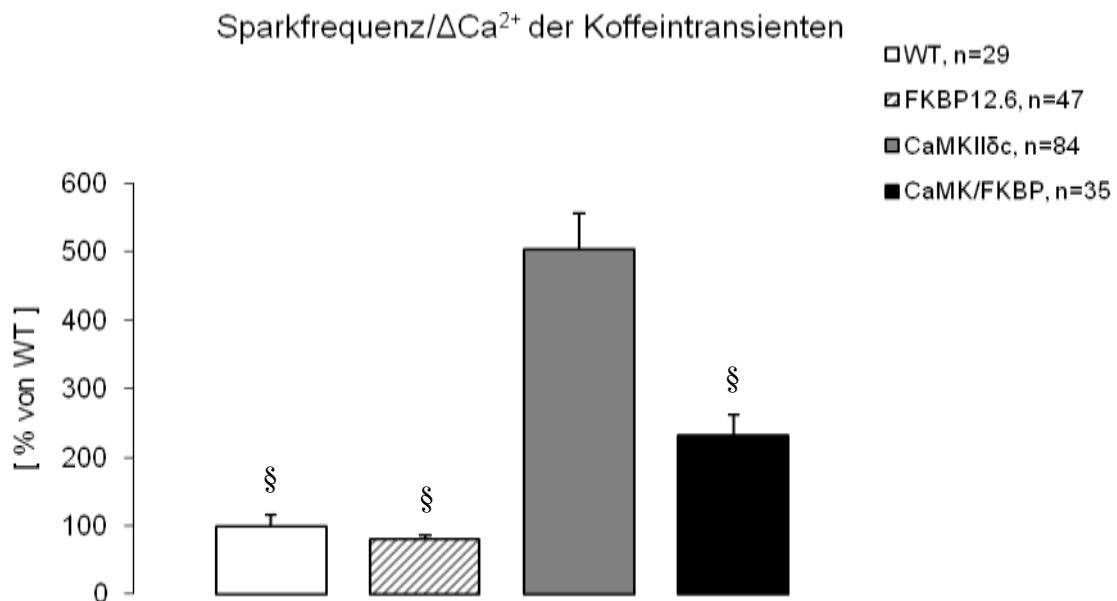


Abbildung 3.11: Kalziumtransienten nach Koffeinapplikation. \* signifikant verschieden gegenüber Wildtyp, # signifikant verschieden gegenüber FKBP12.6<sup>D37S</sup>.

Da eine Erhöhung des SR-Kalziumgehaltes per se mit einer Zunahme der Frequenz diastolischer Kalziumfreisetzungseignisse einhergeht, wurde in einem weiteren Schritt die Sparkfrequenz pro  $\mu\text{mol/l}$  SR-Kalzium berechnet. Der Sparkfrequenz in der Wildtypgruppe wurde anschließend der Wert „100%“ zugeteilt und dann die relative Sparkfrequenz der anderen Gruppen berechnet (siehe Abbildung 3.12). Die hier dargestellte Sparkfrequenz ist somit unabhängig vom SR-Kalziumgehalt, der ja in den verschiedenen Gruppen unterschiedlich ist (vgl. Abschnitt 3.2.2) und beruht somit auf direkten Einflüssen der überexprimierten Proteine (und zum Beispiel Phosphorylierungsmuster des Ryandinsrezeptors). Wie aus der Abbildung hervorgeht ist die Sparkfrequenz pro  $\mu\text{mol/l}$  SR-Kalzium in der CaMKII $\delta_c$ -Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöht. Die doppeltransgenen Zellen nehmen eine Mittelstellung ein zwischen Wildtyp- bzw. FKBP12.6-transgenen Zellen und Zellen der CaMKII-Gruppe.



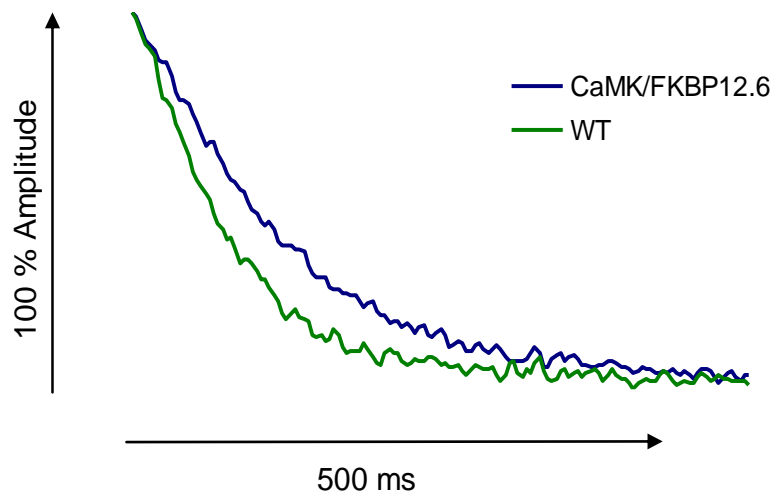
**Abbildung 3.12: Sparkfrequenz pro  $\mu\text{mol/l}$  SR-Kalzium.**

Werte in Prozent des Wildtypwertes angegeben. § signifikant verschieden gegenüber CaMKII $\delta_c$ .

### 3.2.3 Die Funktion der SR-Kalzium-ATPase (SERCA)

Um die in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Befunde im SR-Kalzium-Gehalt in den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen besser nachvollziehen zu können, wurde auch die

Kalziumwiederaufnahme in das SR untersucht. Dafür wurden die Rückgangsparameter der Kalziumtransienten (RT 50%, RT 80%, RT 90%,  $\tau$ ) ausgewertet um so auf die Funktion der SR-Kalzium-ATPase rückzuschließen (für Erläuterungen siehe Abschnitt 2.2.3.2). Abbildung 3.13 zeigt beispielhafte Transientenrückgänge.

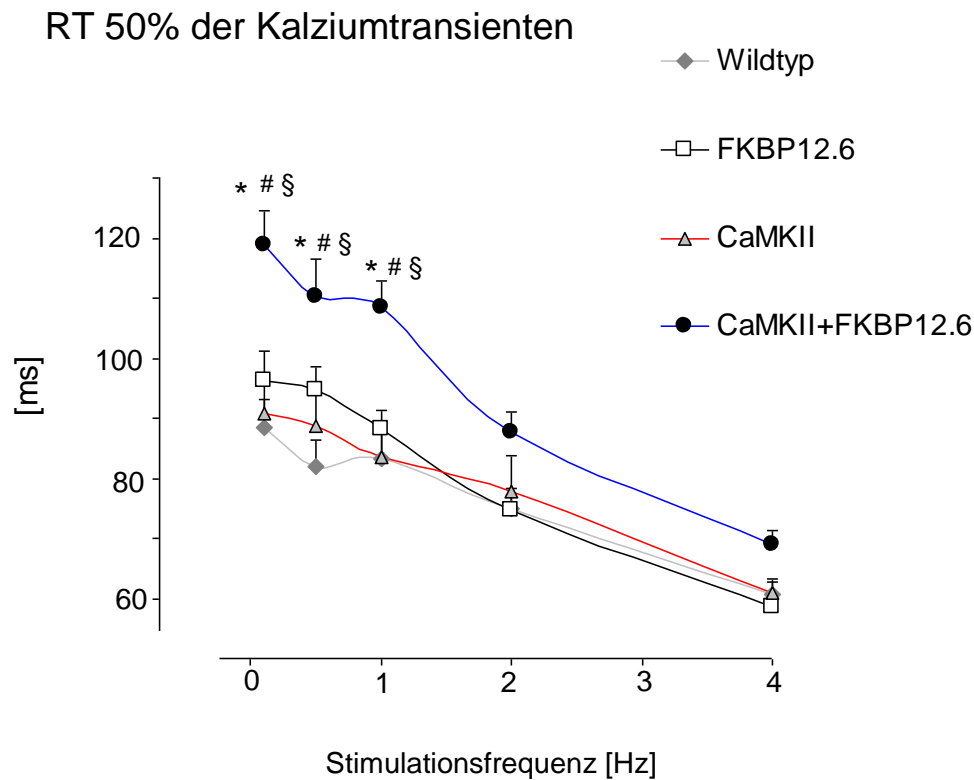


**Abbildung 3.13: Beispielhafter Rückgangsverlauf von Kalziumtransienten.**

Dargestellt sind zwei typische Transientenrückgangsverläufe von einer Zelle, die simultan die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase  $II\delta_c$  und  $FKBP^{D37S}$  überexprimiert und einer Wildtypzelle zum Vergleich. Zur Darstellung wurden zunächst die Fluoreszenzintensitätswerte im Zeitverlauf unter 1 Hz Stimulation aus Ion Wizard 4.0 exportiert. Diese Werte wurden in Kalziumamplituden umgerechnet (vgl. Abschnitt 2.2.3.2). Anschließend wurde durch Subtraktion der jeweiligen Baseline rechnerisch die Baseline für beide Graphen gleich hoch gesetzt. Im nächsten Schritt wurden die Kurven durch Mittelung von jeweils zwei aufeinanderfolgenden Werten einmal geglättet. Der Peakwert der beiden Kurven wurde jeweils 100% gesetzt und als Kurvenstart definiert. In den doppeltransgenen Zellen erfolgt der Transientenrückgang deutlich flacher: während die Kurve bei den Wildtypkardiomyozyten bereits nach zirka 80 ms auf die Hälfte abgefallen ist, benötigt die Kurve der doppeltransgenen Zellen dafür fast 110 ms.

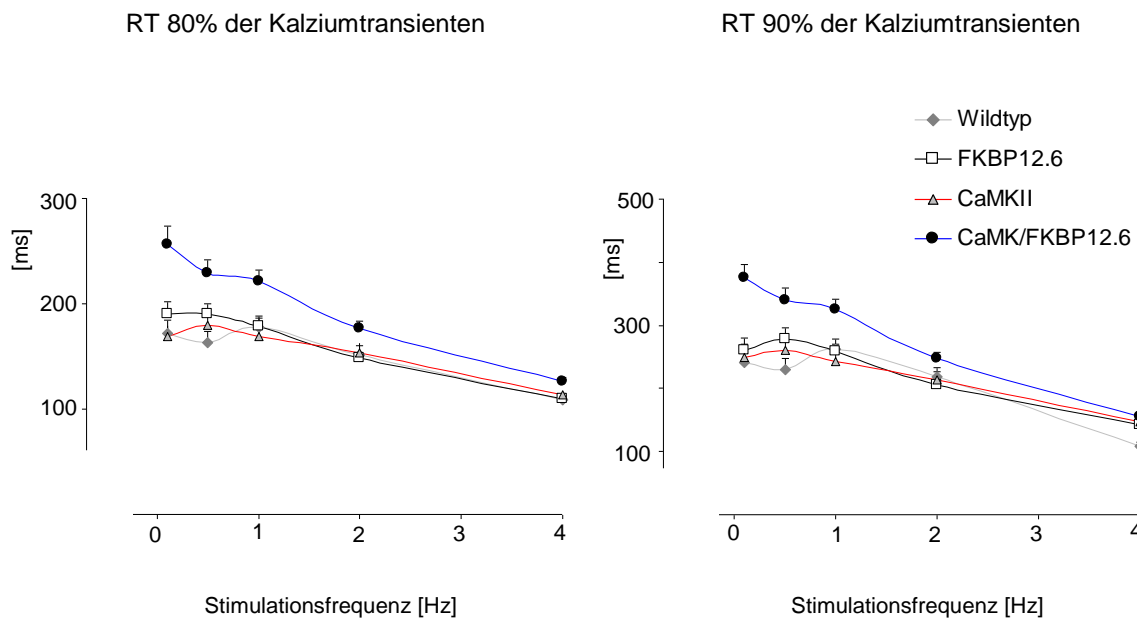
Wie Abbildung 3.14 zeigt nimmt die Rückgangszeit in allen Gruppen mit steigender Stimulationsfrequenz ab. Im Zwei-Wege-ANOVA liegen die Kurvenverläufe von RT 50%, RT 80% und RT 90% der Zellen, die die Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase  $II\delta_c$  und  $FKBP12.6^{D37S}$  simultan überexprimieren, signifikant über denen der anderen Gruppen (siehe Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15). Dies gilt gleichermaßen für die Abfallskonstante  $\tau$  (siehe Abbildung 3.16). Im Vergleich der Gruppen für jede einzelne Stimulationsfrequenz mittels Bonferroni Post Test erreichen die Unterschiede zwischen doppeltransgenen Zellen

und den Kardiomyozyten der anderen Gruppen bei niedrigeren Stimulationsfrequenzen (0,1 bis 1 Hz) ebenfalls Signifikanzniveau (Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14: RT 50% der Kalziumtransienten.**

Bei allen untersuchten Stimulationsfrequenzen liegt die RT 50% der Zellen, die simultan CaMKII $\delta_c$  und FKBP12.6<sup>D37S</sup> überexprimieren, oberhalb der anderen Gruppen. Im Zwei-Wege-ANOVA ist der Kurvenverlauf signifikant ( $P < 0,01$ ) höher als in den anderen Gruppen und auch im Vergleich der RT 50%-Werte für die unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen mittels Bonferroni-Post-Test erreichen die Unterschiede zwischen doppeltransgenen Zellen und den anderen Genotypen bei niedrigen Stimulationsfrequenzen Signifikanzniveau. \* signifikant gegenüber WT, # signifikant gegenüber FKBP<sup>D37S</sup>, § signifikant gegenüber CaMKII $\delta_c$ . Die Anzahlen ausgewerteter Zellen schwanken in Abhängigkeit von Genotyp und Stimulationsfrequenz zwischen 23 und 63. Beispielhaft für 1 Hz Stimulation: WT  $n=27$ , FKBP12.6<sup>D37S</sup>  $n=63$ , CaMKII $\delta_c$   $n=32$ , CaMK/FKBP12.6  $n=34$ . Man beachte: y-Achse startet bei 50 ms.



**Abbildung 3.15: RT 80% und RT 90% der Kalziumtransienten.**

Dargestellt sind die Rückgangszeit 80% und 90% der Kalziumtransienten bei steigenden Stimulationsfrequenzen in Abhängigkeit vom Genotyp. Im Zwei-Wege-ANOVA liegen sowohl die RT 80% Kurve, als auch die RT 90% Kurve der CaMK/FKBP12.6 Gruppe signifikant ( $P < 0,01$ ) über denen der anderen Gruppen.

Vergleicht man die Werte der einzelnen Gruppen für jeweils eine gleiche Stimulationsfrequenz und ein und denselben Rückgangssparameter mit den entsprechenden Werten der  $\text{CaMKII}\delta_c + \text{FKBP12.6}^{\text{D37S}}$  transgenen Zellen mittels eines zweiseitigen ungepaarten T-Tests mit Welch-Korrektur, so sind auch diese in den meisten Fällen signifikant (beispielhaft dargestellt ist der Rückgangssparameter  $\tau$  für die Stimulationsfrequenz 1 Hz in Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16: tau-Werte der Kalziumtransienten bei 1 Hz.**

\* signifikant gegenüber WT, # signifikant gegenüber FKBP12.6<sup>D37S</sup>, § signifikant gegenüber CaMKIIδc.

Zusätzlich zu den Rückgangparametern der Kalziumtransienten wurden auch die Relaxationsparameter Relaxationsparameter der Zellverkürzungen ausgewertet. In guter Übereinstimmung zu den vorgenannten Ergebnissen zeigten sich auch hier signifikant höhere Relaxationsparameter in den doppeltransgenen Zellen gegenüber allen anderen Genotypen. Dies ist beispielhaft in

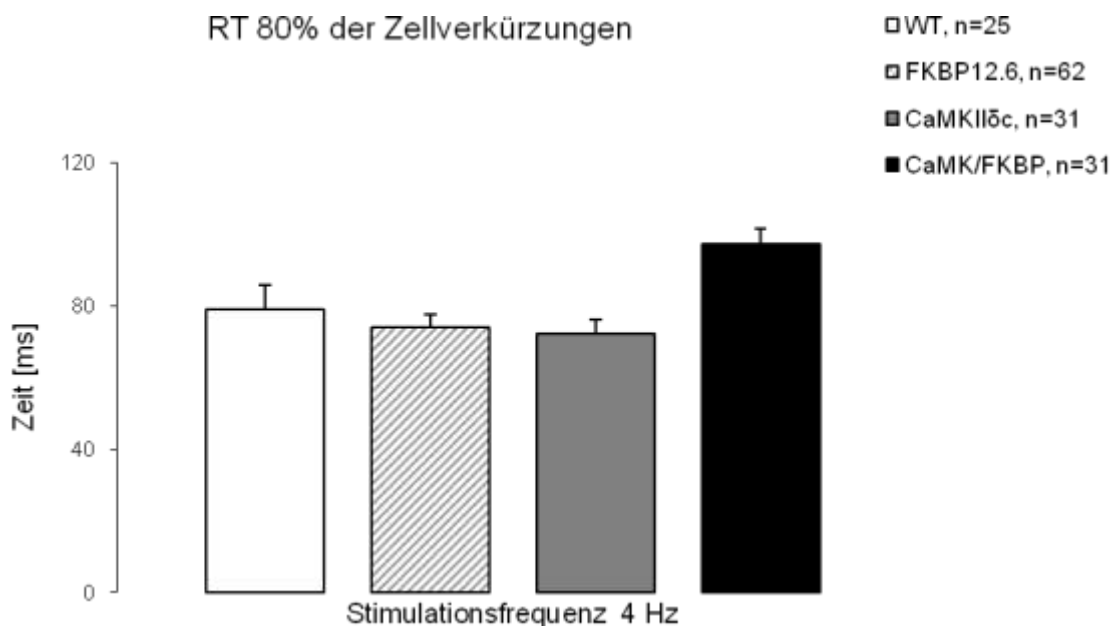
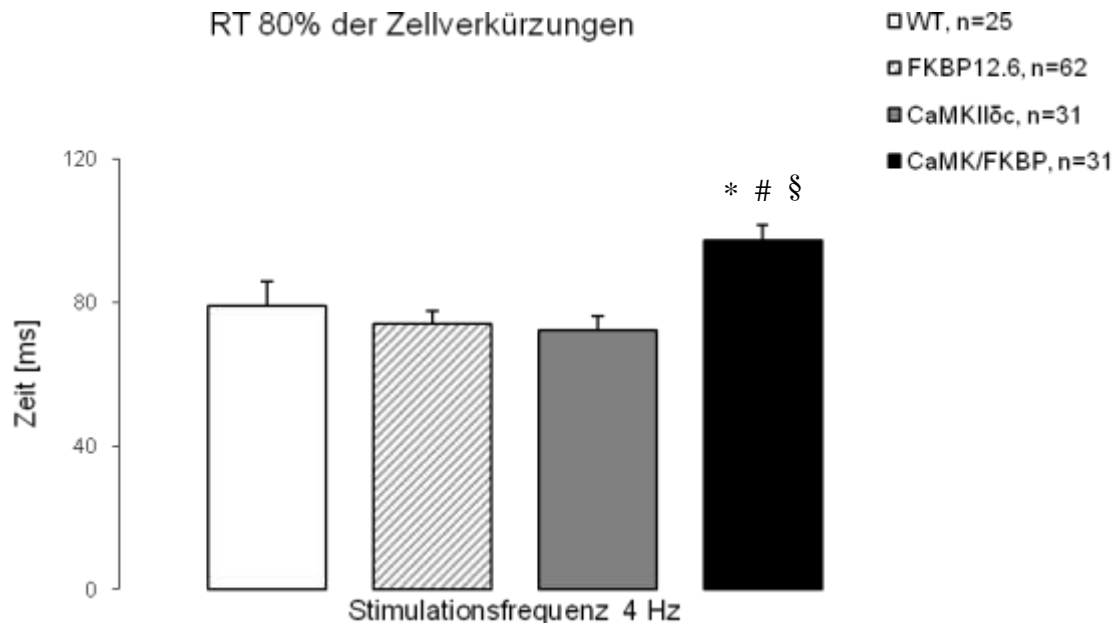


Abbildung 3.17 für die Relaxationszeit 80% bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hertz mit entsprechenden unpaarigen T-Tests dargestellt.

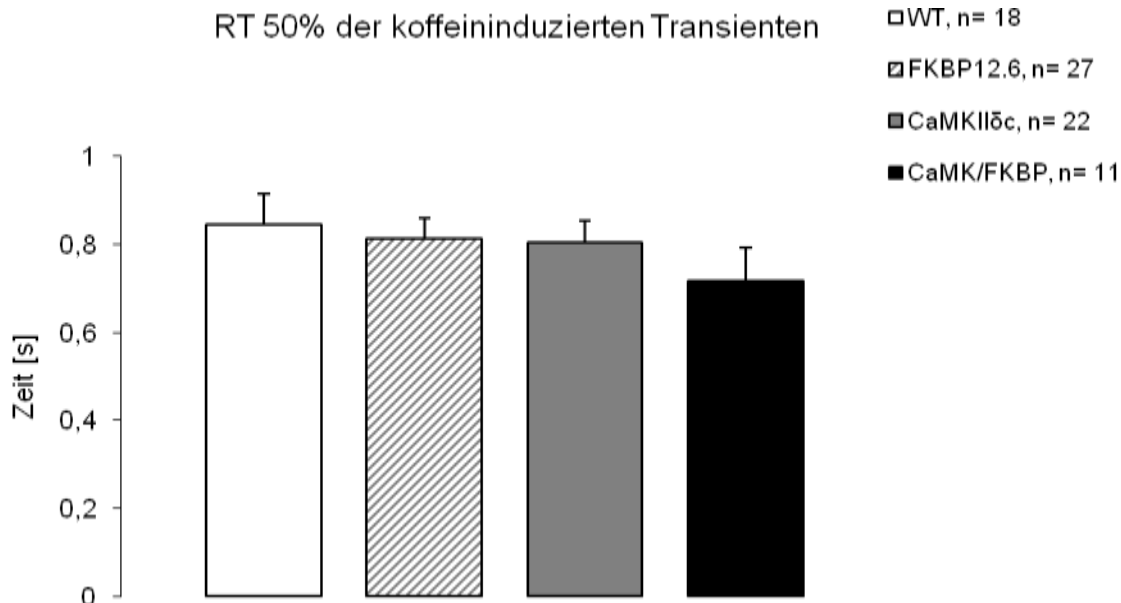


**Abbildung 3.17: Relaxationszeit 80% der stimulierten Zellverkürzungen.**

\* signifikant verschieden gegenüber WT, # signifikant verschieden gegenüber FKBP12.6<sup>D37S</sup>, § signifikant verschieden gegenüber CaMKIIδ<sub>c</sub>.

### 3.2.4 Die Aktivität des Natrium-Kalzium-Austauschers (NCX)

Um die Funktion des Natrium-Kalzium-Austauschers abzuschätzen wurde die Rückgangszeit der koffeininduzierten Transienten ausgewertet (für Erläuterungen siehe Abschnitt 2.2.3.2). Im Gegensatz zu den Auswertungen zur Abschätzung der Aktivität der SR Kalzium ATPase (Abschnitt 3.2.3) wurde hierbei lediglich die RT 50% verwendet und auf andere Rückgangsparameter (RT 80%, RT 90%) bewusst verzichtet, da diese anfälliger für Artefakte durch Hintergrundrauschen sind. Dies spielt, anders als bei den koffeininduzierten Transienten, bei den feldstimulierten (Normal-)transienten keine große Rolle, da hier die erreichten Endzahlen so hoch sind, dass sich potentielle Artefakte ausgleichen. Wie in Abbildung 3.18 dargestellt zeigten die RT 50% der koffeininduzierten Transienten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen. Lediglich in der Gruppe der doppeltransgenen Kardiomyozyten bestand eine Tendenz zu niedrigeren Rückgangswerten.



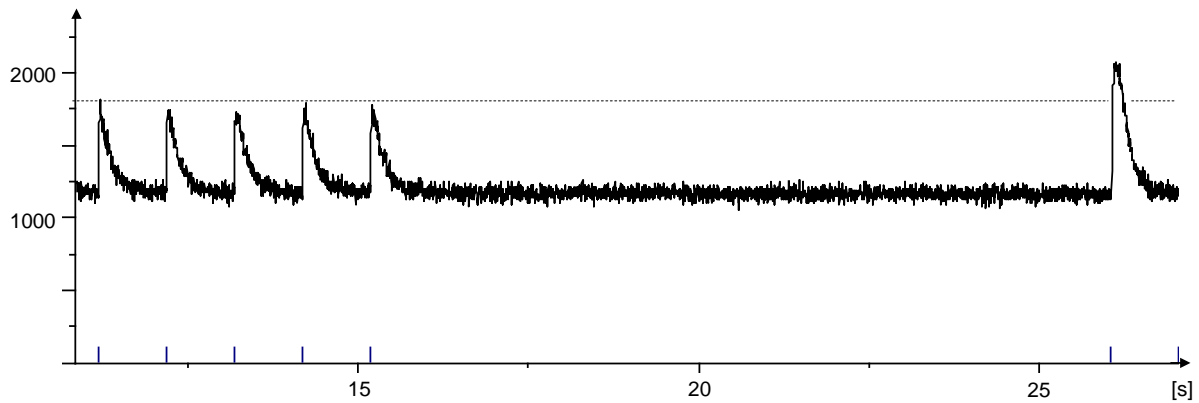
**Abbildung 3.18: RT 50% der koffeininduzierten Transienten.**

Zwischen den Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

### 3.2.5 Die Post-Pausen-Beziehung der Kardiomyozyten: dynamische Änderungen des SR-Kalziumgehaltes

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Änderungen der Kalziumtransienten nach Stimulationspause (Post-Pausen-Beziehung) in allen vier Gruppen untersucht. Dafür wurden die Kardiomyozyten mit einem Hertz stimuliert bis Gleichgewichtsbedingungen erreicht waren und anschließend die Stimulation für zehn bzw. dreißig Sekunden gestoppt. Nach Wiederanschalten der Stimulation wurden der erste Kalziumtransient registriert und die prozentualen Veränderungen zu den Transienten vor der Pause errechnet. Abbildung 3.19 zeigt eine beispielhafte Originalregistrierung mit zehn Sekunden Pausenintervall. In allen untersuchten Gruppen traten typischerweise positive Post-Pausen-Beziehungen auf, das heißt, der erste Transient nach Stimulationspause fiel höher aus als die Gleichgewichtstransienten vor der Pause.

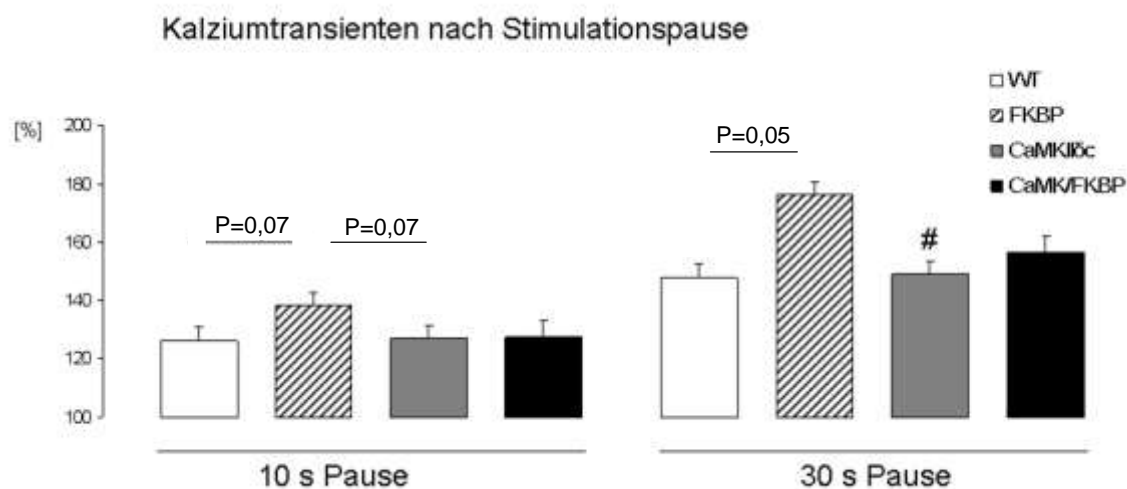




**Abbildung 3.19: Originalregistrierung zur Untersuchung der Post-Pausen-Beziehung.**

Zu sehen sind 5 Transienten, die durch Feldstimulation bei einem Hertz ausgelöst wurden. Zuvor wurde die Stimulation bereits solange durchgeführt, dass Gleichgewichtsbedingungen erreicht wurden. Anschließend wird die Stimulation für zirka zehn Sekunden gestoppt und dann der erste Transient nach Wiedereinschalten registriert und ausgewertet.

Abbildung 3.20 fasst die Mittelwerte der Amplitudenzunahmen nach einer Pause zusammen: In den D37S-transgenen Kardiomyozyten zeigte sich, nach zehn Sekunden Stimulationsstopp, eine Tendenz zu höheren Amplitudenzunahmen, die das Signifikanzniveau jedoch knapp verfehlte. Nach dreißig Sekunden Pause fiel die Amplitudenzunahme signifikant höher aus, als in den Zellen mit CaMKII $\delta_c$ -Überexpression. Der Unterschied zwischen den FKBP<sup>D37S</sup> exprimierenden Kardiomyozyten und Wildtypzellen lag nach dreißig Sekunden Pause auf der Signifikanzgrenze ( $P=0,05$ ). Der Unterschied zwischen den doppeltransgenen Herzmuskelzellen und alleiniger FKBP<sup>D37S</sup>-(Über)expression erreichte kein Signifikanzniveau ( $P=0,15$  nach dreißig Sekunden Pause).



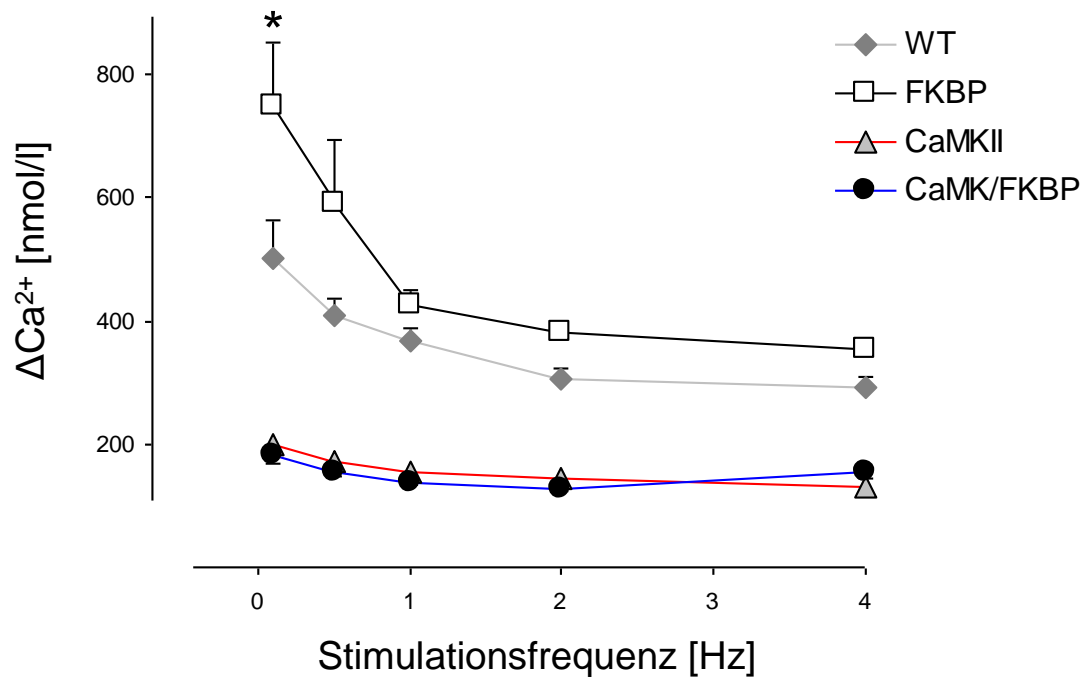
**Abbildung 3.20: Kalziumtransienten nach Stimulationspause.** # signifikant verschieden gegenüber FKBP12.6<sup>D37S</sup>. Anzahlen: Wildtyp: 25 und 24, FKBP<sup>D37S</sup> 58 und 52, CaMKII $\delta_c$  34 und 32, CaMK/FKBP<sup>D37S</sup> 31 und 29 Zellen (Angaben jeweils für Versuche mit 10 und 30 Sekunden Pausendauer).

### 3.2.6 Die Kraft-Frequenz-Beziehung, intrazelluläre Kalziumtransienten und Kontraktilität

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede die beim SR-Kalziumgehalt gefunden wurden auch mit Veränderungen der Kontraktilität und der Kalziumtransienten einhergehen, wurden nachfolgend Kardiomyozyten, wie im Absatz 2.2.3.2 erläutert, mit aufsteigender Frequenz stimuliert. Dabei zeigte sich in allen Untersuchungsgruppen eine Abnahme der Amplituden der Kalziumtransienten (siehe Abbildung 3.21). Bei allen Stimulationsfrequenzen zeigten die FKBP12.6<sup>D37S</sup>-transgenen Myozyten höhere Transientenamplituden, als die Herzmuskelzellen der anderen Gruppen. Im Zwei-Wege-ANOVA war dieser Unterschied signifikant gegenüber den Zellen der anderen Genotypen. Im Vergleich der Gruppen bei einzelnen Stimulationsfrequenzen mittels Bonferroni Post Test bestand zwischen den Kalziumtransienten der FKBP<sup>D37S</sup> transgenen Kardiomyozyten und Wildtyp nur bei sehr langsamer Stimulationsfrequenz (0,1 Hz) ein signifikanter Unterschied, wohingegen der Unterschied zu den beiden anderen Gruppen bei jeder der untersuchten Frequenzen signifikant war. Auch die Kraft-Frequenz-Kurve der Wildtypkardiomyozyten lag im Zwei-Wege-ANOVA signifikant oberhalb der CaMKII- und der doppeltransgenen Zellen. Diese

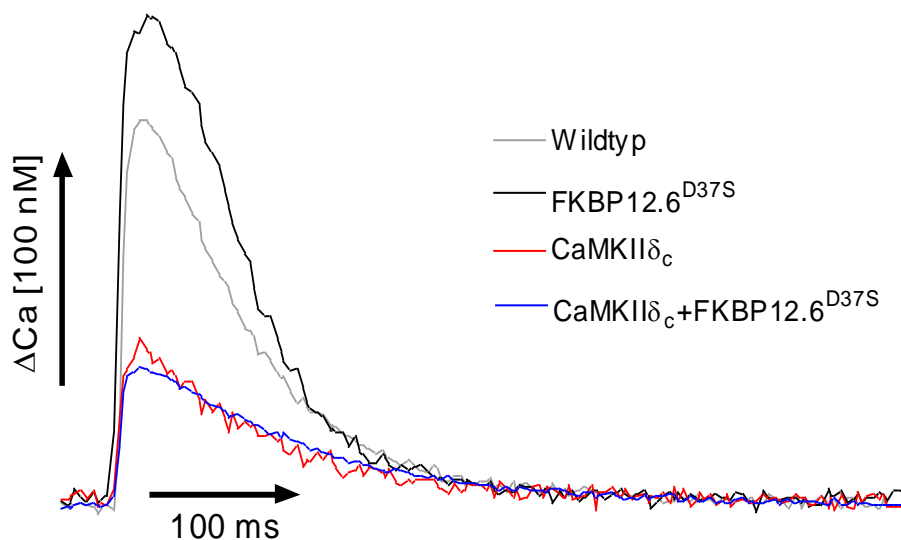
beiden Gruppen wiesen untereinander im Zwei-Wege-ANOVA keinen Unterschied in den Amplituden der Kalziumtransienten auf.

### Kraft-Frequenz-Beziehung: Kalziumtransienten



**Abbildung 3.21: Kraft-Frequenz-Beziehung: Kalziumtransientenamplituden.** \*im Bonferroni Post Test signifikant unterschiedlich von Wildtyp. Ferner liegen die Kalziumtransientenamplituden der Wildtypzellen sowie die Kalziumtransienten der FKBP12.6<sup>D37S</sup> exprimierenden Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ) über denen der CaMKII $\delta_c$ -Gruppe sowie denen der doppeltransgenen Zellen. Die Anzahl der untersuchten Zellen schwankt in Abhängigkeit von Genotyp und Stimulationsfrequenz zwischen 23 und 63. Beispielhaft für ein Hertz: WT  $n=27$ , FKBP12.6<sup>D37S</sup>  $n=63$ , CaMKII $\delta_c$   $n=35$ , CaMKII $\delta_c$ +FKBP12.6<sup>D37S</sup>  $n=34$ .

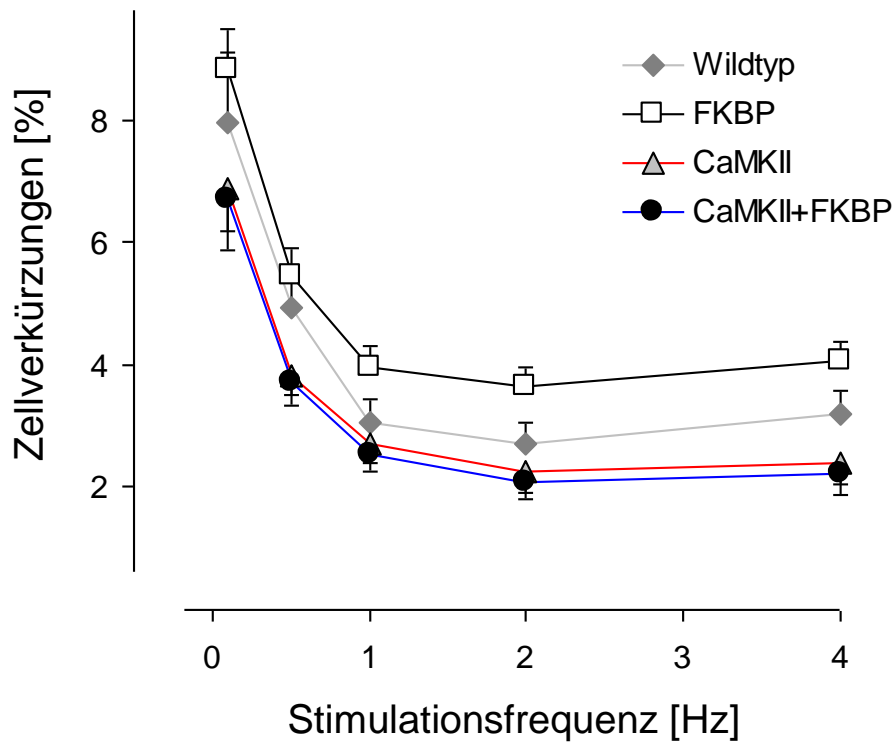
Abbildung 3.22 zeigt beispielhafte Originalregistrierungen der Kalziumtransienten, die bei einer Stimulationsfrequenz von einem Hertz aufgezeichnet wurden.



**Abbildung 3.22: Originalregistrierungen von Kalziumtransienten.** Stimulationsfrequenz ein Hertz. Die Transienten wurden so übereinander gelegt, dass die Baseline auf gleicher Höhe liegt und der Aufstich zur gleichen Zeit erfolgt.

Ähnliche Resultate wie bei den Kalziumtransienten fanden sich auch bei der Untersuchung der Zellverkürzungen unter steigenden Stimulationsfrequenzen. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Herzmuskelzellen die entweder nur die CaMKII $\delta_c$ , oder die CaMKII $\delta_c$  und simultan FKBP12.6<sup>D37S</sup> überexprimierten. Im Zwei-Wege-ANOVA lagen die Kontraktionsstärken dieser Gruppen sowohl signifikant unter denen der Wildtypzellen als auch der FKBP12.6<sup>D37S</sup>-Zellen. Letztere zeigten im Zwei-Wege-ANOVA wiederum signifikant stärkere prozentuale Verkürzungen als Wildtypkardiomyozyten (siehe Abbildung 3.23).

## Kraft-Frequenz-Beziehung: Zellverkürzungen

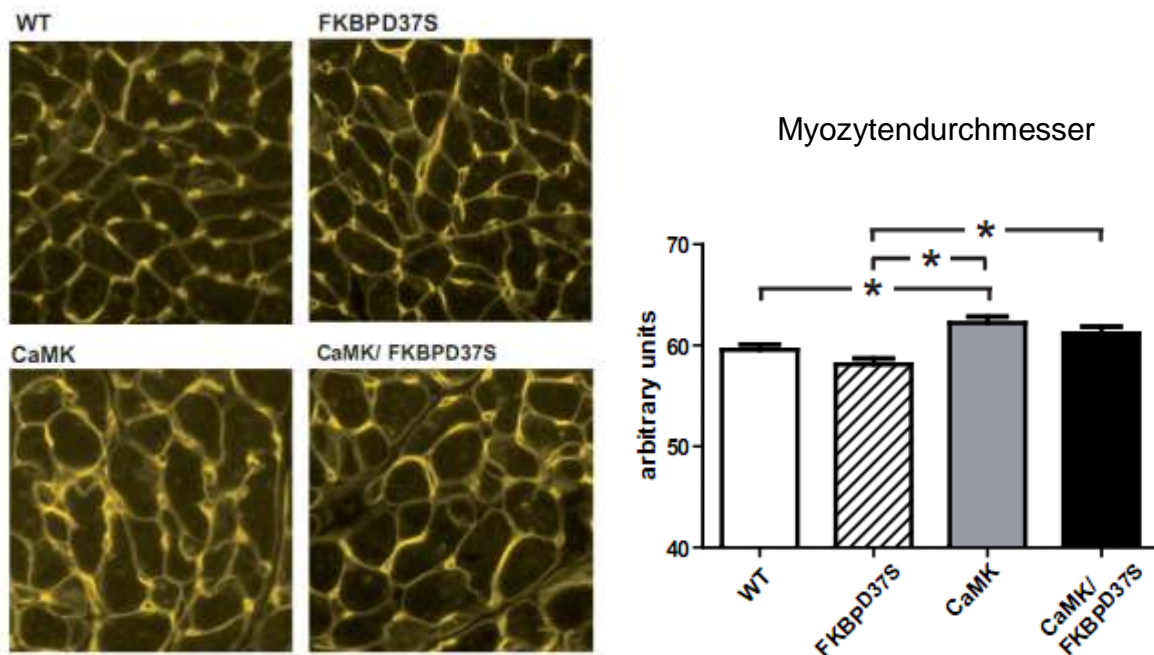


**Abbildung 3.23: Kraft-Frequenz-Beziehung: Zellverkürzungen.** Im Zwei-Wege-ANOVA zeigen sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen FKBP12.6 und WT, FKBP12.6 und CaMKII $\delta$ c sowie FKBP12.6 und CaMKII $\delta$ c+FKBP12.6. Außerdem ergibt der Zwei-Wege-ANOVA auch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen Wildtyp und den anderen Gruppen. Anzahlen je nach Frequenz und Genotyp zwischen 27 und 63. Beispielhaft für ein Hertz: WT  $n=38$ , FKBP12.6  $n=63$ , CaMKII $\delta$ c  $n=41$ , CaMKII $\delta$ c+FKBP12.6  $n=32$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Herzphänotypischer Einfluss von CaMKII $\delta_c$ und FKBP12.6<sup>D37S</sup>

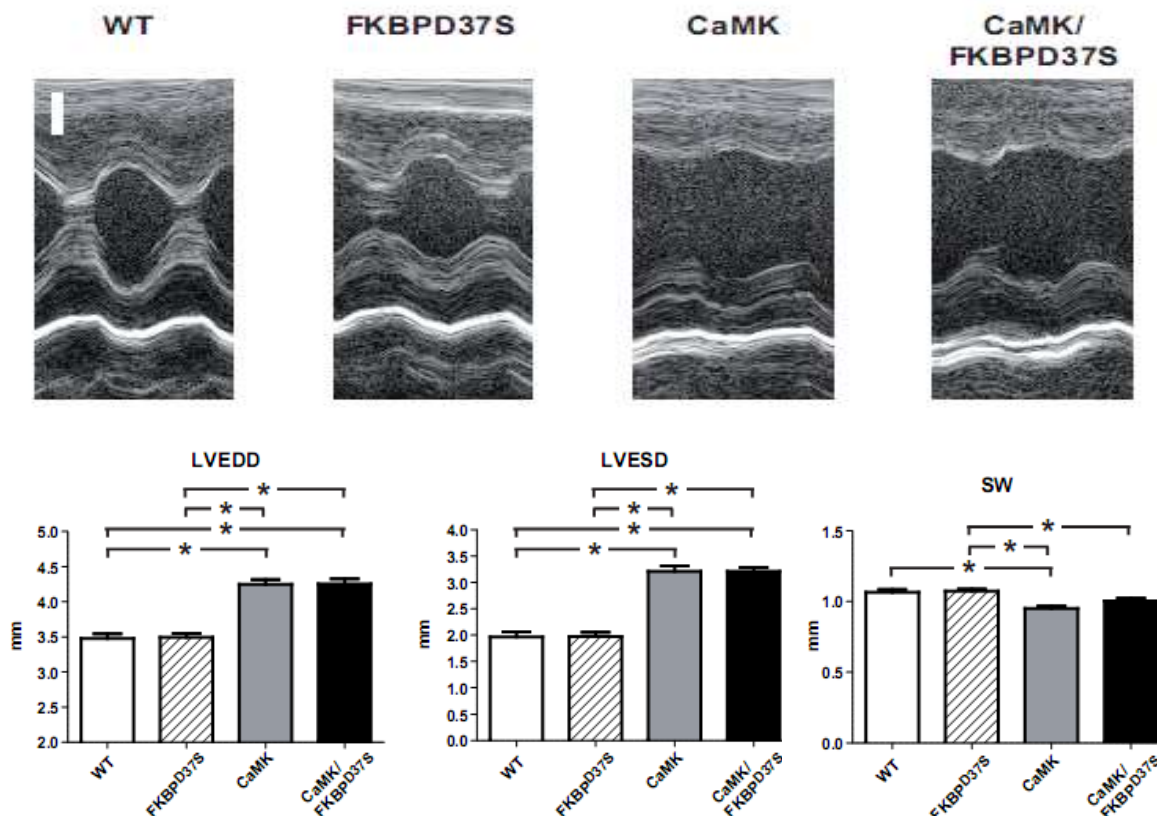
Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht in den Mäusen ermittelt. Eine Erhöhung dieses Verhältnisses kann als Hinweis auf eine Herzhypertrophie angesehen werden. Eine signifikante Erhöhung trat in den Tieren auf, die die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II $\delta_c$  überexprimierten. Dieser Befund ist so in der Literatur vorbeschrieben (Maier et al. 2003) und fiel daher erwartungsgemäß aus. FKBP12.6<sup>D37S</sup>-Expression alleine hatte keinen Einfluss auf die Ratio von Herz- zu Körpergewicht. Eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit war nun, ob durch Überexpression der Calstabin2-Mutante FKBP12.6<sup>D37S</sup> eine Herzhypertrophie bei gleichzeitiger CaMKII $\delta_c$  Überexpression verhindert werden kann. Dies gelang jedoch nicht (vgl. Abschnitt 3.1, Abbildung 3.2). In weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden histologische Schnitte der Herzen aller vier verwendeten Genotypen angefertigt, mit TRITC-markierten Wheat Germ Agglutinin gefärbt und der Myozytendurchmesser bestimmt. In guter Analogie zu den vorgenannten Ergebnissen des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht fand sich hierbei eine signifikante Vergrößerung des Myozytendurchmessers in der CaMKII $\delta_c$ -Gruppe im Vergleich zu Wildtyp, die wiederum nicht durch gleichzeitige FKBP<sup>D37S</sup>-Expression verbessert werden konnte (Seidler et al. 2011; siehe Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Histologie und Myozytendurchmesser in Abhängigkeit vom Genotyp.**

Links Zellverbände nach Färbung mit TRITC-markiertem Wheat Germ Agglutinin zur Darstellung der Zellmembranen. Rechts ausgewertete mittlere Myozytendurchmesser. (Aus Seidler et al. 2011, S. 37)

Weiterhin wurden morphologische Veränderungen *in vivo* mittels Echokardiographie untersucht. Dabei konnte kein Einfluss von FKBP<sup>D37S</sup> alleine nachgewiesen werden, während alleinige Überexpression der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II zu einer Erhöhung des Enddiastolischen sowie des Endsystolischen Linksventrikulären Durchmessers (LVEDD bzw. LVESD) und zu einer Verringerung der Septumdicke im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie führte. Diese Effekte waren wiederum nicht durch gleichzeitige Überexpression der Calstabin2-Mutante rückführbar (Seidler et al. 2011; siehe Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2: Echokardiographische Untersuchung der vier Genotypen.**

Oben: Echokardiographische Originalregistrierungen im M-Modus in parasternal langer Achse. Darauf zu sehen: vergrößerter enddiastolischer und endsystolischer Durchmesser sowie reduzierte Wanddicke in CaMK und CaMK/FKBP $\Delta$ 37S transgenen Mäusen. Unten: zusammengefasste Mittelwerte. (Aus Seidler et al. 2011, S. 37)

Im Unterschied zu den Befunden dieser Arbeit sowie den genannten weiterführenden Untersuchungen unseres Labors wurde in der Arbeitsgruppe von A. Marks in FKBP12.6 $\Delta$ 37V überexprimierenden Mäusen sechs Wochen nach Herzinfarkt eine signifikant geringere Zunahme des Enddiastolischen Volumens beobachtet als in Wildtypmäusen (Huang et al. 2006). Die Forschergruppe führt dies auf eine geringere Dilatation der Herzen in diesen Mäusen zurück. Leider machen Huang und Kollegen in der genannten Publikation keine genaueren Angaben zu echokardiographischen morphologischen Befunden (LVEDD, LVESD, SW). Des Weiteren wurden die Untersuchungen in Mäusen durchgeführt, die eine 22-fache und somit massive Überexpression der Calstabin2-Mutante D37V (verglichen mit Wildtyp-FKBP) aufwiesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bewusst auf solch hohe Überexpressionen verzichtet, da in einigen FKBP12.6 $\Delta$ 37S-transgenen Mäusen mit zirka 20-facher Überexpression Vorhofvergrößerungen echokardiographisch nachgewiesen wurden. In einer anderen Untersuchung aus dem Labor von A. Marks wurde – ebenfalls in Mäusen nach



Herzinfarkt – versucht, den Ryanodinrezeptor medikamentös zu stabilisieren (Wehrens et al. 2005). Dabei konnte in mit JTV-519 behandelten Wildtypmäusen eine verminderte Zunahme der Verhältnisse Herz- zu Körpergewicht und Herzgewicht zu Tibialänge nachgewiesen werden. Da dieser Effekt in Calstabin2-Knockout-Tieren nicht beobachtet werden konnte, resümierten Wehrens und Kollegen, dass die protektive Wirkung von JTV-519 nach Herzinfarkt auf Stabilisierung des Ryanodinrezeptors beruht. Echokardiographisch gelang in dieser Untersuchung jedoch kein Nachweis struktureller Verbesserungen (EDD, ESD, EDV, LVPW unverändert gegenüber unbehandelten Tieren, siehe Wehrens et al. 2005: Online-Supplement) nach Herzinfarkt durch JTV-519. Da im Labor von A. Marks sowohl durch genetische (Huang et al. 2006), als auch durch medikamentöse (Wehrens et al. 2005) Stabilisierung des Ryanodinrezeptors morphologische Verbesserungen nach Herzinfarkt erreicht werden konnten, dies im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht in einem CaMKII-transgenen Mausmodell gelungen ist, wurde in unserer Gruppe in Ergänzung zu dieser Arbeit ein lastinduziertes Hypertrophiemodell untersucht. Dabei wurde in Mäusen durch operative Stenosierung der Aorta eine Hypertrophie erzeugt. Interessanterweise wurde jedoch auch in diesem Modell in den D37S-Mäusen keine geringere Zunahme der Septumdicke sowie der Ratio aus Herz- und Körpergewicht festgestellt (Seidler et al. 2011).

Somit konnte durch die vorliegende Arbeit und anschließende weiterführende Untersuchungen übereinstimmend gezeigt werden, dass 1.) FKBP<sup>D37S</sup> alleine in 5-facher Überexpression keinen strukturellen Einfluss auf das Herz ausübt und dass es 2.) nicht gelingt, morphologische Veränderungen bei CaMKII-Überexpression oder lastinduzierter Hypertrophie mittels FKBP12.6<sup>D37S</sup>-(Über-)expression zu inhibieren.

## **4.2 Funktionelle Charakterisierung der Kardiomyozyten der transgenen Mäuse**

### **4.2.1 Der Ryanodinrezeptor unter Einfluss von CaMKII $\delta_c$ und FKBP12.6<sup>D37S</sup>: Diastolische Kalziumfreisetzungseignisse**

Mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen hinsichtlich des Auftretens und der Charakteristik von Kalziumsparks untersucht. Eine Vermehrung diastolischer Kalziumfreisetzungseignisse kann dabei als funktionelles Korrelat einer erhöhten (diastolischen) Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors angesehen werden.

Die Experimente ergaben keine signifikanten Unterschiede der Sparkfrequenz sowie der Sparkcharakteristik zwischen Wildtypzellen und Zellen, die FKBP12.6<sup>D37S</sup> überexprimierten. Dieser Befund fiel zunächst überraschend aus, da in der Literatur eine Reduktion der Sparkfrequenz, der -amplitude, der -breite sowie der -dauer und konsekutiv eine Verringerung des diastolischen SR-Kalziumlecks durch Calstabin2 beschrieben wurde (Loughrey et al. 2004; Gomez et al. 2004). Auch Prestle et al. haben durch Versuche an FKBP12.6 überexprimierenden Kardiomyozyten ein reduziertes SR-Kalziumleck ermittelt (Prestle et al. 2001). Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Befunde könnte die Tatsache sein, dass die Versuche der oben genannten Autoren an Zellen durchgeführt wurden, in denen eine akute Überexpression von Calstabin2 durch adenoviralen Gentransfer erreicht worden war. Somit spielen bei den Versuchen der aufgeführten Autorengruppen – im Unterschied zu dieser Arbeit – Anpassungsvorgänge im Organismus, wie sie bei chronischer Überexpression eines Proteins zu erwarten sind keine Rolle. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen der koffeininduzierten Transienten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, eine signifikante Erhöhung des SR-Kalziumgehaltes in den Kardiomyozyten die FKBP12.6<sup>D37S</sup> überexprimierten. Da ein hoher Kalziumspiegel im SR seinerseits einen Triggerfaktor für diastolische Kalziumfreisetzungseignisse darstellt (Lukyanenko et al. 1996), kann dies eine weitere Erklärung für die insgesamt unveränderte Sparkhäufigkeit unter alleiniger Überexpression der Calstabin2-Mutante sein: so führt möglicherweise eine reduzierte Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors in den FKBP<sup>D37S</sup>-Zellen zunächst zu einer Erhöhung des SR Kalziumgehaltes, was konsekutiv eine Steigerung der Kalziumfreisetzung nach sich zieht, so dass in der Summe eine unveränderte Sparkfrequenz gegenüber Wildtypzellen bei allerdings höheren SR-Kalziumspiegeln resultiert. Daher wurde zusätzlich die Sparkfrequenz pro Mikromol SR-Kalzium bestimmt. Hierbei zeigte sich eine Tendenz zu einer Reduktion in der FKBP12.6<sup>D37S</sup>-Gruppe gegenüber Wildtyp, wenngleich diese jedoch kein Signifikanzniveau erreicht. Ergänzend wurden Veränderungen der Kalziumtransienten nach 10 sowie nach 30 Sekunden Stimulationspause untersucht. An gesunden Mauscardiomyozyten ist eine Zunahme der Kontraktionsstärke und entsprechend der Kalziumtransienten nach einer Pause vorbeschrieben, die offenbar auf einer Vergrößerung der Fraktion von freigesetztem Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (*Fractional Release*) nach der Pause beruht (Bers 2001). Diesem Mechanismus entgegengesetzt stehen diastolische Kalziumfreisetzungseignisse, die eine Reduktion des SR-Kalziumgehaltes bewirken. Im Rahmen der Herzinsuffizienz kann einerseits das diastolische SR-Kalziumleck verstärkt sein und andererseits nimmt seine Bedeutung zu, da es durch eine gesteigerte Funktion

des Natrium-Kalzium-Austauschers (s. Abschnitt 1.3.1) zu einer vermehrten transsarkolemmalen Kalziumelimination kommt. Diese Effekte können folglich eine Reduktion der positiven bzw. sogar eine negative Post-Pausen-Beziehung nach sich ziehen. Somit lässt die Untersuchung der Kalziumtransienten nach artifiziell verlängerter Diastole indirekte Rückschlüsse auf den Kalziumverlust des SR und letztlich der Zelle zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den FKBP12.6<sup>D37S</sup>-überexprimierenden Kardiomyozyten eine Zunahme der positiven Post-Pausen-Beziehung gegenüber Wildtyp festgestellt, die bei zehn sekundiger Pause jedoch knapp das Signifikanzniveau verfehlte ( $P=0,07$ ) und bei 30 Sekunden Stimulationsstopp auf der Signifikanzgrenze ( $P=0,05$ ) lag. Diese Befunde deuten auf eine Reduktion des diastolischen SR-Kalziumverlustes in den FKBP<sup>D37S</sup> transgenen Kardiomyozyten – zumindest unter Bedingungen einer verlängerten Diastole – hin.

Von noch größerem Interesse war jedoch, ob sich mittels FKBP12.6<sup>D37S</sup> ein verstärktes SR-Kalziumleck wie man es bei Herzinsuffizienz findet (Yano et al. 2000; Shannon et al. 2003) reduzieren lässt. Dafür wurden zunächst Untersuchungen an Kardiomyozyten gemacht die nur die CaMKII $\delta_c$  überexprimierten. Erwartungsgemäß zeigten diese eine signifikante Erhöhung der Sparkfrequenz gegenüber den Kontrollzellen. Eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors durch CaMKII $\delta_c$ -abhängige Phosphorylierung ist auch in der Literatur vorbeschrieben und gilt nach zahlreichen durchgeführten Studien diverser Forschergruppen inzwischen – trotz einzelner widersprechender Arbeiten – als weitgehend akzeptiert. So konnten Witcher et al. bereits 1991 zeigen, dass die CaMKII den RyR phosphoryliert und dadurch aktiviert (Witcher et al., 1991). Nachfolgend wurde dieser Befund in Einzelkanaluntersuchungen mehrerer Autorengruppen bestätigt (Hain et al. 1995; Wehrens et al. 2004). Im Widerspruch dazu fanden Lokuta und Kollegen ebenfalls bei Einzelkanalmessungen eine CaMKII-vermittelte Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit des RyR (Lokuta et al. 1995). Die Ursache für diese Diskrepanz ist unklar. Allerdings ergaben Untersuchungen unter physiologischeren Konditionen an intakten Herzmuskelzellen unterschiedlicher Spezies sowie Untersuchungen an permeabilisierten Kardiomyozyten – analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit – in überwiegender Mehrzahl eine Vermehrung der diastolischen Kalziumfreisetzung durch die CaMKII $\delta_c$  (Li L et al. 1997; Maier et al. 2003; Currie et al. 2003; Kohlhaas et al. 2006; Guo et al. 2006). Im Umkehrschluss passend dazu konnte die Kanalaktivität des Ryanodinrezeptors durch die Proteinphosphatasen PP-1A und PP-2A reduziert werden (duBell et al. 1996). Insbesondere die Arbeiten von Li und Kollegen liefern überzeugende Belege dafür, dass die CaMKII $\delta_c$  direkt die Offenwahrscheinlichkeit des RyR erhöht, da in dieser Studie sowohl der L-Typ-Kalziumeinstrom ( $I_{Ca}$ ) als auch der SR-

Kalziumgehalt, die weitere unabhängige Triggerfaktoren für die SR-Kalziumfreisetzung darstellen, konstant gehalten wurden (Li L et al. 1997). Auch Guo et al. konnten durch Untersuchungen an PLB-Knockout-Mäusen ausschließen, dass die unter CaMKII $\delta_c$ -Wirkung zu beobachtende Erhöhung der Sparkfrequenz und -dauer sekundär durch eine Erhöhung des SR-Kalziumgehaltes verursacht wird (Guo et al. 2006). Lediglich die Untersuchungen von Wu und Kollegen ergaben im Widerspruch zu den aufgeführten Publikationen und zu den Befunden dieser Arbeit eine CaMKII-vermittelte Reduktion der SR-Kalziumfreisetzung (Wu et al. 2001). Allerdings wurden hier SR-Kalziumgehalt und L-Typ-Kalziumeinstrom nicht im gleichen Untersuchungsprotokoll bestimmt, so dass Veränderungen dieser Einflussfaktoren ursächlich für den abweichenden Befund sein könnten. Dies gilt umso mehr, da die Ergebnisse dieser und mehrerer anderer Arbeiten zeigen, dass der SR-Kalziumgehalt unter CaMKII $\delta_c$ -Überexpression tatsächlich reduziert ist (Maier et al. 2003). Auch im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurde versucht den Veränderungen im SR-Kalziumgehalt Rechnung zu tragen und daher die Sparkfrequenz pro  $\mu\text{mol}$  SR-Kalzium bestimmt. So konnte eindeutig gezeigt werden, dass die CaMKII $\delta_c$  die Sparkfrequenz unabhängig vom SR-Kalziumgehalt erhöht und zwar in einem solchen Maße, dass die Sparkfrequenz in den Zellen die die CaMKII $\delta_c$  überexprimierten auch trotz des erniedrigten SR-Kalziumgehaltes erhöht war.

Somit stellte sich nun die Frage, ob es möglich ist mittels FKBP12.6<sup>D37S</sup> den diastolische SR-Kalziumverlust, der bei Herzinsuffizienz im Allgemeinen und bei CaMKII $\delta_c$ -Überexpression im Speziellen vermehrt ist, zu reduzieren und wenn ja in welchem Maße. Daher wurden Untersuchungen in Zellen durchgeführt, die simultan die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase und die Calstabin2-Mutante überexprimierten. Hierbei konnte tatsächlich erstmalig eine signifikante Reduktion der CaMKII $\delta_c$ -vermittelten erhöhten Frequenz diastolischer Kalziumfreisetzungseignisse durch FKBP12.6<sup>D37S</sup> nachgewiesen werden, die sogar nahezu Wildtypkontrollniveau erreichte. Auch der Anteil an Zellen in denen Sparks gefunden wurden sank gegenüber der CaMKII Gruppe signifikant. Andere Sparkcharakteristika ( $F/F_0$ , -breite, -dauer, RT 50%) zeigten zumindest eine Tendenz zur Normalisierung und lagen intermediär zwischen den Wildtypkontrollwerten und den Werten der Zellen, die nur die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II $\delta_c$  überexprimierten. Aus diesen Befunden konnte erstmalig berechnet werden, dass das unter CaMKII-Überexpression auftretende diastolische Kalziumleck (~200% des WT Kontrollwertes) durch die Calstabin2-Mutante D37S deutlich reduziert werden kann (~120% des WT Kontrollwertes). Wiederum wurde die Sparkfrequenz zusätzlich auf den SR-Kalziumgehalt

normalisiert, um FKBP vermittelte Einflüsse auf den Ryanodinrezeptor von indirekten Effekten durch unterschiedliche SR-Kalziumbeladungen zu trennen. Diese Berechnung ergab eine Reduktion der Sparkfrequenz pro  $\mu\text{mol}$  SR-Kalzium von über 50% gegenüber den CaMKII $\delta_c$ -überexprimierenden Kardiomyozyten. Somit konnte also gezeigt werden, dass es 1.) möglich ist durch Calstabin2<sup>D37S</sup> den diastolischen SR-Kalziumverlust der bei CaMKII $\delta_c$ -Überexpression auftritt zu reduzieren und das 2.) dieser Effekt offenbar nicht sekundär durch Veränderungen des SR-Kalziumgehaltes der Herzmuskelzellen verursacht wird. Dies ist besonders interessant, da bisher nur bekannt war, dass die Calstabin2-Mutante D37S PKA-vermittelte Effekte am Ryanodinrezeptor durch eine erhöhte Bindungsaffinität unterbinden kann. Weiterhin wurden in unserer Arbeitsgruppe Versuche mit einem zweiten Herzinsuffizienzmodell durchgeführt. Hierbei wurde einerseits in Calstabin2<sup>D37S</sup>-transgenen Mäusen und andererseits in Wildtypmäusen durch operative Verengung der Aorta eine Nachlasterrhöhung und konsekutiv eine Herzhypertrophie erzeugt. Die Untersuchungen dieser Kardiomyozyten ergaben, in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, eine signifikante Reduktion der Sparkfrequenz pro  $\mu\text{mol}$  SR-Kalzium in den transgenen Zellen gegenüber den Wildtypzellen (Seidler et al. 2011).

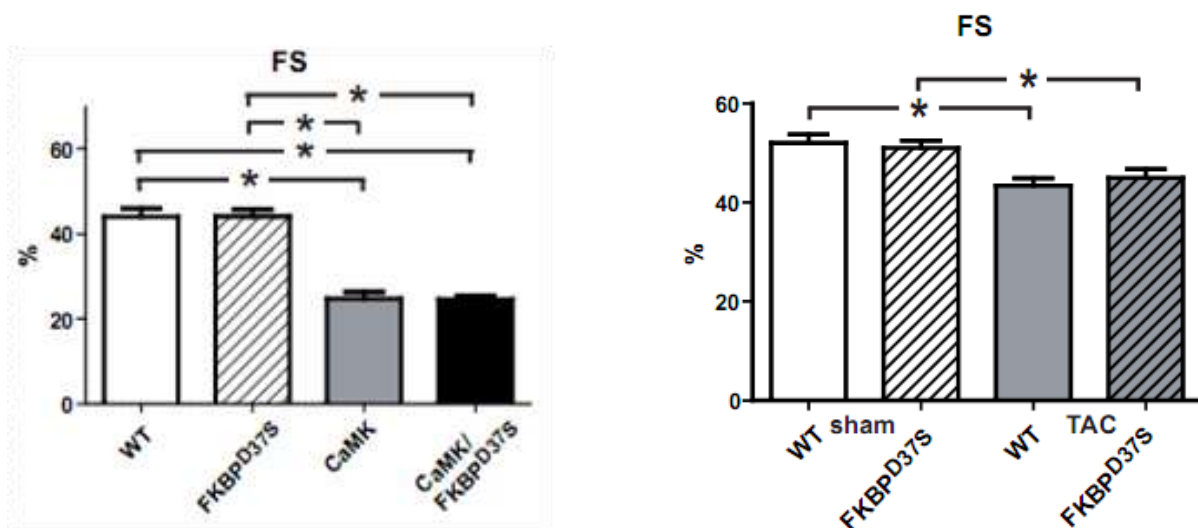
Letztlich ergaben sich aus diesen Befunden natürlich Überlegungen, ob und wenn ja welche funktionellen Konsequenzen die Reduktion des diastolischen SR-Kalziumverlustes nach sich zieht und insbesondere ob dadurch auch die Kontraktilität bei Herzinsuffizienz verbessert werden kann. Daher wurden nachfolgend Versuche zu Kontraktilität und Kalziumtransienten der Herzmuskelzellen durchgeführt.

#### **4.2.2 SR-Kalzium, intrazelluläre Kalziumtransienten und Kontraktilität unter Einfluss von CaMKII $\delta_c$ und FKBP12.6<sup>D37S</sup>**

In den durchgeführten Untersuchungen zeigte die Gruppe der Kardiomyozyten, die die CaMKII $\delta_c$  überexprimierten, eine Reduktion des SR Kalziumgehaltes und passend dazu auch verminderte Kontraktilität und Kalziumtransientenamplituden gegenüber den Zellen der Wildtyp-Gruppe. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit vorbeschriebenen Ergebnissen aus der Literatur (Maier et al. 2003) und fiel somit erwartungsgemäß aus. In den Herzmuskelzellen in denen die Calstabin2-Mutante FKBP12.6<sup>D37S</sup> überexprimiert wurde fand sich ein erhöhter SR Kalziumgehalt, der sich bei niedriger Stimulationsfrequenz (0,1 Hz) oder unter Bedingungen einer verlängerten Diastole (Transient nach 30 Sekunden Diastolendauer) in eine verstärkte Inotropie und größere Kalziumtransientenamplituden als die Kontrollzellen übersetzte, während bei höheren Stimulationsfrequenzen (0,5 bis 4 Hz) keine signifikanten

Unterschiede im Vergleich zu Wildtypzellen auftraten. Hier wurden in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bisher kontroverse Resultate erzielt. Prestle et al. fanden bei Untersuchungen an erwachsenen Kaninchenkardiomyozyten, in denen durch adenoviralen Gentransfer FKBP12.6 überexprimiert wurde, eine Zunahme der Kontraktilität (Prestle et al. 2001). Ergänzt wurden diese Befunde durch weitere Untersuchungen mit dem gleichen Adenovirus in denen sich auch eine Zunahme der Amplituden der Kalziumtransienten in Kaninchen- (Loughrey et al. 2004) und Rattenkardiomyozyten zeigte (Gomez et al. 2004). Im Gegensatz dazu konnten Huang et al. in transgenen Mäusen die Calstabin2 überexprimierten in vivo keinen Unterschied in der Kontraktilität im Vergleich zur Kontrollgruppe finden (Huang et al. 2006). Interessanterweise wurde in einer aktuellen Arbeit von Gellen et al. bei transgener herzspezifischer und konditionaler Überexpression von FKBP12.6 in Mauskardiomyozyten sogar eine signifikante Reduktion der Kalziumtransienten gemessen und das einem gegenüber Wildtyp unveränderten SR Kalzium Gehalt zum Trotz (Gellen et al. 2008). Allerdings fand diese Arbeitsgruppe auch eine Reduktion des L-Typ Kalziumeinstroms in der Gruppe der Kardiomyozyten, die FKBP12.6 überexprimierten, so dass hier eine Verminderung des Triggerkalziums als Ursache für die insgesamt reduzierten Transienten in Frage kommt. L-Typ Kalziumströme wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, so dass hier keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob in den untersuchten Gruppen Unterschiede im Triggerkalzium bestehen. Alle genannten Untersuchungen wurden im Gegensatz zur dieser Arbeit mit Wildtyp-FKBP12.6 durchgeführt. Die Arbeitsgruppe von Huang et al. führte darüber hinaus jedoch auch Untersuchungen an Mäusen aus, die die Calstabin2-Mutante Cal2<sup>D37V</sup> (FKBP12.6<sup>D37V</sup>) überexprimierten. Diese Mutante ist ebenso wie das in dieser Arbeit verwendete FKBP12.6<sup>D37S</sup> in der Lage den PKA-phosphorylierten Ryanodinrezeptor zu binden. Auch in der Cal2<sup>D37V</sup>-Gruppe fanden Huang et al. in vivo keine Zunahme der Kontraktilität (Huang et al. 2006). In Ergänzung dieser Arbeit wurden neben den in Abschnitt 3.2.6 dargestellten Einzelzelluntersuchungen ebenfalls echokardiographische in vivo Daten erhoben. In Analogie zu den Versuchen von Huang et al. und passend zu den Befunden der Einzelzelluntersuchungen zeigten diese keine Zunahme der Kontraktilität in der FKBP<sup>D37S</sup>-Gruppe gegenüber Wildtyp (siehe Abbildung 4.3). Erstmals wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich die reduzierte Kontraktilität wie sie bei Überexpression der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$  gefunden wird durch gleichzeitige Überexpression von Calstabin2<sup>D37S</sup> rückführen lässt. Dies konnte in den durchgeführten Versuchen jedoch nicht erreicht werden. Dieser Befund passt zu den Ergebnissen der koffeininduzierten Transienten, die dem verminderten diastolischen SR-Kalziumverlust zum

Trotz keinen signifikanten Unterschied im SR-Kalziumgehalt der doppeltransgenen Herzmuskelzellen gegenüber den CaMKII $\delta_c$ -überexprimierenden Zellen zeigten. Hierbei zeigte sich lediglich eine Tendenz zu einer Zunahme des SR Kalzium Gehaltes ( $P=0,07$ ), die jedoch nicht ausreichend war, um die Kalziumtransientenamplituden zu steigern. Möglicherweise spielt hierbei auch eine Rolle, dass es unter FKBP-Überexpression zu einer Reduktion des L-Typ Kalziumeinstroms kommt (Gellen et al. 2008) und somit zu einer Verminderung des Triggerkalziums für die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung. Im Unterschied zu den hier durchgeführten Versuchen mit CaMKII $\delta_c$  induzierter Herzinsuffizienz, wurde in Mäusen nach Herzinfarkt eine Verbesserung der in vivo Kontraktilität durch medikamentöse (Wehrens et al. 2005) bzw. genetische (Huang et al. 2006) Stabilisierung des Ryanodinrezeptors beschrieben (vgl. auch Absatz 4.1). Daher wurden ergänzend zu dieser Arbeit echokardiographische in vivo Daten erhoben. Dies wurde einerseits in CaMKII transgenen Mäusen und andererseits in dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Hypertrophiemodell durchgeführt. Allerdings konnte auch hier keine Besserung der Kontraktilität durch die FKBP-Mutante nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.3, Seidler et al. 2011).



**Abbildung 4.3: Fractional Shortening (FS) in vivo.**

Das linke Diagramm zeigt eine reduzierte Kontraktilität in den Herzen der CaMKII-transgenen Mäuse in vivo und keine Verbesserung durch simultane Überexpression von FKBP12.6<sup>D37S</sup>. Im rechten Bild sieht man wiederum eine reduzierte Kontraktilität nach TAC induzierter Hypertrophie und wiederum keine Besserung durch D37S. (Seidler et al. 2011, S. 37 und S. 40)

FS wurde mit Hilfe der Formel  $(LVEDD/LVESD)/LVEDD \times 100$  berechnet. LVEDD und LVESD wurden echokardiographisch bestimmt (vgl. Abbildung 4.2).

### 4.2.3 Die Funktion der Kalziumtransportproteine SERCA und NCX bei Überexpression von CaMKII $\delta_c$ und FKBP12.6<sup>D37S</sup>

Um zu verstehen, warum es zwar einerseits eindeutig gelingt, den durch die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II induzierten erhöhten diastolischen SR-Kalziumverlust mittels FKBP12.6<sup>D37S</sup> zu reduzieren, warum dies aber andererseits keine signifikante Erhöhung im SR-Kalziumgehalt und folglich auch keine Verbesserung der Kontraktilität nach sich zieht, wurde die Funktion von weiteren Kalziumtransportern untersucht.

Die Aktivität der SR-Kalzium-ATPase (SERCA) kann anhand des Rückgangs der Kalziumtransienten abgeschätzt werden, da in der normalen Mauskardiomyozyte die SERCA für zirka 88-92% der diastolischen Kalziumelimination verantwortlich ist (Bassani JW et al. 1994; Maier et al. 2003). Bei Herzinsuffizienz nimmt zwar die Funktion des Natrium-Kalziumaustauschers zu (Hasenfuss et al. 1999), allerdings bleibt die SR-Kalzium-ATPase der bei weitem dominierende Mechanismus der zur Relaxation beiträgt. So haben Untersuchungen an Kardiomyozyten, die die Kalzium/Calmodulin-Kinase II $\delta_c$  überexprimieren ergeben, dass auch hier die SERCA noch einen Anteil von 84% an der diastolischen Kalziumelimination hat (Maier et al. 2003). Somit kann auch hier der Rückgang der Kalziumtransienten Hinweise auf die Funktion der SERCA geben. Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben keinen Unterschied im Transientenrückgang von FKBP12.6<sup>D37S</sup>-, CaMKII $\delta_c$ -überexprimierenden und Wildtyp-Zellen. Ein direkter Einfluss von FKBP auf die SERCA ist in der Literatur auch nicht vorbeschrieben, so dass dieser Befund nicht unerwartet ausfiel. Analog dazu haben auch Prestle und Kollegen keinen Einfluss von FKBP12.6 auf die Relaxationszeiten festgestellt (Prestle et al. 2001). Im Widerspruch stehen Untersuchungen von Gomez et al., die eine Reduktion und Versuche von Gellen et al., die eine Zunahme der Rückgangskonstante  $\tau$  der Kalziumtransienten in FKBP12.6 überexprimierenden Herzmuskelzellen ergeben haben (Gomez et al. 2004; Gellen et al. 2008). Möglicherweise spielen hier unterschiedliche Tiermodelle (Maus, Ratte, Kaninchen), Unterschiede der überexprimierten Proteine (FKBP12.6 vs. D37S-Mutante) sowie methodische Unterschiede (akute adenovirale Überexpression vs. konditionelle transgene Überexpression) eine Rolle.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass es unter CaMKII $\delta_c$ -Überexpression zu einer verminderten Expression der SERCA kommt (Maier et al. 2003). Gleichzeitig konnte diese Forschergruppe aber auch eine reduzierte Expression von Phospholamban, das ja durch die CaMKII $\delta_c$  phosphoryliert wird und dadurch seinen hemmenden Einfluss auf die SERCA



verliert, nachweisen. Da jedoch die Reduktion der SERCA-Expression ausgeprägter war als die Reduktion der PLB-Expression, ergaben funktionelle Untersuchungen eine dezente Verlängerung des Rückgangs der Kalziumtransienten, die jedoch nicht signifikant war (Maier et al. 2003) und in der vorliegenden Arbeit nicht wieder gefunden wurde. Auch Untersuchungen an Herzmuskelzellen von Kaninchen in denen durch adenoviralen Gentransfer eine vermehrte (akute) CaMKII-Überexpression erreicht worden, zeigten keinen Unterschied in der Relaxation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kohlhaas et al. 2006). Ein überraschender Befund dieser Arbeit war zunächst, dass in der Gruppe der Zellen, die die CaMKII $\delta_c$  und FKBP12.6<sup>D37S</sup> gleichzeitig überexprimierten, eine gegenüber den anderen Gruppen signifikante Verlängerung des Rückgangs der Kalziumtransienten beobachtet wurde. Dies gilt übereinstimmend für sämtliche untersuchte Rückgangsparameter (RT<sub>50%</sub>, RT<sub>80%</sub>, RT<sub>90%</sub>,  $\tau$ ) und zwar unabhängig von der Stimulationsfrequenz. Insbesondere da die CaMKII $\delta_c$  und FKBP12.6<sup>D37S</sup> alleine keinen Einfluss auf die Funktion der SR-Kalzium-ATPase zeigten war dieses Ergebnis unerwartet. Andererseits erklärt sich durch eine reduzierte SERCA-Aktivität auch der verringerte SR-Kalziumgehalt, der in dieser Arbeit bei den doppeltransgenen Zellen dem gegenüber CaMKII $\delta_c$  verminderten diastolischen SR-Kalziumverlust zum Trotz beobachtet werden konnte. Somit erscheinen die erhobenen Befunde zwar unerwartet, aber dennoch in sich konsistent zu sein. Möglicherweise stellt Kalziumfreisetzung aus dem SR gleichzeitig einen unmittelbaren intrinsischen Triggerfaktor für eine Verstärkung der SR Kalziumwiederaufnahme dar: Kalziumfreisetzung aus dem SR führt zur Aktivierung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase und folglich zur Phosphorylierung von PLB mit Aktivitätserhöhung der SERCA (Bassani RA et al. 1995, Maier und Bers 2007). Im Umkehrschluss führt das Fehlen dieses Triggers dann zu einer reduzierten SERCA Funktion in den doppeltransgenen Zellen. Im Einklang mit dieser Hypothese würden auch die oben genannten Befunde von Gellen et al. sein, die eine reduzierte SR Kalziumfreisetzung und gleichzeitig reduzierte -wiederaufnahme in einem FKBP12.6 transgenen Mausmodell beschrieben haben (Gellen et al. 2008). Zwar würde man nach dieser Hypothese auf den ersten Blick auch in den Zellen mit alleiniger Überexpression der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$  eine durch das diastolische Kalziumleck getriggerte Zunahme der SERCA Funktion erwarten, allerdings ist zu beachten, dass es sich bei der CaMKII transgenen Maus um ein Herzinsuffizienzmodell handelt: Eine reduzierte SERCA-Expression (de la Bastie et al. 1990) gilt als typischer Befund bei Herzinsuffizienz und bewirkt eine Funktionsabnahme (Gwathmey et al. 1987; Pieske et al. 1995; Schmidt et al. 1998). Neben den Rückgangsparametern der feldstimulierten Transienten wurde auch die RT

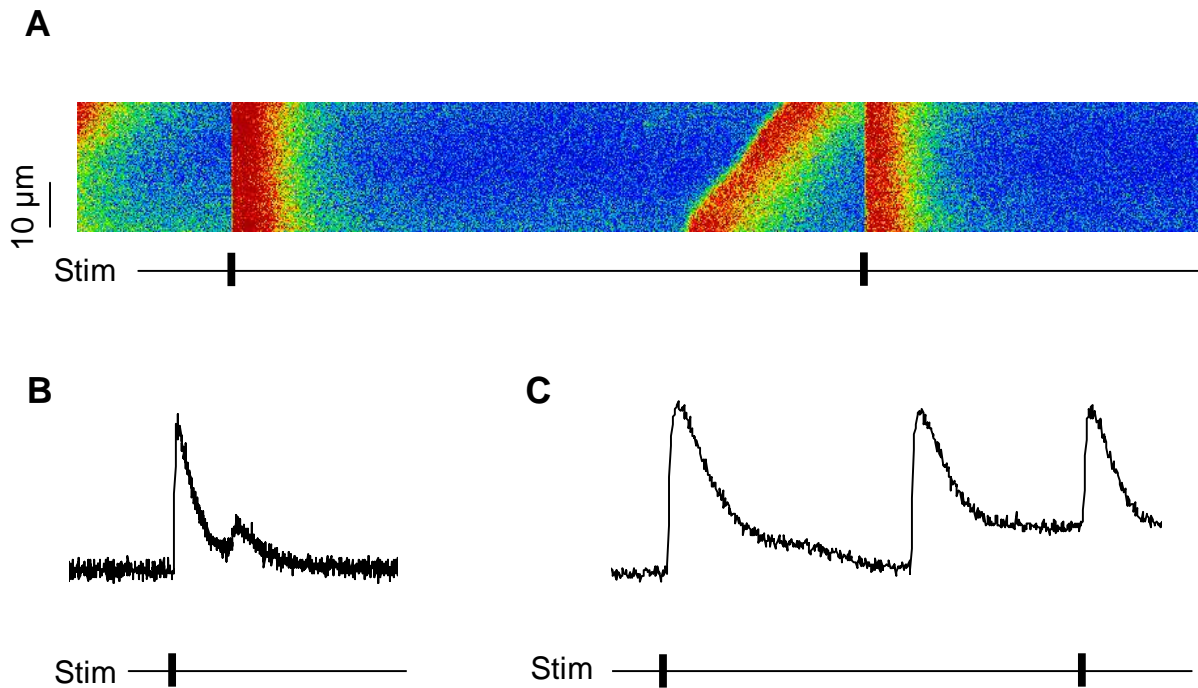
50% der koffeininduzierten Transienten analysiert. Diese lässt Rückschlüsse auf die Aktivität des sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauschers zu, wobei eine verlängerte RT für eine geringe Aktivität spricht und umgekehrt (vgl. Abschnitt 2.2.3.2, Bassani JW et al. 1994, Bers 2001). Eine Funktionszunahme des NCX führt zu einer Verschiebung von Kalzium in den Extrazellulärraum und kann somit – analog zu einer Aktivitätsabnahme der SERCA – zur Kalziumverarmung des SR beitragen. Tatsächlich wurde in den doppeltransgenen Zellen eine Tendenz zu einer Aktivitätszunahme des NCX beobachtet. Diese erreichte zwar nicht das Signifikanzniveau, da sich jedoch die verminderte SERCA Aktivität einerseits und erhöhte NCX Aktivität andererseits in ihrer Wirkung ergänzen, gibt es insgesamt in den Kardiomyozyten, die simultan Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II $\delta_c$  und FKBP<sup>D37S</sup> überexprimieren, eine Verschiebung von Kalzium in Richtung EZR, die zur Kalziumverarmung des SR beiträgt und den hier erhobenen Befund einer nur geringen Erholung des SR Kalziumgehaltes trotz reduziertem SR Kalziumleck, erklärt.

### **4.3 Die Bedeutung von CaMKII $\delta_c$ und FKBP12.6 für Pathogenese und Therapie von Herzinsuffizienz und Arrhythmien: Einschränkungen und Ausblicke**

Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob Calstabin2<sup>D37S</sup> in der Lage ist die phänotypischen und die funktionellen Veränderungen, die bei Herzinsuffizienz auftreten, zu unterbinden. CaMKII $\delta_c$ -überexprimierende und doppeltransgene Kardiomyozyten zeigten keine signifikanten Unterschiede im SR-Kalziumgehalt, in der Kontraktilität und der Amplitude der Kalziumtransienten. Auch der Quotient aus Herz- und Körpergewicht, der als Maß für die Herzhypertrophie verwendet wurde, war durch zusätzliche Überexpression der Calstabin2-Mutante nicht beeinflusst. Somit konnte durch Überexpression von FKBP12.6<sup>D37S</sup> keine Verbesserung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz erreicht werden. Einschränkend muss gesagt werden, dass bei diesen Untersuchungen leider kein Tiermodell zur Verfügung stand, das jeweils inaktive Kontrollproteine anstelle von CaMKII $\delta_c$  und FKBP12.6<sup>D37S</sup> überexprimiert. Transgene Überexpression von zwei Proteinen bedeutet natürlich auch, dass dafür vermehrt Energieträger und Aminosäuren verbraucht werden. Unter Umständen kann die Synthese von Eiweißen die transgen überexprimiert werden dann in Konkurrenz treten mit der Biosynthese anderer Proteine, die von der Herzmuskelzelle benötigt werden. Daher kann zwar letztlich nicht ausgeschlossen werden, dass solche methodisch bedingten Effekte einer

möglichen Verbesserung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz durch Stabilisierung des Ryanodinrezeptors entgegenwirken, allerdings konnte in weiterführenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe an einem nicht-transgenen lastinduzierten Hypertrophiemodell (TAC-Maus) ebenfalls keine Verbesserung von Morphologie und Kontraktilität durch Überexpression der FKBP12.6-Mutante erreicht werden, obwohl auch in diesem Modell eine Reduktion des Verhältnisses von Sparkfrequenz und SR-Gehalt vorlag (Seidler et al. 2011). Somit muss die Wirksamkeit einer reinen Ryanodinrezeptorstabilisierung zur Therapie der Herzinsuffizienz zumindest kritisch betrachtet werden.

Eindeutig gezeigt werden konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit, dass durch FKBP12.6<sup>D37S</sup> das diastolische SR-Kalziumleck, das bei Herzinsuffizienz auftritt, reduziert werden kann. Dieses kann insbesondere bei sympathogener Stimulation zu späten Nachdepolarisationen (DADs) und dadurch letztlich zu tachykarden ventrikulären Arrhythmien führen (vgl. Abschnitt 1.3.2). Erst kürzlich wurde in Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass es in CaMKII $\delta_c$  transgenen Mäusen nach katecholaminerger Provokation tatsächlich zu einer signifikanten Erhöhung der Inzidenz von Arrhythmien gegenüber Wildtyptieren kommt (Sag et al. 2009). Die zellulären Substrate dieser Arrhythmien konnten auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einigen Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 4.4). Da im Rahmen dieser Arbeit keine katecholaminerge Provokation durchgeführt wurde, wurde auch auf eine systematische Auswertung der Auftretenshäufigkeit von zellulären arrhythmogenen Substraten verzichtet. Dennoch belegen die Untersuchungen von Sag et al. die Relevanz diastolischer Kalziumfreisetzungseignisse für die Arrhythmogenese im Rahmen der Herzinsuffizienz und durch die vorliegende Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass FKBP12.6<sup>D37S</sup> den Geschlossenzustand des kardialen Ryanodinrezeptors wirksam stabilisiert. Somit stellt die untersuchte Calstabin2-Mutante einen interessanten und auf molekularen Pathomechanismen beruhenden Ansatzpunkt dar, um Arrhythmien im Rahmen von Herzinsuffizienz zu unterbinden.



**Abbildung 4.4: Zelluläre Substrate von Arrhythmien:** Originalregistrierungen die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeichnet wurden. Abbildungen A zeigt das im Linienrasterverfahren registrierte Fluoreszenzsignal einer Fluo-4 beladenen Kardiomyozyte. Zu sehen sind zwei Kalziumtransienten, die durch elektrische Stimulation (Frequenz 0,5 Hz) getriggert wurden. Weiterhin sind zwei nicht-stimulierte Kalziumwellen zu erkennen, die den Transienten vorausgehen. Abbildung B und C sind Fluoreszenzregistrierungen von Fluo-3 beladenen Herzmuskelzellen, die am Epifluoreszenzmikroskop aufgezeichnet wurden. Beide zeigen unterschiedliche Formen nicht stimulierter Ereignisse: Abbildung B ein frühes nicht stimuliertes Ereignis (esNSE), das vor dem Wendepunkt des stimulierten Transienten auftritt und Abbildung C eine spätes nicht stimuliertes Ereignis (lsNSE). Der nachfolgende stimulierte Transient fällt ein, bevor die Baselinefluoreszenz erreicht wurde. Die Amplitude ist dadurch erniedrigt. (Einteilung der Arrhythmiesubstrate nach Sag et al. 2009)

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an einem transgenen Mausmodell durchgeführt, in dem eine Calstabin2-Mutante (FKBP12.6<sup>D37S</sup>) exprimiert wird, die auch den durch PKA phosphorylierten Ryanodinrezeptor zu binden vermag. Bei Herzinsuffizienz kommt es zu einer Expressionserhöhung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta_c$ , die ebenfalls den RyR phosphoryliert und dadurch zu seiner erhöhten diastolischen Offenwahrscheinlichkeit beiträgt. Es wurden Versuche in einem doppeltransgenen Mausmodell mit simultaner Überexpression der CaMKII $\delta_c$  und FKBP12.6<sup>D37S</sup> durchgeführt, um zu überprüfen, ob in diesem Modell eine Reduktion des diastolischen Kalziumlecks gelingt und inwieweit sich dadurch negative Einflüsse der CaMKII $\delta_c$  auf den Kalziumhaushalt und den Phänotyp zurückführen lassen.

Nach Entnahme der Herzen wurde zunächst das Verhältnis aus Herz- und Körpergewicht ermittelt. Während FKBP<sup>D37S</sup> alleine keinen morphologischen Einfluss zeigte, wiesen die CaMKII $\delta_c$ -transgenen Mäuse eine Herzhypertrophie auf, die nicht durch simultane Überexpression von FKBP<sup>D37S</sup> verhindert werden konnte. In isolierten Einzelzellen konnte gezeigt werden, dass das erhöhte diastolische Kalziumleck der CaMKII $\delta_c$  überexprimierenden Zellen tatsächlich durch gleichzeitige Überexpression der Calstabin2-Mutante wirksam inhibiert werden kann. Dies gelang insbesondere durch eine Reduktion der Sparkfrequenz auf Kontrollniveau. FKBP12.6<sup>D37S</sup>-Expression alleine hatte dagegen keinen Einfluss auf Sparkhäufigkeit und -charakteristika. Interessanterweise bewirkte das reduzierte SR-Kalzium-Leck der doppeltransgenen Zellen jedoch keine signifikante Zunahme des Kalziumgehaltes des Sarkoplasmatischen Retikulums und daher auch keine Verbesserung von Transienten und Kontraktilität. Dafür war eine verminderte SERCA-Aktivität und somit eine verminderte Wiederbeladung des SR in den doppeltransgenen Zellen verantwortlich. Darüber hinaus zeigte sich auch eine Tendenz zu stärkerer Funktion des sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauschers (NCX), die ebenfalls zu einer Kalziumverarmung, trotz reduziertem diastolischen SR-Kalzium-Leck, beitragen kann. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass FKBP12.6<sup>D37S</sup> zwar eine effektive Option zur Stabilisierung des sarkoplasmatischen Kalziumfreisetzungskanals bei CaMKII $\delta_c$ -induzierter Herzinsuffizienz darstellt, dass dies jedoch nicht ausreicht, um den intrazellulären Kalziumhaushalt zu normalisieren oder den klinischen Phänotyp der Herzinsuffizienz zu verbessern. Somit deuten die Versuche auf mögliche Limitationen einer Stabilisierung des RyR zur Therapie der Herzinsuffizienz hin. Andererseits mag eine Stabilisierung des RyR ein möglicher Ansatzpunkt zur Therapie bestimmter Kalziumleck-assoziiierter Herzrhythmusstörungen sein.

## 6 Literaturverzeichnis

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ Res* 97, 1314-22

Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA (1994): Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca<sup>2+</sup>-induced enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 75, 854-61

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1994): Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476, 279-93

Bassani RA, Bassani JW, Bers DM (1992): Mitochondrial and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport reduce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol* 453, 591-608

Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM (1995): CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268, H703-12

Belardinelli L, Isenberg G (1983): Actions of adenosine and isoproterenol on isolated mammalian ventricular myocytes. *Circ Res* 53, 287-97

Benkusky NA, Weber CS, Scherman JA, Farrell EF, Hacker TA, John MC, Powers PA, Valdivia HH (2007): Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 101, 819-29

Bers DM: *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*, 2. Auflage; Kluwer Academic Publishers, Amsterdam 2001

Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205

Bers DM (2004): Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 37, 417-29

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E (1992): Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85, 1046-55

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E (1993): Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73, 379-85

Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I (2005): EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J* 39, 13-23

Blinks JR, Endoh M (1986): Modification of myofibrillar responsiveness to Ca<sup>++</sup> as an inotropic mechanism. *Circulation* 73, III85-98

Borchard U, Hafner D (2000): [Ion channels and arrhythmias]. *Z Kardiol* 89 Suppl 3, 6-12

Braun AP, Schulman H (1995): The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 57, 417-45

Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasova E, Moschella MC, Jayaraman T, Landers M, Ehrlich BE, Marks AR (1994): Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77, 513-23

Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S et al. (1986): Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 59, 297-309

Burg K, Haf H, Wille F: Höhere Mathematik für Ingenieure. Band 1: Analysis. 8. Auflage, Teubner Verlag, Wiesbaden 2008

Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P (1995): Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 96, 2247-59

Collins JH (1991): Sequence analysis of the ryanodine receptor: possible association with a 12K, FK506-binding immunophilin/protein kinase C inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 1288-90

Cranefield PF (1977): Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circ Res* 41, 415-23

Currie S, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL (2004): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J* 377, 357-66

Davis BA, Schwartz A, Samaha FJ, Kranias EG (1983): Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 258, 13587-91

de la Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, Mercadier JJ, Marotte F, Wisnewsky C, Brovkovich V, Schwartz K, Lompre AM (1990): Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 66, 554-64

Denvir MA, MacFarlane NG, Cobbe SM, Miller DJ (1995): Sarcoplasmic reticulum and myofilament function in chemically-treated ventricular trabeculae from patients with heart failure. *Cardiovasc Res* 30, 377-85

DeSantiago J, Maier LS, Bers DM (2002): Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 34, 975-84



duBell WH, Lederer WJ, Rogers TB (1996): Dynamic modulation of excitation-contraction coupling by protein phosphatases in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 493 ( Pt 3), 793-800

Fabiato A, Fabiato F (1975): Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249, 469-95

Ferrier GR, Moe GK (1973): Effect of calcium on acetylcholine-induced transient depolarizations in canine Purkinje tissue. *Circ Res* 33, 508-15

Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR (1991): Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352, 803-7

Fowler MB, Laser JA, Hopkins GL, Minobe W, Bristow MR (1986): Assessment of the beta-adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response. *Circulation* 74, 1290-302

Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I (2000): Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 97-106

Gellen B, Fernandez-Velasco M, Briec F, Vinet L, LeQuang K, Rouet-Benzineb P, Benitah JP, Pezet M, Palais G, Pellegrin N et al. (2008): Conditional FKBP12.6 overexpression in mouse cardiac myocytes prevents triggered ventricular tachycardia through specific alterations in excitation-contraction coupling. *Circulation* 117, 1778-86

George CH, Higgs GV, Lai FA (2003): Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes. *Circ Res* 93, 531-40

Gomez AM, Schuster I, Fauconnier J, Prestle J, Hasenfuss G, Richard S (2004): FKBP12.6 overexpression decreases Ca<sup>2+</sup> spark amplitude but enhances [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H1987-93

Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington 1996

Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM (2006): Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 99, 398-406

Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP (1987): Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61, 70-6

Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995): Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem* 270, 2074-81

Harkins AB, Kurebayashi N, Baylor SM (1993): Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophys J* 65, 865-81

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994): Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75, 434-42

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999): Relationship between Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99, 641-8

Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A et al. (2000): The potential for QT

prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. *Cardiovasc Res* 47, 219-33

Hirzel HO, Tuchschnid CR, Schneider J, Krayenbuehl HP, Schaub MC (1985): Relationship between myosin isoenzyme composition, hemodynamics, and myocardial structure in various forms of human cardiac hypertrophy. *Circ Res* 57, 729-40

Huang F, Shan J, Reiken S, Wehrens XH, Marks AR (2006): Analysis of calstabin2 (FKBP12.6)-ryanodine receptor interactions: rescue of heart failure by calstabin2 in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3456-61

Huke S, Bers DM (2008): Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 80-5

Huse M, Chen YG, Massague J, Kuriyan J (1999): Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96, 425-36

Huxley HE (1967): Recent x-ray diffraction and electron microscope studies of striated muscle. *J Gen Physiol* 50, 71-83

Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-65

Huxley H, Hanson J (1954): Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173, 973-6

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, Takeshita A (2000): Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* 86, 152-7

Iwasa Y, Hosey MM (1984): Phosphorylation of cardiac sarcolemma proteins by the calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 259, 534-40

January CT, Riddle JM (1989): Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current. *Circ Res* 64, 977-90

Jayaraman T, Brillantes AM, Timerman AP, Fleischer S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Marks AR (1992): FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 267, 9474-7

Jett MF, Schworer CM, Bass M, Soderling TR (1987): Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Arch Biochem Biophys* 255, 354-60

Jeyakumar LH, Ballester L, Cheng DS, McIntyre JO, Chang P, Olivey HE, Rollins-Smith L, Barnett JV, Murray K, Xin HB et al. (2001): FKBP binding characteristics of cardiac microsomes from diverse vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 979-86

Jiang MT, Lokuta AJ, Farrell EF, Wolff MR, Haworth RA, Valdivia HH (2002): Abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ Res* 91, 1015-22

Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF (1996): Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 78, 262-73

Kaftan E, Marks AR, Ehrlich BE (1996): Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -release channels from cardiac muscle. *Circ Res* 78, 990-7

Kirchberger MA, Tada M, Katz AM (1974): Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249(19), 6166-73

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42, 254-61

Kjekshus J (1990): Arrhythmias and mortality in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 65, 421-481

Klinke R, Silbernagl S: Lehrbuch der Physiologie, 2. neu gestaltete und überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1996/2000

Kohlhaas M: Die Bedeutung der subzellulären CaMKII $\delta$ -Überexpression auf den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel in Herzmuskelzellen. Naturwissenschaftl. Diss. Göttingen 2006

Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM et al. (2006): Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 98, 235-44

Lam E, Martin MM, Timerman AP, Sabers C, Fleischer S, Lukas T, Abraham RT, O'Keefe SJ, O'Neill EA, Wiederrecht GJ (1995): A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* 270, 26511-22

Lechat P, Grosogeat Y (1983): [Direct cardiac mechanism of action of digitalis glycosides]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 76, 953-8

Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG (1979): Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry* 18, 5150-7

Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM (1997): The effect of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol* 501 ( Pt 1), 17-31

Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM (1998): Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol* 274, H1335-47

Li Y, Kranias EG, Mignery GA, Bers DM (2002): Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 90, 309-16

Libby P, Bonow RO, Zipes DP, Mann DL: Braunwald's Heart Disease, A textbook of cardiovascular medicine, 8. Edition; Saunders, Philadelphia 2007

Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-15

Lokuta AJ, Rogers TB, Lederer WJ, Valdivia HH (1995): Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Physiol* 487 ( Pt 3), 609-22

Loughrey CM, Seidler T, Miller SL, Prestle J, MacEachern KE, Reynolds DF, Hasenfuss G, Smith GL (2004): Over-expression of FK506-binding protein FKBP12.6 alters excitation-contraction coupling in adult rabbit cardiomyocytes. *J Physiol* 556, 919-34

Luellmann H, Mohr K, Hein L: Pharmakologie und Toxikologie, 16. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006

Lukyanenko V, Gyorke I, Gyorke S (1996): Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 432, 1047-54

Maier LS, Bers DM (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-39

Maier LS, Bers DM (2007): Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73, 631-40

Maier LS, Bers DM, Pieske B (2000): Differences in Ca<sup>2+</sup>-handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32(12), 2249-58

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res* 92, 904-11

Marx SO, Ondrias K, Marks AR (1998): Coupled gating between individual skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channels (ryanodine receptors). *Science* 281, 818-21

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, Marks AR (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-76

Marx SO, Gaburjakova J, Gaburjakova M, Henrikson C, Ondrias K, Marks AR (2001): Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ Res* 88, 1151-8

McMurray JJ, Stewart S (2000): Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83, 596-602

Minta A, Kao JP, Tsien RY (1989): Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 264, 8171-8

Molecular Probes Handbook, A guide to fluorescent probes and labeling technologies, 11. Edition, Invitrogen, Carlsbad (Kalifornien), 2010

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998): A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-28

Molloy JE, Burns JE, Kendrick-Jones J, Tregear RT, White DC (1995): Movement and force produced by a single myosin head. *Nature* 378, 209-12

Movsesian MA, Nishikawa M, Adelstein RS (1984): Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *J Biol Chem* 259, 8029-32

Nuss HB, Kaab S, Kass DA, Tomaselli GF, Marban E (1999): Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure. *Am J Physiol* 277, H80-91

Osterrieder W, Brum G, Hescheler J, Trautwein W, Flockerzi V, Hofmann F (1982): Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca<sup>2+</sup> current. *Nature* 298, 576-8

Packer M (1985): Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation* 72, 681-5

Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 1169-78

Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G (1999): Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 85, 38-46

Pogwizd SM, Hoyt RH, Saffitz JE, Corr PB, Cox JL, Cain ME (1992): Reentrant and focal mechanisms underlying ventricular tachycardia in the human heart. *Circulation* 86, 1872-87



Pogwizd SM, McKenzie JP, Cain ME (1998): Mechanisms underlying spontaneous and induced ventricular arrhythmias in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 98, 2404-14

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM (2001): Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 88, 1159-67

Prestle J, Janssen PM, Janssen AP, Zeitz O, Lehnart SE, Bruce L, Smith GL, Hasenfuss G (2001): Overexpression of FK506-binding protein FKBP12.6 in cardiomyocytes reduces ryanodine receptor-mediated Ca(2+) leak from the sarcoplasmic reticulum and increases contractility. *Circ Res* 88, 188-94

Pschyrembel, 262. Auflage, de Gruyter Verlag, Berlin 2010

Reinecke H, Studer R, Vetter R, Just H, Holtz J, Drexler H (1996): Role of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 779, 543-5

Reuter H, Seitz N (1968): The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 195, 451-70

Ringer S (1883): A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* 4, 29-42.3

Rodriguez P, Bhogal MS, Colyer J (2003): Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *J Biol Chem* 278, 38593-600

Rosen MR, Gelband H, Merker C, Hoffman BF (1973): Mechanisms of digitalis toxicity. Effects of ouabain on phase four of canine Purkinje fiber transmembrane potentials. *Circulation* 47, 681-9

Sag CM: Die Bedeutung der Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) für die Erholung von Kontraktionskraft und Ca<sup>2+</sup>-Transienten während der Azidose am Herzen. Med. Diss. Göttingen 2008

Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH et al. (2009): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail* 2, 664-75

Schmidt U, Hajjar RJ, Helm PA, Kim CS, Doye AA, Gwathmey JK (1998): Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1929-37

Schwinger RH, Bohm M, Koch A, Schmidt U, Morano I, Eissner HJ, Uberfuhr P, Reichart B, Erdmann E (1994): The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ Res* 74, 959-69

Seidler T, Teucher N, Hellenkamp K, Unsöld B, Grebe C, Kramps P, Schotola H, Wagner S, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2011): Limitations of FKBP12.6-directed treatment strategies for maladaptive cardiac remodeling and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 50, 33-42

Sewell TJ, Lam E, Martin MM, Leszyk J, Weidner J, Calaycay J, Griffin P, Williams H, Hung S, Cryan J et al. (1994): Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. *J Biol Chem* 269, 21094-102

Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM (2003): Elevated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circ Res* 93, 592-4

Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Charng MJ, Mathews LM, Schneider MD, Hamilton SL, Matzuk MM (1998): Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 391, 489-92

Siekierka JJ, Wiederrecht G, Greulich H, Boulton D, Hung SH, Cryan J, Hodges PJ, Sigal NH (1990): The cytosolic-binding protein for the immunosuppressant FK-506 is both a ubiquitous and highly conserved peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *J Biol Chem* 265, 21011-5

Sigal NH, Siekierka JJ, Dumont FJ (1990): Observations on the mechanism of action of FK-506. A pharmacologic probe of lymphocyte signal transduction. *Biochem Pharmacol* 40, 2201-8

Statistisches Bundesamt: Todesursachenstatistik Berichtsjahr 2008, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2010

Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75, 443-53

Suko J, Vogel JH, Chidsey CA (1970): Intracellular calcium and myocardial contractility. 3. Reduced calcium uptake and ATPase of the sarcoplasmic reticular fraction prepared from chronically failing calf hearts. *Circ Res* 27, 235-47

Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, Colbert MC, Gualberto A, Wieczorek DF, Molkentin JD (1998): Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 281, 1690-3

Tada M, Katz AM (1982): Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol* 44, 401-23

Tada M, Kirchberger MA, Repke DI, Katz AM (1974): The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 249, 6174-80

Tada M, Yamada M, Kadoma M, Inui M, Ohmori F (1982): Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Mol Cell Biochem* 46, 73-95

Takehima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M, Hirose T et al. (1989): Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339, 439-45

Takuma S, Suehiro K, Cardinale C, Hozumi T, Yano H, Shimizu J, Mullis-Jansson S, Sciacca R, Wang J, Burkhoff D et al. (2001): Anesthetic inhibition in ischemic and nonischemic murine heart: comparison with conscious echocardiographic approach. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2364-70

Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M, Mercadier JJ, Hatem SN (1999): Regulation of the transient outward K(+) current by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circ Res* 85, 810-9

Timerman AP, Ogunbumni E, Freund E, Wiederrecht G, Marks AR, Fleischer S (1993): The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 268, 22992-9

Timerman AP, Wiederrecht G, Marcy A, Fleischer S (1995): Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP.ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *J Biol Chem* 270, 2451-9

Timerman AP, Onoue H, Xin HB, Barg S, Copello J, Wiederrecht G, Fleischer S (1996): Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* 271, 20385-91

Toyofuku T, Curotto Kurzydowski K, Narayanan N, MacLennan DH (1994): Identification of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase

that is phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. J Biol Chem 269, 26492-6

Tyska MJ, Dupuis DE, Guilford WH, Patlak JB, Waller GS, Trybus KM, Warshaw DM, Lowey S (1999): Two heads of myosin are better than one for generating force and motion. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 4402-7

Vollger M: Lichtmikroskopie: Theorie und Anwendung. Universität Wien, Wien 2008

Wadsack DP: Einfluss inotroper Stimulation bei CaMKII $\delta_c$  Überexpression am Myokard. Med. Diss. Göttingen 2009

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH et al. (2006): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. J Clin Invest 116, 3127-38

Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, Sowa T, Fabritz L, Kirchhof P, Bers DM et al. (2009): Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. Circ Arrhythm Electrophysiol 2, 285-94

Weber KT, Brilla CG (1991): Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. Circulation 83, 1849-65

Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR (1989): Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. J Biol Chem 264, 11468-74

Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Rosemblyt N et al. (2003): FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell 113, 829-40

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, van der Nagel R, Morales R, Sun J, Cheng Z, Deng SX, de Windt LJ, Landry DW et al. (2005): Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9607-12

Weil J, Schunkert H (2006): Pathophysiology of chronic heart failure. *Clin Res Cardiol* 95 Suppl 4, 1-15; quiz 16-7

Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR (1991): Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 266, 11144-52

Wu Y, Colbran RJ, Anderson ME (2001): Calmodulin kinase is a molecular switch for cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2877-81

Xiao B, Sutherland C, Walsh MP, Chen SR (2004): Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca<sup>2+</sup>-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res* 94, 487-95

Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H, Chen SR (2006): Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J* 396, 7-16

Xin HB, Senbonmatsu T, Cheng DS, Wang YX, Copello JA, Ji GJ, Collier ML, Deng KY, Jeyakumar LH, Magnuson MA et al. (2002): Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* 416, 334-8

Xu A, Hawkins C, Narayanan N (1993): Phosphorylation and activation of the Ca(2+)-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 268, 8394-7

Yano M, Ono K, Ohkusa T, Suetsugu M, Kohno M, Hisaoka T, Kobayashi S, Hisamatsu Y, Yamamoto T, Kohno M et al. (2000): Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation* 102, 2131-6

Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Doi M, Tokuhisa T, Okuda S, Suetsugu M, Hisaoka T, Obayashi M, Ohkusa T et al. (2003): FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 107, 477-84

Yuan W, Bers DM (1994): Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 267, H982-93

Zeiss: LSM 5 Familie Laser Scanning Mikroskope, Jena, ohne Jahresangabe

Zhang T, Brown JH (2004): Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63, 476-86

Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH (2003): The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912-9

Zhang T, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, Chang S, Ling H, Bers DM, Maier LS et al. (2007): CaMKII $\delta$  isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J Biol Chem* 282, 35078-87

Zipes DP (2003): Mechanisms of clinical arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14, 902-12

## 7 Publikationsverzeichnis

Seidler T, Teucher N, Hellenkamp K, Unsold B, Grebe C, Kramps P, Schotola H, Wagner S, Schondube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2011): Limitations of FKBP12.6-directed treatment strategies for maladaptive cardiac remodeling and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 50, 33-42

Hellenkamp K, Lehnart SE (2010): Ryanodin-Rezeptor-Stabilisatoren. Neue Strategien zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz. *Der Kardiologe* 4, 324-28

Berg S, Luther S, Lehnart SE, Hellenkamp K, Schirdewan A, Kurths J, Wessel N, Parlitz U (2010): Comparison of features characterizing beat-to-beat time series. Postervortrag Biosignal 2010. Berlin.

Kockskamper J, Seidlmayer L, Walther S, Hellenkamp K, Maier LS, Pieske B (2008): Endothelin-1 enhances nuclear Ca<sup>2+</sup> transients in atrial myocytes through Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> release from perinuclear Ca<sup>2+</sup> stores. *J Cell Sci.* 121, 186-95

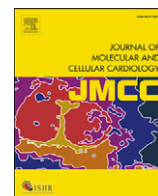


## 8 Anhang: Publikation

Erschienen im Journal of Molecular And Cellular Cardiology, Band 50 im Januar 2011:

“Limitations of FKBP12.6-directed treatment strategies for maladaptive cardiac remodeling and heart failure.”

von Seidler T, Teucher N, Hellenkamp K, Unsöld B, Grebe C, Kramps P, Schotola H, Wagner S, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS



## Highlighted Article

## Limitations of FKBP12.6-directed treatment strategies for maladaptive cardiac remodeling and heart failure

Tim Seidler<sup>a,\*</sup>, Nils Teucher<sup>b,1</sup>, Kristian Hellenkamp<sup>a</sup>, Bernhard Unsöld<sup>a</sup>, Cornelia Grebe<sup>a</sup>, Petra Kramps<sup>a</sup>, Hanna Schotola<sup>c</sup>, Stefan Wagner<sup>c</sup>, Friedrich A. Schöndube<sup>b</sup>, Gerd Hasenfuss<sup>a</sup>, Lars S. Maier<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Cardiology and Pneumology, Heart Center, University of Göttingen, Germany

<sup>b</sup> Department of Cardiac and Thoracic and Cardiovascular Surgery, Heart Center, University of Göttingen, Germany

<sup>c</sup> Department of Anesthesiology, Heart Center, University of Göttingen, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 March 2010

Received in revised form 16 August 2010

Accepted 17 August 2010

Available online 24 August 2010

## Keywords:

Transgenic mice

Maladaptive remodelling

Heart failure

FKBP

CaMK

Pressure overload

Ca sparks

Ca transients

## ABSTRACT

Sarcoplasmic reticulum (SR) calcium (Ca) leak can be reduced by enhancing FKBP12.6 binding to SR Ca release channels (RyR2) and expression of a “sticky” FKBP12.6<sup>D37S</sup> mutant may correct reduced binding stoichiometry in RyR2 from failing hearts. Both calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ) and protein kinase A (PKA) are activated in heart failure and promote SR Ca leak at RyR2. It is possible that FKBP12.6 dissociation from RyR2 may promote remodeling and that interventions to reassociate FKBP12.6 with RyR2 reflect a future therapeutic strategy. We created transgenic (TG) mice expressing FKBP12.6<sup>D37S</sup> and tested their capacity to improve intracellular Ca handling and pathological remodeling *in vivo*. FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice were cross-bred with CaMKII $\delta$  TG mice, which are known to exhibit pronounced RyR2 dysfunction and heart failure. We observed a significant improvement of post-rest Ca transients and a higher SR Ca content in FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice. In double-TG mice, a marked reduction of SR Ca spark frequency indicated reduced SR Ca leak but neither SR Ca transient amplitude, SR Ca content nor morphological or functional parameters improved *in vivo*. Likewise, FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice subjected to increased afterload after aortic banding exhibited higher SR Ca load but did not exhibit any improvement in hypertrophic growth or functional decline. Enhancement of FKBP12.6–RyR2 binding markedly reduced RyR2 Ca leak in CaMKII $\delta$ -induced heart failure and in pressure overload. Our data suggest that activation of CaMKII $\delta$  and pressure overload confer resistance towards approaches aiming at FKBP12.6–RyR2 reconstitution in heart failure and maladaptive remodeling, although RyR2 Ca leak can be reduced.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Abnormal Ca homeostasis is considered a central mechanism of reduced contractile function in heart failure and pathological remodeling. Adequate release of Ca from the SR depends on appropriate opening and closure of the SR Ca release channel, the cardiac ryanodine receptor (RyR2) [1]. Several mechanisms were demonstrated to influence RyR2. The 12.6-kDa FK-506 binding protein (FKBP12.6, calstabin 2) can bind to RyR2 with up to 4:1 stoichiometry, and we and others have previously shown that enhanced expression of FKBP12.6 in cardiomyocytes increases the association of FKBP12.6

with RyR2 and profoundly alters Ca release characteristics of RyR2 [2–6]. These changes included fewer spontaneous SR Ca release events in resting myocytes (Ca sparks), higher systolic Ca concentration in the cytosol (Ca transients) and greater synchrony of systolic release from the SR. These observations suggested that the FKBP12.6–RyR2 interaction reduced diastolic open probability (and hence Ca leak from the SR) and enhanced coupled gating. In FKBP12.6 knockout mice, a number of opposite changes were observed in Ca handling and larger wall diameters and higher heart weight-to-body weight ratio (hw/bw) implicated an important role for FKBP12.6–RyR2 dependent Ca dysregulation in the pathogenesis of cardiac hypertrophy [7], although the hypertrophic effect was confined to male mice and not found in another knockout model [8]. Conversely, changes in Ca handling typically seen in heart failure (reduced systolic Ca release, higher Ca spark frequency (CaSpF), reduced SR Ca content and reduced synchrony of systolic RyR2 opening) are opposite to many effects seen upon FKBP12.6 overexpression. In addition, less FKBP12.6 copurifies with RyR2 in heart failure, suggesting that RyR2–FKBP12.6 binding is a central mechanism in

\* Corresponding author. Department of Cardiology and Pneumology, Heart Center, University of Göttingen, Robert-Koch Str. 40, 37075 Göttingen, Germany. Tel.: +49 551 396380; fax: +49 551 3922953.

E-mail address: [tseidle@gwdg.de](mailto:tseidle@gwdg.de) (T. Seidler).

<sup>1</sup> Equal contribution.

the course of maladaptive remodeling. Catecholamine-induced protein kinase A (PKA) activation was demonstrated to inhibit RyR2–FKBP12.6 interaction, and this was suggested as a leading mechanism underlying heart failure [9–14]. Moreover, the benefit of pharmacological  $\beta$ -blockade in heart failure was linked to this mechanism [9,15–17]. Furthermore, FKBP12.6 deficiency has been linked to sudden cardiac death [8]. Consequently, small molecules, namely JTV-519 (K201) and derivatives as well as FKBP12.6 “sticky mutants” (FKBP12.6<sup>D37S/V</sup> and additional mutants) were developed to directly enhance binding of FKBP12.6 to RyR2 even in the presence of high adrenergic stimulation (and PKA activity at RyR2), as in the cases of pathological cardiac hypertrophy and in heart failure [8,12,13,18]. JTV-519 failed to rescue reduced ejection fraction in FKBP12.6 knockout but not in WT mice, again supporting a central role for FKBP12.6 in heart failure [13]. The “sticky mutant” FKBP12.6<sup>D37S</sup> significantly reduced RyR2 conductance determined in lipid bilayer experiments and increased the association of FKBP with RyR2 despite its “hyperphosphorylation” or pseudo-phosphorylation *in vitro* and *in vivo* [8,12]. Enhanced expression of the FKBP12.6<sup>D37V</sup> ‘sticky mutant’ in transgenic mice reportedly rescued myocardial infarction-induced experimental heart failure [12]. The outcome of these studies suggested enhanced binding of FKBP12.6 to RyR2 as a potential therapeutic strategy against heart failure.

CaMKII, like PKA, is also activated in heart failure and was also demonstrated to phosphorylate RyR2 leading to reduced SR Ca content [19,20]. CaMKII enhances RyR2 conductance causing significant SR Ca leak via RyR2. Previous work in isolated myocytes and one report in lipid bilayers suggest that CaMKII-induced Ca leak is not susceptible to FKBP12.6 [20]. These findings suggest that CaMKII-driven pathological remodeling is resistant towards strategies aimed at FKBP–RyR2 rebinding. On the other hand, *in vivo*, a broad range of stimuli causing contractile failure will ultimately lead to a hyperadrenergic state [21] and activation of several stress kinases. Therefore, part of the attractiveness of the approaches directed towards FKBP12.6–RyR2 reassociation is that it should not matter which initial cause underlies heart failure, as catecholaminergic stimulation and subsequent PKA activation can be expected to occur during the course of the disease, regardless of its initial cause. However, despite promising results with K201 and FKBP12.6 overexpression following myocardial infarction, it is not yet clear to which extent an FKBP12.6-directed intervention might contribute to improvement of negative remodeling and functional decline *in vivo* [12,14,22,23]. Moreover, an intact  $\beta$ -adrenergic response and unmodified progression towards heart failure were still observed in the absence of the putative PKA phosphorylation site at RyR2 *in vivo* [24,25]. Consequently, the relevance of the latter mechanism is still not decided and several additional mechanisms regulating SR Ca release (RyR2) or reuptake and sarcolemmal Ca cycling are under intense investigation due to profound influences on SR Ca content and SR-dependent arrhythmias. We wanted to test the hypothesis that FKBP–RyR2 dissociation *in vivo* might represent a common prerequisite for a significant proportion of cellular dysfunction and whether it is required as part of a vicious circle in hyperadrenergic functional decay of the myocyte. We studied this through experimentally enhancing FKBP12.6–RyR2 association in two models of maladaptive remodeling and contractile dysfunction. In order to do this, we created transgenic mice expressing the FKBP<sup>D37S</sup> sticky mutant, which was previously characterized in depth *in vitro* [8,12]. These mice were either crossed with CaMKII $\delta$ c transgenic (TG) mice to provoke a SR Ca leak or subjected to aortic constriction-induced pressure overload. Our data indicate that a marked proportion of SR Ca release via RyR2 is susceptible to FKBP12.6 even in CaMKII $\delta$ c-induced heart failure, but a lack of morphological or functional improvement in both models suggests success of FKBP12.6-directed therapies may be profoundly limited by additional mechanisms driving pathological remodeling.

## 2. Methods<sup>2</sup>

### 2.1. Generation of FKBP12.6<sup>D37S</sup> sticky mutant mice

All animal procedures were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee as well as by the state of Lower Saxony. Generation of CaMKII $\delta$ c TG mice was described previously [26]. For generation of FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice, a cDNA encoding the full-length open reading frame of human FKBP12.6 mRNA was subjected to PCR based site directed mutagenesis to create the FKBP12.6<sup>D37S</sup> mutant. The incorporation of the mutation was confirmed by DNA sequencing. The cDNA was ligated 3' of a modified alpha-MHC promoter kindly provided by J. Robbins. TG mice were generated by pronuclear microinjection in FVB/N background of the purified plasmid after BamHI-mediated excision of vector sequences. Western blotting using FKBP antibody C19 (Santa Cruz) was used to estimate the expression level relative to endogenous FKBP (i.e., both FKBP12.0 and FKBP12.6) with calculation of integrated densitometric values using software from AlphaInnotech.

### 2.2. Aortic constriction surgery

Following anaesthesia with ketamine and xylazine (100 mg/kg and 5 mg/kg, i.p.), spontaneously breathing mice (8 weeks old) were subjected to aortic ligation via a suprasternal access avoiding injury of the pleural cavity as described before [27]. A 27 gauge needle with a 5-0 suture was used to standardize constriction of the transversal aorta. Sham-operated animals were subjected to the same procedure including mobilization of the aortic arch but without ligation. The surgeon was blinded towards the genotype of the animals.

### 2.3. Measurement of $[Ca]_i$ and shortening in isolated myocytes

Mouse ventricular myocytes were isolated as described previously [28]. Shortening and  $[Ca]_i$  measurements were performed as reported previously [29]. Briefly, isolated ventricular myocytes were placed on laminin-coated recording chambers and loaded with either 10  $\mu$ mol/L Fluo-3 AM for 20 min or 10  $\mu$ mol/L Fura-2 AM for 1 h, in the presence of 0.02% (wt./vol.) pluronic acid (Molecular Probes, Eugene, OR). The chambers were mounted on the stage of an inverted microscope (Nikon Eclipse TE2000-U) and superfused with Tyrode solution (37 °C) containing (in mmol/L) 140 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 10 glucose, 1 CaCl<sub>2</sub>, at pH 7.4. After a short period of washing out the external dye, myocytes were field-stimulated (voltage 25% above threshold) to obtain force–frequency relation and postrest behavior at steady-state conditions by measuring simultaneously cell shortening and fluorescence.

### 2.4. Measurement of Ca sparks by confocal microscopy

Ca signals were recorded on a laser scanning confocal microscope (Zeiss Pascal 5), following incubation of myocytes with 10  $\mu$ mol/L fluo-4 AM (Molecular Probes). Fluo-4 was excited via an argon laser (488 nm) and emitted fluorescence (F) was collected through a 515 nm long-pass emission filter. Ca sparks were counted and characterized by blinded observers.

<sup>2</sup> Please find additional methods in the online supplement.

## 2.5. Statistics

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. For longitudinal data, two-way repeated-measures ANOVA was run. Otherwise a one-way ANOVA or Student's unpaired *t*-test was used where appropriate. Double-sided *P* values of  $<0.05$  were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Baseline parameters in FKBP12.6<sup>D37S</sup> transgenic mice

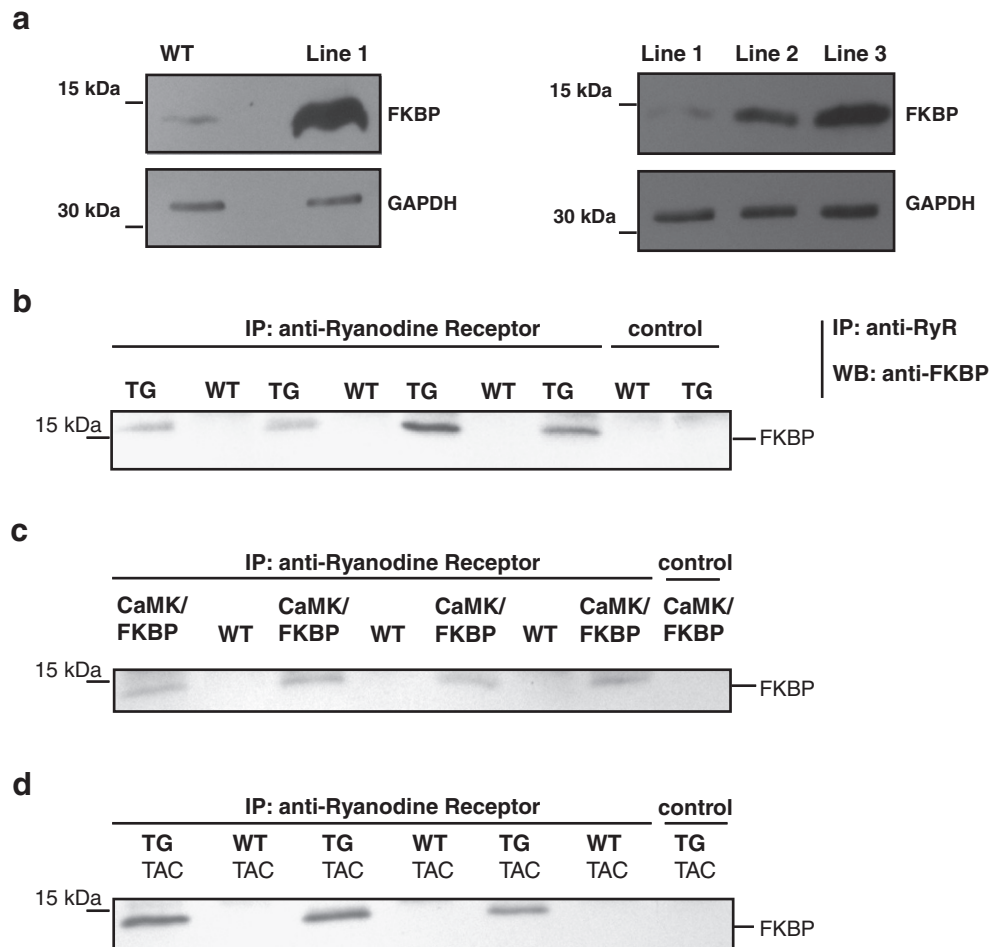
We generated three FKBP12.6<sup>D37S</sup> “sticky mutant” TG mouse lines and determined expression levels of the sticky mutant in comparison to FKBP in WT littermates (Fig. 1a). Line 1 exhibited the lowest expression level which was calculated approximately 5-fold over total FKBP. Hearts obtained from lines 2 and 3 were not studied further due to excessively higher expression levels (i.e.,  $<20$ -fold). Mice from line 1 survived without obvious morphological or functional impairment, based on their observation up to 12 months of age. Hw/bw ratio ( $7.69 \pm 0.14$  mg/g,  $n = 22$  vs.  $7.74 \pm 0.1$  mg/g,  $n = 20$ ;  $P = 0.8$ ; WT vs. FKBP) and echocardiographic examination in 2- to 3-month-old animals revealed that FKBP12.6<sup>D37S</sup> transgenic mice did not differ from WT littermates in morphological or functional parameters (Table 1). Immunoprecipitation of RyR2 from myocardium of TG mice

demonstrated enhanced association of FKBP with RyR2 in normal (Fig. 1b), in CaMKII $\delta$ c transgenic (Fig. 1c) and in mice subjected to transverse aortic banding (TAC)-induced pressure overload (Fig. 1d) as expected from a previous study [8].

### 3.2. Effect of FKBP12.6<sup>D37S</sup> on CaMKII $\delta$ c-induced remodeling

We cross-bred CaMKII $\delta$ c TG mice with FKBP12.6<sup>D37S</sup> mice and examined the four resulting genotypes within littermates. Papillary muscles from WT, FKBP12.6<sup>D37S</sup>, CaMKII $\delta$ c, and FKBP12.6<sup>D37S</sup>/CaMKII $\delta$ c double-transgenic (DT) mice exhibited a biphasic force-frequency relationship. Absolute force was not different between WT and FKBP12.6<sup>D37S</sup> (2 Hz:  $10.7 \pm 1.4$  mN/mm<sup>2</sup>,  $n = 17$  vs.  $11.5 \pm 1.6$  mN/mm<sup>2</sup>,  $n = 10$ ,  $P = \text{ns}$ ) (Fig. 2a). Muscle strips from both CaMKII $\delta$ c and DT mice exhibited similar developed force ( $2.7 \pm 1.0$  mN/mm<sup>2</sup>,  $n = 10$  vs.  $2.0 \pm 0.4$  mN/mm<sup>2</sup>,  $n = 8$ ,  $P = \text{ns}$ ) but significantly less force compared to WT or FKBP12.6<sup>D37S</sup> ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2a). At 10 Hz, CaMKII $\delta$ c TG mice exhibited a significantly reduced relative shortening vs. WT ( $P < 0.01$ ) but not vs. FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice (Figs. 2b and c).

As expected from previous data, at 8 weeks, CaMKII $\delta$ c TG mice exhibited a significantly enlarged heart with increased hw/bw ratio. FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG littermates did not differ from WT littermates (Fig. 3). As heart weight/body weight was significantly increased in



**Fig. 1.** Enhanced expression and RyR2 binding in FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice. (a) From several generated mouse lines, three transgenic mouse lines were selected based on low, intermediate, and high protein expression levels of FKBP12.6<sup>D37S</sup>, compared to WT littermates. Line 1 exhibited ~5-fold overexpression over total FKBP (i.e., both FKBP12.0 + FKBP12.6, see Supplemental methods) and was used for subsequent experiments in the study. Immunoprecipitation of RyR2 from cardiac extracts of line 1 and subsequent detection of FKBP in the precipitates indicated enhanced coimmunoprecipitation of RyR2 with FKBP12.6 in normal mice (b) and in failing myocardium in CaMKII $\delta$ c TG (c) and mice subjected to TAC (d). Control indicates cardiac extracts subjected to all experimental steps but without addition of the primary antibody.

**Table 1**  
Echocardiographic examination of FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice.

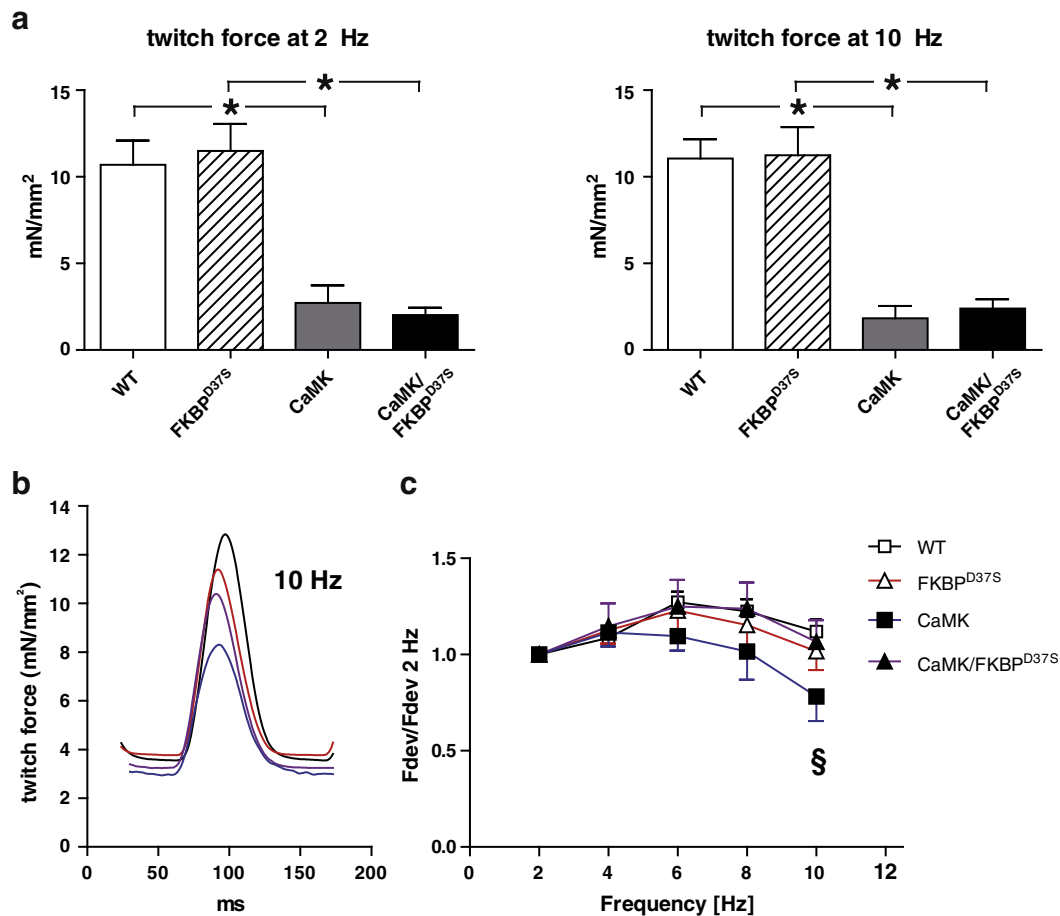
	SW mm	PW mm	LVEDD mm	LVESD mm	FS %	HR min <sup>-1</sup>
WT (n = 32)	0.85 ± 0.08	0.83 ± 0.08	3.48 ± 0.25	1.59 ± 0.24	54.4 ± 4.8	564.8 ± 77.7
FKBP12.6 <sup>D37S</sup> (n = 32)	0.87 ± 0.10	0.83 ± 0.11	3.41 ± 0.23	1.53 ± 0.17	55.0 ± 4.4	572.9 ± 42.3

FKBP12.6<sup>D37S</sup> transgenic mice aged 2–3 months old were compared with WT littermates by echocardiography with an examiner blinded towards the genotype. There were no statistically significant differences between WT and FKBP12.6<sup>D37S</sup> for any of the parameters. SW = septal wall thickness, PW = posterior wall thickness, LVEDD = left ventricular end-diastolic diameter, LVESD = left ventricular end-systolic diameter, FS = fractional shortening, HR = heart rate.

CaMKII $\delta$ c vs. WT mice and echocardiography demonstrated significant enlargement (LVEDD  $3.48 \pm 0.07$ ,  $n = 19$  vs.  $4.25 \pm 0.07$ ,  $n = 21$ ;  $P < 0.05$ ; WT vs. CaMKII $\delta$ c), CaMKII $\delta$ c mice fulfilled typical morphological features of dilated cardiomyopathy including pathological hypertrophy. Wheat germ agglutinin staining revealed a significant increase in myofiber diameter in CaMKII $\delta$ c vs. WT mice. Noticeably, none of the above parameters were significantly different between CaMKII $\delta$ c TG and FKBP12.6<sup>D37S</sup>/CaMKII $\delta$ c double-transgenic mice, strongly suggesting FKBP12.6 is not centrally involved in hypertrophic growth in CaMKII $\delta$ c mice.

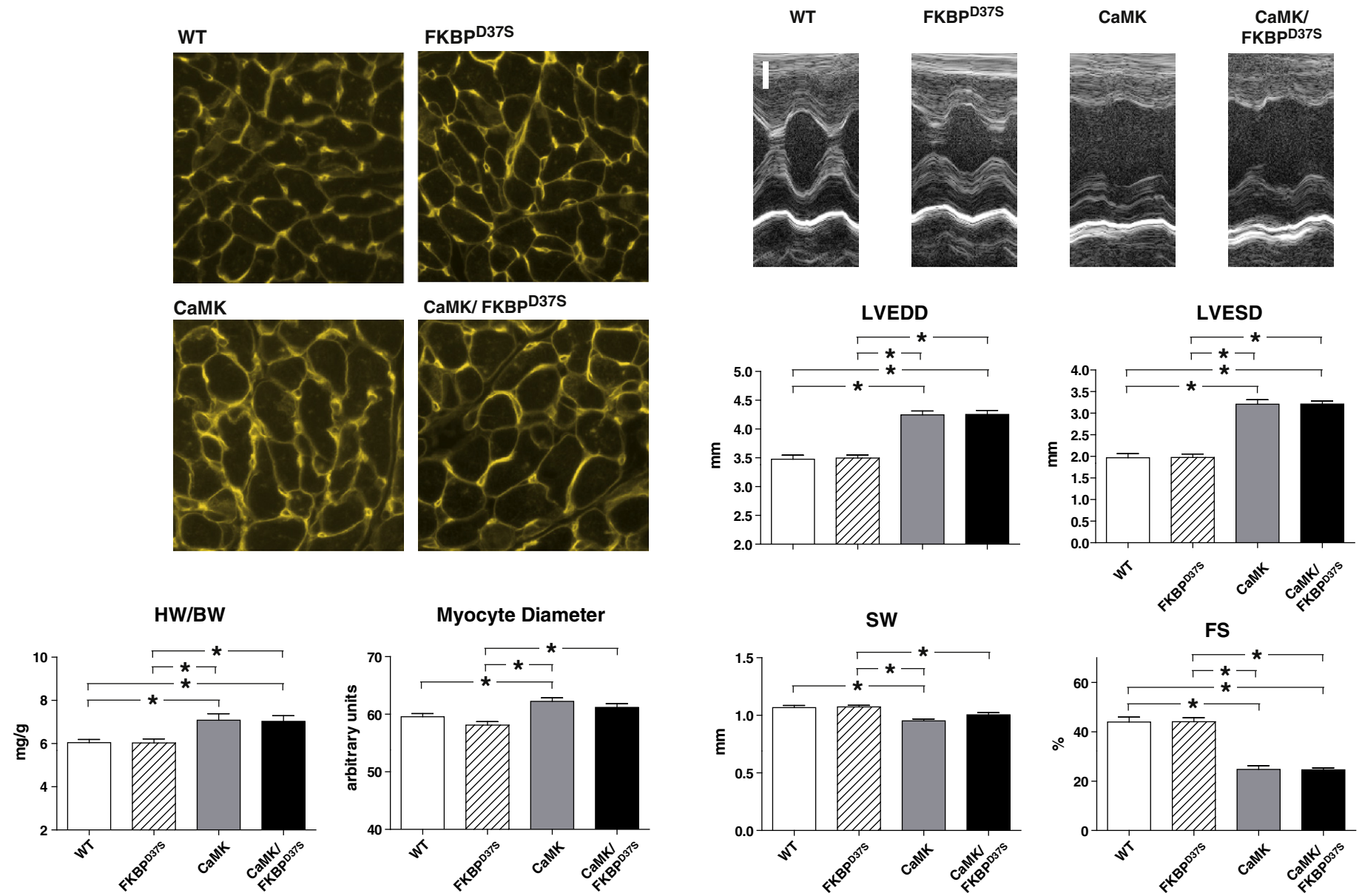
Maladaptive eccentric hypertrophy in CaMKII $\delta$ c mice is associated with a severely impaired contractile function [26]. LVESD was significantly larger in CaMKII $\delta$ c TG mice and fractional shortening significantly reduced to 24.8% (Fig. 3). Again, both parameters did not differ in CaMKII $\delta$ c TG compared to DT mice, suggesting that increasing

the affinity of FKBP12.6 to RyR2 cannot improve morphological or functional deficit resulting from enhanced CaMKII $\delta$ c expression. Next, we examined intracellular Ca handling in isolated cardiomyocytes. Baseline Ca transients did not differ between FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG and WT mice at stimulation frequencies from 1 to 4 Hz. At very low frequencies (0.1 Hz), cardiomyocytes from FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice exhibited a significantly higher Ca transient compared to WT, suggesting that less Ca is lost from SR in diastole (Figs. 4a and b). Despite this prominent effect in FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice, expression of FKBP12.6<sup>D37S</sup> did not improve Ca transients in CaMKII $\delta$ c mice (Figs. 4a and b; CaMKII $\delta$ c vs. DT,  $P = ns$ ). The Ca transient decay is an estimate of Ca reuptake into the SR. Interestingly, this decay (RT50%) was significantly prolonged in cells from DT mice compared to the other genotypes. This suggests that SERCA2 function is reduced (Fig. 4c). Caffeine-induced Ca release from the SR reflects SR Ca load. Caffeine-induced Ca release measured at 1 Hz

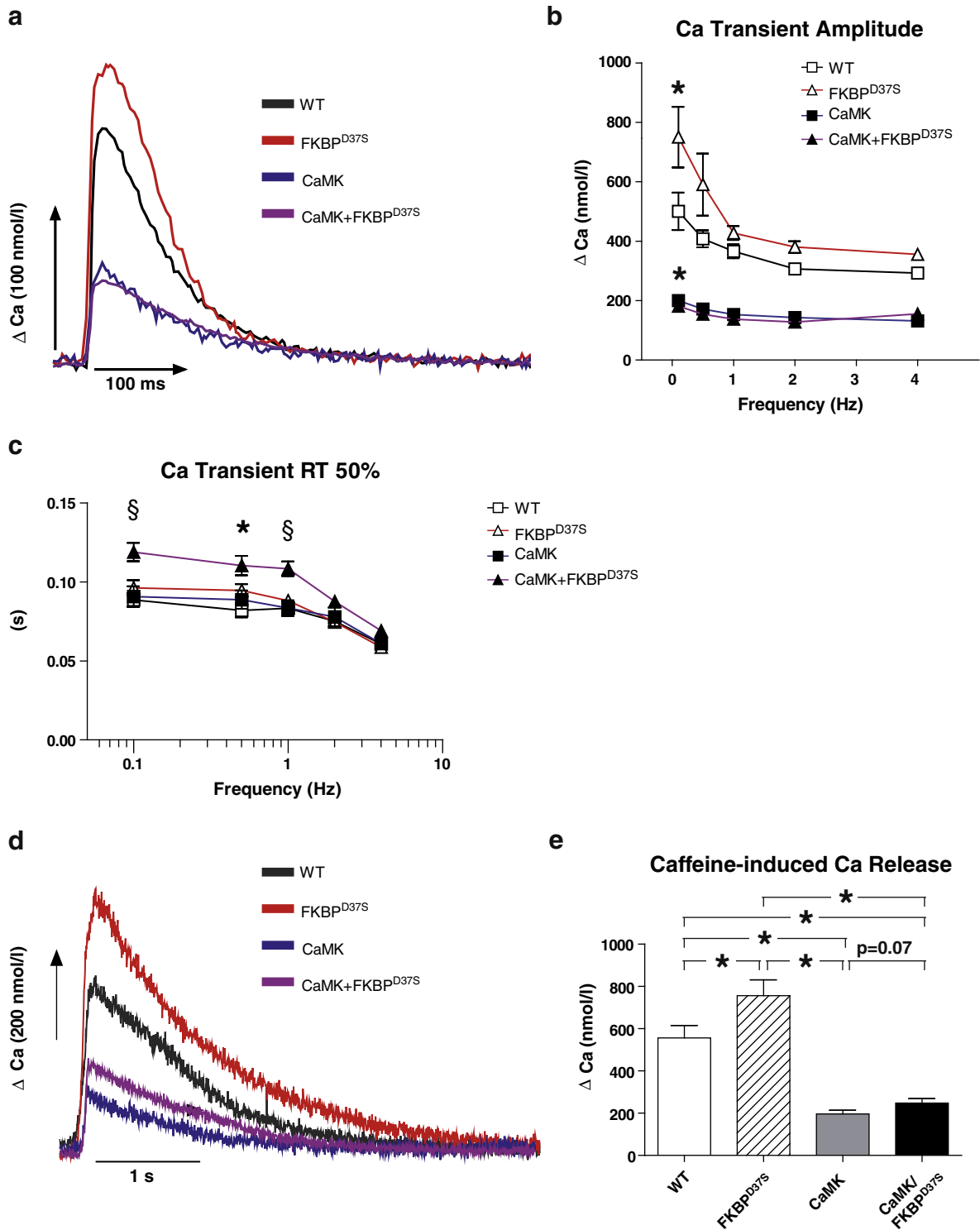


**Fig. 2.** Force and force–frequency relationship in isolated muscle preparations from WT and FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice. To examine contractile performance in the absence of neurohumoral stimuli, papillary muscles from WT, FKBP12.6<sup>D37S</sup>, CaMK, and CaMK/FKBP12.6<sup>D37S</sup> double-transgenic mice were field stimulated *ex vivo*. (a, b) Absolute force was reduced to similar levels in CaMK and DT mice at 2–10 Hz ( $*P < 0.001$ ). (c) A range of different stimulation frequencies revealed a biphasic force–frequency relation with slightly more reduction of relative force in CaMK ( $^{\$}P < 0.01$  vs. WT at 10 Hz).





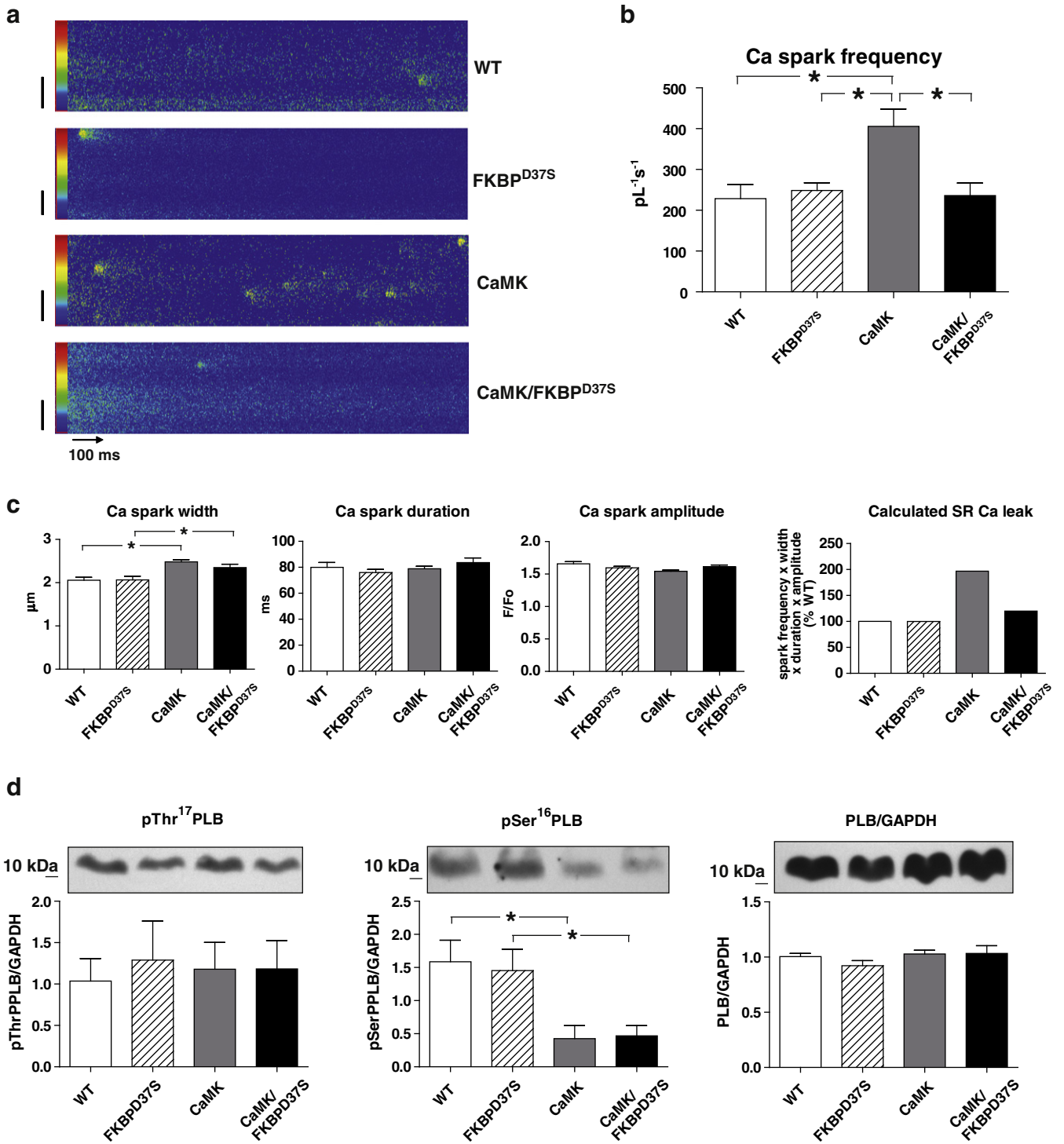
**Fig. 3.** Morphometric and echocardiographic examination of FKBP12.6<sup>D37S</sup> mice cross-bred with CaMKII $\delta$ c TG mice. FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice were cross-bred with CaMKII $\delta$ c TG mice and the resulting four genotypes compared. Histological sections at 400 $\times$  magnification of left ventricular myocardium stained with TRITC-labeled wheat germ agglutinin (WGA) (top left) were used to determine myocyte diameters. Heart weight-to-body weight (hw/bw) ratio and WGA stain indicate significantly heavier hearts and higher myofiber diameters in CaMKII $\delta$ c TG and double-TG mice vs. WT and FKBP12.6<sup>D37S</sup>. Examples for echocardiographic measurements from M-mode recordings in parasternal long-axis view (top right) highlight severe eccentric hypertrophy with enlarged left ventricular end-diastolic and end-systolic (LVEDD/LVESD) diameters, as well as increased septal wall thickness (SW). Fractional shortening (FS) in CaMKII $\delta$ c and double-TG mice is half of WT and FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG mice. \* $P < 0.05$ .



**Fig. 4.** Intracellular Ca transients and SR Ca content. (a) Original recordings showing Ca transients at 1 Hz and (b) average data for Ca transient amplitude in isolated cardiomyocytes field stimulated from 0.1 to 4 Hz. Resting  $[Ca]_i$  levels (nmol/L) were  $142.6 \pm 4.2$  (WT,  $n = 15$ ),  $136.5 \pm 3.3$  (FKBP12.6<sup>D37S</sup>,  $n = 24$ ),  $81.1 \pm 3.9$  (CaMKII $\delta$  TG,  $n = 35$ ), and  $80.7 \pm 3.5$  (DT,  $n = 27$ ). At low stimulation frequency (0.1 Hz), Ca transient amplitude was significantly increased in FKBP12.6<sup>D37S</sup> vs. WT but significantly reduced upon CaMKII $\delta$  overexpression (for both CaMKII $\delta$  as well as DT mice). \* $P < 0.01$  FKBP vs. all and WT vs. CaMKII $\delta$  and DT. (c) Time to 50% decline of the Ca transient (RT50%) was significantly prolonged in DT mice, suggesting Ca uptake into SR is markedly inhibited. § $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ . Application of caffeine induces near complete opening of RyR2, allowing approximate determination of SR Ca content. (d) Original caffeine-induced Ca transients (measured at 1 Hz) and (e) average data suggest increased SR Ca content in FKBP12.6<sup>D37S</sup> mice and no significant restoration of SR Ca content by FKBP12.6<sup>D37S</sup> vs. CaMKII $\delta$  mice. \* $P < 0.05$ .

was significantly enhanced in FKBP12.6<sup>D37S</sup> TG vs. WT mice (Figs. 4d and e). In DT mice, despite a trend towards higher SR Ca load in caffeine experiments ( $P = 0.07$ ), postrest Ca transients were not different from CaMKII $\delta$  TG mice, which may be a consequence of reduced SERCA2a activity.

To further delineate the Ca release mechanism we examined Ca sparks in intact cardiac myocytes. In accordance with an FKBP12.6<sup>D37S</sup>-dependent reduction of spontaneous RyR2 openings, there was no increase in CaSpF after overexpression of FKBP12.6<sup>D37S</sup> despite a significantly higher SR Ca load (Figs. 4d and e). CaMKII $\delta$  TG mice

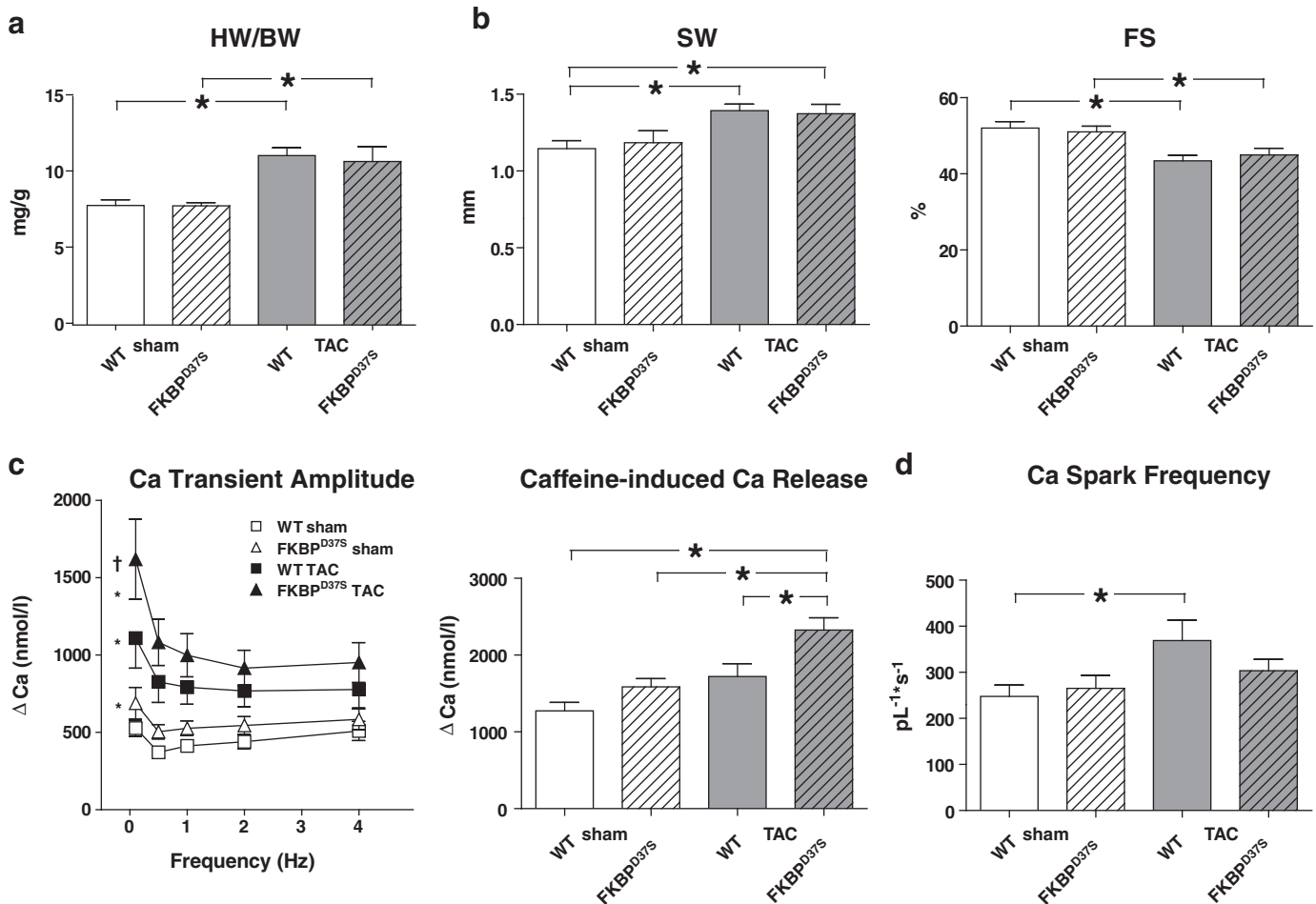


**Fig. 5.** Ca sparks and Ca handling proteins in FKBP12.6<sup>D37S</sup> and CaMKII $\delta$ c TG mice. (a) Original line scan recordings of temporally and spatially resolved Ca release in resting isolated cardiomyocytes (bar = 10  $\mu$ m). Average data indicate significant restoration of (b) Ca spark frequency (CaSpF) in CaMKII $\delta$ c/FKBP12.6<sup>D37S</sup> double-TG mice compared to CaMKII $\delta$ c TG mice. (c) Additional spark characteristics were evaluated to estimate the SR Ca leak. (d) Western blots of left ventricular samples (9–11 different hearts per genotype) demonstrate little changes for phospholamban (PLB) expression and PLB phosphorylation at threonine-17 but exhibit significant reduction in PLB phosphorylation at serine-16. \* $P < 0.05$ .

exhibited markedly higher CaSpF (Figs. 5a and b). Notably, coexpression of FKBP12.6<sup>D37S</sup> in DT mice caused a marked reduction (by about half) in CaSpF. However, as Ca spark width was still increased, not all Ca spark characteristics influenced by CaMKII $\delta$ c-induced RyR2 gating were susceptible to enhanced FKBP12.6–RyR2 association (Fig. 5c). SR leak, estimated on the basis of the product of spark amplitude, width, duration, and frequency, was reduced to 118% of WT in DT mice.

Nevertheless, despite the pronounced restoration of CaSpF, this was not sufficient to prevent hypertrophic growth, restore SR Ca content, Ca transients, or contractile performance *in vivo*. To further delineate the discrepancy between substantial improvement of leak and lack of recovery of SR Ca content or Ca transients, we examined expression of Ca handling proteins. While expression of SERCA2 and NCX was not altered significantly (not shown), phosphorylation of serine 16 in





**Fig. 6.** Morphometry and Ca handling in mice subjected to pressure overload. (a) Heart weight-to-body weight (HW/BW) measurement indicates significant hypertrophic growth 8 weeks after aortic banding (TAC) compared to sham-operated littermate control mice. (b) Septal wall thickness (SW) and fractional shortening (FS) highlight hypertrophic growth which is associated with a significant contractile deficit. (c) At low stimulation frequency (0.1 Hz), the Ca transient amplitude is significantly greater in FKBP12.6<sup>D375</sup> vs. WT (both sham-operated) and mice subjected to TAC vs. sham-operated WT mice. Resting [Ca]<sub>i</sub> levels (nmol/L) were 139.4 ± 9 (WT-Sham, n = 28), 142.8 ± 2.6 (FKBP12.6<sup>D375</sup>-Sham, n = 32), 177.2 ± 6.9 (WT-TAC, n = 24), and 168.8 ± 6.5 (FKBP12.6<sup>D375</sup>-TAC, n = 18). Also, the effect of FKBP12.6<sup>D375</sup> on Ca transient amplitude at 0.1 Hz was preserved after TAC. \*P < 0.05 vs. WT sham; †P < 0.05 vs. WT TAC. This is associated with a significantly enlarged caffeine-evoked Ca transient (measured at 1 Hz) in FKBP12.6<sup>D375</sup> mice subjected to TAC and (d) fewer increase in Ca spark frequency (CaSpF) after TAC in FKBP12.6<sup>D375</sup> vs. WT mice. \*P < 0.05.

phospholamban was markedly reduced in both CaMKII $\delta$ c and DT mice (Fig. 5d), suggesting that increased phospholamban-SERCA2 association may be the underlying mechanism leading to the reduced SERCA2 function and preventing recovery of SR Ca content to levels of WT in DT mice.

### 3.3. Impact of FKBP12.6<sup>D375</sup> on pressure overload-induced remodeling

We examined the impact of FKBP12.6<sup>D375</sup> on an alternative form of hypertrophy and impaired cardiac contractile function in mice subjected to TAC. Mice subjected to TAC exhibited profound left ventricular hypertrophy (hw/bw 11.13 ± 0.51 mg/g, n = 13 vs. sham 7.86 ± 0.37 mg/g, n = 11; P < 0.05) (Fig. 6a). After 8 weeks of TAC, echocardiography demonstrated that hypertrophy was at the transition from concentric to eccentric hypertrophy, as left ventricular end-systolic diameter (LVESD) were significantly larger and end-diastolic diameter (LVEDD) was equal to sham (Supplemental Fig. 1), despite increased septum thickness and higher hw/bw. In accordance with early cardiac decompensation, fractional shortening was significantly reduced compared to sham operated littermates in WT (Fig. 6b). Transgenic expression of FKBP12.6<sup>D375</sup> did not prevent hypertrophy or impairment of fractional shortening after TAC, demonstrating that FKBP12.6<sup>D375</sup> expression cannot delay or blunt the development of eccentric

hypertrophy and functional decline induced by pressure overload (Fig. 6). Again, postrest Ca transient amplitude, but not Ca transient amplitude at near physiological stimulation frequencies, was increased in FKBP12.6<sup>D375</sup> TG compared to WT mice. Caffeine-induced SR Ca release was markedly higher in FKBP12.6<sup>D375</sup> TG mice following TAC compared to sham and compared to WT mice subjected to TAC (Fig. 6c). However, since postrest Ca transient amplitude and SR Ca content was increased or similar to sham in WT animals, respectively, Ca leak was unlikely to be a critical determinant of maladaptive changes following TAC in our model. Moreover, CaSpF was increased upon TAC in WT mice but not different between CaMKII $\delta$ c and DT mice (Fig. 6d), again suggesting reducing RyR2 opening frequency in diastole may not be a suitable strategy to prevent hypertrophy or functional decline in pressure overload-induced heart disease.

## 4. Discussion

Like PKA, CaMKII is activated in heart failure and increased activity of CaMKII $\delta$ c was previously examined in TG mice *in vivo* and found to mimic several features of severe heart failure including increased hw/bw ratio, decreased Ca transient amplitude and SR Ca content [26]. Here, CaMKII $\delta$ c TG mice also exhibited the previously described paradox of a higher CaSpF despite lower SR Ca content [26,30]. CaMKII

is directly associated with RyR2 and inhibition of CaMKII with KN-93 or autocalmitide-2-related inhibitory peptide (AIP) in isolated cardiac myocytes markedly decreased CaSpF, suggesting CaMKII can directly affect Ca release at RyR2. *In vivo*, a proportion of altered RyR2 function in CaMKII $\delta$ c-induced heart failure can be expected to occur also via additional stress kinases, as these will be activated secondary to a systemic hyperadrenergic state following cardiac failure or via additional mechanical or neurohumoral stimuli [10]. PKA was suggested to play a key role in this context [9,20,31]. *In vivo*, knockout of FKBP12.6 can cause cardiac hypertrophy in mice [7] and enhanced expression of a FKBP12.6 mutant that bound to RyR2 with supranormal affinity despite PKA phosphorylation, prevented myocardial infarction-induced heart failure [12]. Thus, PKA-mediated phosphorylation of RyR2 and subsequent Ca leak was suggested as an important and common mechanism of heart failure. In addition, genetically enhanced RyR2 leakiness via knock-in of the RyR-R176Q mutation increased pathological remodeling and calcineurin-dependent NFAT activity upon pressure overload in mice [32]. However, the relative contribution of SR Ca leak and PKA is contentious and several additional mechanisms controlling Ca handling and RyR2 in heart failure were demonstrated over the past decades [24,33–35]. In CaMKII $\delta$ c overexpressing myocytes, we have previously deciphered that despite enhanced RyR2 Ca sensitivity this mechanism does not contribute appreciably to negative inotropy in the presence of unaltered SR Ca uptake function [29]. Likewise, another study suggests that in heart failure, CaMKII $\delta$ c expression is increased, SR Ca leak is enhanced and blockade of CaMKII $\delta$ c can greatly enhance SR Ca content, without major changes in systolic function [19].

Therefore, we speculate that an important component of CaMKII $\delta$ c-induced Ca dysregulation in heart failure might also depend on PKA-dependent and -independent FKBP12.6 dissociation of RyR2. To test this possibility, we induced hypertrophy and heart failure (1) based on direct overactivation of CaMKII in CaMKII $\delta$ c TG mice and (2) in pressure overload-induced remodeling, in order to compare FKBP12.6<sup>D37S</sup> sticky mutant mice with WT littermates for morphological and functional differences. We found that enhanced expression of FKBP12.6<sup>D37S</sup> was associated with enhanced Ca transients during rest periods (i.e., at low stimulation rates) and reduced CaSpF. This suggested transgenic FKBP12.6<sup>D37S</sup> expression led to lower open probability of RyR2 and less Ca leak in DT mice and these findings are completely in line with previous results obtained *in vitro* in isolated cardiomyocytes with reduced Ca transients, enhanced SR Ca content and reduced spark frequency upon FKBP12.6 over-expression [2–4]. Despite these obvious effects of FKBP12.6<sup>D37S</sup> on RyR2, neither hypertrophy nor heart failure was substantially prevented by enhanced expression of the sticky mutant FKBP12.6<sup>D37S</sup> *in vivo*. This may be explained in part by the observation that in addition to the effects of CaMKII on RyR2 and intracellular Ca handling, other mechanisms, e.g., direct phosphorylation of HDAC resulting in activation of hypertrophic pathways in the nucleus, may play an important role in hypertrophy and heart failure [36]. In our study, lack of a significant functional rescue strongly suggests that FKBP12.6 is not sufficient to antagonize CaMKII $\delta$ c-induced functional decay, despite marked restoration of RyR2 open probability. This is mechanistically explained (in addition to incomplete reduction of leak) by a lack of SR Ca-reuptake via SERCA2 (Fig. 4c) which is less active due to dephosphorylation of phospholamban at Ser-16 (Fig. 5d). Importantly, phospholamban dephosphorylation was previously shown to result from enhanced activity of phosphatases rather than reduced activity of PKA, and this is a frequent finding in heart failure and a major contributor to reduced SERCA2A activity [37]. Despite overexpression of CaMKII, Thr-17 phosphorylation was not enhanced. This is in line with a previous study demonstrating Ser-16 phosphorylation is a prerequisite for Thr-17 phosphorylation *in vivo* [38]. Obviously, CaMKII is a pleiotropic kinase and alters the function of several targets other than RyR2 [36]. Indeed, the most

likely explanation for the lack of a functional or morphological rescue is that these targets, rather than CaMKII-induced Ca leak, are central to the development of hypertrophy or heart failure via CaMKII. As with all overexpression studies, it should be noticed as a limitation of this model that these mechanisms might be disproportionately activated and could impede beneficial effects of FKBP12.6. To address this issue and to examine an alternative form of maladaptive hypertrophy, we next examined the potential of FKBP12.6<sup>D37S</sup> to improve pressure overload-induced hypertrophy and failure. CaSpF was significantly higher in mice subjected to TAC, but SR Ca content was not reduced suggesting that compensatory mechanisms (i.e., enhanced SERCA2 function) may be involved. The significant increase in CaSpF between sham vs. TAC operated WT mice was blunted in CaMKII $\delta$ c vs. DT, which may explain why SR Ca content was significantly increased in DT. However, heart weight/body weight or fractional shortening did not improve, suggesting that reduction of RyR2 leak is of little benefit in pressure overload-induced hypertrophy and failure. A limitation of our study is the examination of SR Ca handling in the mouse model. Mammals and humans that operate at a lower heart rate where SR leak may play a more significant role in the control of the SR may still benefit from strategies targeting Ca leak. According to the model of neuroendocrine activation of RyR2 leak, reduced fractional shortening should be associated with hyperactivation of PKA and SR Ca leak. However, our data suggest that these changes were not prominent in this model. These observations are in line with a recent study by Van Oort et al. who found only a trend (but no statistically significant increase) in Ca leak following 8 weeks of TAC in mice. However, in that study, leak was evoked by the RyR2-R176Q mutation, which renders RyR2 leakier following catecholaminergic stimulation and in these mutant mice, indeed hypertrophy was enhanced [32]. It is possible that the comparably milder dysfunction with WT RyR2 in our study did not suffice to uncover the potential of reducing SR Ca leak and increasing coupled gating by FKBP12.6. This is supported by the fact that Ca transient amplitudes were enhanced rather than reduced in TAC at 0.1 Hz (where diastolic effects are pronounced). On the other hand, this implies that significant hypertrophy and functional decline may well occur without the involvement of profound alterations in SR Ca content and FKBP12.6-associated mechanisms. This would suggest that FKBP12.6/Ca leak-targeted therapies might be of greatest benefit specifically in severe states of RyR2 dysfunction. However, for the latter scenario our data suggest that profound activation of CaMKII $\delta$ c, as observed in severe heart failure, could (in part) antagonize RyR2-FKBP12.6-targeted therapies for heart failure. Severe RyR2 isolated dysfunction without CaMKII activation may also occur in specific types of arrhythmia in the absence of contractile dysfunction and given ample evidence that FKBP12.6 targeted therapies may be suitable for such entities, our data suggest this indication might deserve superior priority.

In summary, lack of a significant functional or morphological benefit in both CaMKII $\delta$ c overexpressing mice and in pressure overload-induced remodeling implies that important prohypertrophic and maladaptive pathways resist strategies aiming at reconstitution of FKBP12.6-RyR2 association in murine hypertrophy and heart failure. While our results indicate limitations of FKBP12.6/Ca leak-targeted treatment strategies for hypertrophy and heart failure *in vivo*, improvement of Ca handling by enhanced FKBP12.6 expression was a prominent finding, indicating aspects of maladaptive entities can indeed be rescued on the molecular level.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.jmcc.2010.08.016.

## Funding

This work was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to G.H. and T.S. (1233/7-3) and to L.S.M. (MA 1982/2-2

and MA 1982/4-1). T.S. and S.W. were supported by the research program, Faculty of Medicine, Georg-August-University Göttingen. This work was also supported in part by the Fondation Leducq Awards "Alliance for Calmodulin Kinase Signaling in Heart Disease."

### Conflict of interest

None declared.

### Acknowledgments

We would like to thank Jessica Spitalieri, Gudrun Müller, Timo Schulte, and Thomas Sowa for excellent technical assistance.

### References

- [1] Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* Jan 10 2002;415(6868):198–205.
- [2] Prestle J, Janssen PM, Janssen AP, Zeitz O, Lehnart SE, Bruce L, et al. Overexpression of FK506-binding protein FKBP12.6 in cardiomyocytes reduces ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> leak from the sarcoplasmic reticulum and increases contractility. *Circ Res* Feb 2 2001;88(2):188–94.
- [3] Loughrey CM, Seidler T, Miller SL, Prestle J, MacEachern KE, Reynolds DF, et al. Over-expression of FK506-binding protein FKBP12.6 alters excitation–contraction coupling in adult rabbit cardiomyocytes. *J Physiol* May 1 2004;556(Pt 3):919–34.
- [4] Gomez AM, Schuster I, Fauconnier J, Prestle J, Hasenfuss G, Richard S. FKBP12.6 overexpression decreases Ca<sup>2+</sup> spark amplitude but enhances [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* Nov 2004;287(5):H1987–93.
- [5] George CH, Sorathia R, Bertrand BM, Lai FA. In situ modulation of the human cardiac ryanodine receptor (hRyR2) by FKBP12.6. *Biochem J* Mar 1 2003;370(Pt 2):579–89.
- [6] Gellen B, Fernandez-Velasco M, Briec F, Vinet L, LeQuang K, Rouet-Benzineb P, et al. Conditional FKBP12.6 overexpression in mouse cardiac myocytes prevents triggered ventricular tachycardia through specific alterations in excitation–contraction coupling. *Circulation* Apr 8 2008;117(14):1778–86.
- [7] Xin HB, Senbonmatsu T, Cheng DS, Wang YX, Copello JA, Ji GJ, et al. Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* Mar 21 2002;416(6878):334–8.
- [8] Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, et al. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* Jun 27 2003;113(7):829–40.
- [9] Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Roseblit N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* May 12 2000;101(4):365–76.
- [10] Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jan 17 2006;103(3):511–8.
- [11] Marks AR. Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol* Apr 2001;33(4):615–24.
- [12] Huang F, Shan J, Reiken S, Wehrens XH, Marks AR. Analysis of calstabin2 (FKBP12.6)–ryanodine receptor interactions: rescue of heart failure by calstabin2 in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* Feb 28 2006;103(9):3456–61.
- [13] Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, van der Nagel R, Morales R, Sun J, et al. Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jul 5 2005;102(27):9607–12.
- [14] Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Doi M, Tokuhisa T, Okuda S, et al. FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* Jan 28 2003;107(3):477–84.
- [15] Marks AR. Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ Res* Jul 7 2000;87(1):8–11.
- [16] Doi M, Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Tokuhisa T, Okuda S, et al. Propranolol prevents the development of heart failure by restoring FKBP12.6-mediated stabilization of ryanodine receptor. *Circulation* Mar 19 2002;105(11):1374–9.
- [17] Reiken S, Gaburjakova M, Gaburjakova J, He Kl KL, Prieto A, Becker E. beta-adrenergic receptor blockers restore cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) structure and function in heart failure. *Circulation* Dec 4 2001;104(23):2843–8.
- [18] Kohno M, Yano M, Kobayashi S, Doi M, Oda T, Tokuhisa T, et al. A new cardioprotective agent, JTV519, improves defective channel gating of ryanodine receptor in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* Mar 2003;284(3):H1035–42.
- [19] Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ Res* Dec 9 2005;97(12):1314–22.
- [20] Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* Apr 2 2004;94(6):e61–70.
- [21] Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Gilbert EM, Sandoval A, Rasmussen R, et al. beta-Adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* Aug 1990;82(2 Suppl):112–25.
- [22] Hasenfuss G, Seidler T. Treatment of heart failure through stabilization of the cardiac ryanodine receptor. *Circulation* Jan 28 2003;107(3):378–80.
- [23] Eisner DA, Kashimura T, O'Neill SC, Venetucci LA, Trafford AW. What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis? *J Mol Cell Cardiol* Apr 2009;46(4):474–81.
- [24] Benkusky NA, Weber CS, Scherman JA, Farrell EF, Hacker TA, John MC, et al. Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* Oct 12 2007;101(8):819–29.
- [25] MacDonnell SM, Garcia-Rivas G, Scherman JA, Kubo H, Chen X, Valdivia H, et al. Adrenergic regulation of cardiac contractility does not involve phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808. *Circ Res* Apr 25 2008;102(8):e65–72.
- [26] Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross Jr J, Bers DM, et al. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* May 2 2003;92(8):912–9.
- [27] Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litvin SE. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* Sep 2003;285(3):H1261–9.
- [28] Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J Clin Invest* Dec 2006;116(12):3127–38.
- [29] Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, et al. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* Feb 3 2006;98(2):235–44.
- [30] Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKIIdeltaC overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res* May 2 2003;92(8):904–11.
- [31] Marks AR, Reiken S, Marx SO. Progression of heart failure: is protein kinase a hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor? *Circulation* Jan 22 2002;105(3):272–5.
- [32] van Oort RJ, Respress JL, Li N, Reynolds C, De Almeida AC, Skapura DG, et al. Accelerated development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy and dysfunction in an RyR2–R176Q knockin mouse model. *Hypertension* 2010;55(4):932–8.
- [33] Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 2008;70:23–49.
- [34] Zhang X, Tallini YN, Chen Z, Gan L, Wei B, Doran R, et al. Dissociation of FKBP12.6 from ryanodine receptor type 2 is regulated by cyclic ADP-ribose but not beta-adrenergic stimulation in mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* Nov 1 2009;84(2):253–62.
- [35] Jiang MT, Lokuta AJ, Farrell EF, Wolff MR, Haworth RA, Valdivia HH. Abnormal Ca<sup>2+</sup> release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ Res* Nov 29 2002;91(11):1015–22.
- [36] Zhang T, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, et al. CaMKIIdeltaC isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J Biol Chem* Nov 30 2007;282(48):35078–87.
- [37] Sande JB, Sjaastad I, Hoehn IB, Bokenes J, Tonnesen T, Holt E, et al. Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res* Feb 1 2002;53(2):382–91.
- [38] Chu G, Kranias EG. Functional interplay between dual site phospholamban phosphorylation: insights from genetically altered mouse models. *Basic Res Cardiol* 2002;97(Suppl 1):143–8.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Lars S. Maier für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas sowie für seine Unterstützung und sein Vertrauen. Sein Enthusiasmus und sein Engagement haben mir geholfen, auch über Phasen des Zweifels hinweg zu kommen. Seine stets hilfreichen Anmerkungen waren mir bei der Durchführung der Versuche, bei der Interpretation der Ergebnisse sowie bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit von unschätzbarem Wert.

Dr. Stefan Wagner danke ich für seine große Hilfe insbesondere bei der Durchführung und Interpretation einiger meiner Experimente. Mein Dank gilt Dr. Tim Seidler für das Konstrukt der FKBP12.6<sup>D37S</sup>-transgenen Mäuse sowie für konstruktive Diskussionen der Ergebnisse. Dr. Tim Seidler und Dr. Stefan Wagner möchte ich des Weiteren auch für eine hervorragende Zusammenarbeit beim gesamten D37S-Projekt danken.

Weiterhin möchte ich Dr. Samuel Sossalla danken, da er mir seinerzeit das Labor Lars Maier zur Anfertigung einer experimentellen kardiologischen Doktorarbeit empfohlen hat.

Mein Dank gilt Dr. Michael Kohlhaas, der mich in der Initialphase dieser Arbeit in einige der Arbeitstechniken eingearbeitet hat.

Ich danke Stefan Neef für seine Hilfsbereitschaft, sein offenes Ohr, sowie für zahlreiche gute und produktive Ratschläge.

Weiterhin bin ich meinen Mitdoktoranden Dr. Daniel Wadsack, Dr. Hanna Ruf und Johannes Vogt für die stets kollegiale Zusammenarbeit zu Dank verpflichtet. Für die technische Unterstützung danke ich Thomas Sowa, Timo Schulte und Gudrun Müller.

Der gesamten Arbeitsgruppe L. Maier danke ich für eine freundliche und kollegiale Atmosphäre sowie für gute wissenschaftliche Diskussionen. Namentlich nennen möchte ich noch Herrn Dr. Can Sag, Herrn Dr. Adam Rokita sowie Frau Dr. Natalyia Dybkova. Mein Dank gilt auch Tobias und Martin Hellenkamp für zahlreiche Ratschläge und Hilfestellungen bei technischen Fragen.

# Lebenslauf

Geboren wurde ich am 28. August 1981 in Koblenz. Nach dem Besuch der Grundschule wechselte ich 1992 an das Bertha-von-Suttner Gymnasium Andernach, wo ich am bilingualen deutsch-französischen Zug teilgenommen habe. Die elfte Klasse verbrachte ich in Besançon, Frankreich, wo ich das Lycée Claude-Nicolas-Ledoux besuchte. Anschließend setzte ich meine schulische Laufbahn am Bertha-von-Suttner Gymnasium Andernach fort, die ich im Jahr 2001 mit dem Abitur abschloss. Von 2001 bis 2002 leistete ich meinen Zivildienst beim Rettungsdienst Andernach ab und absolvierte eine Ausbildung zum Rettungssanitäter. Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester 2002 in Göttingen. Im März 2006 fing ich mit den experimentellen Arbeiten für die vorliegende Promotionsschrift in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Betreuung von Prof. Dr. L. Maier an. Im Jahr 2008 war ich in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie darüber hinaus als studentische Hilfskraft angestellt und für die studentische Betreuung am Auskultationstrainer Harvey zuständig. Mein erstes Tertial des Praktischen Jahres absolvierte ich im August 2007 in der Abteilung für Anästhesie der Universitätsmedizin Göttingen. Es folgten das chirurgische Tertial am Hôpital St.-Pierre, La Réunion sowie das Tertial in Innerer Medizin in der Ammerlandklinik Westerstede. Meine ärztliche Prüfung legte ich im Dezember 2008 ab. Im Mai 2009 trat ich meine erste Stelle als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für Translationale Kardiologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. S. Lehnart an. Im Rahmen meiner Arbeit dort konnte ich im April 2010 einen Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. W. Lederer an der Universität Maryland in Baltimore, USA verbringen. Im studentischen Modul „Kardiopulmonale Lehre“ im Sommersemester 2010 konnte ich als Dozent beim Unterricht am Krankenbett wertvolle Lehrerfahrungen an der Universitätsmedizin Göttingen sammeln. Darüber hinaus beschäftigte ich mich weiterhin mit der Fertigstellung der vorliegenden Dissertationsarbeit. Seit Juli 2010 bin ich als Assistenzarzt der Kardiologie der Universitätsmedizin Göttingen angestellt. Im Rahmen einer Kooperation zwischen der UMG und dem Rhön-Klinikum Herzberg bin ich seit dem 01. September 2010 bis voraussichtlich Ende Februar 2011 in der Inneren Medizin des Krankenhauses Herzberg angestellt, wo ich neben kardiologischen Erfahrungen auch Erfahrungen in Gastroenterologie sowie in der allgemeininternistischen Notaufnahme sammeln kann.