

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie

(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase  
(CaMKII) verbessert die Kontraktilität von terminal  
insuffizientem Myokard des Menschen**

**INAUGURAL - DISSERTATION**

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

vorgelegt von

Nina Fluschnik

aus

Berlin

Göttingen 2011

**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel

**I. Berichtstatter:** Prof. Dr. med. Lars S. Maier

**II. Berichtstatterin:** Prof. Dr. med. Katschinski

**III. Berichtstatter:** Prof. Dr. med. Hülsmann

**IV. Berichtstatter:** Prof. Dr. med. Oppermann

**Tag der mündlichen Prüfung:** 10. Januar 2012

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1</b>	<b>Herzinsuffizienz .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>Die Physiologie des Myokards .....</b>	<b>11</b>
1.2.1	Die elektromechanische Kopplung: Von der Erregung zur Kontraktion .....	11
1.2.2	Der Querbrückenzyklus .....	12
1.2.3	Die Relaxation .....	13
<b>1.3</b>	<b>Die kardialen Ryanodinrezeptoren (RyR2).....</b>	<b>14</b>
<b>1.4</b>	<b>Beeinflussung der Inotropie .....</b>	<b>15</b>
1.4.1	Frank-Starling-Mechanismus.....	15
1.4.2	Kraft-Frequenz-Beziehungen .....	16
1.4.3	Inotropie durch das sympathische System.....	16
<b>1.5</b>	<b>Die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) .....</b>	<b>17</b>
1.5.1	Charakteristika der CaMKII .....	17
1.5.2	Die Aktivierung der CaMKII .....	17
1.5.3	Die Inaktivierung und pharmakologische Hemmung der CaMKII .....	18
1.5.4	Die Rolle der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung .....	19
<b>1.6</b>	<b>Pathophysiologie der Herzinsuffizienz .....</b>	<b>20</b>
<b>1.7</b>	<b>Fragestellung der Dissertation .....</b>	<b>22</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Probengewinnung von humanem Ventrikel.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Pharmakologische Intervention mit CaMKII-Inhibitoren .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Muskelstreifenexperimente.....</b>	<b>24</b>
2.3.1	Dissektionslösung und Krebs-Henseleit-Messlösung .....	24
2.3.2	Versuchsaufbau der Muskelstreifenexperimente .....	25
2.3.3	Präparation rechtsventrikulärer Muskelstreifen .....	26
2.3.4	Versuchsprotokoll zur Überprüfung der Effekte der CaMKII-Inhibitoren .....	27
2.3.5	Post-Pausen-Verhalten .....	28
2.3.6	Datenakquisition und -auswertung .....	29
<b>2.4</b>	<b>Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalysen.....</b>	<b>30</b>
2.4.1	Lösungen und verwendete Substanzen für Western Blots .....	30
2.4.2	Anfertigung der Proteinhomogenate und Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration .....	31
2.4.3	SDS-Gelelektrophorese und elektrophoretischer Transfer .....	32
2.4.4	Antikörper .....	34
<b>2.5</b>	<b>Isolation humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten .....</b>	<b>35</b>

---

2.5.1	Lösung .....	35
2.5.2	Isolationsprotokoll .....	35
<b>2.6</b>	<b>Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messungen via Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopie.</b>	<b>36</b>
2.6.1	Lösungen für Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopiemessungen .....	36
2.6.2	Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 .....	37
<b>2.6.3</b>	<b>Die Epifluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>38</b>
2.6.3.1	Aufbau und Prinzip des Fluoreszenzsetups .....	38
2.6.3.2	Versuchsprotokoll zur Messung von Caffein-induzierten Ca <sup>2+</sup> -Transienten ..	40
2.6.3.3	Datenauswertung .....	41
<b>2.6.4</b>	<b>Die konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>42</b>
2.6.4.1	Grundlagen .....	42
2.6.4.2	Versuchsprotokoll zur Messung von SR-Ca <sup>2+</sup> -Sparks .....	43
2.6.4.3	Datengenerierung und -auswertung .....	44
<b>2.7</b>	<b>Statistik und Datenauswertung .....</b>	<b>44</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Klinische Daten der verwendeten humanen Herzen .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>CaMKII-Expression im humanen ventrikulären Myokard.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3</b>	<b>Die Effekte der CaMKII-Inhibition auf die Kontraktilität terminal insuffizienter Muskelstreifen .....</b>	<b>49</b>
3.3.1	Ausgangsbedingungen .....	49
3.3.2	Beeinflussung der Inotropie durch den CaMKII-Inhibitor KN-93 .....	50
3.3.3	Relaxationskinetik in Gegenwart des CaMKII-Inhibitors KN-93 .....	52
3.3.4	Beeinflussung der Kraft-Frequenz-Beziehungen durch AIP .....	53
3.3.5	Relaxationskinetik unter AIP-Exposition .....	54
<b>3.4</b>	<b>Die Auswirkungen der CaMKII-Inhibition auf den SR-Ca<sup>2+</sup>-Haushalt .....</b>	<b>55</b>
3.4.1	Post-Pausen-Verhalten .....	55
3.4.2	SR-Ca <sup>2+</sup> -Gehalt .....	56
<b>3.5</b>	<b>Die Effekte von AIP auf die RyR2-Funktion .....</b>	<b>57</b>
<b>3.6</b>	<b>Der Phosphorylierungsstatus verschiedener durch die CaMKII regulierter Proteine .....</b>	<b>59</b>
3.6.1	Die Effektivität der CaMKII-Inhibition .....	60
3.6.2	Die Phosphorylierung von Phospholamban .....	60
3.6.3	Der RyR2-Phosphorylierungsstatus .....	61
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1	Erhöhte CaMKII-Expression im humanen terminal insuffizienten Myokard .....	63
4.2	Der positiv inotrope Effekt unter akuter CaMKII-Inhibition .....	64

---

4.3	Beeinflussung des SR-Ca <sup>2+</sup> -Stoffwechsels durch CaMKII-Inhibition .....	66
4.4	Ein vermindertes SR-Ca <sup>2+</sup> -Leck über die RyR2 als Schlüsselrolle für den positiv inotropen Effekt?.....	67
4.5	Unveränderte Relaxationskinetik.....	70
4.6	Limitationen der Arbeit.....	71
4.7	Ausblick und klinische Relevanz .....	72
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	.....	14
Abb. 1.2	.....	18
Abb. 1.3	.....	20
Abb. 2.1	.....	26
Abb. 2.2	.....	27
Abb. 2.3	.....	36
Abb. 2.4	.....	38
Abb. 2.5	.....	40
Abb. 2.6	.....	41
Abb. 2.7	.....	43
Abb. 3.1	.....	46
Abb. 3.2	.....	47
Abb. 3.3	.....	48
Abb. 3.4	.....	49
Abb. 3.5	.....	50
Abb. 3.6	.....	51
Abb. 3.7	.....	52
Abb. 3.8	.....	53
Abb. 3.9	.....	53
Abb. 3.10	.....	54
Abb. 3.11	.....	55
Abb. 3.12	.....	56
Abb. 3.13	.....	57
Abb. 3.14	.....	58
Abb. 3.15	.....	59
Abb. 3.16	.....	60
Abb. 3.17	.....	61
Abb. 3.18	.....	62

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	.....	23
Tab. 2.2	.....	24
Tab. 2.3	.....	25
Tab. 2.4	.....	30

Tab. 2.5	.....	30
Tab. 2.6	.....	30
Tab. 2.7	.....	31
Tab. 2.8	.....	34
Tab. 2.9	.....	34
Tab. 2.10	.....	35
Tab. 2.11	.....	36
Tab. 2.12	.....	37
Tab. 3.1	.....	45
Tab. 3.2	.....	48
Tab. 3.3	.....	59

## **Formelverzeichnis**

Formel 2.1	.....	28
Formel 2.2	.....	37
Formel 2.3	.....	38
Formel 2.4	.....	41
Formel 2.5	.....	44
Formel 2.6	.....	44
Formel 2.7	.....	44

## Abkürzungsverzeichnis

AIP	Autocamtide-2-related inhibitory peptide
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumpersulfat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BDM	2,3-Butandion-Monoxim
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaM	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
F/F <sub>0</sub>	Quotient aus systolischer und diastolischer Fluoreszenz
Fluo-3	Ca <sup>2+</sup> -Fluoreszenzfarbstoff N-[4-[6-[(acetyloxy)methoxy]-2,7-dichloro-3-oxo-3H-xanthen-9-yl]-2-[2-[2-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]2-oxyethyl]amino]-5-methylphenoxy]phenyl]-N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxyethyl]
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICM	Ischämische Herzerkrankung bzw. Kardiomyopathie
K <sup>+</sup>	Kalium
KHS-Lösung	Krebs-Henseleit-Lösung
KN-92	CaMKII-Inhibitor (inaktives Analogon) 2-[N-(2-Methoxybenzenesulfonyl)]-amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamin
KN-93	aktiver CaMKII-Inhibitor 2-[N-(4-Hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]-amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamin
LV	Linker Ventrikel
MW	Molekulargewicht
Na <sup>+</sup>	Natrium
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher

P-Wert	Signifikanzniveau
PCWP	Pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PR-Kontraktion	post rest= Post-Pausen-Kontraktion
RV	Rechter Ventrikel
RT	Raumtemperatur
RT 50%	Zeit bis zu 50% der Relaxation
RyR2	Ryanodinrezeptoren vom kardialen Subtyp
SS-Kontraktion	steady-state-Kontraktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Ser	Serin
SERCA2a	kardiale Sarkoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tdev	entwickelte Kraft
Tdia	diastolische Spannung
Thr	Threonin
TTP	Zeit zum Peak

# 1. Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

Bei der Herzinsuffizienz handelt es sich pathophysiologisch um eine Erkrankung des Herzmuskels mit der Unfähigkeit, die peripheren Organe des Körpers mit ausreichend Blut zu versorgen und somit den Sauerstoffbedarf für den Gewebestoffwechsel sicherzustellen. Ursächlich für eine Herzinsuffizienz ist oftmals eine ischämische Kardiomyopathie als Endzustand einer koronaren Herzerkrankung (MC MURRAY und STEWART 2000) sowie eine dilatative Kardiomyopathie mit multifaktorieller Ätiologie. Je nach Pathophysiologie kann die Herzinsuffizienz in eine systolische oder diastolische Herzinsuffizienz eingeteilt werden. Kennzeichen einer systolischen Funktionsstörung ist eine Reduktion der ventrikulären Ejektionsfraktion. Dagegen ist die diastolische Herzinsuffizienz durch typische klinische Symptome einer chronischen Herzinsuffizienz bei echokardiographisch erhaltener systolischer Pumpfunktion gekennzeichnet (HOPPE et al. 2005). Eine Einteilung dieses klinischen Syndroms kann u.a. nach dem subjektiven Leistungsvermögen der Patienten nach der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA I-IV) vorgenommen werden, wobei die Klasse NYHA IV als terminale Herzinsuffizienz mit Ruhebeschwerden bezeichnet wird. Ausdruck findet diese in den typischen Symptomen Dyspnoe und Leistungsminderung aufgrund von Flüssigkeitsretention mit Stauungszeichen, die im Zuge der kardialen Funktionsstörung entstehen. Doch welche Bedeutung kommt der Herzinsuffizienz heutzutage zu?

Gemäß Angaben des Statistischen Bundesamtes stellt die Herzinsuffizienz die häufigste Diagnose für einen stationären Krankenhausaufenthalt in Deutschland dar (STATISTISCHES BUNDESAMT 2011). Infolgedessen ist sie zu einer ökonomischen Herausforderung als eine der kostenintensivsten chronischen Erkrankungen mit einem Anteil von 1-2% an den Krankheitskosten geworden (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010b). Aufgrund der demographischen Entwicklung und der Abnahme der Sterblichkeit durch einen Myokardinfarkt, als häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz, wird eine Zunahme von Prävalenz und Inzidenz prognostiziert. Die Prävalenz für die Gesamtbevölkerung liegt derzeit bei etwa 1%, jenseits eines Alters von 80 Jahren bereits bei 10% (HOPPE et al. 2005, MC MURRAY und STEWART 2000). Obwohl in den vergangenen Jahren eine Senkung der Gesamtmortalität durch verbesserte Therapiestrategien erreicht wurde, zu nennen seien  $\beta$ -Blocker (HJALMARSON et al. 2000, HOPPE et al. 2005, KRUM et al. 2003, PACKER et al. 1996), ACE-Hemmer (CLELAND et al. 1997, HOPPE et al. 2005) und AT1-

Antagonisten (COHN und TOGNONI 2001, GRANGER et al. 2003, HOPPE et al. 2005), findet man die Herzinsuffizienz weiterhin an dritter Stelle bezogen auf die absolute Anzahl der Todesursachen in Deutschland (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010a). Der Tod tritt zumeist durch Pumpversagen oder tachykarde Rhythmusstörungen und den plötzlichen Herztod ein, wobei die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (NYHA II-IV) immer noch 40-60% beträgt (MC KEE et al. 1971, MC MURRAY und STEWART 2000). Angesichts der zunehmenden Bedeutung der Herzinsuffizienz muss sowohl deren Ätiologie besser aufgeklärt als auch deren Therapie zukünftig verbessert werden.

Diverse Publikationen zeigten in den vergangenen Jahren, dass in der Fehlregulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels und in den Prozessen der elektromechanischen Kopplung zentrale Ursachen für die kontraktile Dysfunktion zu suchen sind (GWATHMEY et al. 1987, HASENFUSS und PIESKE 2002, HASENFUSS et al. 1994, MAIER et al. 2003, MULIERI et al. 1992, ZHANG und BROWN 2004). Gekennzeichnet sind diese durch ein Missverhältnis zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung,  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, worin unterschiedliche Proteine involviert sind. Um diese Zusammenhänge zu verstehen, folgt zunächst eine Einführung in die Physiologie des Myokards. Basierend auf diesen einleitenden Erläuterungen ergibt sich schließlich die konkrete Fragestellung dieser Dissertation.

## 1.2 Die Physiologie des Myokards

### 1.2.1 Die elektromechanische Kopplung: Von der Erregung zur Kontraktion

Die Einführung beginnt mit der Darstellung der elektromechanischen Kopplung, welche den Prozess zwischen elektrischer Erregung über den intrazellulären Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bis hin zur Kontraktion der Herzmuskelzelle beschreibt. Bereits 1883 entdeckte Sidney Ringer die zentrale Funktion des  $\text{Ca}^{2+}$  für die Kontraktionsvorgänge an isolierten Froschherzen (RINGER 1883, RINGER und BUXTON 1885).

Ein elektrischer Stimulus erreicht in Form eines Aktionspotentials (Abb. 1.1, 1) die Herzmuskelzelle über die transversalen (T-) Tubuli (Abb. 1.1, 2), welche Invaginationen der sarkolemmalen Membran darstellen. Das fortgeleitete Aktionspotential führt zur Depolarisation der Zellmembran von einem Ruhemembranpotential von -80 mV zu einem positiven Membranpotential von +30-50 mV (BERS 2001). Dieser Aufstrich des Aktions-

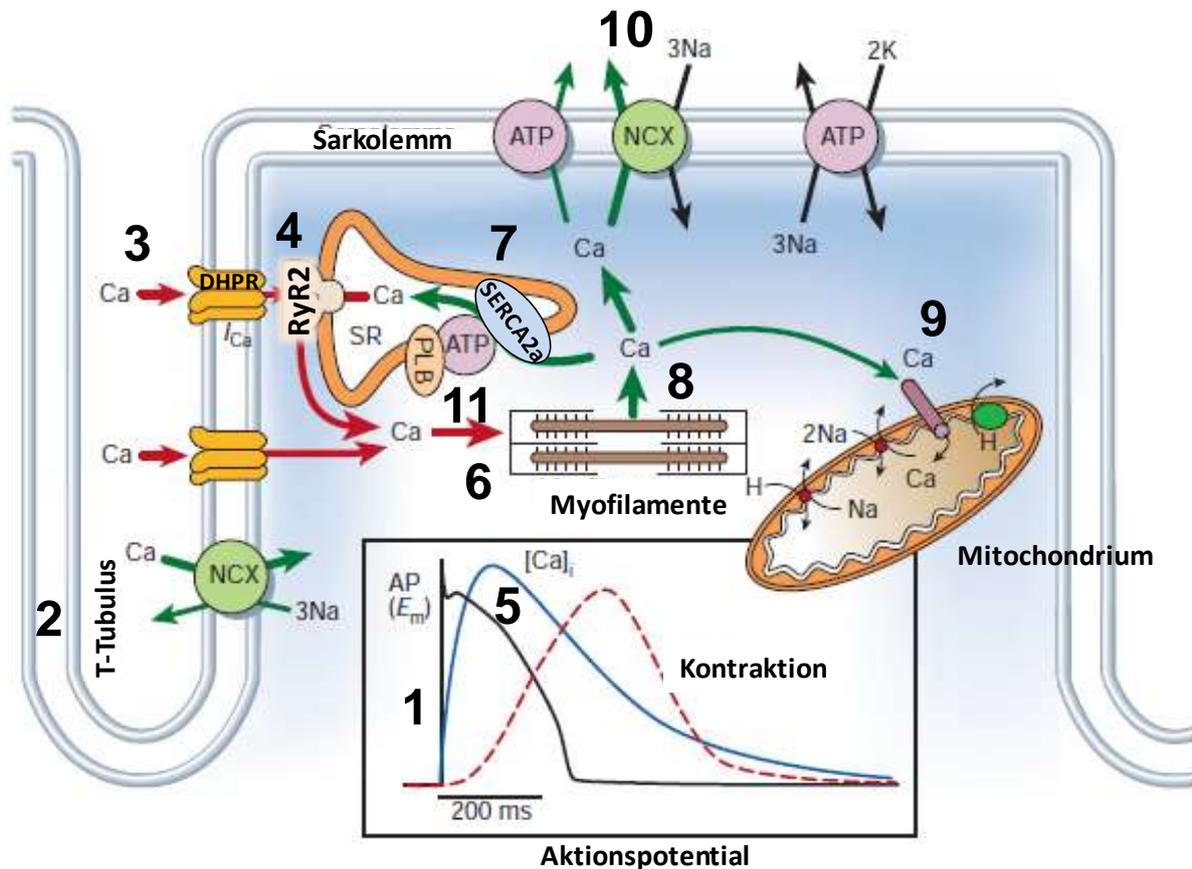
potentials wird durch schnelle  $\text{Na}^+$ -Kanäle generiert. Daraufhin öffnen sich sogenannte einwärtsgerichtete, spannungsabhängige L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Dihydropyridin-Rezeptoren=DHPR) (Abb. 1.1, 3). Durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die sarkolemmalen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erfolgt eine getriggerte und verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttungskanäle, den sogenannten Ryanodinrezeptoren (RyR2) (Abb. 1.1, 4), aus dem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherorganell des Kardiomyozten, dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (BASSANI JW 1993, DELBRIDGE et al. 1997). Ermöglicht wird diese sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (FABIATO A 1983, FABIATO A 1985, FABIATO A und FABIATO F 1975) durch die funktionelle und räumliche Organisation von 10-25 L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und 100 geclusterten RyR2 im Bereich der T-Tubuli und des SR in Gestalt von „Couplons“ (BERS und GUO 2005, ZALK et al. 2007). Der Anstieg der freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ~100 nM auf ~1  $\mu\text{M}$  resultiert dabei zum überwiegenden Teil aus der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über die RyR2 (MAIER und BERS 2002). Morphologisch entspricht der zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom der 200-300 ms langen Plateauphase des Aktionspotentials (Abb. 1.1, 5). Die Repolarisation des Aktionspotentials dagegen wird hauptsächlich von auswärtsgerichteten  $\text{K}^+$ -Strömen getragen (BERS 2001).

### 1.2.2 Der Querbrückenzyklus

Durch Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  am Troponin C werden am Aktin Bindungsstellen für das Myosinköpfchen freigelegt (Abb. 1.1, 6), so dass der als Querbrückenzyklus bezeichnete Kontraktionsvorgang ausgelöst wird (RAYMENT et al. 1993). Während einer Kontraktion verschieben sich die kontraktile Elemente, die Myofilamente Aktin und Myosin, nach dem Gleitfilamentmechanismus ineinander (HUXLEY 1969). Als Energielieferant dient hierbei Adenosintriphosphat (ATP). Ein Querbrückenzyklus läuft hierbei, wie folgt, ab: Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C bewirkt eine Interaktion mit Troponin I mit konsekutiver Konformationsänderung des Proteins Tropomyosin. Daraus resultiert die Freilegung der Bindungsstelle für das Myosinköpfchen am Aktin. Mit der Hydrolyse eines ATP klappt das in einer 90-Grad-Stellung befindliche Myosinköpfchen in eine 45-Grad-Stellung um, so dass ein Kraftschlag ausgeführt wird. Pro Kraftschlag werden dadurch Aktin- und Myosinfilamente um etwa 10 nm gegeneinander verschoben, sichtbar in einer Verkürzung der funktionellen Einheiten, der Sarkomere. Erst eine erneute ATP-Bindung am Myosinköpfchen leitet unter Lösung der hochaffinen Bindung die Relaxation wieder ein (BERS 2001).

### 1.2.3 Die Relaxation

Die Relaxation der Herzmuskelzelle erfordert wiederum eine Senkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, damit eine Abdissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vom Troponin C erfolgen kann (Abb. 1.1, 8). Vier Transportproteine realisieren hauptsächlich die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Eliminierung, wobei ihr dazu beitragender Teil je nach Spezies variiert (BERS 2002): die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, dominante kardiale Isoform SERCA2a), der sarkolemmale sekundär aktive  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sowie mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (Abb. 1.1, 7, 10 und 9). Da in dieser Arbeit ausschließlich humanes Myokard verwendet wurde, möchte ich mich auf die prozentualen Anteile beim Menschen fokussieren. Die SERCA2a leistet unter ATP-Verbrauch mit 70% den größten Beitrag an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Eliminierung aus dem Zytosol in das SR, wobei deren Modulation durch Phospholamban (PLB) erfolgen kann (Abb.1.1, 7 und 11). Hingegen transportiert der NCX nur 28% des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol (Abb.1.1, 10) (BERS 2002). Folglich sind sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen sowie mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (Abb. 1.1, 9) mit einem Anteil von 2% in einem geringen Maße an der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Eliminierung in humanen Kardiomyozyten beteiligt. Aus diesem Grund soll auf ihre Funktion hier nicht weiter eingegangen werden. Unter physiologischen Bedingungen arbeitet der NCX zumeist im Vorwärtsmodus, was bedeutet, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion nach extrazellulär im Zuge gegen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten ausgetauscht wird. Dieser Modus wird bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ - und niedrigen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen sowie einem negativen Membranpotential favorisiert (BERS 2002).



**Abb. 1.1: Schema zur elektromechanischen Kopplung, modifiziert nach BERS (2002), S.198.**

In Folge eines Aktionspotentials (AP, 1) strömt Ca<sup>2+</sup> über L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (DHPR, 3) (I<sub>Ca</sub>) in das Zytosol und induziert eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung über die Ryanodinrezeptoren (RyR2, 4) aus dem SR (rote Pfeile). Dieser intrazelluläre Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bewirkt eine Aktivierung der Myofilamente mit folgender Kontraktion der Herzmuskelzelle (rote Kurve im Kasten). Für die Relaxation muss das zytosolische Ca<sup>2+</sup> wieder eliminiert werden (grüne Pfeile), bewerkstelligt über die SERCA2a (7), welche über Phospholamban (PLB, 11) reguliert wird, über den NCX (10) und im geringen Maße über mitochondriale Uniporter (9).

### 1.3 Die kardialen Ryanodinrezeptoren (RyR2)

Bisher konnten drei Isoformen der Ryanodinrezeptoren (RyR) identifiziert werden. Dabei stellen die RyR2 die dominanten kardialen Isoformen dar (INUI et al. 1987). Verantwortlich sind die RyR2 für die Ca<sup>2+</sup>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung (vgl. Einleitung Kap. 1.2.1). Cheng et al. beschrieben als erste sogenannte SR-Ca<sup>2+</sup>-Sparks als die Verkörperung von elementaren SR-Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungseignisse aus geclusterten RyR2 (CHENG et al. 1993, GUATIMOSIM et al. 2002). Diese Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung ist bedeutend, da sie eine Aktivierung von verschiedenen Ca<sup>2+</sup>-Bindeproteinen verursachen kann. Die RyR2 sind 2200 kDA große

homotetramere Komplexe mit einer Pore, die zwischen den vier 565 kDA großen Untereinheiten liegt (ZALK et al. 2007). Unklar ist jedoch die genauere Struktur der RyR2, die vermutlich aus 4-6 Transmembrandomänen bestehen (BERS 2001). Die N-terminalen zytoplasmatischen Domänen der RyR2 modulieren die Öffnung der Pore und sind am Aufbau eines großen regulatorischen Signalkomplexes beteiligt. Zu diesem zählen Calstabin 2 (FK506-Bindeprotein 12.6= FKBP12.6), ein muskelspezifisches Ankerprotein für die Proteinkinase A (mAKAP) sowie Phosphatasen (PP) PP1 und PP2A (BERS 2001, ZALK et al. 2007). Weitere Interaktionen können mit einem Komplex aus Triadin, Junctin und Calsequestrin sowie mit Sorcin erfolgen. Zahlreichen Regulationen unterliegen die RyR2 durch Calmodulin, durch die Proteinkinase A (PKA), die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), sowie durch das FKBP12.6. FK-506 provoziert die Abdissoziation von FKBP12.6 von den RyR2 und modifiziert die RyR2-Öffnungswahrscheinlichkeit in Richtung  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (BERS 2001, WEHRENS et al. 2003). Des Weiteren vermögen sowohl die PKA als auch die CaMKII die RyR2 zu phosphorylieren. Somit tragen sie zur Regulation von deren Öffnungswahrscheinlichkeit bei (HAIN et al. 1995, MARX et al. 2000, VALDIVIA et al. 1995, WEHRENS et al. 2003, WITCHER et al. 1991). In den entsprechenden Kapiteln über die PKA und die CaMKII erfolgt eine Erläuterung ihrer spezifischen RyR2-Phosphorylierungsstellen (vgl. Einleitung Kap. 1.4.3 und 1.5.4).

### 1.4 Beeinflussung der Inotropie

Eine Steigerung der Kontraktionskraft des Herzens wird mit dem Begriff „positive Inotropie“ beschrieben. Welche drei Hauptmechanismen in diese Inotropiemodulation involviert sind, soll in den folgenden drei Abschnitten erläutert werden.

#### 1.4.1 Frank-Starling-Mechanismus

Der Frank-Starling-Mechanismus dient der automatischen Anpassung des Schlagvolumens an den venösen Rückstrom zum Herzen. Dies geschieht folgendermaßen: Eine erhöhte enddiastolische Vordehnung des Ventrikels durch zunehmende Volumenbelastung (Erhöhung der Vorlast) bewirkt eine Steigerung der Kontraktionskraft des Herzmuskels. Auf zellulärer Ebene bedeutet dies eine dehnungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivitätssteigerung der Myofilamente (HIBBERD und JEWELL 1982, KENTISH et al. 1986). Darüber hinaus kommt es zu einer effektiveren Überlappung der Myofilamente mit verstärkter Querbrückenaktivierung (GORDON et al. 1966) sowie zu einer vermehrten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -

Ausschüttung bei erhöhter Sarkomerlänge (ALLEN und KURIHARA 1982, KENTISH und WRZOSEK 1998).

### 1.4.2 Kraft-Frequenz-Beziehungen

Bowditch beschrieb erstmals das Vermögen des Herzens bei steigenden Herzfrequenzen mit einer proportionalen Zunahme der Myokardkontraktilität zu reagieren (BOWDITCH 1871). Dies sichert ein adäquates Herzminutenvolumen bei verstärkter körperlicher Tätigkeit und Stress. Da das Herzminutenvolumen sich aus Herzfrequenz und Schlagvolumen zusammensetzt, die diastolische Füllungszeit und somit das Schlagvolumen bei höheren Herzfrequenzen abnimmt, muss kompensatorisch die Kontraktilität zunehmen. Experimentell kann diese Beziehung zwischen Kraftentwicklung und steigenden Stimulationsfrequenzen mittels Kraft-Frequenz-Beziehungen untersucht werden. Am gesunden humanen Myokard ist eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung feststellbar, das heißt, die entwickelte Kraft nimmt mit steigenden Stimulationsfrequenzen zu (BLINKS und KOCH-WESER 1961, BUCKLEY et al. 1972, SCHWINGER et al. 1993). Zurückzuführen ist dies zum einen auf eine konsekutive Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch vermehrt ankommende Aktionspotentiale bei steigenden Stimulationsfrequenzen, durch welche die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung gefördert wird (PIOT et al. 1996). Zum anderen auf eine gesteigerte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über die SERCA2a, so dass mehr  $\text{Ca}^{2+}$  für die darauffolgende Systole bereitgestellt werden kann (PIESKE et al. 1999).

### 1.4.3 Inotropie durch das sympathische System

Eine weitere Möglichkeit der Inotropiemodulation besteht in der sympathischen  $\beta_1$ -adrenergen Stimulation des Myokards. Über eine cAMP-vermittelte „Second-messenger“-Kaskade wird die PKA aktiviert, die ihrerseits an verschiedenen Stellen phosphorylierend tätig wird. Die PKA vermag den Phosphorylierungsstatus von PLB zu regulieren, wodurch die SERCA2a in ihrer Aktivität beeinflusst werden kann (Abb. 1.1, 7 und 11). Dephosphoryliertes PLB hemmt die SERCA2a in ihrer Aktivität,  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR zu transportieren (JAMES et al. 1989). Dieser inhibitorische Effekt wird durch PLB-Phosphorylierung durch die PKA an Serin-16 aufgehoben (LE PEUCH et al. 1980). Folglich kann die SERCA2a vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR pumpen, was sowohl eine gesteigerte Relaxationsgeschwindigkeit der Herzmuskelzelle (positiv lusitroper Effekt) als auch eine erhöhte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Bereitstellung für die nächste Kontraktion (positiv inotroper Effekt) zur Folge hat (LUO et al. 1994). Des Weiteren phosphoryliert die PKA Troponin I mit Folge einer

verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente. Jedoch überwiegt der zuvor beschriebene positiv inotrope Mechanismus (ENDOH und BLINKS 1988). Daneben kann die PKA den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das Zytosol steigern, indem sie eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 via Phosphorylierung an Ser-2809 mit folgender Abdissoziation von FKBP12.6 induziert (MARX et al. 2000, WEHRENS et al. 2003).

### 1.5 Die $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

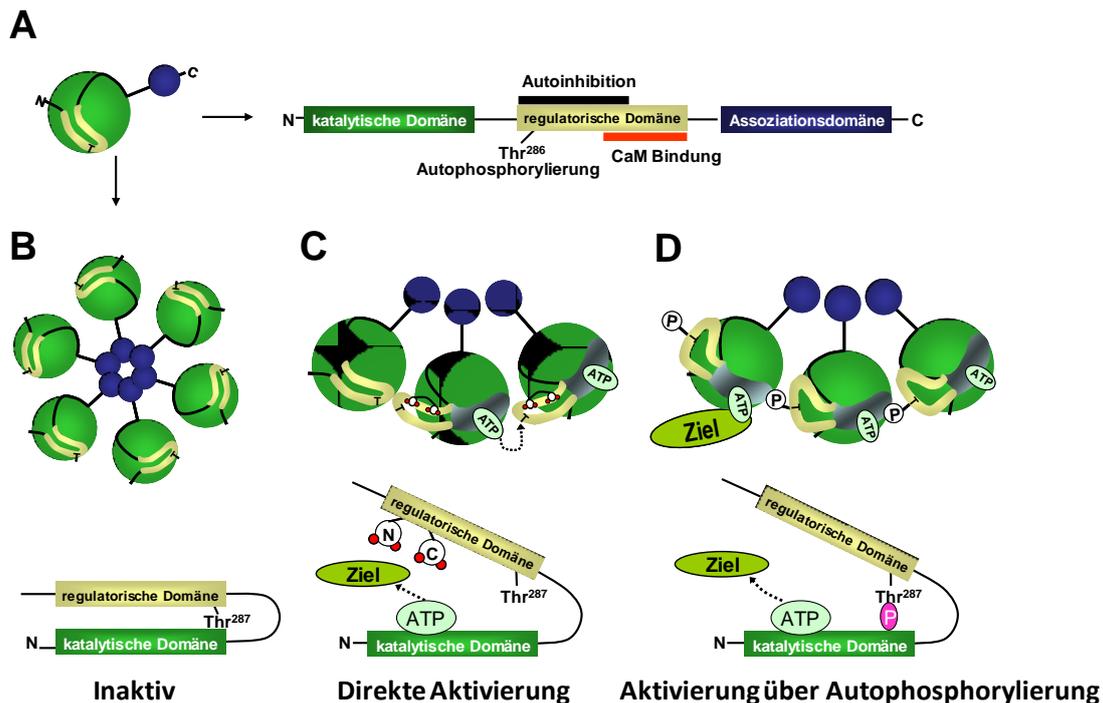
#### 1.5.1 Charakteristika der CaMKII

Eine zentrale regulatorische Funktion in der elektromechanischen Kopplung am Herzen nimmt die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ein, stammend aus der Familie der multifunktionellen Serin/Threonin-Proteinkinasen (BRAUN und SCHULMAN 1995). Vier Gene  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  kodieren für die verschiedenen Isoformen der CaMKII. Die ubiquitäre CaMKII $\gamma$  und im stärkeren Maße die CaMKII $\delta$  stellen die häufigsten Isoformen im Herzen dar, während die CaMKII $\alpha$  und CaMKII $\beta$  dagegen vorwiegend im Nervensystem exprimiert werden (EDMAN und SCHULMAN 1994, MAIER und BERS 2002, TOBIMATSU und FUJISAWA 1989). Eine Differenzierung der CaMKII $\delta$  erfolgt in zwei Splicevarianten mit jeweils unterschiedlicher Lokalisierung (EDMAN und SCHULMAN 1994): Die Splicevariante CaMKII $\delta_B$  ist aufgrund ihrer aus elf Aminosäuren bestehenden Kernlokalisierungssequenz im Nukleus, die Splicevariante CaMKII $\delta_C$  hingegen im Zytosol der Kardiomyozyten anzutreffen (SRINIVASAN et al. 1994). Das Holoenzym der CaMKII wird aus 6-12 Monomeren (Homo- oder Heteromultimeren) gebildet, die sich wiederum zu einer ringförmigen Struktur gruppieren (Abb. 1.2 B). Jedes CaMKII-Monomer weist folgenden Aufbau auf: Es besteht aus einer aminoterminalen Domäne mit katalytischer Funktion, einem zentral regulatorischen Bereich mit einer sich überlappenden Autoinhibitions- und  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Bindungsregion und aus einer carboxyterminalen Domäne, welche für die Oligomerisation des Holoenzym verantwortlich ist (Abb. 1.2 A) (MAIER und BERS 2002).

#### 1.5.2 Die Aktivierung der CaMKII

Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole bewirkt eine Aktivierung der CaMKII, indem vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit Calmodulin einen Komplex bilden und an die zentral regulatorische Domäne der CaMKII binden. Durch diese Interaktion wird die autoinhibitorische Domäne verdrängt und deren katalytische Seite freigelegt (Abb. 1.2 C). Neben dieser  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-(CaM)abhängigen Aktivierung kann diese darüber hinaus

über Autophosphorylierung an ihrer autoinhibitorischen Domäne an Threonin-286 (Thr-286) bzw. an Threonin-287 (Thr-287) aktiv bleiben (Abb. 1.2 D) (ZHANG und BROWN 2004). Dieser Mechanismus ist allerdings nicht essentiell für die Aktivität der CaMKII, sondern bewirkt vielmehr eine Affinitätssteigerung für den CaM-Komplex um das 700-fache (MEYER et al. 1992). Aus diesem Grund verfügt die CaMKII auch nach Absinken der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Diastole über 20-80% ihrer Aktivität (LAI et al. 1986, LOU et al. 1986, SCHWORER et al. 1986).



**Abb. 1.2:** Die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), modifiziert nach BRAUN und SCHULMAN (1995), S. 421 und MAIER und BERS (2002), S.924.

**A:** Darstellung eines CaMKII-Monomers bestehend aus drei Domänen. **B:** Formierung des CaMKII-Holoenzym aus seinen Monomeren mit seiner nach außen ragenden katalytischen Domäne. **C:** Direkte Aktivierung der CaMKII über den CaM-Komplex (rote Punkte) **D:** Über Autophosphorylierung der regulatorischen Domäne an Thr-286 bzw. an Thr-287 kann die CaMKII über einen längeren Zeitraum aktiv bleiben.

### 1.5.3 Die Inaktivierung und pharmakologische Hemmung der CaMKII

Proteinphosphatasen (PP) in Form der PP1, PP2A und PP2C sorgen für die komplette Inaktivierung der CaMKII über Dephosphorylierung (ZHANG und BROWN 2004). Die pharmakologische Hemmung der CaMKII kann über zwei etablierte CaMKII-Inhibitoren

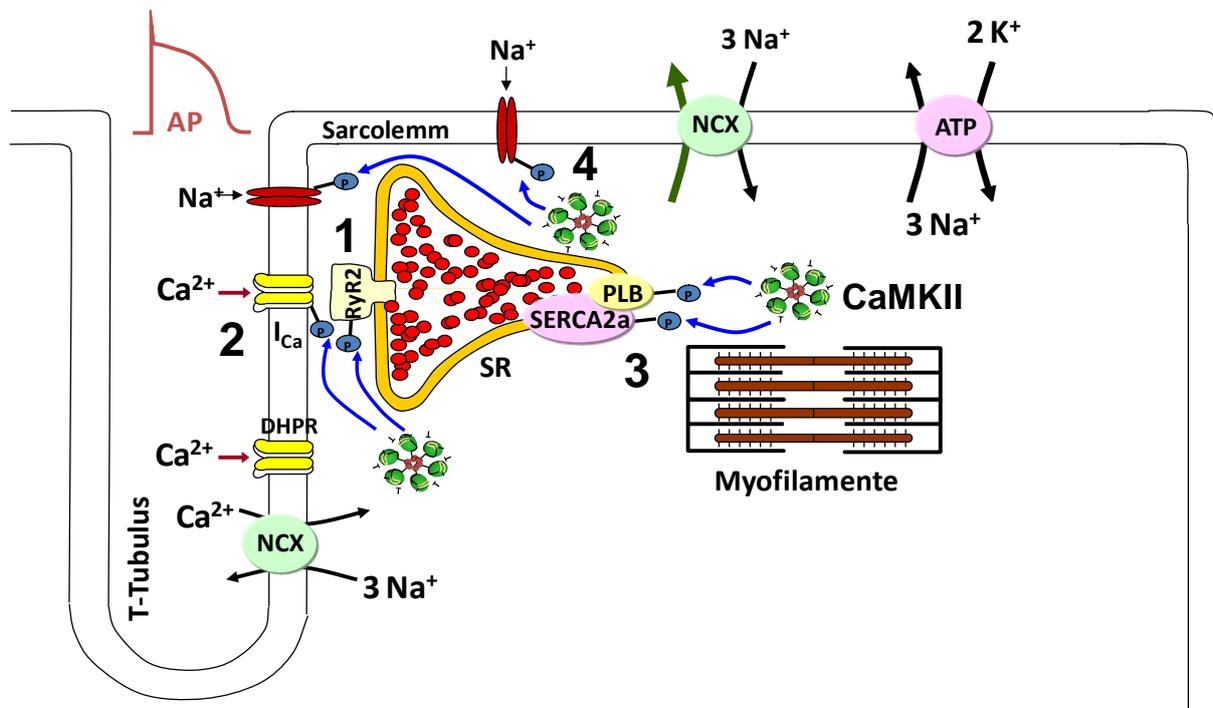
erfolgen, die ebenfalls in der vorliegenden Dissertation zum Einsatz kamen: einerseits durch das Methoxybenzensulfonamid KN-93 und andererseits durch das synthetische Peptid AIP („Autocamtide-2-related inhibitory peptide“). Die wasserlösliche Substanz KN-93 konkurriert kompetitiv um die Bindungsstelle der regulatorischen Domäne der CaMKII mit CaM. Dabei besitzt KN-93 eine halbmaximale inhibitorische Potenz von  $K_i=0,37 \mu\text{M}$  (LI et al. 1997, SUMI et al. 1991). Darüber hinaus weist KN-93 keine relevanten Effekte auf andere wichtige „second-messenger“-Kaskaden wie die cAMP-abhängige PKA auf (SUMI et al. 1991). Es sind jedoch Nebeneffekte auf die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle von einigen Gruppen beschrieben worden (ANDERSON et al. 1998, GAO et al. 2006, LI et al. 1997). KN-92 dient als etablierte Kontrollsubstanz, da es die gleichen CaMKII-unabhängigen Nebeneffekte wie KN-93 aufweist (GAO et al. 2006). AIP hingegen stellt ein synthetisches Peptid dar, welches eine nicht-kompetitive Inhibition der CaMKII bewirkt und somit unabhängig von der Präsenz von CaM diese blockiert. Studien belegen eine 50-500-fach potentere Hemmung der CaMKII als KN-93, wobei  $1 \mu\text{M}$  AIP die CaMKII effektiv inhibiert. Ebenfalls weist AIP keine Nebeneffekte auf andere multifunktionale Proteinkinasen auf (ISHIDA et al. 1995).

### 1.5.4 Die Rolle der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung

Wie auch die PKA nimmt die CaMKII eine zentrale regulatorische Funktion in der elektromechanischen Kopplung ein, indem sie verschiedene intrazelluläre Proteine wie die SERCA2a (XU et al. 1993), PLB (DAVIS et al. 1983, LE PEUCH et al. 1979), die RyR2 (HAIN et al. 1995, WITCHER et al. 1991) und Ionenkanäle wie  $\text{Na}^+$ - (WAGNER et al. 2006),  $\text{K}^+$ - (WAGNER et al. 2009) und L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (DZHURA et al. 2000) phosphoryliert (Abb.1.3, 1-4). Dies kann sowohl in einer Hemmung oder Aktivierung von diesen resultieren, wodurch die elektromechanische Kopplung beeinflusst wird. Die CaMKII kann die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 (Abb. 1.3, 1) modulieren, jedoch sind die molekularen Mechanismen nicht hinreichend geklärt. Witcher et al. konnten zeigen, dass die RyR2 direkt an Serin-2809 (Ser-2809) durch die CaMKII phosphoryliert werden können (WITCHER et al. 1991). Neben dieser ebenfalls durch die PKA beeinflussbaren Phosphorylierungsstelle gibt es eine für die CaMKII spezifische Phosphorylierungsstelle an der Aminosäure Serin-2815 (Ser-2815) (WEHRENS et al. 2004). Weitere vier Phosphorylierungsstellen wurden von Rodriguez et al. in „in-vitro“-Experimenten vorgeschlagen (RODRIGUEZ et al. 2003), wobei Ser-2814 ebenfalls von Bedeutung zu sein scheint (ZALK et al. 2007).

Analog zur PKA (Kapitel 1.3.3) phosphoryliert die CaMKII PLB (Abb.1.3, 3), jedoch an deren spezifischer Phosphorylierungsstelle Threonin-17 (Thr-17) (LE PEUCH et al. 1979). Dadurch erfolgt eine raschere  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme in das SR sowie eine erhöhte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -

Speicherung. Es wird kontrovers diskutiert, ob dieser Mechanismus eine schnellere Relaxation der Herzmuskelzelle bei steigenden Herzfrequenzen bewirkt, in der Literatur auch als „frequency dependent acceleration of relaxation“ („FDAR“) bezeichnet (BASSANI RA 1995, DESANTIAGO et al. 2002, ODERMATT et al. 1996, SCHOUTEN 1990).



**Abb. 1.3: Die regulatorische Funktion der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung, modifiziert nach MAIER und BERS (2007), S.632.**

Die CaMKII kann über Phosphorylierungen (blaue Pfeile) verschiedene an der elektromechanischen Kopplung involvierte Proteine modulieren, wie z.B. die RyR2 (1), die SERCA2a und PLB (3) und Na<sup>+</sup>- (4) und L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (2). Weiterhin dargestellt sind der NCX, der für die Relaxation mitverantwortlich ist und die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, welche einen Konzentrationsgradienten herstellt.

## 1.6 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Störungen der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase und Veränderungen der Prozesse in der elektromechanischen Kopplung avancierten zu fundamentalen Ursachen in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, wie einleitend erwähnt.

Interessanterweise konnte am terminal insuffizienten Myokard des Menschen eine inverse bzw. negative Kraft-Frequenz-Beziehung gezeigt werden (GWATHMEY et al. 1987, HASENFUSS und PIESKE 2002, MULIERI et al. 1992, PIESKE et al. 1995). Pieske et al.

erklärten diese inverse Kraft-Frequenz-Beziehung mit reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten-Amplituden und einer verminderten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, welche zu einem reduzierten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt führte (PIESKE et al. 1999, PIESKE et al. 1995). Allgemein akzeptiert zu sein scheint, dass ein gestörter SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel der Kardiomyozyten, d. h. zwischen SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation und  $\text{Ca}^{2+}$ -Entfernung aus dem Zytosol, ursächlich für die systolische und diastolische Dysfunktion ist. Drei Faktoren tragen hierzu bei: Diverse Publikationen erbrachten den Nachweis, dass die SERCA2 sowohl in ihren mRNA-Leveln und in ihrer Proteinexpression als auch in ihrer Aktivität bei der Herzinsuffizienz reduziert sind (HASENFUSS et al. 1994, MERCADIER et al. 1990, STUDER et al. 1994). Infolgedessen ist der NCX sowohl in seiner Proteinexpression (STUDER et al. 1994) als auch in seiner Funktion (REINECKE et al. 1996) zumeist kompensatorisch erhöht. Konsequenterweise äußert sich dies in einer verminderten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und schließlich in einer konsekutiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols.

Ein weiterer wichtiger Prozess ist die Abnahme der  $\beta$ -Rezeptordichte (BRISTOW und GINSBURG 1986), die mit einem Anstieg inhibitorischer G-Proteine vergesellschaftet ist. Somit verliert das sympathische System seine modulatorische und insbesondere inotrope Wirkung am Myokard.

In den vergangenen Jahren erweckte vor allem die CaMKII besonderes Interesse in der Pathogenese der Herzinsuffizienz. Zunächst wurde über eine kompensatorische Rolle der CaMKII bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie spekuliert, da deren erhöhte Aktivität mit einer verminderten Ejektionsfraktion positiv korrelierte (KIRCHHEFER et al. 1999). Zahlreiche Tiermodelle widerlegten jedoch diese ursprüngliche Hypothese. Transgene Mäuse mit Überexpression der CaMKII $\delta_B$  (ZHANG et al. 2002) und CaMKII $\delta_C$  (MAIER et al. 2003, ZHANG et al. 2003) entwickelten eine Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Doch nicht nur im Tiermodell konnte eine CaMKII-Überexpression festgestellt werden. Laut Hoch et al. war die CaMKII $\delta$ -Expression ebenfalls im humanen Myokard, stammend von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, signifikant erhöht (HOCH et al. 1999). Ferner wird als weiterer Pathomechanismus in der Entwicklung einer kontraktilen Dysfunktion ein erhöhtes SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck über die RyR2 angenommen. Diese Hypothese ließ sich in verschiedenen Tiermodellen bestätigen (AI et al. 2005, MAIER et al. 2003, SHANNON et al. 2003, ZHANG et al. 2003). Kontrovers diskutiert wird allerdings der für das SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck zu Grunde liegende Mechanismus. Strittig ist, ob die CaMKII-bedingte RyR2-Phosphorylierung zu einer erhöhten (AI et al. 2005, KOHLHAAS et al. 2006, MAIER et al. 2003, NEEF et al. 2010) oder verminderten (YANG et al. 2007) Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 führt. Weiterhin diskutiert wird das Thema, ob die CaMKII zu einer frequenzabhängigen beschleunigten

Relaxation („FDAR“) via PLB-Phosphorylierung führt und somit zu einer verbesserten diastolischen Füllung des Herzens bei steigenden Herzfrequenzen beiträgt (DESANTIAGO et al. 2002, HUSSAIN et al. 1997, ODERMATT et al. 1996, SCHOUTEN 1990, VALVERDE et al. 2005).

Es bleibt zu erwähnen, dass die CaMKII an der Transkription verschiedener Proteine mitwirkt, die in die elektromechanische Kopplung involviert sind (MAIER 2009, SEIDLER et al. 2007). Diese „Exzitations-Transkriptions-Kopplung“ stellt jedoch keinen Schwerpunkt der Dissertation dar, so dass in diesem Rahmen nicht auf sie eingegangen werden soll.

### 1.7 Fragestellung der Dissertation

Die Erläuterungen über die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz veranschaulichen, dass sowohl die Rolle der CaMKII in der Herzinsuffizienz noch nicht hinreichend geklärt ist, als auch ihre genauen Regulationsmechanismen aktuell kontrovers diskutiert werden. Zwar existieren einige tierexperimentelle Studien, jedoch gibt es keine Publikationen über die Funktion der CaMKII im terminal insuffizienten Myokard des Menschen. Ziel der vorliegenden Dissertation ist es deshalb, detailliertere Aussagen über die CaMKII-Expressionen treffen zu können sowie vor allem den Einfluss der CaMKII-Inhibition auf die Kontraktilität im terminal insuffizienten Myokard des Menschen zu erforschen.

Folgende konkrete Fragestellungen wurden in diesem Zusammenhang aufgeworfen:

1. Wie stellen sich die Expression der CaMKII $\delta$  und deren Splicevarianten sowie die CaMKII $\gamma$  im terminal insuffizienten Myokard des Menschen dar?
2. Gibt es Expressionsunterschiede im rechten und linken Ventrikel sowie Unterschiede auf Grund der Ursache der terminalen Herzinsuffizienz?
3. Inwiefern kann die Myokardkontraktilität durch CaMKII-Inhibition in humanen terminal insuffizienten Herzen beeinflusst werden?
4. Welche Einflüsse hat die Inhibition der CaMKII auf den SR-Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel bzw. auf den SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt der Kardiomyozyten?
5. Wie beeinflusst die Hemmung der CaMKII das SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck?
6. Inwiefern beeinflusst die CaMKII-Inhibition die Phosphorylierung von Proteinen, die an der elektromechanischen Kopplung involviert sind?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Probengewinnung von humanem Ventrikel

Die Arbeit mit ventrikulärem humanem Myokard wurde durch eine Kooperation mit der Herzchirurgie des Herzzentrums von Bad Oeynhausen ermöglicht. Ein positives Votum der Ethikkommission lag vor. Die terminal insuffizienten Herzen (NYHA IV) stammten i.d.R. von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie oder mit ischämischer Herzerkrankung, die sich einer allogenen Herztransplantation unterziehen mussten. Gesundes Myokard für Proteinexpressionsanalysen wurde nicht-insuffizienten Herzen von anonymen Organspendern entnommen, welche aus medizinischen Gründen nicht transplantiert werden konnten. Proben für Western-Blot-Experimente wurden unverzüglich in Bad Oeynhausen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Göttingen bei -80 °C gelagert. Die gekühlten und in Custodiol® (CH.-B. 0933411, Dr. Franz Höhler Chemie GmbH) konservierten extraplatantierten Herzen wurden für die Präparation humaner rechtsventrikulärer Muskelstreifen und für die Isolierung von linksventrikulären Kardiomyozyten unverzüglich nach Göttingen transportiert.

### 2.2 Pharmakologische Intervention mit CaMKII-Inhibitoren

Substanz	Firma	MW [g/mol]	Muskelstreifen- experimente [ $\mu$ M]	Fluoreszenz- experimente [ $\mu$ M]	10 mM Stock bzw. AIP 1 mM Stock
<b>KN-93</b>	Merck Calbiochem®, Cat. No. 422711	599,0	2,0	1	1 mg in 166,9 $\mu$ l ddH <sub>2</sub> O
<b>KN-92</b>	Merck Calbiochem®, Cat. No. 422709	555,0	2,0	1	1 mg in 180,2 $\mu$ l DMSO
<b>AIP</b>	ALEXIS Biochemicals®, Lot. 12434	1708,1	2,5	1	0,5 mg in 292 $\mu$ l ddH <sub>2</sub> O

**Tab. 2.1: Ansatz der CaMKII-Inhibitoren AIP und KN-93 und des inaktiven Analogons KN-92**

**Fluoreszenzexperimente [ $\mu$ M]:** verwendete Konzentrationen für Fluoreszenzexperimente,  
**Muskelstreifenexperimente [ $\mu$ M]:** verwendete Konzentrationen für Muskelstreifenexperimente

In der vorliegenden Dissertation kamen die zwei verschiedenen CaMKII-Inhibitoren KN-93 und AIP zum Einsatz. Als etablierte Kontrollsubstanz für KN-93 diente sein inaktives

Analogon KN-92. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzmessungen wurden für die Muskelstreifenexperimente höhere Konzentrationen zur Inhibition der CaMKII gewählt, um eine optimale Diffusion der Substanzen in das multizelluläre Gewebe zu gewährleisten.

## 2.3 Muskelstreifenexperimente

### 2.3.1 Dissektionslösung und Krebs-Henseleit-Messlösung

Für die Präparation der rechtsventrikulären Muskelstreifen aus den humanen extraplatantierten terminal insuffizienten Herzen wurde eine 2,3-Butandion-Monoxim-(BDM) haltige Lösung verwendet. Diese ist kardioprotektiv, indem BDM  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen des Troponin C sowie essentielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle blockiert. Folglich werden die elektromechanische Kopplung und mögliche Kontraktionen der Muskelstreifen unterbunden (MULIERI et al. 1989). Um einen physiologischen pH-Wert ( $\text{pH}=7,4$ ) zu garantieren, erfolgte eine stetige Begasung mit einem Gemisch aus 95%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Das Hydrogencarbonat in der Lösung bildete hierbei mit Carbogen ein offenes Puffersystem.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	116,1
KCl	74,56	5,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 (\text{H}_2\text{O})$	137,99	2,0
$\text{MgCl}_2 (6\text{H}_2\text{O})$	203,31	1,2
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	142,04	1,2
$\text{NaHCO}_3$	85,01	20,0
Glukose	180,16	10,0
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	101,10	20,0
$\text{CaCl}_2$	110,98	0,25

Tab. 2.2: 2,3- Butandion-Monoxim-(BDM)-haltige Dissektionslösung

Die präparierten Muskelstreifen wurden während eines Versuches kontinuierlich mit Krebs-Henseleit (KHS)-Messlösung perfundiert, wobei ein physiologischer pH-Wert ( $\text{pH}=7,4$ ) nach dem gleichen Prinzip wie bei der Dissektionslösung über eine kontinuierliche Begasung erzielt wurde (Abb. 2.1, 1).

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	116,1
KCl	74,56	5,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	137,99	2,0
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	203,31	1,2
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142,04	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	20,0
Glukose	180,16	10,0
<b>CaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration)</b>	<b>110,98</b>	<b>2,0</b>

Tab. 2.3: Krebs-Henseleit-Messlösung (KHS-Lösung)

### 2.3.2 Versuchsaufbau der Muskelstreifenexperimente

Der Versuchsaufbau bestand aus folgenden Elementen: einem Organbad, einem doppelwandigen Glasgefäß als Reservoir für die KHS-Lösung, einer Pumpe und einer Heizung (Abb. 2.1, 2-5). Die kontinuierliche Perfusion konnte über die Pumpe, durch welche die Plastikschläuche verliefen, reguliert werden (Abb. 2.1, 4a und 4b). Zudem wurden sowohl das Reservoir als auch die zum Organbad führenden Plastikschläuche über ein Doppelwandprinzip mittels Heizungswasser auf eine physiologische Temperatur von 37 °C erwärmt (Abb. 2.1, 3, 5, 6).

Das Organbad verfügte auf der einen Seite über eine Mikrometerschraube (Abb. 2.1, 9) mit einem aus dünnem Draht bestehenden Haken (Abb. 2.1, 8), der zur Fixation des Muskelstreifens diente. Auf der Gegenseite befand sich eine aus Draht bestehende Öse (Abb. 2.1, 11), welche direkt mit dem Kraftabnehmer (Force Transducer Typ KG3, Scientific Instruments, Heidelberg) verbunden war (Abb. 2.1, 7). Unter Zuhilfenahme zweier Pinzetten konnte der Muskelstreifen durch die Öse geführt, am Haken fixiert und über diese Vorrichtung anschließend gedehnt werden. Die Stimulation des Muskelstreifens mit unterschiedlichen Frequenzen leistete ein Stimulator (Scientific Instruments, Heidelberg), welcher mit in das Organbad eingelassenen Kontaktdrähten verbunden war. Der elektrische Impuls konnte somit über die Lösung auf den fixierten Muskelstreifen übertragen werden. Durch isometrische Kontraktionen wurde der Kraftabnehmer ausgelenkt und die Dynamik des sich kontrahierenden Muskelstreifens registriert. Via Brückenverstärker (Firma Scientific Instruments) und Analog-Digital-Wandler (National Instruments, Typ: PCI 1200) wurde die

Zugspannung in ein proportionales analoges Spannungssignal konvertiert und zum Computer geleitet.

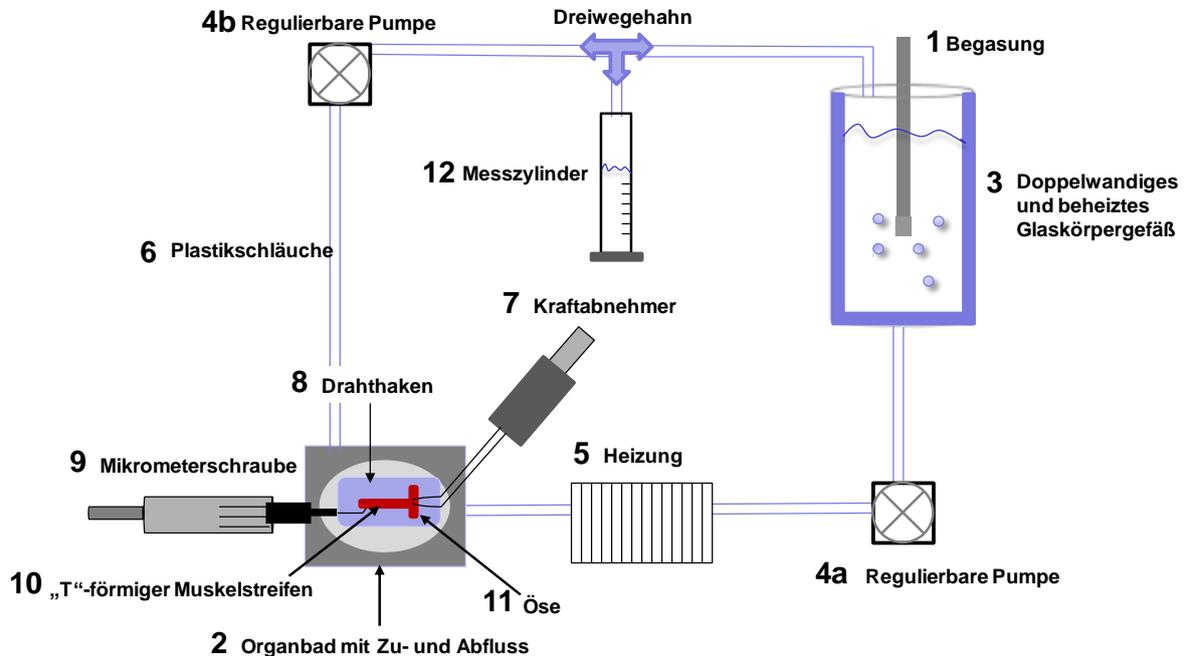
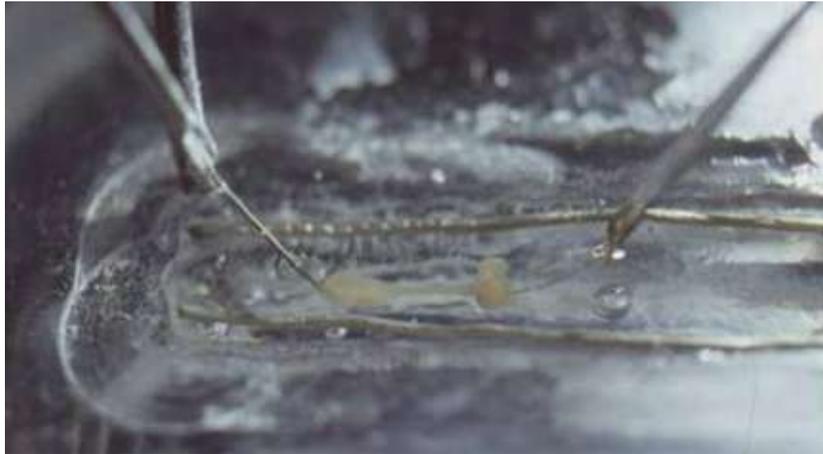


Abb. 2.1 : Versuchsaufbau der Muskelstreifenexperimente

### 2.3.3 Präparation rechtsventrikulärer Muskelstreifen

Auf Grund der höhergradigen linksventrikulären endokardialen Fibrose wurden rechtsventrikuläre Muskelstreifen für die Versuche gewählt. Als Qualitätskriterium wurde eine rötliche Färbung der Streifen herangezogen, da diese mit dem Myoglobin- und Fibrillenanteil korreliert. Um eine Verfälschung der Kontraktilitätsexperimente zu vermeiden, war eine atraumatische Präparation essentiell. Die kardioplegische Transportlösung (vgl. Material und Methoden Kap. 2.1) wurde durch frische BDM-haltige Dissektionslösung ersetzt. Bei der Präparation mussten folgende Aspekte stets beachtet werden: Nach Verdeutlichung der anatomischen Strukturen des Herzens wurde der rechtsventrikuläre Anteil in einer mit Dissektionslösung gefüllten Schale freipräpariert und mittels einer Nadel fixiert. Zunächst wurde der Muskelstreifen weiträumig aus dem Myokard präpariert, um möglichen Schäden durch Dehnung oder Präparierinstrumente vorzubeugen. In einer kleineren Schale erfolgte die exakte Präparation zu „T-förmigen“ Muskelstreifen (Abb. 2.1, 10). Das breite Ende des „T“ diente zur Positionierung in der Drahtöse, der schmale Anteil zur Fixation am Haken (Abb. 2.1, 10 und Abb. 2.2).



**Abb. 2.2:** Photographische Aufnahme eines eingespannten Muskelstreifen (© Labor Prof. Dr. Maier)

### 2.3.4 Versuchsprotokoll zur Überprüfung der Effekte der CaMKII-Inhibitoren

Zu Anfang eines Experimentes wurden 100 ml der KHS-Lösung in ein beheiztes Reservoir gefüllt und durch Anschalten der Pumpe das Organbad mit dieser versetzt. Anschließend wurde die Zirkulation gestoppt, der Muskelstreifen mit Hilfe einer Pipette in einigen Millilitern Dissektionslösung in das Organbad überführt und ohne jegliche Spannung und Dehnung positioniert. Zur Eliminierung der sich im Organbad befindlichen BDM-Reste musste der Flüssigkeitskreislauf geöffnet werden. Der aus dem Organbad wegführende Schlauch wurde zu diesem Zweck in einen Messzylinder gehängt und 50 ml der 100 ml KHS-Lösung ausgespült und verworfen (Abb. 2.1, 12). Nach erneutem Schließen des Flüssigkeitskreislaufes wurde die biphasische Stimulation (25% über der Schwellenspannung) mit einer Basisstimulationsfrequenz von 1 Hz begonnen. Parallel dazu erfolgte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau, wobei in Zwei-Minuten-Abständen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Anfangskonzentration von 0,25 mM auf eine Endkonzentration von 2 mM angehoben wurde (Tab. 2.2). Ziel hierbei war es, eine rasche  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung zu vermeiden, um den Muskelstreifen vor Kontraktur zu schützen. Um eine optimale Anpassung an die Versuchsbedingungen zu ermöglichen, folgte eine Einschlagphase des Muskelstreifens von 30 min. Sodann konnte dieser langsam gedehnt werden, bis er seine maximale Kraft nach dem Frank-Starling-Mechanismus entfaltetete. Eine erneute Einschlagphase schloss sich an, bis der Muskelstreifen eine konstante Kraft entwickelte, ein sogenanntes „steady state“. Darauffolgend wurde die pharmakologische Intervention mit den CaMKII-Inhibitoren AIP oder KN-93 bzw. mit ihren jeweiligen Kontrollen begonnen (vgl. Material und Methoden Kap. 2.2). Nach einer 20-minütigen Inkubations- und

Stimulationspause und Erreichen eines „steady state“ konnte mit den Messungen begonnen werden. Für die Ermittlung der Kraft-Frequenz-Beziehungen wurden die Stimulationsfrequenzen schrittweise von 0,5 Hz auf 1 Hz, 2 Hz und 3 Hz erhöht.

### 2.3.5 Post-Pausen-Verhalten

Post-Pausen-Beziehungen dienen zur Untersuchung des SR-Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsels. Dabei spiegelt das Verhalten der ersten Kontraktion nach einer Stimulationspause verglichen mit der ersten vor der Pause, die funktionelle SR-Ca<sup>2+</sup>-Kapazität wider, d. h. die Fähigkeit Ca<sup>2+</sup> in das SR wiederaufzunehmen und -freizusetzen (RA BASSANI und BERS 1994, BERS 2001, BERS et al. 1993, KOCH-WESER und BLINKS 1963). Während der Pause konkurrieren vor allem die SERCA2a und der NCX um die Ca<sup>2+</sup>-Elimination aus dem Zytosol. Gleichzeitig können Ca<sup>2+</sup>-Leckströme über die RyR2 einen Ca<sup>2+</sup>-Verlust aus dem SR bewirken. Je mehr Ca<sup>2+</sup> über den NCX nach extrazellulär befördert, je weniger Ca<sup>2+</sup> über die SERCA2a in das SR aufgenommen wird und je höher das SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck ist, desto geringer ist der Netto-SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt für die nächste Kontraktion (BERS 1985). Folglich weisen Post-Pausen-Beziehungen indirekt auf den SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt hin und können mögliche Störungen dieser SR-Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel-Balance im Rahmen einer Herzinsuffizienz aufdecken.

Zur Untersuchung des Post-Pausen-Verhaltens wurde die Basisstimulation von 1 Hz für 10 s, 30 s und 120 s unterbrochen. Verglichen wurden hierbei die entwickelte Kraft und die diastolische Spannung der ersten Kontraktion vor der Pause („steady-state“-Systole und „steady-state“-Diastole) mit der ersten Kontraktion nach der Pause („post-rest“-Systole und „post-rest“-Diastole). Das Post-Pausen-Verhalten wurde, wie folgt, berechnet:

$$\text{Post-Pausen-Verhalten:} \quad \frac{PR}{SS} = \frac{PR_{\text{Systole}} - PR_{\text{Diastole}}}{SS_{\text{Systole}} - SS_{\text{Diastole}}}$$

**Formel 2.1:** PR: "post rest", SS: "steady state"

Nach Beendigung eines Experimentes wurden die Muskelstreifen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Herstellung der Homogenate für die proteinbiochemischen Untersuchungen konserviert.

### 2.3.6 Datenakquisition und -auswertung

Mit Hilfe der Software LabView (Firma National Instruments) wurden die Daten akquiriert. Die im Abstand von einer Millisekunde aufgezeichneten 900 Datenpunkte wurden über den Stimulator vermittelt. Dabei erfolgte eine Konvertierung der Spannungswerte über die Zeit mit folgender graphischer Auftragung. Zur Echtzeit-Umrechnung der elektrischen Spannung in Zugspannung ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ ) wurden Eichfaktoren akquiriert, welche in einer Kalibrierung von Kraftaufnehmer und -messbrücke gewonnen wurden. Anhand der mit einem Binokular integrierten Messskala konnten die Dimensionen der Muskelstreifen in Breite und Tiefe (mm) ausgemessen werden. Aus den eingegebenen Werten berechnete das Programm schließlich die entwickelte Kraft des Muskelstreifens auf seinen Querschnitt ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ ). Diese Normalisierung erlaubte eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche, da mit variierenden Dimensionen der Muskelstreifen andere Kräfte entwickelt werden. Für die Auswertung wurden folgende Parameter automatisch berechnet: die entwickelte Kraft, die diastolische Spannung und die Kontraktionskinetiken (Zeiten bis zum Erreichen von 50% und 90% der Relaxation = RT 50 und RT 90).

Zur Speicherung der registrierten Daten wurden zwei Dateien angelegt: der gesamte Versuchsablauf eines Muskelstreifenexperimentes in einer Chartdatei, die Speicherung von Einzelkontraktionen in einer Averagedatei. In einem Textfeld konnten vorgenommene Interventionen für die spätere Auswertung eingegeben werden. In der Chartdatei wurde der kontinuierlich während jedes Triggerzyklus registrierte Minimalwert als Maß für die diastolische Spannung mit dem Maximalwert der entwickelten Kraft verbunden und graphisch aufgetragen. Zur exakteren Analyse der Messparameter diente die oben genannte Averagedatei, die zur Speicherung von fünf Einzelkontraktionen via Tastaturbefehl diente.

## 2.4 Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalysen

### 2.4.1 Lösungen und verwendete Substanzen für Western Blots

Substanz	Konzentration	10 ml	Endkonzentration
Tris-HCl (pH=7,4)	2 mM	100 µl	20 mM
NaCl	4 M	500 µl	200 mM
NaF	200 mM	1000 µl	20 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	100 mM	100 µl	1 mM
DTT	100 mM	100 µl	1 mM
Triton X-100 Puffer	1 %	100 µl	1 %

mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 ml

Vor Gebrauch PhosSTOP (Cat. No. 04906845001, Roche®) und EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablette hinzugeben (Cat. No. 04693132001, Roche®).

**Tab. 2.4:** Homogenisierungs- und Lysepuffer

Tris/SDS-Stock	Substanz	Masse
4 x Tris/SDS mit pH= 8,8 bei RT	Tris	6,05 g
	SDS 10%	0,49 g
4 x Tris/SDS mit pH= 6,8 bei RT	Tris	45,5 g
	SDS 10%	1 g

mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 mlmit ddH<sub>2</sub>O auf 250 ml

**Tab 2.5:** 4 x Tris/SDS-Stock für Sammel- und Trenngelherstellung

	Sammelgel	Trenngel			
Gelkonzentration	4-5%	7,5%	10%	12,5%	15%
Substanzen	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Polyacrylamid	0,83 ml	2,5 ml	3,33 ml	4 ml	4,45 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,86 ml	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,45 ml
4 x Tris/SDS mit pH=8,8/pH=6,8	1,25 ml pH=6,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
APS 10%	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

pH=8,8

**Tab. 2.6:** Sammel- und Trenngel

Transferpuffer	Substanz		
5 x Stock Transferpuffer	Tris	39,4 g	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2l, pH=8,3 bei RT
	Glyzin	144 g	
1 x Stock Transferpuffer	5 x Stock Transferpuffer	400 ml	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2l
	10% SDS	2 ml	
	100% Methanol	20% Methanol	
		400 ml	60 ml
<b>Waschpuffer</b>			
10 x Stock TBS	Tris	48,4 g	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2l, pH=7,5 bei RT
	NaCl	58,48 g	
1 x Stock Waschpuffer	10 x Stock TBS	200 ml	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2l, pH=7,5 bei RT
	Tween 20	2 ml	
<b>Laufpuffer</b>			
5 x Stock Laufpuffer	Tris	30,2 g	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2l, pH=8,3 bei RT
	Glyzin	144 g	
	SDS	10g	
1x Stock Laufpuffer	5 x Stock	400 ml	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2l

Tab. 2.7: Transfer-, Wasch- und Laufpuffer

#### 2.4.2 Anfertigung der Proteinhomogenate und Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Zur Proteinexpressions- und Proteinphosphorylierungsanalyse des ventrikulären Myokards wurden Western Blots durchgeführt. Die gefrorenen Ventrikelproben und die in den funktionellen Experimenten pharmakologisch behandelten und anschließend konservierten Muskelstreifen wurden, wie im Folgendem beschrieben, dazu aufbereitet (vgl. Material und Methoden Kap. 2.1 und 2.3.5).

Die Proben wurden mit 200-300 µl Homogenisierungs- und Lysepuffer versetzt und mit dem Hochleistungswerkzeug Typ Mikropistill (Bestell.-Nr. EX63.1, Roth) zerkleinert, so dass die zytosolischen Proteine freigesetzt wurden. Um eine Denaturierung der Proteine zu

unterbinden, erfolgte der Vorgang auf Eis. Die Homogenate wurden anschließend für 10 min bei 3000x g (4 °C) ultrazentrifugiert, um Nuclei und Zelldetritus zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt, bei -80 °C weggefroren bzw. unverzüglich weiterverarbeitet.

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde der BCA-Protein-Assay (BCA Protein Assay Kit, A No. 23233, B No. 23244) verwendet, bevor die Auftrennung der Proteine via SDS(Sodiumdodecylsulfat)-Gel nach ihrer Masse erfolgte. Essentiell ist dies, um eine fortwährend gleichartige Beladung der Gele zu gewährleisten (SMITH et al. 1985). Hierfür wurde eine Zwischenverdünnung aus 5 µl Überstand und 95 µl PBS hergestellt, davon 25 µl mit dem BCA-Protein-Assay-Kit versetzt, auf einer 96-Well-Platte kurz auf dem Thermomixer geschüttelt und folgend für 30 min (37 °C) inkubiert. Zur Feststellung der Proteinkonzentration konnten die Extinktionswerte der Proben mit einem Photometer (562 nm) gemessen werden. Als Leerkontrolle diente der Homogenisierungs- und Lysepuffer.

Die aliquotierten homogenisierten Proben wurden zur Denaturierung und Reduktion der Proteine mit Lämmli-Puffer, der 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt, versetzt (30 min bei 37 °C für PLB, Phospho-PLB Thr-17, Phospho-RyR2 Ser-2809, Phospho-RyR2 Ser-2815, RyR2 und 5 min bei 95 °C für GAPDH, CaMKII $\delta$ , CaMKII $\gamma$  und Phospho-CaMKII Thr-286).

### 2.4.3 SDS-Gelelektrophorese und elektrophoretischer Transfer

Zur vertikalen Proteinelektrophorese wurden ein 4-5 % Sammel-, ein 7,5-15 % Trenngel und die Anlage Mini-PROTEAN III™ Electrophoresis Cell (BioRad) verwendet. Die Konzentration des Trenngels wurde je nach Größe des zu untersuchenden Proteins gewählt. Das hergestellte Trenngel wurde zwischen die beiden Glasplatten gefüllt und die auf der Oberfläche entstandenen Luftblasen mit 200 µl Propanolol eliminiert. Nach Polymerisierung des Gels (15 min bei RT) wurde der Propanololüberstand abgenommen und das Sammelgel zwischen die Platten auf das Trenngel gegossen. Für die Beladung des Gels wurde Geltaschen durch Eindrücken eines Plastikammes geformt. Nach 10-15-minütiger Polymerisation des Gels wurde der Laufpuffer für die Elektrophorese eingefüllt. Jeweils 10-15 µl der Proben wurden in die Taschen des Ladegels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte über Anlegen eines elektrischen Feldes bei einer Stromstärke von 30 mA per Gel (maximale Potentialdifferenz von 100 V), so dass eine Auftrennung der gleichmäßig negativ geladenen Proteine nach ihrer Masse erfolgte (Gesamtlaufzeit: 90 min).

Die dabei entstehende Wärme fing das um die Kammer befindliche Eis ab. Dabei zeigt ein Standardproteinmassenmarker (Protein Marker V, Bestell. Br. 27-2210, PEQ-Lab) den Stand der aufgetrennten Proteinbanden an. Daraufhin erfolgte die Überführung des Trenngels in den Transferpuffer. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman Protran™) wurde gemäß des Prinzips von Towbin et al. (TOWBIN et al. 1979) nach folgendem Kammerschichtaufbau der Anlage vorgegangen: Schwamm, zwei Blätter Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Trenngel, zwei Blätter Filterpapier, Schwamm. Nach Auffüllung der vertikalen Box mit Transferpuffer wurde ein zu dem SDS-Gel vertikales elektrisches Feld mit 400 mA (Potentialdifferenz von 200 V) angelegt, wobei die Transferdauer unter konstanter Kühlung zwei Stunden betrug.

Nach Abschalten des Stroms wurde die Membran, die aufgrund hydrophober Wechselwirkungen die Proteine nun gebunden hatte, in eine Box überführt. Sodann wurde zur Qualitätsüberprüfung des Transfers und zur Markierung der Schnittführung Ponceaurot hinzugefügt, welches die Proteinbanden reversibel anfärbte. Unter Applikation von Waschpuffer wurde der Farbstoff wieder aus der Membran gelöst.

Anschließend wurden die freien unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit 5% Trockenmilchlösung, die weiterhin Waschpuffer mit jeweils 0,1% Tween 20 und 10-fach-Stock TBS enthielt, für eine Stunde bei RT geblockt. Danach wurden die Membranen zweigeteilt, um jeweils eine Hälfte mit einem anderen Primärantikörper für zwei Stunden (bzw. für 30 min bei GAPDH) bei RT zu inkubieren. Nach dreimaliger Auswaschung der nichthaftenden und unspezifisch gebundenen Antikörper, fügte man den in Waschpuffer und 0,5% Trockenmilch gelösten sekundären Antikörper hinzu. Unter Agitation inkubierte man zwei Stunden bei RT. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind tabellarisch aufgeführt (Tab. 2.8 und Tab. 2.9). Nach einem erneuten Auswaschen wurde die Membran 5 min mit dem Chemolumineszenz-Kit (Pierce Superisgnal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) behandelt. Dazu wurden die beiden Substrate Chemoluminophor und Peroxid im gleichen Verhältnis gemischt, um weiterhin über dessen Peroxidaseaktivität den sekundären Antikörper sichtbar zu machen. In einer Dunkelkammer konnte die Membran in einer Fotokassette auf einen Röntgenfilm fixiert und entwickelt werden. Die Belichtungszeiten und -durchgänge passte man der erforderlichen Bandenstärke an. Die Bandenintensität wurde mit dem Imaging Densitometer (Multimage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation) ausgewertet.

## 2.4.4 Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Firma/ Bestellnummer #	Titer
Anti-GAPDH	Maus	Biotrend Chemikalien GmbH/ # BT46-9995-55	1:20 000
Anti-CaMKII $\delta$	Kaninchen	Überlassen von Dr. Bers	1:15 000
Anti-CaMKII $\gamma$	Ziege	Santa Cruz/ # sc-1541	1:2 000
Anti-Phospho-CaMKII Thr-286	Maus	Affinity Bio Reagents/# MA1-047	1:1 500
Anti-Phospholamban	Maus	Millipore	1:5 000
Anti-Phospho-Phospholamban Thr-17	Kaninchen	Badrilla/ # A010-13	1:5 000
Anti-RyR2	Kaninchen	Überlassen von Dr. Marks	1:1 000
Anti-Phospho-RyR2 Ser-2809	Kaninchen	Überlassen von Dr. Marks	1:1 000
Anti-Phospho-RyR2 Ser-2815	Kaninchen	Überlassen von Dr. Marks	1:1 000

Tab. 2.8: Verwendete primäre Antikörper für Western Blots

Sekundärer Antikörper	Firma/ Bestellnummer #	Titer
Anti-Maus-AK	GE Healthcare/ # NA 931-100 $\mu$ l	1:5 000 für Anti-Phospholamban 1:10 000 für Anti-Phospho-CaMKII Thr-286 1:20 000 für Anti-GAPDH
Anti-Kaninchen-AK	GE Healthcare/ # NA 934-100 $\mu$ l	1:10 000
Anti-Ziegen-AK	DAKO/ # P0449I	1:10 000

Tab. 2.9: Verwendete sekundäre Antikörper für Western Blots

## 2.5 Isolation humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten

### 2.5.1 Lösung

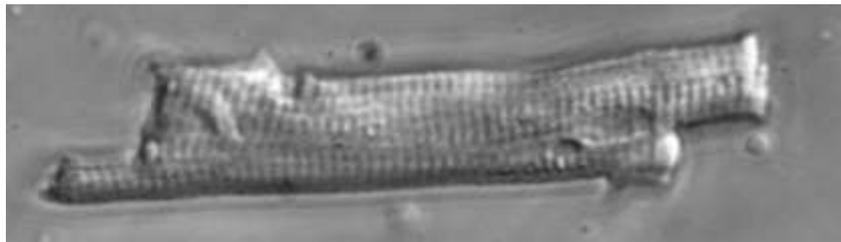
Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]	
Taurin	125,15	10	
KCl	74,56	25	
Glutaminsäure	147,1	70	pH=7,4 eingestellt mit NaOH bei 37 °C
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	10	
Glukose	180,16	22	
EGTA	380,4	0,05	

**Tabelle 2.10:** KB-Puffer (KB: "Kraft-Brühe")

### 2.5.2 Isolationsprotokoll

Für die Isolation humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten wurde mit Hilfe eines Skalpell ein Stück (ca. 5x5 cm) linker Ventrikel aus dem Herzen geschnitten. In einer Präparierschale, die Jolik-MEM-Lösung (Jolik-MEM, modifiziert für Spinner-Kulturen, Art.-Nr. APP1539A, Baacklab<sup>®</sup> Armin Baack) enthielt, wurde das Gewebe mit einer Nadel an einer Seite fixiert. Zunächst konnte mit einer Präparierschere das Myokard vom Epikard abgesetzt, sowie Fett- und Bindegewebe entfernt werden. Das Myokard wurde weiterhin zu ca. 1 mm großen Gewebestücken zerschnitten und mit einer Pipette in ein 15 ml Falcon überführt. Es folgte die dreimalige Waschung mit Jolik-MEM-Lösung. Parallel dazu konnte die erste Verdauung angesetzt werden. Je nach Gewebebeschaffenheit wurden 1,2-1,5 ml Trypsin (Gibco<sup>®</sup> Trypsin 2,5%, Cat.-No. 15090-046, Invitrogen) und 20-30 mg Kollagenase Typ II mit 250 U/mg (Lot.-Nr. 47B9464, Worthington Biochem<sup>®</sup>) in 15-20 ml Jolik-MEM gelöst. Nach Erwärmung der ersten Verdauung in der Isolationsflasche (36 °C) wurden die Gewebestücke aus dem Falcon in etwas Verdauung resuspendiert. Mit einer Pipette wurden die Gewebestücke in die Isolationsflasche überführt, um unter leichtem Rühren bei 36 °C für 45 min verdaut zu werden. In dieser Zeit erfolgte das Ansetzen der zweiten Verdauung, die ebenfalls gewebeadaptiert in ihrer Konzentration (20-42 mg Kollagenase auf 40 ml Jolik-MEM-Lösung) variiert wurde. Nach der ersten enzymatischen Verdauphase (45 min) wurde die Gewebelösung in ein 50 ml Falcon gefüllt. Nach Absinken der Pellets wurde der Überstand mit einer 25 ml Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit der zweiten Verdauung resuspendiert und erneut in die Isolationsflasche

überführt. Nach 15 Minuten wurde die Gewebelösung abermals in ein Falcon überführt. Der über ein Sieb gefilterte Überstand konnte in ein 15 ml Falcon gefüllt und die Zellen abzentrifugiert werden (3 min, RT, 60 g). Die gewonnenen Zellen wurden in 1-3 ml KB-Puffer resuspendiert. Die beschriebenen Verdauungsschritte wurden ohne Trypsin in gleicher Weise vier- bis fünfmal fortgesetzt. (Zeitintervall: 10 min). Zellqualität und -quantität wurden unter einem Lichtmikroskop beurteilt. Zur Selektion qualitativ hochwertiger Kardiomyozyten für die Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopie mussten die Zellen eine deutliche Querstreifung, eine rechteckige Form sowie wenig Granulationen aufweisen (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3:** Photographie eines frisch isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten (Vergrößerung)

## 2.6 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen via Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopie

### 2.6.1 Lösungen für Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopiemessungen

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]	
NaCl	58,44	140	
KCl	74,56	4	
MgCl <sub>2</sub>	95,21	1	pH=7,4 eingestellt bei 37 °C mit NaOH
HEPES	238,31	5	
Glukose	180,16	10	
CaCl <sub>2</sub>	110,98	1	
Caffein	194,20	10	

**Tab. 2.11:** Messtyrode mit bzw. ohne Caffein für  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenzmessungen

<b>Farbstoffstock</b>	Fluo-3 AM	1 mM	in 885 µl DMSO gelöst, Lagerung bei -20 °C
<b>Messfarbstofflösung</b>	Fluo-3 AM (Farbstoffstock)	10 µM	in 1 mM CaCl <sub>2</sub> Messtyrode lichtgeschützt bei RT lösen, Lagerung bei -20 °C
	Pluronic Acid-Lösung (20 % w/v in DMSO gelöst)	200 mg/ml	

Tab. 2.12: Ansatz der Farbstofflösung Fluo-3-AM

### 2.6.2 Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3

Zur Messung von Caffein-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten und von spontanen SR-Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungen über die RyR2 fungierte bei der vorliegenden Dissertation der nicht-ratiometrische Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3-Acetoxy-methylester (AM) (Bestellnr. 01241, MoBiTec®) (KAO et al. 1989, MINTA et al. 1989). Nicht-ratiometrische Farbstoffe erfahren nach ihrer selektiven Bindung an Ca<sup>2+</sup> (Abb. 2.4, 3) eine hundertfache Erhöhung ihrer Fluoreszenzintensität, jedoch nicht eine relevante Änderung ihrer Absorptions- und Emissionsmaxima. Gewählt wurde dieser Farbstoff, da er über ein günstiges Verhältnis von Signalfluoreszenz zu Hintergrundrauschen verfügt. Folgendes Prinzip macht man sich hierbei zu Nutze: Das Fluochrom Fluo-3 liegt zunächst als Pentaacetoxy-methylester (Abb. 2.4, 1) vor, welcher auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften über die Zellmembran der Kardiomyozyten diffundieren kann. Intrazelluläre Esterasen hydrolysieren das Molekül in seine Bestandteile Acetoxy-methyl und den polaren Farbstoff Fluo-3, der folglich seine Membranpermeabilität verliert (Abb. 2.4, 2). Der Fluoreszenzeffekt gehorcht hierbei der sogenannten Stokes'schen Verschiebung („Stokes Shift“), entdeckt von Sir George Gabriel Stokes 1953 (LAKOWICZ 1999). Fluo-3 wird mit Licht definierter kurzer Wellenlänge angeregt (Abb. 2.4, 4). Die Absorption von Photonen bewirkt eine kurzzeitige Anhebung der Elektronen in ein höheres Orbital. Da diese jedoch stets einen stabileren niederenergetischen Zustand anstreben, fallen sie auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei wird Energie  $\Delta E$  in Form von Licht frei, welches jedoch in den langwelligen und somit energieärmeren Bereich verschoben ist (Abb. 2.4, 5), da ein Teil der Energie auch in thermische und Vibrationsenergie umgewandelt wird. Diese Differenz zwischen Exzitations- ( $\lambda_{ex}$ ) und Emissionswellenlänge ( $\lambda_{em}$ ) von 20-50 nm wird als Stokes'sche Verschiebung bezeichnet (LICHTMAN und CONCHELLO 2005).

Stokes'sche Verschiebung:

$$\lambda_s = |\lambda_{ex} - \lambda_{em}|$$

Energiedifferenz:

$$\Delta E = h \times c \left( \frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{em}} \right)$$

Formel 2.2 und 2.3:

$\lambda_s$ : Wellenlängenverschiebung nach Stokes,  $\lambda_{ex}$ : Exzitationswellenlänge,  $\lambda_{em}$ : Emissionswellenlänge,  $\Delta E$ : Energiedifferenz,  $h$ : Plancksches Wirkungsquantum  $6,63 \times 10^{-34}$  Js,  $c$ : Lichtgeschwindigkeit

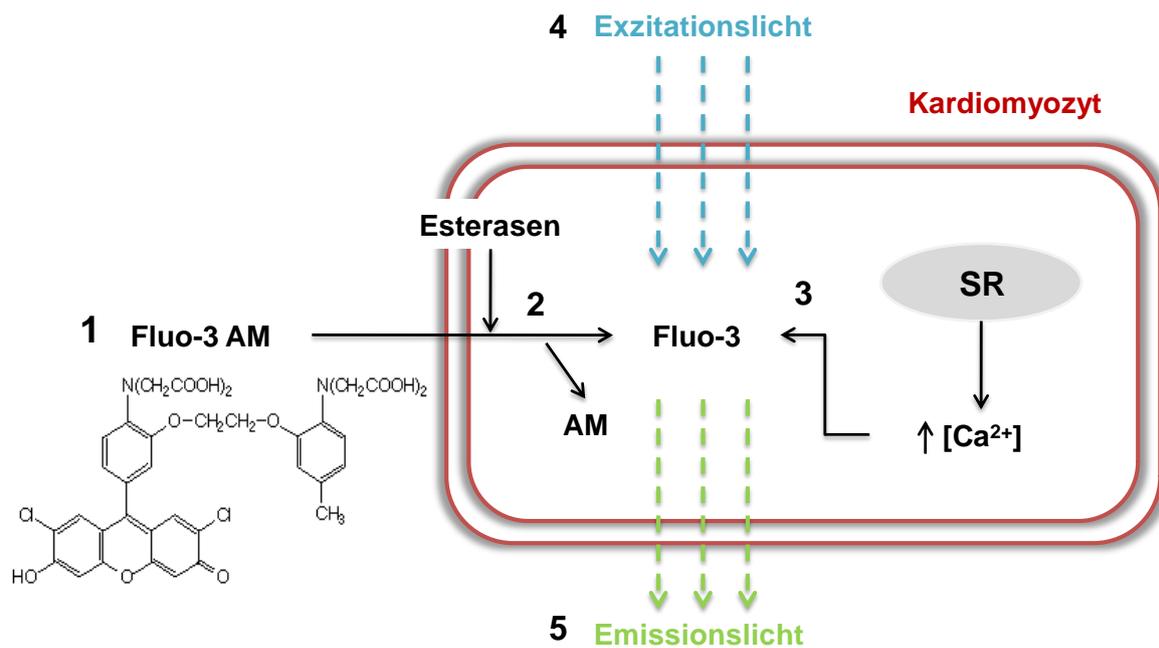


Abb. 2.4: Schema zum Wirkungsprinzip des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3

## 2.6.3 Die Epifluoreszenzmikroskopie

### 2.6.3.1 Aufbau und Prinzip des Epifluoreszenzsetups

Das Kontraktionsverhalten frisch isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten und deren intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsveränderungen können mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie erfasst werden. Die fraktionelle Sarkomerverkürzung der Kardiomyozyten dient hierbei als Maß für die Kontraktionskraft. Simultan können intrazelluläre Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über die Zeit, auch als  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bezeichnet, mit Hilfe von  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen gemessen werden.

Das Epifluoreszenzsetup bestand aus einem inversen Mikroskop (Nikon Eclipse TE 2000-U), ausgestattet mit einem 40-fach vergrößernden Ölimmersionsobjektiv (Abb. 2.5, 6). Über einen Zu- und Abfluss wurde eine kontinuierliche Perfusion der Versuchskammer mit beheizter Messtyrode (37 °C) gewährleistet. Als Stimulator diente der MyoPacer™ (Firma IonOptix) (Abb. 2.5, 14), dessen Stimulationsfrequenz über Platinelektroden auf die in der Versuchskammer befindliche Messtyrode übertragen wurde. Die für Fluo-3 benötigte Anregungswellenlänge von  $480\pm 15$  nm wurden über einen Anregungsfilter (Chroma Technology Corp, USA) aus dem weißen Licht einer 75 W Xenonlampe (Xenon Short Arc Lamp, Typ UXL-75XE, Ushio Inc. Japan) herausgefiltert. Dichromatische Spiegel besitzen die Fähigkeit, kurze Wellenlängen zu reflektieren und lange hindurchzulassen. Folglich wurden die Spiegel so gewählt, dass das nötige Exzitationslicht ( $480\pm 15$  nm) das Objektiv zur Zelle passieren und das emittierte langwelligere Fluoreszenzlicht ( $535\pm 20$  nm) zurück zur Kamera gelangen konnten (Abb. 2.5, 4). Das emittierte Licht, welches vorher über Emissionsfilter vom Streulicht getrennt wurde, gelangte zum Photomultiplier (electron tubes limited, USA) (Abb. 2.5, 11). Über den photoelektrischen Effekt lösen die emittierten Photonen Elektronen aus der Kathode des Photomultipliers, welche dann in einem elektrischen Feld eine Beschleunigung erfahren. Aus hintereinandergeschalteten Dynoden lösen diese Sekundärelektronen heraus, resultierend in einer Signalverstärkung. Der Spannungsabfall an einem Widerstand ermöglichte die Datentransfomierung. Die fraktionelle Zellverkürzung als Maß für die Kontraktionskraft der Kardiomyozyten konnte optisch mit Hilfe einer Myozytenkamera (MyoCam™, Firma IonOptix, Milton, MA, USA) über dessen Sarkomerlänge simultan detektiert werden (Abb. 2.5, 9). Zur Darstellung dieser diente das Licht einer Rotlichtlampe (Wellenlänge  $>650$ nm), wodurch eine Interferenz mit der Fluoreszenz vermieden wurde (Abb. 2.5, 6).

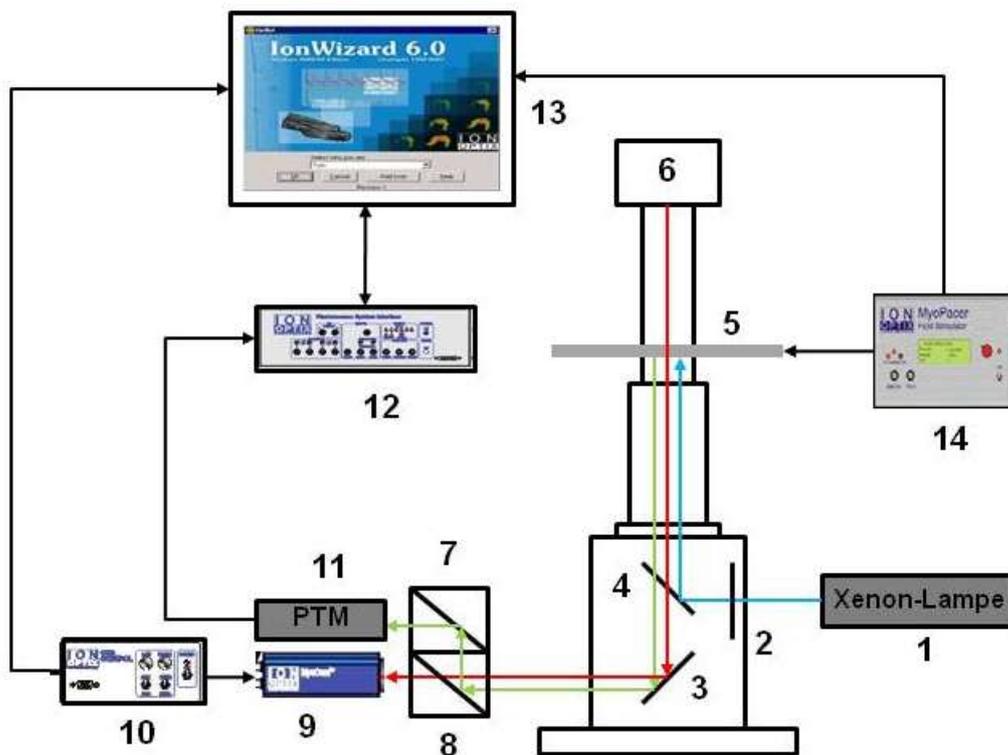


Abb. 2.5: Aufbau des Epifluoreszenzsetups, modifiziert nach KOHLHAAS (2006), S.65 und IonOptix 2009 (<http://www.ionoptix.com/userfiles/File/Database/HPSYS.pdf>)

**Blauer Pfeil:** Exzitationslicht, **Grüner Pfeil:** Emissionslicht, **roter Pfeil:** Rotlicht, **1:** Xenonlampe, **2:** Filter, **3:** Spiegel, **4:** Dichromatischer Spiegel, **5:** Objektisch mit Versuchskammer, **6:** Rotlichtlampe und Mikroskop, **7:** Spiegel, **8:** Dichromatischer Spiegel, **9:** Kamera, **10:** Kamerakontrolleinheit, **11:** PTM (Photomultiplier) **12:** Fluoreszenzkontrolleinheit, **13:** Computer mit Programm IonWizard, **14:** Stimulator

### 2.6.3.2 Versuchsprotokoll zur Messung von Caffein-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

200-500  $\mu\text{l}$  Zellsuspension frisch isolierter linksventrikulärer Kardiomyozyten wurden auf einer mit 1,5-2  $\mu\text{l}$  Laminin (L2020, Sigma-Aldrich®) beschichteten Versuchskammer ausplattiert. Nach Adhärenz der Kardiomyozyten nach einer Stunde wurden der Überstand abpipettiert und diese mit 10  $\mu\text{M}$  Fluo-3 AM lichtgeschützt inkubiert (20 min bei RT). Die Farbstofflösung enthielt zur pharmakologischen Intervention entweder den CaMKII-Inhibitor KN-93 oder die Kontrollsubstanz KN-92 (vgl. Material und Methoden Kap. 2.2). Nach Ablauf der Inkubationszeit und dem Montieren der Versuchskammer auf den Objektisch wurde diese für 5 min mit Messtyrode gespült, um extrazellulären, unspezifisch gebundenen

Farbstoff und Zelldetritus zu eliminieren. Während eines Versuches wurde die Zellkammer mit Tyrode, die KN-93 bzw. KN-92 beinhaltete, superperfundiert (bei RT). Die Kardiomyozyten wurden mit bei einer Frequenz von 1 Hz stimuliert (25% über der Reizschwelle, der für die Zellen liegenden Spannung). Nach dem Erreichen konstanter Versuchsbedingungen konnten die Fluoreszenzmessungen begonnen werden. Hierzu erfolgten die horizontale Einstellung einer sich regelmäßig kontrahierenden Zelle und die Ausblendung des Hintergrundes. Zur Messung des SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehaltes wurde die Stimulation im weiteren Versuchsablauf für eine Sekunde gestoppt und 10 µmol/l Caffeinlösung direkt auf die Zelle appliziert. Caffein führt zur reversiblen Öffnung der RyR2, so dass es zu einer vollständigen SR-Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung kommt. Somit repräsentiert die Amplitude des Caffein-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten den SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt.

### 2.6.3.3 Datenauswertung

Die konvertierten Daten wurden mittels der Software IonWizard 5.0 (IonOptix) graphisch veranschaulicht und analysiert. Die Amplitude des Caffein-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten wurde mit folgender Formel aus systolischer und diastolischer Fluoreszenz berechnet, wobei die Hintergrundfluoreszenz, die durch Phänomene wie Streulicht und Autofluoreszenz entstand, subtrahiert wurde (Formel 2.4 und Abb.2.6).

Ca<sup>2+</sup>-Transienten-Amplitude:

$$\Delta \frac{F}{F_0} = \frac{F_{\text{systolisch}} - F_{\text{Hintergrundfluoreszenz}}}{F_{\text{diastolisch}} - F_{\text{Hintergrundfluoreszenz}}}$$

Formel 2.4: Ca<sup>2+</sup>-Transienten-Amplitude

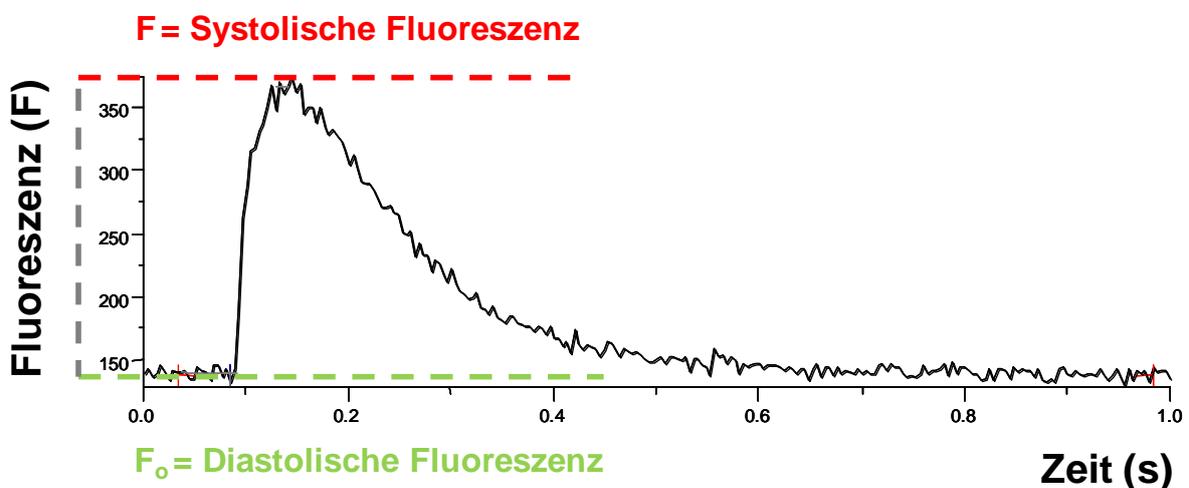


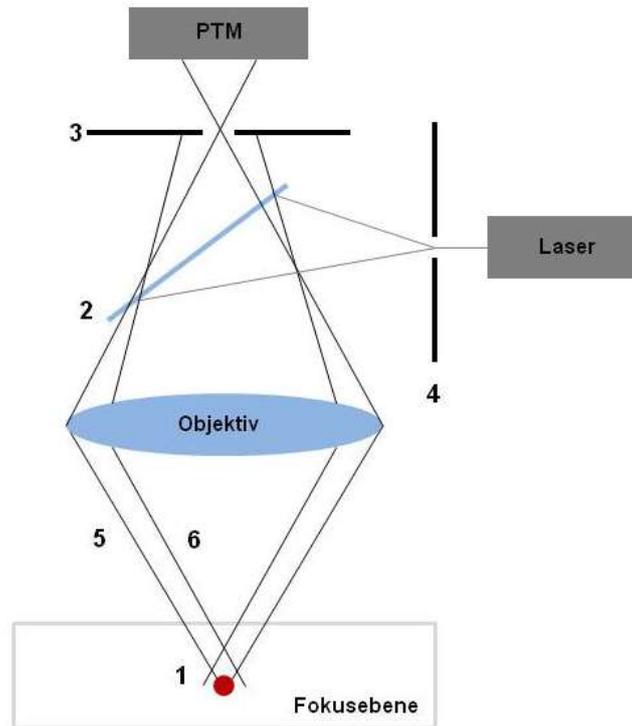
Abb. 2.6: Beispiel eines Ca<sup>2+</sup>-Transienten und Veranschaulichung der Amplitudenberechnung

## 2.6.4 Die konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie

### 2.6.4.1 Grundlagen

Die konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, räumlich und zeitlich summierte SR-Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungen in den Intrazellulärraum, sog. SR-Ca<sup>2+</sup>-Sparks, zu untersuchen. Diese erfolgen durch geclusterte RyR2 und lassen somit Rückschlüsse auf die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 zu (CHENG et al. 1993, GUATIMOSIM et al. 2002). Bei der konventionellen Lichtmikroskopie ist die räumliche Auflösung des Objektes durch die Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht limitiert. Die Konfokalmikroskopie, begründet durch den US-amerikanischen Forscher Marvin Minsky 1961 (MINSKY 1988), stellt eine Weiterentwicklung von dieser dar.

Die Besonderheit im Strahlengang bei dieser Methode liegt in der Zwischenschaltung einer Lochblende (Abb. 2.7, 3 und 4). Das Exzitationslicht wird über verschiedene Spiegel auf das Objekt fokussiert und das emittierte Fluoreszenzlicht über einen dichromatischen Spiegel von diesem separiert. Emittiertes Licht, welches ober- oder unterhalb der Fokusebene (Abb. 2.7, 1) emittiert wird, trifft defokussiert auf die vor dem Detektor platzierte Blende und wird somit ausgeblendet (Abb. 2.7, 6). Anregungs- und Detektionsfokus liegen übereinander, sprich konfokal (CONCHELLO und LICHTMAN 2005). Resultierend entstehen kontrastreichere Bilder durch Streulichtunterdrückung mit höherer lateraler und axialer Auflösung. Die Auflösung und die Tiefendiskriminierung können über die Größe der Lochblende variiert werden. Ein zweiter Unterschied zum herkömmlichen Lichtmikroskop stellt die punktweise Abtastung des zu untersuchenden Objektes dar. Das Konfokalmikroskop ist mit einem Punktscanner ausgestattet, welches über ein bewegliches Spiegelsystem verfügt, sodass die Zelle Punkt für Punkt mit einem fokussierenden Laser gerastert, d. h. gescannt werden kann. Die emittierte Fluoreszenz wird somit pixelweise detektiert. Örtliche Änderungen der Objekteigenschaften werden als zeitliche Intensitätsschwankungen wahrgenommen. Folglich entsteht das Bild nicht für alle Punkte gleichzeitig, sondern seriell. Die optische Information wurde in ein elektrisches Signal konvertiert, über einen Photomultiplier verstärkt und mit Hilfe eines Analog-Digital-Wandlers digitalisiert.



**Abb. 2.7: Prinzip eines Konfokalmikroskops**

1: zu fokussierender Punkt, 2: dichromatischer Spiegel, 3: Lochblende vor dem Photomultiplier (konfokale Blende), 4: Lochblende vor dem Laserlicht, 5: Licht innerhalb des Detektionsfokus, 6: Licht außerhalb des Detektionsfokus

#### 2.6.4.2 Versuchsprotokoll zur Messung von SR-Ca<sup>2+</sup>-Sparks

Alle Aufnahmen entstanden mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss AG, Deutschland), ausgestattet mit einem 40x Ölimmersionsobjektiv unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3 AM. Wie bei der Epifluoreszenzmikroskopie wurden die frisch isolierten linksventrikuläre Kardiomyozyten ausplattiert, mit 10  $\mu\text{M}$  Fluo-3 AM lichtgeschützt inkubiert (20 min bei RT) und die Messtyrode mit 1  $\mu\text{mol/l}$  AIP zur CaMKII-Inhibition versetzt. Als Kontrolle diente die 1 mM CaCl<sub>2</sub> Messtyrode. Vor Beginn eines Experiments erfolgte die Auswaschung des überflüssigen und extrazellulär verbliebenen Farbstoffes für 5 min. Ein Argon-Ion-Laser regte Fluo-3 mit einer Wellenlänge von 488 nm an, wobei die daraufhin emittierte Fluoreszenz durch einen Emissionsfilter (505 nm) zum Photomultiplier gelangte. Im „Line-Scan“- Modus wurden die Fluoreszenzbilder mit folgenden Einstellungen registriert: 512 Pixel pro Linie, Scanbreite 38,4  $\mu\text{m}$ , Pixelzeit 0,64  $\mu\text{s}$ , Pixelgröße 0,07  $\mu\text{m}$  x 0,07  $\mu\text{m}$ , Pixeltiefe 12 bit.

### 2.6.4.3 Datengenerierung und -auswertung

Das zum Setup dazugehörige Computerprogramm (Carl Zeiss AG, Deutschland) welches die gemessenen Daten registrierte, diente gleichzeitig zur Auswertung. Die SR-Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz (CaSpF) wurde nach einer repetitiven Feldstimulation (10 Impulse bei 1 Hz) und unter Ruhebedingungen aufgenommen und später auf Zellvolumen und Scanrate normalisiert (pL<sup>-1</sup> x s<sup>-1</sup>). Die SR-Ca<sup>2+</sup>-Sparkamplitude (F/F<sub>0</sub>) wurde kalkuliert nachdem die Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz erfolgt war, indem die Spitzenfluoreszenz, auch Peakfluoreszenz genannt, durch die Basisfluoreszenz geteilt wurde. Folgende Größen wurden weiterhin, wie folgt, berechnet:

$$CaSpS = \frac{F}{F_0} \times Sparkdauer \times Sparkbreite \quad \left[ \frac{F}{F_0} \times ms \times \mu m \right]$$

$$durchschnittliches\ Leck\ per\ Zelle = CaSpS \times mittlere\ CaSpF\ der\ Zelle \quad [pF/F_0/\mu m^2]$$

**Formel 2.5 und 2.6:**

**CaSpS:** Ca<sup>2+</sup>-Spark-Größe, **CaSpF:** Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz, **F/F<sub>0</sub>:** Ca<sup>2+</sup>-Sparkamplitude

## 2.7 Statistik und Datenauswertung

Die Importierung der Daten in Microsoft Exel und GraphPad Prism™ 4.0 ermöglichte deren statistische und graphische Auswertung. Im folgenden Ergebnisteil sind die erhobenen Messwerte als arithmetisches Mittel ± Standardfehler des Mittelwertes („standard error of the mean“=S.E.M) dargestellt. Dieser wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Standardfehler des Mittelwertes} \quad S.E.M. = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

**Formel 2.7:**

*S.E.M.:* Standardfehler des Mittelwerts, *n:* Anzahl, *σ<sup>2</sup>:* Varianz, *σ:* Standardabweichung

Der Student t-Test kam je nach Anforderungslage der Daten gepaart oder ungepaart zur statistischen Analyse zur Anwendung. Darüber hinaus wurde die Zweiweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen mit dem Holm-Sidak-Post-Hoc-Test angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von P<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Daten der verwendeten humanen Herzen

Die Darstellung der Ergebnisse beginnt mit der tabellarischen Auswertung des durchschnittlichen Alters, der Hämodynamik und der medikamentösen Therapie der Patienten, die sich einer allogenen Herztransplantation unterziehen mussten. Insgesamt wurden 37 humane terminal insuffiziente Herzen (NYHA Klasse VI) für diese Dissertation verwendet. 20 Patienten wiesen davon eine ischämische Kardiomyopathie (ICM), 15 eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) und zwei eine andere Ursache für eine Herzinsuffizienz auf (Tab. 3.1). Davon waren 28 Patienten männlichen und neun weiblichen Geschlechts. Als Kontrolle für die Expression der CaMKII $\delta$  und CaMKII $\gamma$  dienten zwölf gesunde Herzen, welche aus verschiedenen Gründen nicht transplantiert werden konnten. Da diese gesunden Herzen von anonymen Spendern stammten, waren keine weiteren Informationen über die Patienten verfügbar.

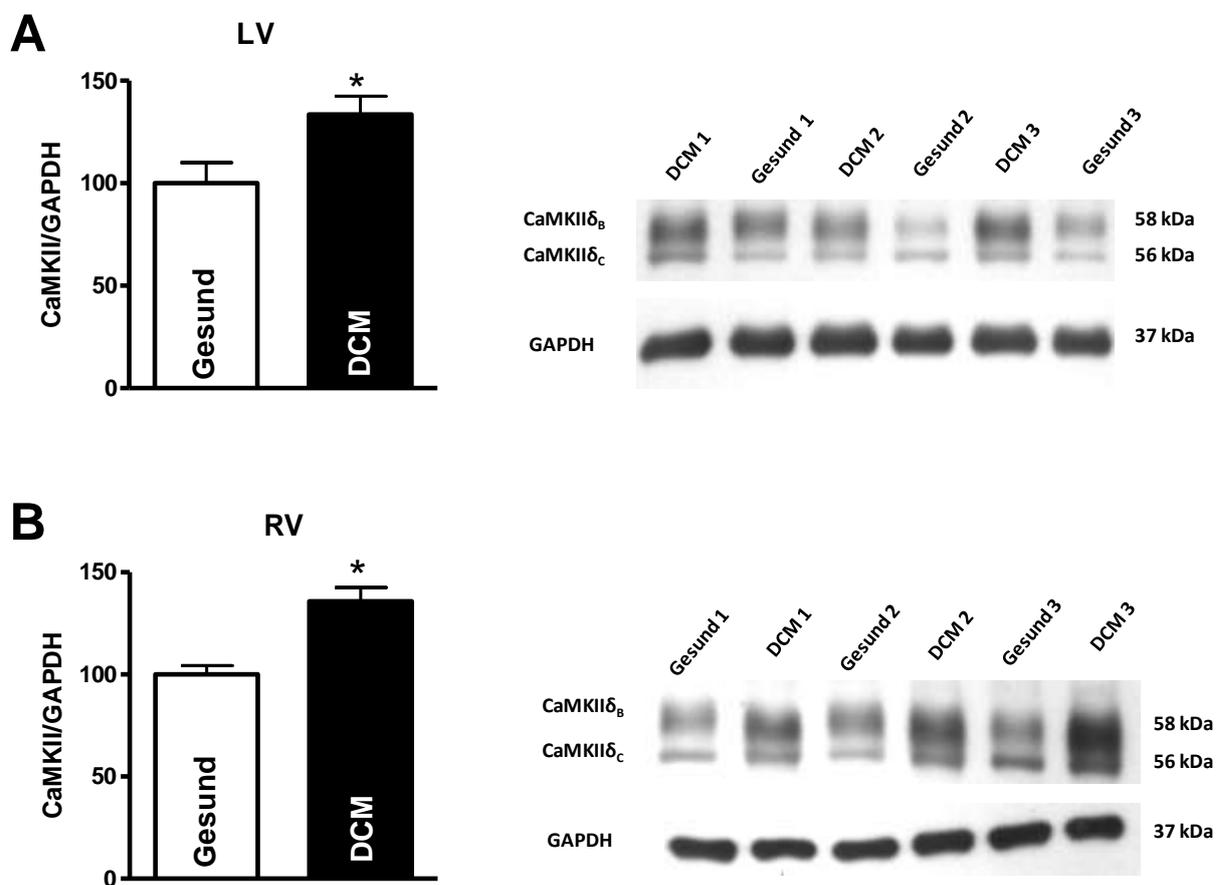
	Alter (Jahre)	Hämodynamik			Medikation (%)						
		EF (%)	PCWP (mmHg)	CI (l/min/m <sup>2</sup> )	ACE	$\beta$ -B	ARB	DIU	DIG	KAT	AA
Mittelwert $\pm$ SEM	48,5 $\pm$ 2,3	23,1 $\pm$ 1,3	21,2 $\pm$ 1,5	2,1 $\pm$ 0,1	53	83	27	90	27	30	24

**Tab.3.1: Übersicht über Alter, Hämodynamik (Mittelwert  $\pm$  SEM) und die medikamentöse Therapie (%) der verwendeten humanen terminal insuffizienten Herzen**

**EF:** Ejektionsfraktion; **PCWP:** Pulmonalkapillärer Verschlussdruck („pulmonal capillary wedge pressure“); **CI:** Herzindex („Cardiac Index“), **ACE:** ACE-Hemmer,  **$\beta$ -B:**  $\beta$ -Blocker, **ARB:** Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker, **DIU:** Diuretika, **DIG:** Digitalis, **KAT:** Katecholamine, **AA:** Antiarrhythmika

### 3.2 CaMKII-Expression im humanen ventrikulären Myokard

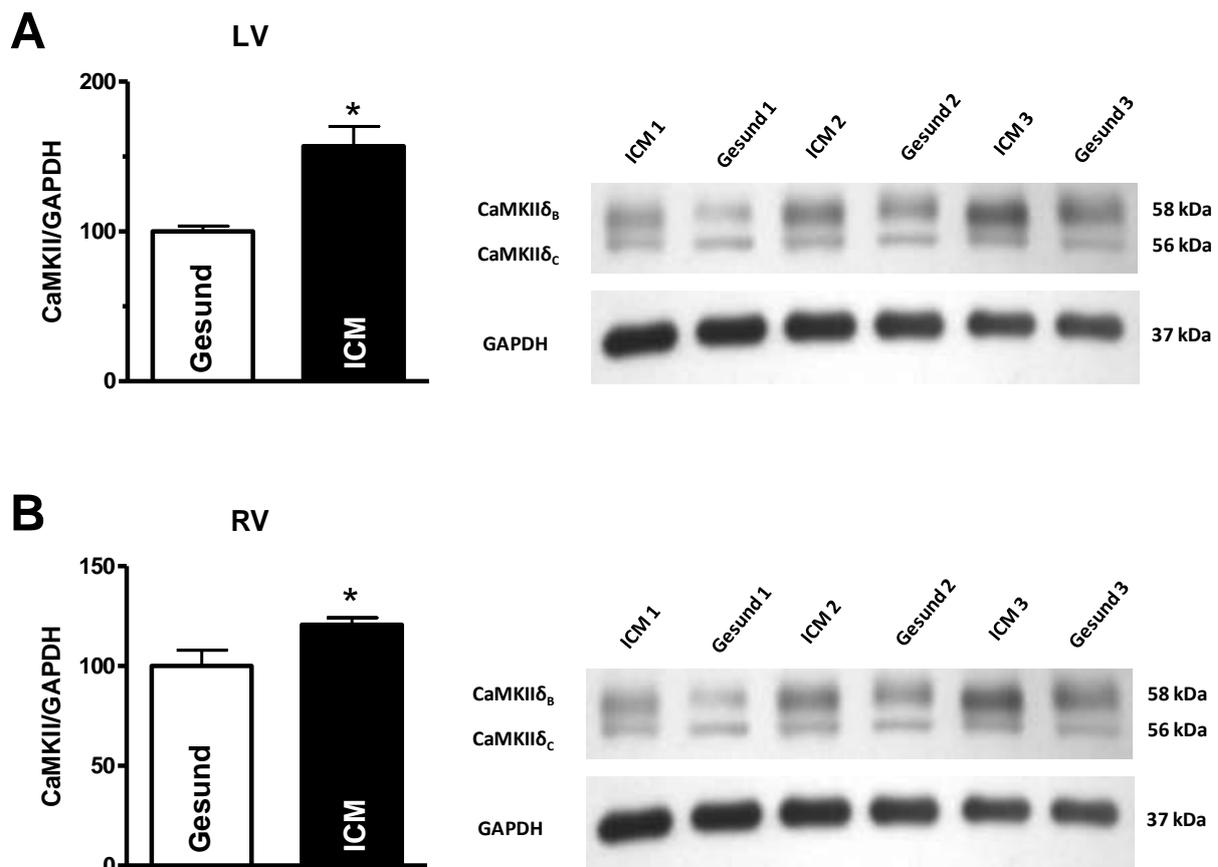
Die durchschnittliche linksventrikuläre (LV) CaMKII $\delta$ -Proteinexpression war von Patienten, die unter DCM litten (n=10), signifikant um  $33,5\pm 8,9\%$  gegenüber linksventrikulärem gesundem Gewebe (Gesund) (n=8) erhöht (Abb. 3.1 A,  $P<0,05$  vs. Gesund). Analog zeigte rechtsventrikuläres (RV) Myokard mit DCM eine deutliche Erhöhung der CaMKII $\delta$ -Expression um  $35,8\pm 6,8\%$  (n=8) verglichen mit gesundem Myokard (n=6) (Abb. 3.1 B.,  $P<0,05$  vs. Gesund).



**Abb. 3.1: CaMKII $\delta$ -Proteinexpression in Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie verglichen mit gesunden**

**A:** CaMKII $\delta$ -Überexpression in linksventrikulären Myokard (LV) von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) (n=10 vs. n=8) **B:** Gleiche Ergebnisse zeigten sich für rechtsventrikuläres Myokard (RV) (n=8 vs. n=6) (normalisiert auf GAPDH,  $*P<0,05$  vs. Gesund).

Es galt zu prüfen, ob die CaMKII $\delta$ -Expression nicht nur bei Patienten mit DCM gesteigert ist. Deshalb wurden Expressionsanalysen in Patientengewebe mit ischämischer Herzerkrankung bzw. Kardiomyopathie (ICM) durchgeführt. In Abbildung 3.2 A erkennt man, dass auch in ICM-Hezen die CaMKII $\delta$ -Expression im linken Ventrikel signifikant um  $45,1 \pm 12,9\%$  gegenüber gesunden Herzen gesteigert ist (jeweils  $n=12$ ,  $P < 0,05$  vs. Gesund). Ähnliche Ergebnisse fanden sich für den rechten Ventrikel von Patienten mit ICM von  $28,9 \pm 9,5\%$  im Vergleich zu gesundem rechten Ventrikel (jeweils  $n=6$ ) (Abb. 3.2 B,  $P < 0,05$  vs. Gesund).



**Abb. 3.2: Erhöhte CaMKII $\delta$ -Expression im humanen terminal insuffizienten Myokard mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM)**

**A:** Linksventrikuläres Myokard (LV) zeigte eine Elevation der CaMKII $\delta$ -Expression in Myokard mit ICM im Gegensatz zu gesundem Myokard (jeweils  $n=12$ ). **B:** Die CaMKII $\delta$ -Expression im rechten Ventrikel bei einer ICM war äquivalent erhöht (jeweils  $n=6$ ) (normalisiert auf GAPDH, \* $P < 0,05$  vs. Gesund).

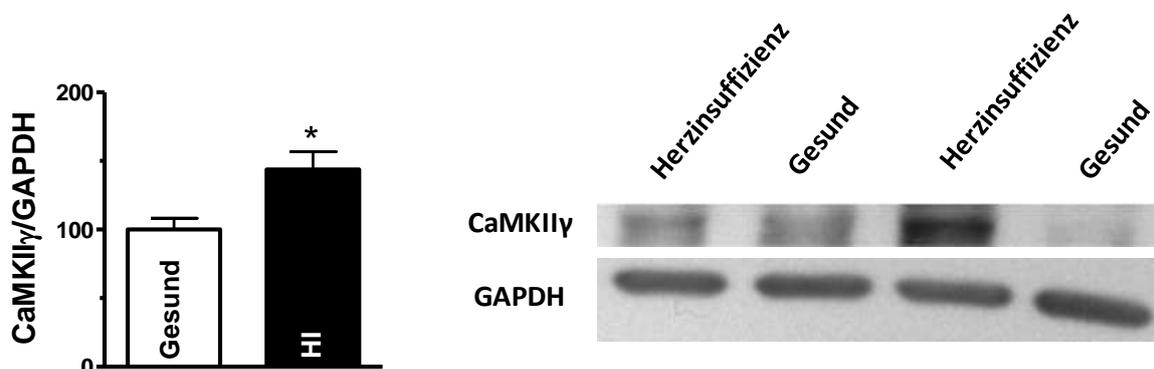
In allen dargestellten Gruppen war die Expression der CaMKII $\delta$ -Splicevarianten, die nukleäre CaMKII $\delta_B$  und die zytosolische CaMKII $\delta_C$ , im linken und rechten Ventrikel signifikant gesteigert, was in der folgenden Tabelle nochmals aufgeschlüsselt ist (Tab. 3.2).

	DCM		ICM	
	LV	RV	LV	RV
CaMKII $\delta$ total	133,5 $\pm$ 8,9*	135,8 $\pm$ 6,8*	145,1 $\pm$ 12,9*	128,9 $\pm$ 9,5*
CaMKII $\delta$ <sub>C</sub>	151,3 $\pm$ 11,7*	127,4 $\pm$ 9,2*	146,5 $\pm$ 12,8*	151,7 $\pm$ 9,9*
CaMKII $\delta$ <sub>B</sub>	130,3 $\pm$ 5,7*	134,4 $\pm$ 5,3*	144,3 $\pm$ 18,7*	131,8 $\pm$ 9,9*

**Tab. 3.2: Detaillierte Proteinexpressionsanalysen der CaMKII $\delta$**

Aufgeführt sind die Gesamtproteinexpression der CaMKII $\delta$  (CaMKII $\delta$  total) sowie ihre Aufteilung in ihre zytosolische (CaMKII $\delta$ <sub>C</sub>) und ihre nukleäre Isoform (CaMKII $\delta$ <sub>B</sub>). Die Herzen waren sowohl links- (LV) als auch rechtsventrikulären (RV) Ursprungs von Patienten, die unter einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) bzw. ischämischen Kardiomyopathie (ICM) litten (normalisiert auf GAPDH, \*P<0,05 vs. Gesund).

Darüber hinaus wurde die Expression der kardialen Isoform CaMKII $\gamma$  im linken Ventrikel in humanen terminal insuffizienten Herzen untersucht. Diese wies ebenfalls eine Elevation ihrer Proteinexpression um 43,7 $\pm$ 13,0% gegenüber gesundem linksventrikulärem Gewebe auf (Abb.3.3, n=9 vs. n=8, normalisiert auf GAPDH, P<0,05 vs. Gesund).



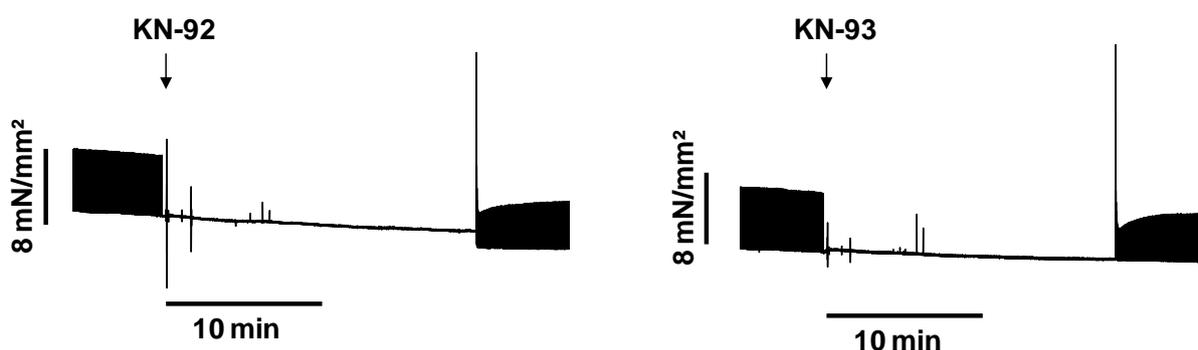
**Abb. 3.3:** Western-Blot-Auswertung der CaMKII $\gamma$  (n=9 vs. n=8, normalisiert auf GAPDH, \*P<0,05 vs. Gesund)

### 3.3 Die Effekte der CaMKII-Inhibition auf die Kontraktilität terminal insuffizienter Muskelstreifen

In den folgenden Experimenten sollte zunächst der Einfluss der CaMKII-Inhibition auf die Kontraktilität der humanen rechtsventrikulären Muskelstreifen untersucht werden.

#### 3.3.1 Ausgangsbedingungen

Die Versuche mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 und seinem inaktiven Analogon KN-92 als Kontrolle erfolgten stets paarweise. Eine Vergleichbarkeit der Experimente wurde sichergestellt, indem die Kontrollgruppe und die CaMKII-Inhibitorgruppe gleiche Ausgangsbedingungen zeigten. Zum einen wiesen beide Versuchsgruppen die gleichen mittleren Dimensionen für die Muskelstreifen,  $0,38 \pm 0,06 \text{ mm}^2$  für KN-93 und  $0,37 \pm 0,06 \text{ mm}^2$  für KN-92, auf. Zum anderen waren die Ausgangswerte der entwickelten Kräfte vor der pharmakologischen Intervention bei einer Basisstimulation von 1 Hz für beide Gruppen nahezu gleich, für die mit KN-93 behandelten Streifen mit  $6,6 \pm 1,6 \text{ mN/mm}^2$  und für die Kontrollgruppe mit  $6,8 \pm 1,1 \text{ mN/mm}^2$  (jeweils  $n=14$  aus 9 Herzen,  $P=0,9$ ). Betrachtet man die Basiswerte der entwickelten Kräfte der Muskelstreifen nach der 20-minütigen Inkubations- und Stimulationspause mit den Pharmaka, so können ebenfalls vergleichbare Ausgangskräfte festgestellt werden, wie in Abbildung 3.4 ersichtlich ( $5,1 \pm 1,1 \text{ mN/mm}^2$  für KN-93 vs.  $5,6 \pm 0,9 \text{ mN/mm}^2$  für KN-92, jeweils  $n=14$  aus 9 Herzen,  $P=0,7$ ).

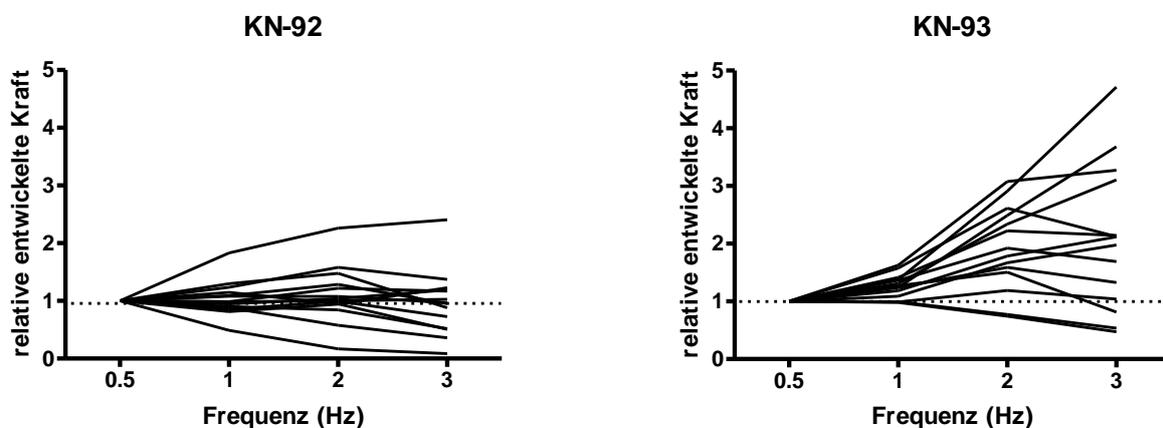


**Abb. 3.4: Originalregistrierungen zur Veranschaulichung der äquivalenten Ausgangsbedingungen**

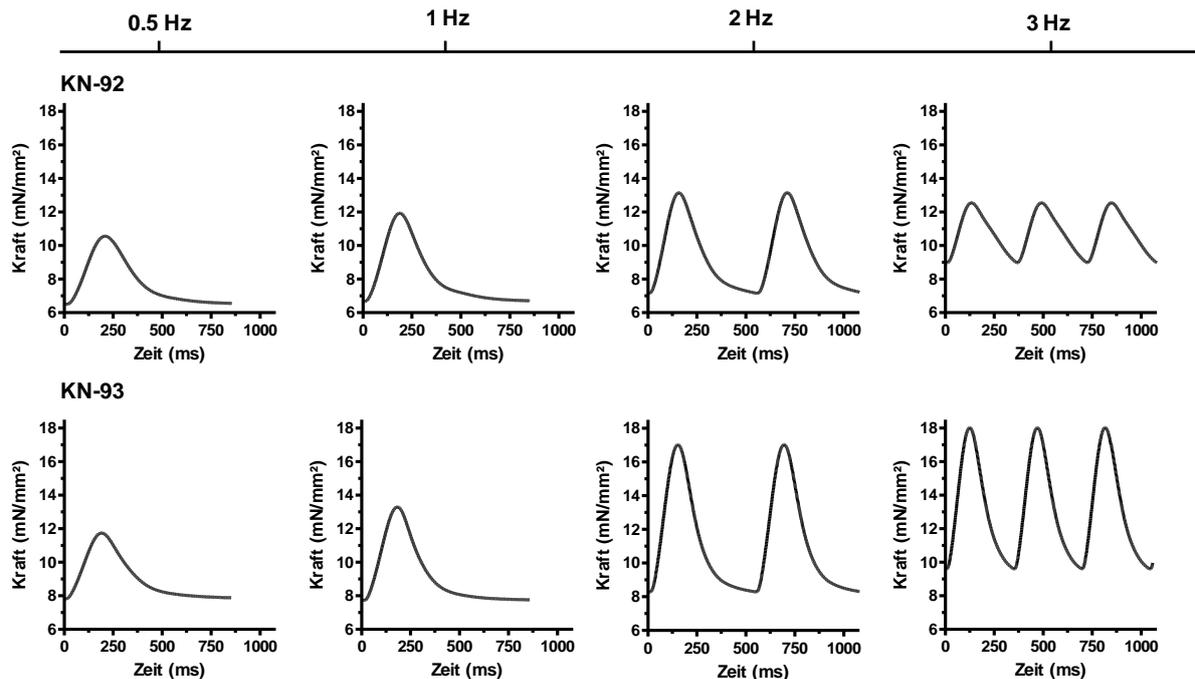
Der mit KN-92 bzw. KN-93 bezeichnete Pfeil symbolisiert die jeweilige pharmakologische Intervention nach einer 20-minütigen Inkubations- und Stimulationspause.

### 3.3.2 Beeinflussung der Inotropie durch den CaMKII-Inhibitor KN-93

Um der Frage auf den Grund zu gehen, welche Auswirkungen die CaMKII-Inhibition auf die Kontraktilität von humanem terminal insuffizientem Myokard unter steigenden Stimulationsfrequenzen hat, führten wir Kraft-Frequenz-Beziehungen durch. Die Ergebnisse für die entwickelten Kräfte wurden auf die Werte bei 0,5 Hz normalisiert. Die Kontrollen zeigten eine für die terminale Herzinsuffizienz typische negative bzw. inverse Kraft-Frequenz-Beziehung. Im Gegensatz dazu bewirkte die CaMKII-Inhibition mittels KN-93 einen statistisch hochsignifikanten positiv inotropen Effekt. Während die mittlere entwickelte Kraft bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz zunächst unverändert in Anwesenheit von KN-93 mit  $4,6 \pm 0,9$  mN/mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe KN-92 mit  $4,2 \pm 0,8$  mN/mm<sup>2</sup> war (jeweils n=14 aus 9 Herzen, P=0,78), kam es zu einer hoch signifikanten Steigerung von dieser unter CaMKII-Blockade bei steigenden Stimulationsfrequenzen. Veranschaulicht wird diese positive Kraft-Frequenz-Beziehung unter CaMKII-Inhibition in der folgenden Abbildung 3.5, welche die auf 0,5 Hz normalisierten entwickelten Kräfte aller Muskelstreifen während kontinuierlicher Frequenzerhöhungen demonstriert.

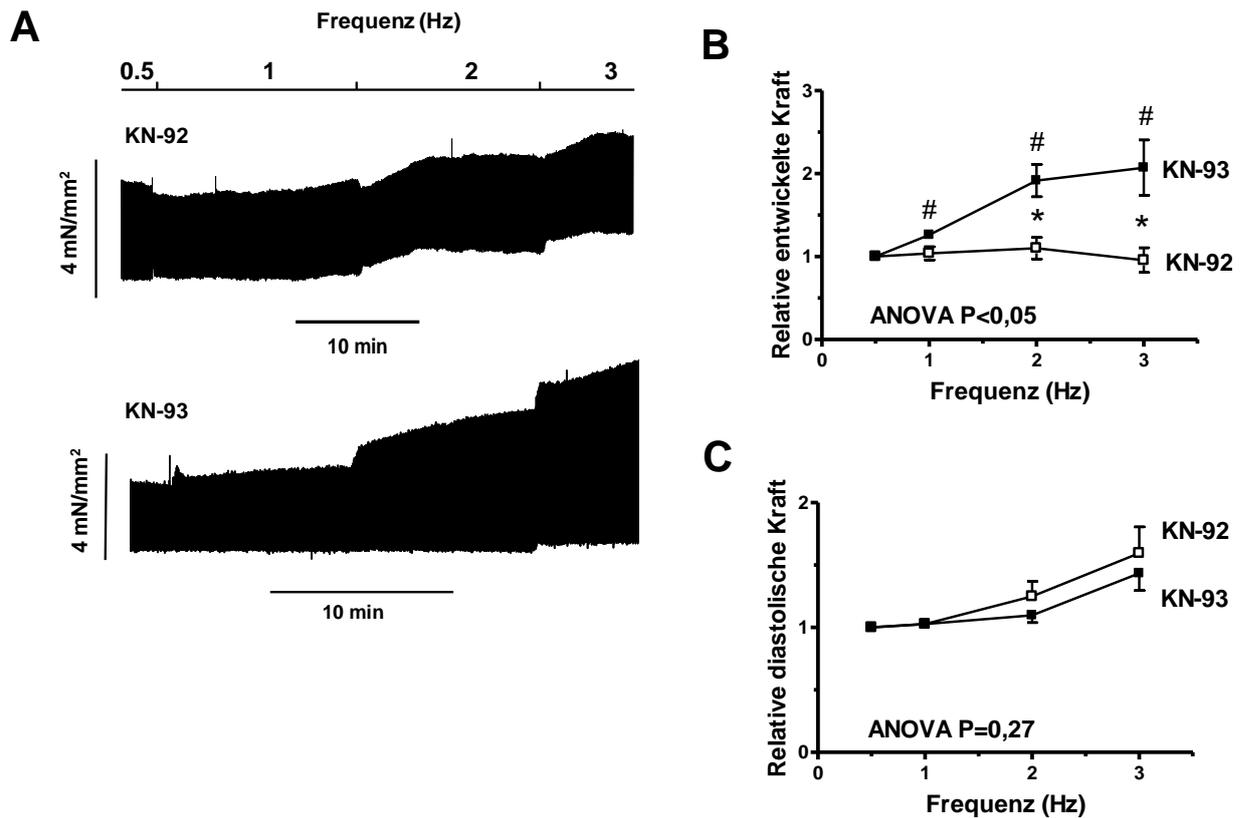


**Abb. 3.5:** Darstellung aller verwendeten Muskelstreifen mit ihren auf 0,5 Hz normalisierten entwickelten Kräften unter Durchführung der Kraft-Frequenz-Beziehungen (jeweils n=14 für KN-92 und KN-93 aus 9 Herzen).



**Abb. 3.6:** Exemplarische Originalabbildungen von Einzelkontraktion bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen.

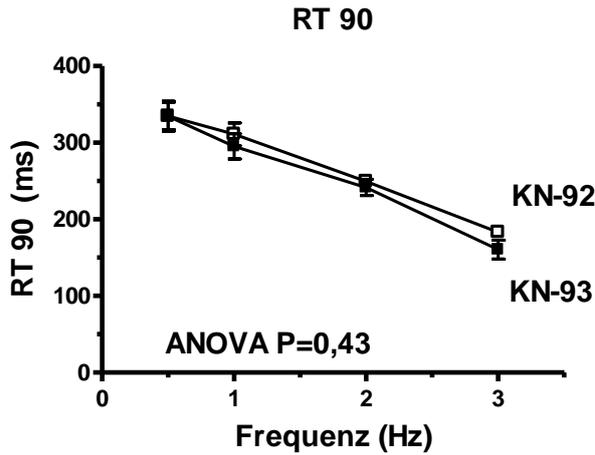
Die relative entwickelte Kraft erhöhte sich durch KN-92 nur um  $10 \pm 13\%$  im Gegensatz zu KN-93 mit  $92 \pm 20\%$  bei 2 Hz vs. 0,5 Hz. Bei einer maximalen Stimulationsfrequenz von 3 Hz kamen diese Effekte noch deutlicher zum Tragen, wobei die entwickelte Kraft für die mit KN-92 behandelten Muskelstreifen sogar um  $-4 \pm 15\%$  sank und sich für KN-93 um  $101 \pm 33\%$  gegenüber der Ausgangskraft bei 0,5 Hz erhöhte (Abb. 3.7, beide Frequenzen, jeweils  $n=14$  aus 9 Herzen,  $P < 0,05$  vs. KN-92 und vs. 0,5 Hz, ANOVA mit Holm-Sidak-Post-Hoc-Test). Die in Abbildung 3.7 C aufgetragenen relativen diastolischen Spannungen zeigten zwischen KN-92 und KN-93 keine statistische Signifikanz (Abb. 3.7 C, jeweils  $n=14$  aus 9 Herzen,  $P=0,27$  ANOVA mit Holm-Sidak-Post-Hoc-Test).



**Abb. 3.7:** **A:** Originalregistrierungen verdeutlichen den positiv inotropen Effekt durch KN-93. **B:** Die durchschnittlichen entwickelten Kräfte der Muskelstreifen illustrieren den statistisch hochsignifikanten positiv inotropen Effekt während CaMKII-Inhibition mittels KN-93 (jeweils n=14 aus 9 Herzen, \*P<0,05 vs. KN-92 und #P<0,05 vs. 0,5 Hz; im ANOVA und Holm-Sidak-Post-Hoc-Test) **C:** Keine Unterschiede ergaben sich für KN-93 vs. KN-92 bezüglich der relativen diastolischen Spannung.

### 3.3.3 Relaxationskinetik in Gegenwart des CaMKII-Inhibitors KN-93

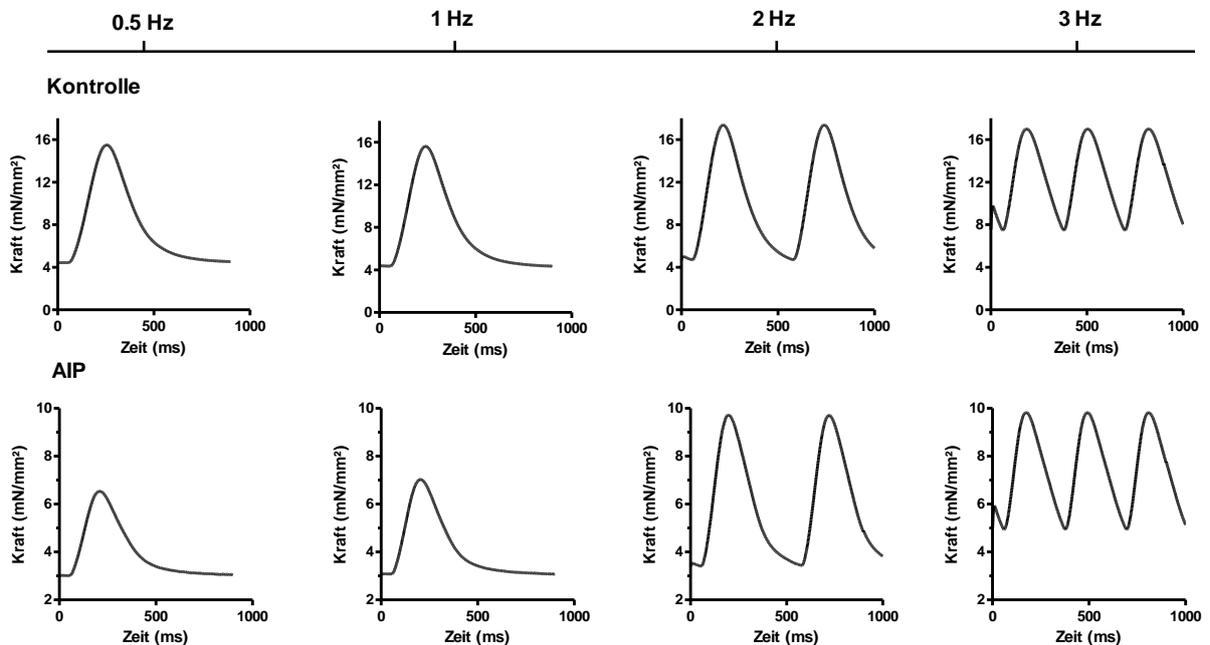
Weiterhin lag bei den funktionellen Experimenten das Augenmerk auf der Relaxationskinetik der Muskelstreifen unter CaMKII-Inhibition. Die Relaxationszeiten RT 50 und RT 90 (Zeiten bis zu 50% bzw. 90% der Relaxation) waren zwischen KN-93 und KN-92 unverändert, wie für die RT 90 in Abbildung 3.8 illustriert (ANOVA P=0,43).



**Abb. 3.8:** Die durchschnittlichen Werte für die Zeiten bis 90% der Relaxation (RT 90) waren nicht signifikant zwischen KN-93 und KN-92 verändert (P=0,43 ANOVA).

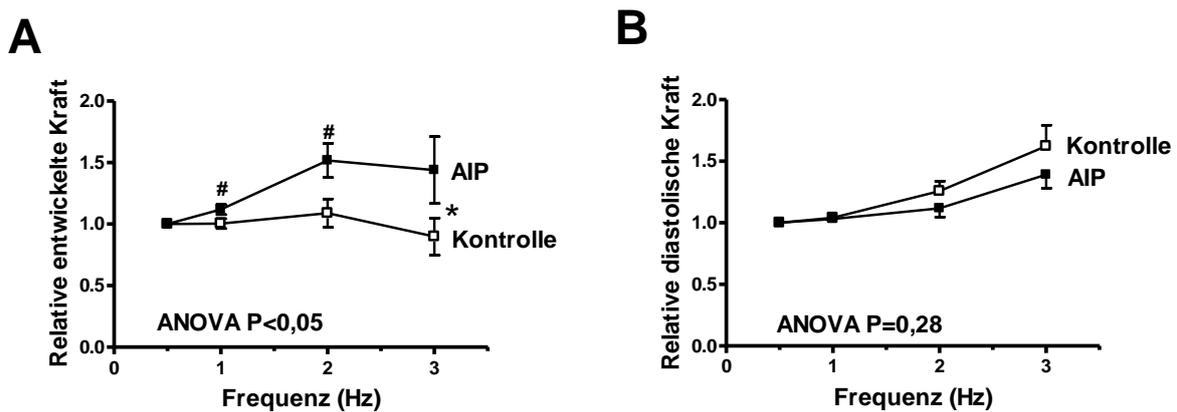
### 3.3.4 Beeinflussung der Kraft-Frequenz-Beziehungen durch AIP

Bestätigt werden konnte der unter KN-93 hervorgerufene positiv inotrope Effekt mit dem Peptid AIP als weiterem CaMKII-Inhibitor. In Abbildung 3.9 erkennt man repräsentative Einzelkontraktionen von mit AIP behandelten Muskelstreifen von 0,5 Hz bis 3 Hz im Vergleich zu Kontrollmuskelstreifen. Diese verdeutlichen ebenfalls den positiv inotropen Effekt durch CaMKII-Inhibition mittels AIP.



**Abb. 3.9:** Repräsentative Einzelkontraktionen von Muskelstreifen mit AIP vs. Kontrollmuskelstreifen

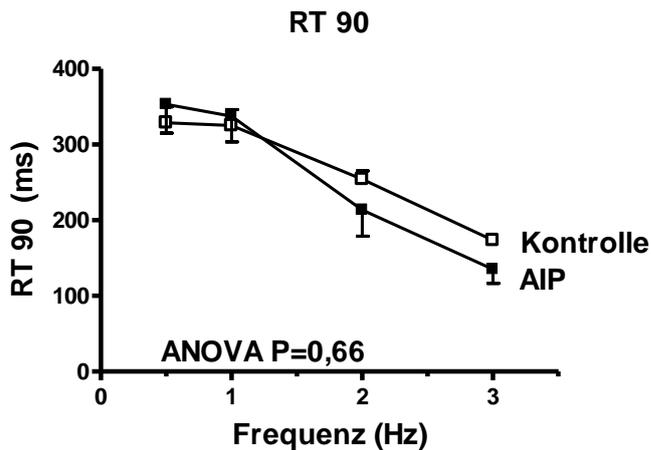
Trägt man wiederum die relativen Kräfte bei 2 Hz und 3 Hz auf, wie in Abbildung 3.10 A geschehen, zeigt sich eine Steigerung der entwickelten Kraft um  $52 \pm 14\%$  bei 2 Hz unter CaMKII-Hemmung mittels AIP und um  $9 \pm 11\%$  für die Kontrolle (jeweils  $n=9$  aus 5 Herzen,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle und vs. 0,5 Hz, im ANOVA mit Holm-Sidak-Post-hoc-Test). Übereinstimmend zu den Ergebnissen mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 ergaben sich für die diastolischen Spannungen unter Einsatz von AIP im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.10 B, ANOVA  $P=0,28$ ).



**Abb. 3.10:** **A:** Korrespondierend zu KN-93 war AIP ein positiv inotropes Agens bei steigenden Stimulationsfrequenzen. **B:** Die auf 0,5 Hz normalisierten diastolischen Spannungen zeigten keine signifikanten Ergebnisse zwischen AIP und der Kontrolle (jeweils  $n=9$  aus 5 Herzen,  $*P < 0,05$  vs. Kontrolle und  $\#P < 0,05$  vs. durchschnittlich entwickelte Kraft bei 0,5 Hz im ANOVA mit Holm-Sidak-Post-Hoc-Test).

### 3.3.5 Relaxationskinetik unter AIP-Exposition

Abbildung 3.11 unterstreicht die oben erhobenen Daten mit KN-93. Korrespondierend bewirkte auch hier die CaMKII-Inhibition mit AIP keine signifikanten Auswirkungen auf die Relaxationskinetik in den terminal insuffizienten Muskelstreifen (ANOVA  $P=0,66$ ).



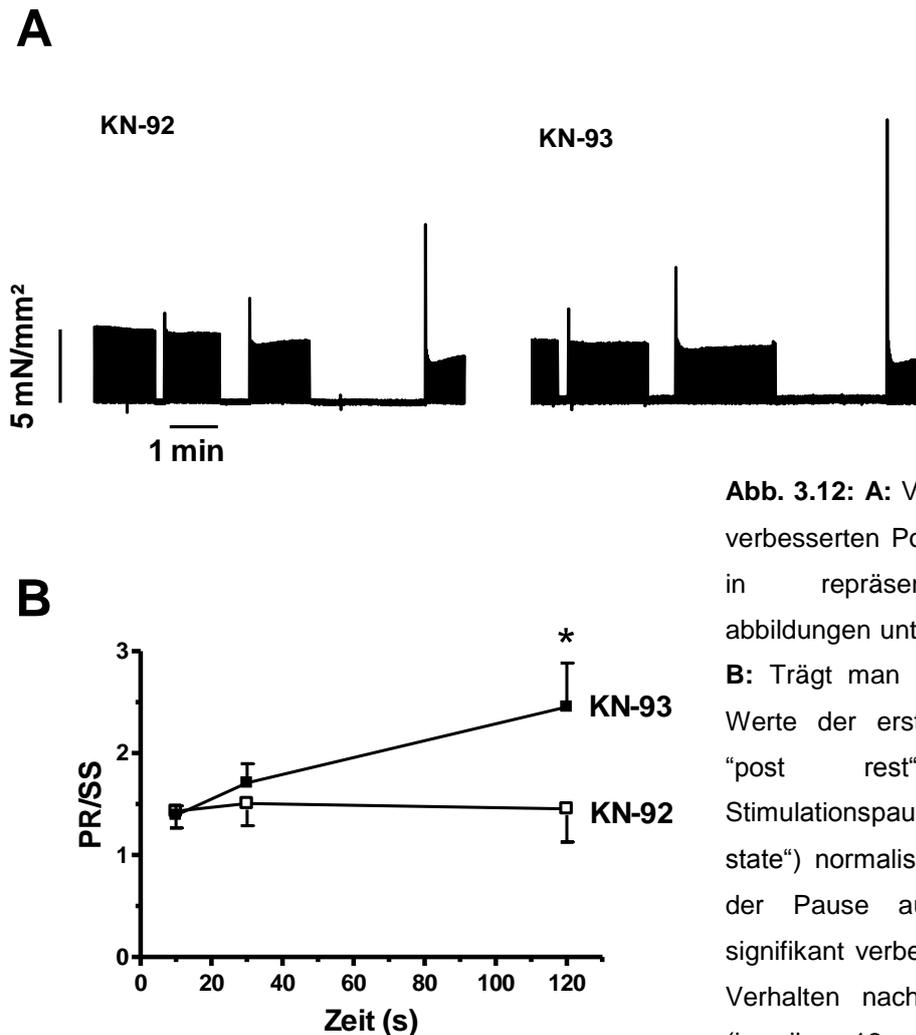
**Abb. 3.11:** Unveränderte durchschnittliche Relaxationskinetiken unter AIP vs. Kontrolle (RT 90: 90% der Relaxationszeit) (ANOVA  $P=0,66$ ).

Resümierend bewirkte also die Inhibition der CaMKII einen positiv inotropen Effekt im terminal insuffizienten Myokard des Menschen, wobei keine signifikanten Effekte auf die diastolische Spannung als auch auf die Relaxationskinetik bei steigenden Stimulationsfrequenzen zu sehen waren.

### 3.4 Die Auswirkungen der CaMKII-Inhibition auf den SR-Ca<sup>2+</sup>-Haushalt

#### 3.4.1 Post-Pausen-Verhalten

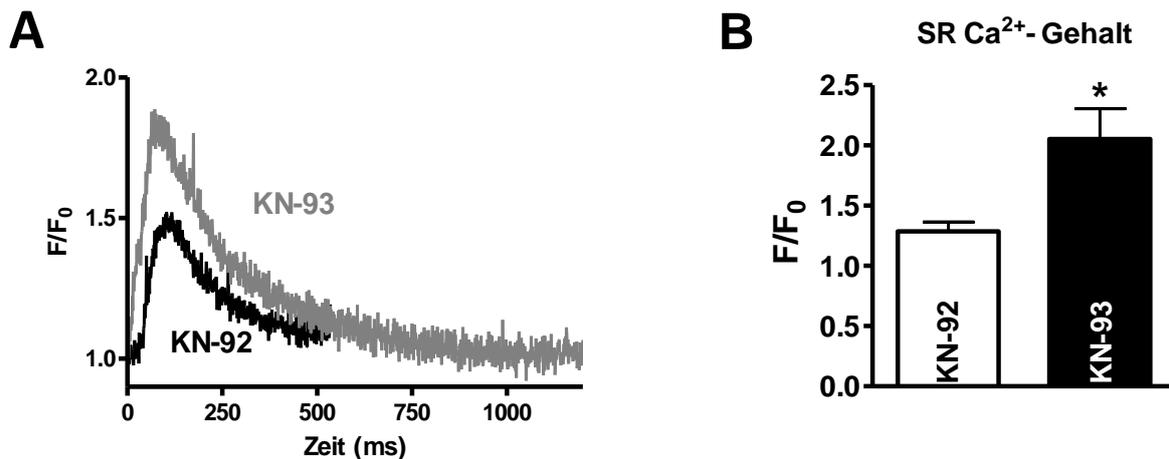
Eine mögliche Erklärung für diesen positiv inotropen Effekt durch die Hemmung einer CaMKII-Überexpression bei terminaler Herzinsuffizienz stellt eine Veränderung des SR-Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsels dar. Um dieses zu evaluieren, schlossen sich Post-Pausen-Beziehungen mit Stimulationspausen von jeweils 10s, 30s und 120s an die Kraft-Frequenz-Beziehungen an. Das Post-Pausen-Verhalten war nach 120s unter Anwendung von KN-93 mit  $2,5 \pm 0,4$  im Vergleich zu KN-92 mit  $1,5 \pm 0,3$  signifikant verbessert (Abb. 3.12 B, jeweils  $n=12$  aus 7 Herzen,  $P < 0,05$ ). Wie in Abbildung 3.12 A demonstriert, verbesserte sich das Post-Pausen-Verhalten der Muskelstreifen nach Behandlung mit KN-93.



**Abb. 3.12:** **A:** Veranschaulichung des verbesserten Post-Pausen-Verhaltens in repräsentativen Originalabbildungen unter Einsatz von KN-93. **B:** Trägt man die durchschnittlichen Werte der ersten Kontraktion (PR: “post rest”) nach der Stimulationspause (SS: “steady state”) normalisiert auf die letzte vor der Pause auf, ergibt sich ein signifikant verbessertes Post-Pausen-Verhalten nach 120s unter KN-93 (jeweils  $n=12$  aus 7 Herzen,  $*P<0,05$ ).

### 3.4.2 SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt

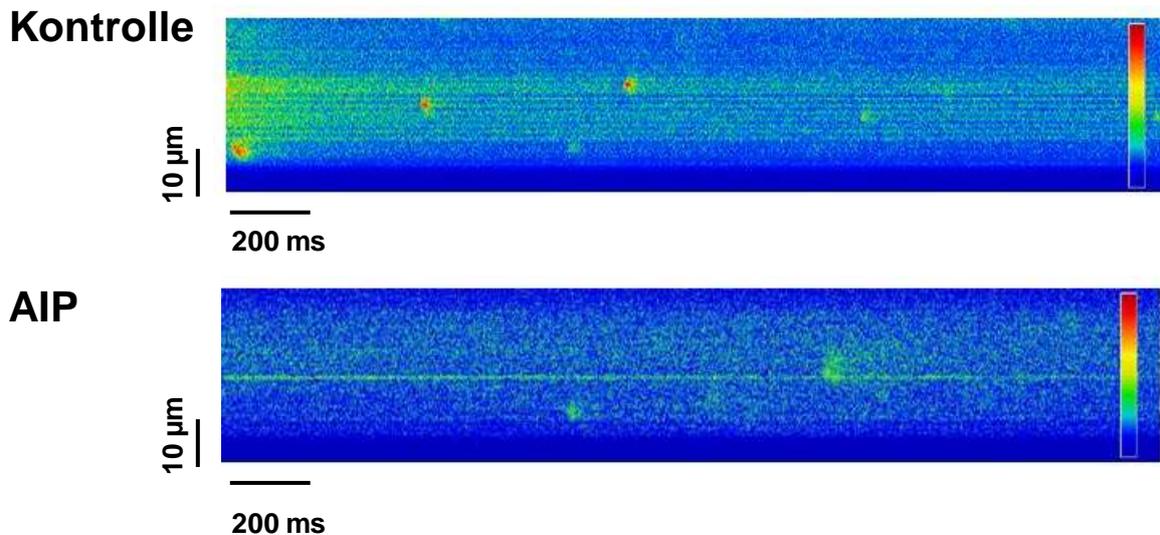
Die Ergebnisse des Post-Pausen-Verhaltens wiesen auf einen verbesserten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt unter CaMKII-Inhibition hin. Deshalb wurden zur direkten Messung des gesamten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts Caffein-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten mit Fluo-3 beladenen frisch isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten durchgeführt. Passend zu den Resultaten des Post-Pausen-Verhaltens waren die Amplituden der Caffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ( $F/F_0$ ) in den terminal insuffizienten Kardiomyozyten in Anwesenheit von KN-93 erhöht, wie in Abbildung 3.13 A ersichtlich. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten-Amplitude ( $\Delta F/F_0$ ) war unter KN-93 mit  $2,1 \pm 0,3$  im Gegensatz zu  $1,3 \pm 0,1$  zur Kontrolle KN-92 signifikant verbessert (Abb. 3.13 B,  $n=5$  vs. 9 aus 3 Herzen,  $P<0,05$ ).



**Abb. 3.13:** **A:** Originalregistrierungen der Caffein-induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten unter KN-93- bzw. KN-92-Exposition. **B:** Der CaMKII-Inhibitor KN-93 verbesserte im Gegensatz zur Kontrolle die Caffein-induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten-Amplitude ( $F/F_0$ ) als Maß für den SR- $Ca^{2+}$ -Gehalt KN-92 (n=5 vs. n=9 aus 3 Herzen, \* $P < 0,05$ ).

### 3.5 Die Effekte von AIP auf die RyR2-Funktion

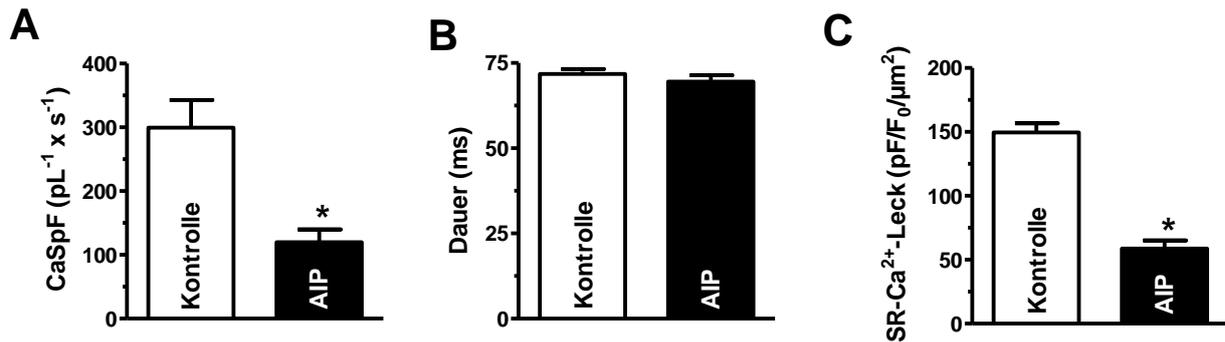
Ob in einem reduzierten SR- $Ca^{2+}$ -Leck über die RyR2 die Ursache für den verbesserten SR- $Ca^{2+}$ -Gehalt zu suchen ist, sollte mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie geprüft werden. Die Originalabbildung 3.14 zweier Kardiomyozyten im Line-Scan-Modus illustriert, dass unter Einsatz des CaMKII-Inhibitors AIP spontane SR- $Ca^{2+}$ -Freisetzungen aus geclusterten RyR2, sog. SR- $Ca^{2+}$ -Sparks, in frisch isolierten und mit Fluo-3 beladenen linksventrikulären Kardiomyozyten deutlich reduziert waren.



**Abb. 3.14: Originalregistrierungen der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie im Line-Scan-Modus**

Diese illustrieren die signifikante Suppression der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks unter CaMKII-Inhibition mittels AIP. Der Farbstreifen dient zur Übersetzung der Farbkodierung der gemessenen Farbintensitäten des emittierten Fluoreszenzsignals.

Ferner entwickelten nur 29% der Kardiomyozyten während CaMKII-Inhibition SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks im Vergleich zu 47% der Kontrollzellen ( $n=55$  vs.  $n=51$  aus 5 Herzen,  $P=0,06$ ). Hingegen war die Dauer der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks unter AIP nicht verändert (Abb.3.15 B, AIP  $n=31$  vs. Kontrolle  $n=105$  aus 5 Herzen,  $P>0,05$ ). Im Rahmen dieser Betrachtungen fiel ebenfalls eine statistisch signifikante verminderte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz von  $119,8 \pm 20,1 \text{ pL}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  in der CaMKII-Inhibitorgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $299,6 \pm 43,2 \text{ pL}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  auf (Abb.3.15 A,  $n=16$  vs.  $n=23$  aus 5 Herzen,  $P < 0,05$ ). Das totale SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck per Zelle, welches sich aus den erhobenen Daten berechnen lässt, entsprach  $58,8 \pm 6,2 \text{ pF}/F_0/\mu\text{m}^2$  für AIP im Gegensatz zu  $149,7 \pm 7,2 \text{ pF}/F_0/\mu\text{m}^2$  für die Kontrolle. Dies entspricht einer Reduktion des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks von 39% unter CaMKII-Inhibition (Abb. 3.15 C,  $P < 0,05$ ). Zusammenfassend lässt sich also schlussfolgern, dass vermutlich in einem verminderten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust über die RyR2 der Grund für den verbesserten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt unter CaMKII-Inhibition zu suchen ist.



**Abb. 3.15:** **A:** Die SR-Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz war unter CaMKII-Inhibition signifikant erniedrigt. **B:** Keine Unterschiede ergaben sich für die Dauer der SR-Ca<sup>2+</sup>-Sparks. **C:** Unter AIP ist das berechnete SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck per Zelle signifikant reduziert (\*P=0,05).

	Frequenz (pL <sup>-1</sup> x s <sup>-1</sup> )	TTP (ms)	Amplitude (F/F <sub>0</sub> )	Dauer (ms)	Ca <sup>2+</sup> -Spark- Größe (F/F <sub>0</sub> x ms x μm)	SR-Ca <sup>2+</sup> - Leck (pF/F <sub>0</sub> /μm <sup>2</sup> )	RT 80 (ms)
Kontrolle	299,6±43,2	10,9±0,3	1,7±0,02	71,8±1,4	371,4±17,8	149,7±7,2	42,5±0,8
AIP	119,8±20,1*	10,9±0,5	1,7±0,05	69,5±1,9	376,9±19,6	58,8±6,2*	41,4±1,2

**Tab. 3.3:** Detaillierte Aufführung der durchschnittlichen SR-Ca<sup>2+</sup>-Spark-Parameter

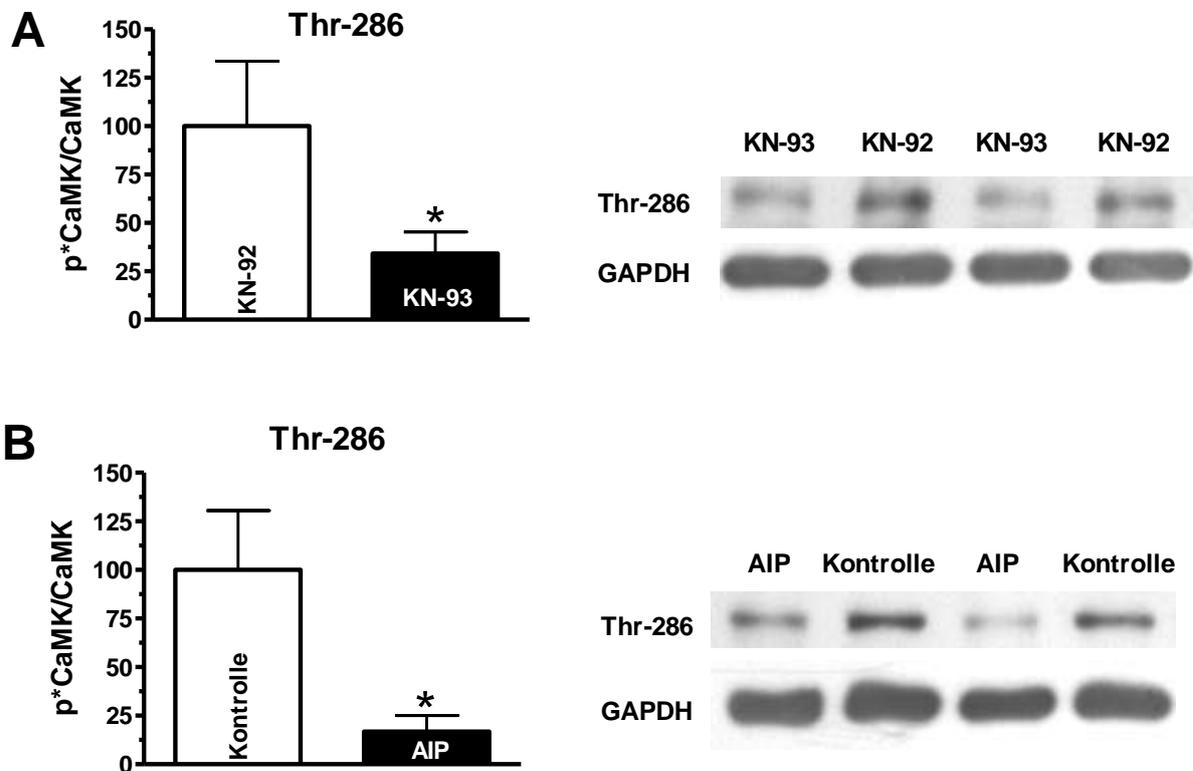
TTP: Zeit bis zum Erreichen des Maximums („time to peak“), RT 80: Zeit bis 80% der Relaxation (\*P<0,05 vs. Kontrolle)

### 3.6 Der Phosphorylierungsstatus verschiedener durch die CaMKII regulierter Proteine

Die im folgenden Ergebnisteil dargestellten Western-Blot-Resultate dienen dazu, mögliche Effekte der CaMKII-Inhibition auf Proteine, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind und welche durch die CaMKII reguliert werden, zu untersuchen sowie molekularbiologische Erklärungen für die funktionellen Experimente zu finden.

### 3.6.1 Die Effektivität der CaMKII-Inhibition

Betrachtet man die CaMKII-Autophosphorylierungsstelle an Thr-286 nach KN-93-Exposition, so ist diese um  $65,8 \pm 11,2\%$  gegenüber der Kontrolle KN-92 reduziert (Abb.3.16 A, jeweils  $n=7$ , normalisiert auf die CaMKII-Proteinexpression,  $P < 0,05$  vs. KN-92). Gleiche Ergebnisse wurden für die mit AIP behandelten Muskelstreifen erhoben. Analog war die Phosphorylierung unter CaMKII-Inhibition in diesen Muskelstreifen um  $83,1 \pm 8,2\%$  vermindert (Abb. 16 B, jeweils  $n=4$ , normalisiert auf die CaMKII-Proteinexpression,  $P < 0,05$  vs. Kontrolle).

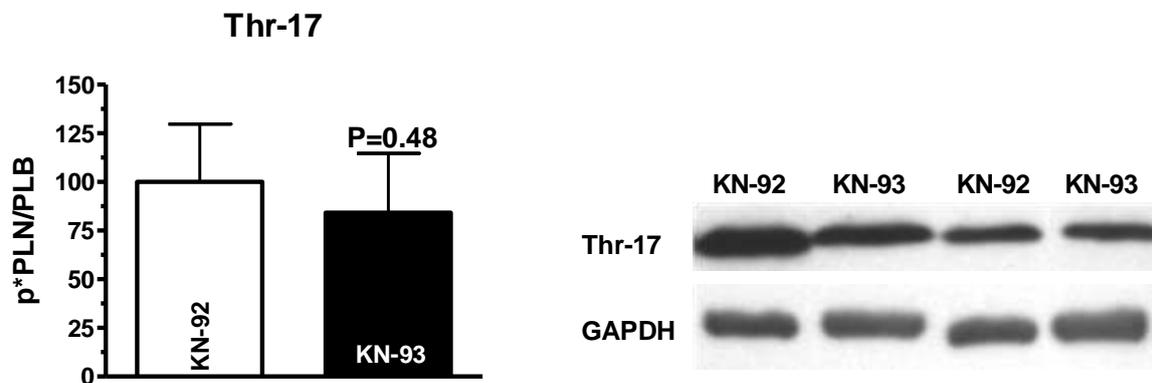


**Abb. 3.16:** **A:** Die CaMKII-Autophosphorylierungsstelle an Thr-286 ist signifikant weniger phosphoryliert nach KN-93-Exposition (jeweils  $n=7$ ,  $*P < 0,05$ ). **B:** Gleiche Ergebnisse fanden sich für den CaMKII-Inhibitor AIP (jeweils  $n=4$ ,  $*P < 0,05$ ).

### 3.6.2 Die Phosphorylierung von Phospholamban

In den Muskelstreifenexperimenten zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Relaxationskinetik unter CaMKII-Inhibition. Daher wurde mittels Western Blot die für die

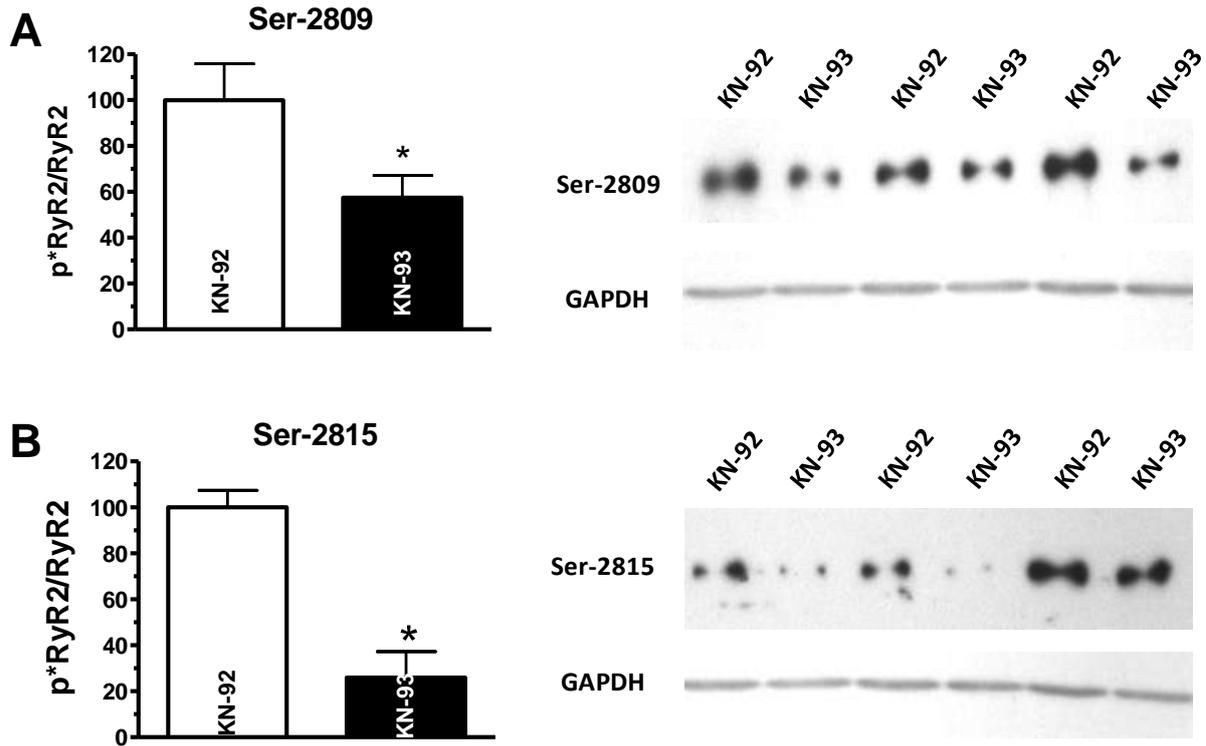
CaMKII-spezifische PLB-Phosphorylierungsstelle an Thr-17 gemessen. Korrespondierend zu den Ergebnissen in den Muskelstreifenexperimenten war diese nach Einsatz von KN-93 im Vergleich zur Kontrolle KN-92 unverändert (Abb.3.17, jeweils n=8, normalisiert auf PLB,  $P=0,48$  vs. KN-92).



**Abb. 3.17:** Die für die CaMKII spezifische PLB-Phosphorylierungsstelle an Thr-17 war nach Einsatz von KN-93 nicht signifikant verändert (jeweils n=8, normalisiert auf PLB,  $*P=0,48$ ).

### 3.6.3 Der RyR2-Phosphorylierungsstatus

Abbildung 3.18 A illustriert, dass die gemeinsame RyR2-Phosphorylierungsstelle für die CaMKII und für die PKA an Ser-2809 in den aufbereiteten Muskelstreifen eine verminderte Phosphorylierung um  $42,6 \pm 9,8\%$  nach Intervention mit KN-93 gegenüber KN-92 aufwies (n=5 aus 3 Herzen, normalisiert auf RyR2-Expression,  $P < 0,05$ ). Ein stärkerer Effekt war an der für die CaMKII spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2815 feststellbar (Abb. 3.18 B, n=3 aus 2 Herzen, normalisiert auf RyR2-Expression,  $P < 0,05$ ). Das reduzierte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck könnte somit durch vermindert hyperphosphorylierte RyR2 erklärt werden.



**Abb. 3.18:** **A:** Die RyR2-Phosphorylierungsstelle für die PKA und die CaMKII an Ser-2809 war unter KN-93 weniger phosphoryliert. **B:** Eine stärkere Reduktion der RyR2-Hyperphosphorylierung zeigte sich an der CaMKII spezifischen Phosphorylierungsstelle an Ser-2815 (\* $P < 0,05$ ).

## 4. Diskussion

Die vorliegende Dissertation zeigt erstmalig, dass die akute Inhibition einer erhöhten CaMKII-Proteinexpression zu einer verbesserten Kontraktilität von humanem terminal insuffizientem Myokard „in vitro“ führt. Dieser positiv inotrope Effekt während steigender Stimulationsfrequenzen ließ sich auf einen verbesserten SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt zurückführen. Zentral hierfür scheint ein vermindertes SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck während akuter CaMKII-Inhibition mit reduziertem Ca<sup>2+</sup>-Verlust in das Zytosol zu sein, wie Konfokalmikroskopiemessungen verdeutlichten. Proteinbiochemische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass das reduzierte SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck einer verminderten RyR2-Hyperphosphorylierung an Ser-2809 und an Ser-2815 durch die CaMKII zuzuschreiben ist. Die Hemmung der CaMKII bewirkte folglich über eine reduzierte RyR2-Hyperphosphorylierung eine verminderte und verkürzte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2.

### 4.1 Erhöhte CaMKII-Expression im humanen terminal insuffizienten Myokard

Der CaMKII wurde zunächst eine kompensatorische Funktion in der Pathogenese der Herzinsuffizienz beim Menschen zugeschrieben, da ihre Aktivität mit hämodynamischen Parametern, wie einer reduzierten Ejektionsfraktion, positiv korrelierte (KIRCHHEFER et al. 1999). Diese Theorie wurde jedoch durch diverse Tiermodelle widerlegt. Maier et al. erbrachten den Nachweis, dass die Überexpression der CaMKII $\delta_c$  im transgenen Mausmodell über Veränderungen in der elektromechanischen Kopplung zu einer massiven kardialen Hypertrophie und zu einer dilatativen Kardiomyopathie führte (MAIER et al. 2003, ZHANG et al. 2003). Ebenfalls resultierte die Überexpression der nukleären Isoform CaMKII $\delta_B$  in Mäuseherzen in einer kardialen Hypertrophie und milden ventrikulären Dysfunktion (ZHANG et al. 2003, ZHANG et al. 2002). Die Tatsache, dass Mäuse auf eine Nachlast-induzierte Herzhypertrophie mittels transverser Aortenkonstriktion mit einer Aktivierung der Splicevarianten CaMKII $\delta_B$  und CaMKII $\delta_c$  reagierten, bestätigten im umgekehrten Szenario die essentielle Rolle der CaMKII in der Etablierung einer Myokardhypertrophie (COLOMER et al. 2003, TOISCHER et al. 2010, ZHANG et al. 2003). Doch nicht nur verschiedene Tiermodelle verdeutlichten diesen Zusammenhang. Hoch et al. publizierten bereits im Jahre 1999 eine Steigerung der Transkriptionslevel der CaMKII $\delta$ -Isoformen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (HOCH et al. 1999). Diese bisherigen Publikationen gingen jedoch nicht weiter auf die regionale CaMKII $\delta$ -Expression im

linken bzw. rechten Ventrikel ein. Erst im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten detaillierte CaMKII-Proteinexpressionsanalysen in terminal insuffizienten Herzen des Menschen erhoben werden. Die Ergebnisse in dieser Dissertation belegen, dass die Proteinexpression der kardialen Isoformen CaMKII $\delta$  und CaMKII $\gamma$  sowohl bei Patienten, die unter einer dilatativen Kardiomyopathie litten, als auch bei Patienten mit einer ischämischen Herzerkrankung signifikant erhöht sind. Interessanterweise scheint also die Expressionssteigerung der CaMKII $\delta$  und CaMKII $\gamma$  nicht auf eine dilatative Kardiomyopathie als Ursache einer Herzinsuffizienz limitiert zu sein. Vielmehr gilt es in weiteren Studien zu prüfen, ob die CaMKII-Expressionssteigerung ein generelles Phänomen bei kardialer Herzinsuffizienz und Hypertrophie beim Menschen mit unterschiedlicher Ätiologie darstellen könnte. Die Feststellung, dass in den Proteinexpressionsanalysen der rechte und linke Ventrikel nahezu äquivalente Steigerungen der CaMKII $\delta$ -Expression aufwiesen, stellte in den folgenden Experimenten weiterhin sicher, dass die erhobenen Ergebnisse in den rechtsventrikulären Muskelstreifen mit Fluoreszenzmessungen an isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten verglichen werden konnten.

### 4.2 Der positiv inotrope Effekt unter akuter CaMKII-Inhibition

Über die vergangenen Jahre zeigte sich, dass humanes terminal insuffizientes Myokard eine negative bzw. inverse Kraft-Frequenz-Beziehung aufweist (GWATHMEY et al. 1987, HASENFUSS und PIESKE 2002, HASENFUSS et al. 1994, MULIERI et al. 1992, PIESKE et al. 1995), während gesundes Myokard mit einer Zunahme der Kontraktionskraft bei steigenden Stimulationsfrequenzen reagiert (positive Kraft-Frequenz-Beziehung) (BUCKLEY et al. 1972, KOCH-WESER und BLINKS 1963, SCHWINGER et al. 1993). Diese negative Kraft-Frequenz-Beziehung führt zu einer erheblichen Einschränkung der kardialen Funktion bei Stress und bei verstärkter Aktivität, da das Herzzeitvolumen mit der verminderten diastolischen Füllungszeit abfällt. Vor diesem Hintergrund stellte sich eine der Hauptfragen dieser Arbeit: Welchen Effekt bewirkt die Inhibition der CaMKII-Überexpression auf die Myokardkontraktilität von humanen terminal insuffizienten Herzen bei steigenden Stimulationsfrequenzen?

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Muskelstreifenexperimente lässt sich ein signifikant positiv inotroper Effekt durch die akute Inhibition der CaMKII feststellen. Gleiche Ergebnisse fanden sich für die unterschiedlichen CaMKII-Inhibitoren KN-93 und AIP. Durch die Verwendung dieser verschiedenen CaMKII-Inhibitoren wird die Wertigkeit des beobachteten positiv inotropen Effektes erheblich aufgewertet. Ein ausgeprägterer Effekt manifestierte sich

bei höheren Stimulationsfrequenzen. Dieser lässt sich durch eine verstärkte, frequenzabhängige CaMKII-Aktivierung erklären (WEHRENS et al. 2004). Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe weiterhin zeigen, dass die Inhibition der CaMKII in gesundem Schafmyokard nicht mit einer Beeinflussung der Kontraktilität einhergeht (SOSSALLA et al. 2010). Dies erscheint schlüssig, da es im gesunden Myokard im Gegensatz zum terminal insuffizienten Myokard nicht zu einer CaMKII-Überexpression kommt.

Anzusprechen bleibt, warum Kohlhaas et al. keine verbesserte Myokardkontraktilität in ihrem Kaninchenmodell mit akuter (24 h) adenoviral vermittelter CaMKII $\delta_c$ -Überexpression in isolierten Herzmuskelzellen unter CaMKII-Inhibition feststellten (KOHLHAAS et al. 2006). Es ist anzunehmen, dass die akute Überexpression der CaMKII zunächst notwendige und essentielle Umbauvorgänge („Remodeling“) in der Herzinsuffizienz hervorruft. Im Rahmen dieser Experimente hingegen liegt eine chronische CaMKII-Überexpression vor. Somit ist der chronischen CaMKII-Proteinerhöhung vermutlich keine positive Funktion mehr im kardialen „Remodeling“ zuzuschreiben, sondern eine negative Beeinflussung der Myokardkontraktilität. Zusammengefasst sollte also stets zwischen einer Inhibition einer akuten oder chronischen CaMKII-Überexpression unterschieden werden. Des Weiteren bleibt zu beachten, dass Kohlhaas et al. mit isotonisch kontrahierenden Einzelkardiomyozyten arbeiteten (KOHLHAAS et al. 2006), während hingegen in der vorliegenden Dissertation isometrische Kontraktionen von multizellulären Muskelstreifen registriert wurden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt soll in dem Kontext der Kraft-Frequenz-Beziehungen besprochen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass durch CaMKII-Inhibition die entwickelte Kraft im humanen terminal insuffizienten Myokard verbessert wird. Im Gegensatz dazu konnte die CaMKII-Inhibition die diastolische Spannung nicht verbessern, d. h. die diastolische Dysfunktion persistierte trotz CaMKII-Inhibition bei steigenden Stimulationsfrequenzen. Vielmehr ließ sich ein frequenzabhängiger geringfügiger Anstieg der diastolischen Spannung in allen Versuchsgruppen verzeichnen. Einen möglichen Erklärungsansatz für die weiterhin persistierende diastolische Dysfunktion liefern verschiedene Publikationen, die diverse Veränderungen der extrazellulären Matrix in der Herzinsuffizienz beschreiben (FERREIRA-MARTINS und LEITE-MOREIRA 2010, VILLARI et al. 2009). Diese Modifikationen der extrazellulären Matrix gehen beispielsweise mit einem erhöhten Kollagengehalt einher. Eine Kollagenzunahme führt folglich zu einer reduzierten Dehnbarkeit des Myokards, was zu einer diastolischen Dysfunktion beiträgt. Villari et al. beschrieben, dass Druck- und Volumenbelastungen des linken Ventrikels in einer

exzentrischen Hypertrophie mit langfristigen zellulären Umbauvorgängen des Myokards („Remodeling“) endeten (VILLARI et al. 2009). Es zeigte sich hierbei eine Korrelation zwischen interstitieller Fibrose und Steifheit im humanen insuffizienten Myokard. Selbst nach Aufhebung der Volumenbelastung durch Aortenklappenersatz persistierte die diastolische Dysfunktion auf Grund dieses „Remodelingprozesses“. Dementsprechend könnte die akute Inhibition der CaMKII mit folgenden Veränderungen der Ionenhomöostase ebenfalls nicht im Stande sein eine akute Regression der interstitiellen Fibrose zu bewirken und somit die diastolische Dysfunktion zu verbessern. Ein solcher Adaptationsprozess der extrazellulären Matrix im humanen Myokard scheint durch akute Hemmung der CaMKII nicht reversibel zu sein.

Neben diesem strukturellen kardialen „Remodeling“ scheint von weiterer Bedeutung für die anhaltende diastolische Dysfunktion die Reduktion der SERCA2a-Aktivität und -Expression in der Herzinsuffizienz zu sein (HASENFUSS et al. 1994, MERCADIER et al. 1990). Es zeigten sich in den Experimenten keine Veränderungen des PLB-Phosphorylierungsstatus durch CaMKII-Inhibition und ebenfalls keine Änderung der SERCA2a-Aktivität, indirekt durch Relaxationsparameter gemessen. Anzunehmen ist folglich, dass die Funktion der SERCA2a auch bei CaMKII-Inhibition in den hiesigen Experimenten nicht verbessert wird. Im Zuge dessen unterbleibt eine verbesserte  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination aus dem Zytosol in der Herzinsuffizienz und die diastolische zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bleibt erhöht. Somit kann in der Diastole das  $\text{Ca}^{2+}$  nicht ausreichend von den Myofilamenten abdissoziieren, was sich in einer diastolischen Dysfunktion manifestiert.

### 4.3 Beeinflussung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels durch CaMKII-Inhibition

Es blieb zu klären, welche Mechanismen den positiv inotropen Effekt durch die CaMKII-Inhibition erklären. Seit einigen Jahren herrscht Konsens, dass Alterationen im SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel und in einem verminderten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt ursächlich für inverse Kraft-Frequenz-Beziehungen sein können (GWATHMEY et al. 1987, PIESKE et al. 1999, PIESKE et al. 1995). Schon 1995 nahmen Pieske et al. einen gestörten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel und verminderte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten als Ursachen für die negative Kraft-Frequenz-Beziehung bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie an (PIESKE et al. 1995). Zwei Ursachen können einen verminderten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt bedingen: (1) eine Reduktion der SERCA2a-Aktivität mit ggf. kompensatorischer Erhöhung des NCX und (2) ein vermehrter SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust (SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck).

Diverse Forschungsgruppen konnten bestätigen, dass in der Herzinsuffizienz die SERCA2a in ihrer Aktivität reduziert und der NCX zumeist kompensatorisch erhöht ist, was in eine verminderte SR-Ca<sup>2+</sup>-Akkumulation mündet (vgl. Einleitung Kap 1.6) (HASENFUSS et al. 1994, MERCADIER et al. 1990, REINECKE et al. 1996, STUDER et al. 1994). Die Versuche zum Post-Pausen-Verhalten der Muskelstreifen und die Ergebnisse der erhobenen Caffein-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten bestätigten die Hypothese, dass die verbesserte Myokardkontraktilität unter akuter CaMKII-Inhibition auf einen verbesserten SR-Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel mit einem erhöhten SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt zurückzuführen ist. Infolgedessen steht vermehrt Ca<sup>2+</sup> für eine Kontraktion der Kardiomyozyten bereit.

### **4.4 Ein vermindertes SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck über die RyR2 als Schlüsselrolle für den positiv inotropen Effekt?**

Als wichtige Faktoren für die Entwicklung einer kontraktile Dysfunktion kristallisierten sich in den letzten Jahren Veränderungen in der Funktion und Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 heraus. Erstmals gelang es Shannon et al. ein erhöhtes diastolisches SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck direkt in einem Kaninchenmodell mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz nachzuweisen (SHANNON et al. 2003). Dieses SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck resultiert in einem Nettoverlust von Ca<sup>2+</sup> aus dem SR mit konsekutiver zytosolischer Ca<sup>2+</sup>-Akkumulation und trägt somit zur kontraktile Dysfunktion bei. Bis dato sind jedoch die zugrunde liegenden Mechanismen des erhöhten SR-Ca<sup>2+</sup>-Lecks in der Herzinsuffizienz nicht hinreichend geklärt.

In transgenen Mauskardiomyozyten mit CaMKII $\delta_c$ -Überexpression kam es zum vermehrten SR-Ca<sup>2+</sup>-Verlust über die RyR2. Als Parameter für ein erhöhtes SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck diente dabei die erhöhte SR-Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz (MAIER et al. 2003, ZHANG et al. 2003). Bemerkenswerterweise konnte speziesunabhängig eine Reduktion des SR-Ca<sup>2+</sup>-Lecks via CaMKII-Inhibition nachgewiesen werden. Kohlhaas et al. fanden in isolierten Kaninchenzellen mit akuter adenoviral-vermittelter CaMKII $\delta_c$ -Überexpression eine erhöhte SR-Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz, welche sowohl über KN-93 als auch AIP reduziert werden konnte (KOHLHAAS et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse erhoben Ai et al. für ein Kaninchenmodell mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz (AI et al. 2005). Das Herzinsuffizienzmodell von Ai et al. zeichnete sich durch eine 50-100% CaMKII-Überexpression und CaMKII-Aktivitätssteigerung aus. Die CaMKII war direkt mit den RyR2 assoziiert, was in einer Hyperphosphorylierung der RyR2 an Ser-2809 und Ser-2815 mit erhöhtem SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck resultierte. Dieser SR-Ca<sup>2+</sup>-Verlust war durch CaMKII-Inhibition im Gegensatz zu einer PKA-Inhibition reversibel. Keine signifikanten Alterationen durch die CaMKII-Inhibition konnten Ai et al. jedoch auf die Ca<sup>2+</sup>-

Transienten-Amplituden zeigen (AI et al. 2005). Analog konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass ein erhöhtes SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck im humanen terminal insuffizienten Myokard durch Hemmung der CaMKII mittels AIP reduziert werden kann. Gleiche Ergebnisse ließen sich von unserer Arbeitsgruppe mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 erzielen (SOSSALLA et al. 2010). Demnach lässt sich die positive Kraft-Frequenz-Beziehung der Muskelstreifen auf ein reduziertes SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck durch Hemmung der CaMKII sowohl über AIP als auch über KN-93 zurückführen.

Modulationen des RyR2-Phosphorylierungsstatus wurden schon vielfach diskutiert, in der Verursachung eines SR-Ca<sup>2+</sup>-Lecks involviert zu sein. Sowohl Hyperphosphorylierungen der RyR2 durch die PKA (MARX et al. 2001, VALDIVIA et al. 1995, WEHRENS et al. 2003, WITCHER et al. 1991) als auch durch die CaMKII wurden vorgeschlagen den erhöhten SR-Ca<sup>2+</sup>-Verlust zu bedingen (AI et al. 2005, KOHLHAAS et al. 2006, MAIER et al. 2003, NEEF et al. 2010, YANG et al. 2007, ZHANG et al. 2003). Infolgedessen steht weniger Ca<sup>2+</sup> für die darauffolgende Kontraktion bereit, was sich in einer ventrikulären Kontraktionsinsuffizienz äußert. In den letzten Jahren haben diverse Publikationen zeigen können, dass die CaMKII direkt mit den RyR2 assoziiert ist und diese phosphorylieren kann (CURRIE et al. 2004, MAIER et al. 2003, RODRIGUEZ et al. 2003, WITCHER et al. 1991). Verschiedene RyR2-Phosphorylierungsstellen durch die CaMKII konnten identifiziert werden. Hauptsächlich scheint die CaMKII die RyR2 an den Aminosäuren Ser-2815 und Ser-2809 zu phosphorylieren, gezeigt mittels gezielter Mutagenese, wobei eine Modulation von Ser-2809 ebenfalls durch die PKA erfolgen kann (WEHRENS et al. 2003). Weitere RyR2-Phosphorylierungsstellen der CaMKII wurden vorgeschlagen, wie beispielsweise an Ser-2814 (RODRIGUEZ et al. 2003, ZALK et al. 2007). Schon Untersuchungen von Kohlhaas et al. zeigten eine verminderte RyR2-Phosphorylierung der CaMKII spezifischen Phosphorylierungsstellen an Ser-2815 und an Ser-28109 nach CaMKII-Inhibition (KOHLHAAS et al. 2006). Korrespondierend konnte in dieser Dissertation eine verminderte RyR2-Hyperphosphorylierung nach Behandlung der Muskelstreifen mit KN-93 an Ser-2809 und an der für die CaMKII spezifischen Phosphorylierungsstelle an Ser-2815 festgestellt werden. Damit konnte der Nachweis für die Hypothese erbracht werden, dass die verbesserte Kontraktilität der Muskelstreifen durch ein reduziertes SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck hervorgerufen wird. Schließlich wird über die verminderte RyR2-Hyperphosphorylierung deren Öffnungswahrscheinlichkeit vermindert.

Anzumerken bleibt eine mögliche durch die PKA hervorgerufene gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2. Durch  $\beta$ -adrenerge Aktivierung der PKA kann über

RyR2-Phosphorylierung an Ser-2809 das kanalstabilisierende Protein FKBP12.6 abdissoziieren (MARX et al. 2000, WEHRENS et al. 2003). Folglich kommt es zu einem gesteigerten SR-Ca<sup>2+</sup>-Verlust über die RyR2. Ai et al. fanden jedoch keine Reduktion des SR-Ca<sup>2+</sup>-Verlustes bei PKA-Inhibition in ihrem Herzinsuffizienzmodell (AI et al. 2005). Hypothetisch könnte die CaMKII die RyR2 ebenfalls über Veränderungen der FKBP12.6-Assoziation beeinflussen. Dieser molekulare Mechanismus soll an dieser Stelle jedoch ausgeschlossen werden. Wehrens et al. wiesen in Einzelkanalmessungen in Lipid-Bilayern keine Änderungen in der FKBP12.6-Assoziation in Zusammenhang mit der CaMKII nach (WEHRENS et al. 2004). Auch spätere Erhebungen von Kohlhaas et al. bestätigten keine Affektion des FKBP12.6 durch die CaMKII in Koimmunpräzipitationen (KOHLHAAS et al. 2006).

Im Widerspruch zu den erläuterten Ergebnissen am Menschen dieser Arbeit stehen zunächst die aktuellen Resultate im Mausmodell von Kushnir et al. (KUSHNIR et al. 2010). Diese Arbeitsgruppe entwickelte ein Knock-in-Mausmodell mit einer RyR2-Ser-2814A-Mutation. Durch diese RyR2-Mutation wurde eine Regulation der RyR2 durch die CaMKII $\delta$  an dieser spezifischen Phosphorylierungsstelle unterbunden. In diesem Knock-in Modell beobachteten Kushnir et al. eine Aufhebung der positiven Kraft-Frequenz-Beziehung im Gegensatz zu Mäusen ohne RyR2-Ser-2814A-Mutation. Folglich schrieben Kushnir et al. und eine kooperierende Arbeitsgruppe der CaMKII eine nötige Rolle in der Entwicklung eines positiv inotropen Effektes während Kraft-Frequenz-Beziehungen via RyR2-Phosphorylierung zu (KUSHNIR et al. 2010, WEHRENS et al. 2004). Zwar offenbart sich hier zunächst eine Diskrepanz zu den erhobenen Ergebnissen dieser Dissertation, jedoch bleibt zu konstatieren, dass es sich bei den Daten von Kushnir et al. um ein Mausmodell und nicht um humanes Myokard handelt. Beachtenswert ist also, dass zwischen den verschiedenen Versuchsmodellen die Pathophysiologie der elektromechanischen Kopplung stets variiert und allgemein akzeptiert ist (HASENFUSS 1998). Darüber hinaus wurden in dieser Dissertation humane terminal insuffiziente Herzen verwendet, die eine chronische CaMKII-Überexpression aufwiesen. Das Modell von Kushnir et al. hingegen stellt kein Herzinsuffizienzmodell dar, so dass hier die CaMKII weder überexprimiert zu sein scheint, noch positive Effekte durch Inhibition der CaMKII-Überexpression auf die Kontraktilität aufgezeigt werden können. Des Weiteren kann der Knock-in der CaMKII-Phosphorylierungsstelle an Ser-2814 erhebliche allosterische Veränderungen der homotetrameren RyR2-Megakomplexe nach sich ziehen (EISNER et al. 2010). Diese können Veränderungen der PKA-Phosphorylierungsstellen oder in der Affinität des FKBP12.6 zu den RyR2 bewirken und Änderungen in der Öffnungswahrscheinlichkeit der

RyR2 induzieren. Darüber hinaus sind Folgen auf die Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle denkbar, da diese mit den RyR2 funktionell und räumlich als „Couplons“ gekoppelt sind (BERS und GUO 2005, EISNER et al. 2010, ZALK et al. 2007) (vgl. Einleitung Kap. 1.2.1). Weiterhin bleibt festzustellen, dass Kushnir et al. keine Untersuchungen des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks unternahmen (BERS 2010). Folglich muss in diesem Knock-in-Mausmodell der fehlende positiv inotrope Effekt nicht zwangsläufig auf die CaMKII zurückzuführen sein, sondern kann durch andere Effekte bedingt sein.

### 4.5 Unveränderte Relaxationskinetik

Gemäß einiger Publikationen soll die CaMKII verantwortlich sein für die frequenzabhängige beschleunigte Relaxation von Kardiomyozyten („frequency dependent acceleration of relaxation“=„FDAR“) (RA BASSANI et al. 1995, ODERMATT et al. 1996, SCHOUTEN 1990). Während steigender Herzfrequenzen soll dieser Mechanismus eine adäquate Ventrikelfüllung in der Diastole garantieren. Schouten et al. führten diese „FDAR“ auf eine CaMKII-abhängige PLB-Phosphorylierung mit folgendem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das SR über die SERCA2a zurück. Die CaMKII solle in den isolierten Muskelstreifen aus gesunden Rattenherzen durch erhöhte frequenzabhängige intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aktiviert werden (SCHOUTEN 1990). Primär waren die Ergebnisse dieser Dissertation über die unveränderte Relaxationskinetik der Muskelstreifen unter CaMKII-Inhibition also überraschend. Wenn man sich jedoch mit der entsprechenden Literatur über die „FDAR“ via PLB-Phosphorylierung und die dabei spielende Rolle der CaMKII auseinandersetzt, kommt die Kontroversität dieses Themas zum Vorschein. Hageman et al. zeigten beispielsweise, dass die frequenzabhängige PLB-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten an Thr-17, der CaMKII-Phosphorylierungsstelle, erhöht war, jedoch nicht an Ser-16, der PKA-Phosphorylierungsstelle. Dabei korrelierte die CaMKII-abhängige PLB-Phosphorylierung mit der Relaxation der Zellen (HAGEMANN et al. 2000). Im Gegensatz dazu wiesen PLB-Knock-out-Mäuse weiterhin eine beschleunigte Relaxation bei steigenden Herzfrequenzen auf, die darüber hinaus sensitiv auf CaMKII-Inhibition reagierten (DESANTIAGO et al. 2002). Die Phosphorylierung von PLB über die CaMKII kann also nicht als einziger Mechanismus eine frequenzabhängige beschleunigte Relaxation induzieren. Weiterhin ist die Arbeit von Brixius et al. erwähnenswert, da in dieser Publikation analog zu dieser Dissertation humanes terminal insuffizientes Myokard verwendet wurde. Diese Arbeitsgruppe schrieb zwar der PKA über PLB-Phosphorylierung an Ser-16 eine Relaxationsbeschleunigung sowohl im humanen gesunden als auch im insuffizienten Myokard zu, jedoch nicht einer CaMKII-abhängigen Phosphorylierung an Thr-17 (BRIXIUS et al. 2003). Kohlhaas et al. zeigten ergänzend zu

den Resultaten der vorliegenden Arbeit keinerlei Relaxationsveränderungen in Kaninchenkardiomyozyten mit akuter adenoviraler CaMKII-Überexpression (KOHLHAAS et al. 2006). Um diesem kontroversen Thema in dieser Arbeit weiter auf den Grund zu gehen, wurden neben den Relaxationsparametern der Muskelstreifen die für die CaMKII spezifische PLB-Phosphorylierungsstelle an Thr-17 untersucht. Passend zu den erhobenen unveränderten Relaxationskinetiken und den Ergebnissen von Brixius et al. (BRIXIUS et al. 2003) war diese nach CaMKII-Blockade nicht signifikant gegenüber der Kontrolle verändert.

Verschiedene Forschergruppen postulieren eine essentielle Rolle der Proteinphosphatasen für die Balance zwischen Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung, die somit intrazelluläre Proteine in ihrer Aktivität in der elektromechanischen Kopplung beeinflussen können (BERS und GUO 2005, NEUMANN et al. 1997, ZHANG et al. 2002). Diese Proteinregulation durch Proteinphosphatasen kann eine weitere mögliche Erklärung für die Divergenz des RyR2- und PLB-Phosphorylierungsstatus liefern. Bereits 1997 fiel eine erhöhte Phosphatasenaktivität in humanen terminal insuffizienten Herzen auf (NEUMANN et al. 1997). Vor allem die unterschiedliche Kompartimentalisierung der Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A) können einen unterschiedlichen RyR2- und PLB-Phosphorylierungsstatus in der Herzinsuffizienz bedingen (MARX et al. 2001). El-Armouche et al. fanden eine um 2,5-fach erhöhte Phosphatasenaktivität der PP1 im humanen insuffizienten Myokard, welche eine verminderte PLB-Phosphorylierung zur Folge hatte (EL-ARMOUCHE et al. 2004). Zuzuschreiben war dies einer Verminderung der Proteinlevel des Phosphataseninhibitors-1 (I-1) und einer Reduktion von dessen Phosphorylierung. Diese PP1-Aktivität war jedoch nicht global erhöht. Vielmehr variierte die PP1-Aktivität je nach intrazellulärer Kompartimentalisierung. Bedeutend scheint hier, dass der I-1 vor allem mit dem freien SR und somit mit PLB vermehrt assoziiert ist und nicht mit dem junktionalen SR, der Lokalisation des RyR2. Somit kann es zu einer Divergenz des RyR2- und PLB-Phosphorylierungsstatus kommen.

### 4.6 Limitationen der Arbeit

Von einigen Arbeitsgruppen wurden unspezifische Nebeneffekte des CaMKII-Inhibitors KN-93 auf die L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle mit Folge erhöhter systolischer Ca<sup>2+</sup>-Transienten gezeigt (ANDERSON et al. 1998, GAO et al. 2006, LI et al. 1997). Folgende Überlegungen kamen deshalb bei den Experimenten zum Tragen: Zum einen wurde das etablierte inaktive Analogon KN-92 als Kontrolle eingesetzt, zum anderen die Experimente mit dem anderen CaMKII-Inhibitor AIP ergänzt, der keine Nebeneffekte auf die L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aufweist

(ISHIDA et al. 1995). Grueter et al. detektierten die CaMKII-Phosphorylierungsstelle der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle an deren  $\beta_{2a}$ -Untereinheit an Thr-498 (GRUETER et al. 2006). In unseren Versuchen war die Phosphorylierung der  $\beta_{2a}$ -Untereinheit der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zwischen dem CaMKII-Inhibitor KN-93 und dessen Kontrolle KN-92 im humanen terminal insuffizienten Ventrikelmyokard nicht verändert (SOSSALLA et al. 2010). Ergänzend zu diesen Erhebungen konnten wir kürzlich in Patch-Clamp-Experimenten keine signifikanten Ca<sup>2+</sup>-Strom-Alterationen ( $I_{Ca}$ ) zwischen mit KN-93 und KN-92 behandelten isolierten humanen Kardiomyozyten zeigen (NEEF et al. 2010). Einzuräumen bleibt allerdings, dass es sich in diesem Fall um humane Vorhofkardiomyozyten von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern handelte und nicht um ventrikuläres Myokard. Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass die L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in dieser Dissertation vermutlich nicht signifikant durch KN-93 beeinflusst wurden.

An dieser Stelle soll festgehalten werden, dass hier die CaMKII akut inhibiert wurde. Chronische Effekte der CaMKII-Inhibition, wie Veränderungen der Transkriptionslevel einiger Proteine, die in die elektromechanischen Kopplung involviert sind, konnten in diesem Versuchsszenario weder untersucht, noch ausgeschlossen werden.

Die Effektivität der CaMKII-Hemmung mittels AIP und KN-93 wurde in dieser Dissertation mittels molekularbiologischer Untersuchungen überprüft. Eine verminderte CaMKII-Autophosphorylierung an Thr-286 um 65-84% konnte detektiert werden. Eine residuale CaMKII-Aktivität kann folglich in den Experimenten nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Es handelt sich in dieser Dissertation folglich nicht um eine vollständige CaMKII-Ablation, sondern vielmehr um eine Suppression der erhöhten CaMKII-Aktivität, wie sie bei der terminalen Herzinsuffizienz des Menschen nachzuweisen ist.

### 4.7 Ausblick und klinische Relevanz

Bisher existieren kaum positiv inotrope und etablierte pharmakologische Ansätze zur medikamentösen Behandlung einer Herzinsuffizienz, bis auf herzwirksame Glykoside, Phosphodiesterase-III-Inhibitoren, Katecholamine und seit einigen Jahren Ca<sup>2+</sup>-Sensitizer (HOPPE et al. 2005). Problematisch sind vor allem ihre zahlreichen Nebenwirkungen und ihre limitierten Indikationen (FOLLATH et al. 2002, GHEORGHIADÉ et al. 2003, HOPPE et al. 2005). Die wiederholte und dauerhafte orale Gabe von Inotropika erhöht teilweise sogar die Mortalität von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (HOPPE et al. 2005). Beispielsweise bewirkte die Gabe von Milrinon keinen Benefit auf die Hospitalisationsdauer,

sondern führte sogar behandlungsassoziiert zu kardiovaskulären Ereignissen (GHEORGHIADÉ et al. 2003). Einzig Levosimendan aus der Gruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer scheint die Symptome von Patienten mit einer schweren systolischen Herzinsuffizienz aktuell suffizient zu verbessern, ohne schwerwiegende Nebenwirkungen hervorzurufen (FOLLATH et al. 2002). Von Nachteil ist jedoch, dass Levosimendan zwar in der akuten, dekompensierten chronischen Herzinsuffizienz eingesetzt werden kann, jedoch nicht als Dauermedikation (FOLLATH et al. 2002, HOPPE et al. 2005).

Anhand dieser Ausführungen zeigt sich, dass die Inhibition der CaMKII-Überexpression eine neuartige Möglichkeit in der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz des Menschen darstellt. Erstmals konnte in dieser Dissertation der Beweis angetreten werden, dass nicht nur im Tiermodell die Inhibition der CaMKII ein durch RyR2-Hyperphosphorylierungen bedingtes SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck vermindern kann, sondern auch im menschlichen Myokard. Demzufolge kann durch den erhöhten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt die Myokardkontraktilität verbessert und die systolische Dysfunktion aufgehoben werden. Die spezifische Entwicklung von Phospho-Inhibitoren bzw. die Inhibition des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks durch vermehrte CaMKII-abhängige Phosphorylierung an den RyR2 sollte vorangetrieben werden und stellt möglicherweise einen neuartigen Angriffspunkt in der Therapie der Herzinsuffizienz dar, die in ihrer medizinischen Relevanz und sozioökonomischen Bedeutung stetig zunimmt. CaMKII-Inhibitoren als mögliche positiv inotrope Substanzen bedürfen in Zukunft weiterer experimenteller und klinischer Studien.

## 5. Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren avancierte die Herzinsuffizienz zu einer der häufigsten Todesursachen und kostenintensivsten Krankheiten. Bekannterweise ist die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) in der Herzinsuffizienz sowohl in ihrer Aktivität als auch in ihrer Expression erhöht, jedoch ist ihre funktionelle Rolle bei dieser noch nicht hinreichend geklärt. In dieser Dissertation konnten zum ersten Mal detaillierte Expressionsanalysen der CaMKII in humanen terminal insuffizienten Herzen und die Folgen der CaMKII-Inhibition auf die Myokardkontraktilität untersucht werden.

Die Expressionsanalysen zeigten, dass die Proteinexpression der CaMKII $\delta$  sowohl ihrer nukleären Splicevariante CaMKII $\delta_B$  als auch ihrer zytosolischen Splicevariante CaMKII $\delta_C$  und die CaMKII $\gamma$ -Expression bei Patienten mit DCM und ICM im linken und rechten Ventrikel in humanen terminal insuffizienten Herzen im Vergleich zu gesunden Herzen erhöht sind. Die Inhibition der CaMKII-Überexpression mit KN-93 und AIP bewirkte einen signifikant positiv inotropen Effekt in Muskelstreifenexperimenten. Signifikante Effekte auf die diastolische Spannung und die Relaxationskinetik der Muskelstreifen konnten nicht detektiert werden. Darüber hinaus wies das verbesserte Post-Pausen-Verhalten der Muskelstreifen und die durchgeführten Caffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auf einen verbesserten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel unter CaMKII-Inhibition hin. Die Hypothese, ob der verbesserte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt auf einem reduzierten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck beruhen könne, wurde mit Hilfe der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie überprüft. Durch CaMKII-Inhibition konnte das SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck signifikant vermindert werden und bestätigte somit die erhobene Hypothese. Darüber hinaus war die RyR2-Phosphorylierung an Ser-2809 und an der für die CaMKII spezifischen RyR2-Phosphorylierungsstelle an Ser-2815 nach CaMKII-Hemmung signifikant vermindert. Diese reduzierte RyR2-Hyperphosphorylierung durch CaMKII-Inhibition zog wahrscheinlich eine verminderte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 nach sich.

Zusammenfassend erscheint die Inhibition der CaMKII bzw. die Inhibition des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks durch vermehrte CaMKII-abhängige Phosphorylierung der RyR2 eine mögliche neue und vielversprechende Therapieoption in der Herzinsuffizienz und bedarf weiterführender Studien „in vitro“ und „in vivo“.

## 6. Literaturverzeichnis

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005):  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak in heart failure. *Circ Res* 97, 1314-1322

Allen DG, Kurihara S (1982): The effects of muscle length on intracellular  $Ca^{2+}$  transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol* 327, 79-94

Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Wu Y, Schulman H, Sung RJ (1998): KN-93, an inhibitor of multifunctional  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 996-1006

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1993): Twitch-dependent SR  $Ca^{2+}$  accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 265, C533-540

Bassani RA, Bers DM (1994):  $Na^+/Ca^{2+}$ -exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 26, 1335-1347

Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM (1995): CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268, H703-712

Bers DM (1985):  $Ca^{2+}$  influx and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release in cardiac muscle activation during postrest recovery. *Am J Physiol* 248, H366-381

Bers DM: Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001

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

Bers DM (2010): CaMKII inhibition in heart failure makes jump to human. *Circ Res* 107, 1044-1046

Bers DM, Guo T (2005): Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1047, 86-98

Bers DM, Bassani RA, Bassani JW, Baudet S, Hryshko LV (1993): Paradoxical twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR Ca<sup>2+</sup>. *J Mol Cell Cardiol* 25, 1047-1057

Blinks JR, Koch-Weser J (1961): Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 134, 373-389

Bowditch H (1871): Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Verh Saechs Akad Wiss* 23, 652-689

Braun AP, Schulman H (1995): The multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 57, 417-445

Bristow MR, Ginsburg R (1986):  $\beta_2$  receptors on myocardial cells in human ventricular myocardium. *Am J Cardiol* 57, 3F-6F

Brixius K, Wollmer A, Bolck B, Mehlhorn U, Schwinger RH (2003): Ser-16, but not Thr-17 phosphorylation of phospholamban influences frequency-dependent force generation in human myocardium. *Pflugers Arch* 447, 150-157

Buckley NM, Penefsky ZJ, Litwak RS (1972): Comparative force-frequency relationships in human and other mammalian ventricular myocardium. *Pflugers Arch* 332, 259-270

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB (1993): Ca<sup>2+</sup>-sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262, 740-744

Cleland JG, Erhardt L, Murray G, Hall AS, Ball SG (1997): Effect of ramipril on morbidity and mode of death among survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. A report from the AIRE Study Investigators. *Eur Heart J* 18, 41-51

Cohn JN, Tognoni G (2001): A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 345, 1667-1675

Colomer JM, Mao L, Rockman HA, Means AR (2003): Pressure overload selectively up-regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol* 17, 183-192

Conchello JA, Lichtman JW (2005): Optical sectioning microscopy. *Nat Methods* 2, 920-931

Currie S, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL (2004): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J* 377, 357-366

Davis BA, Schwartz A, Samaha FJ, Kranias EG (1983): Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 258, 13587-13591

Delbridge LM, Satoh H, Yuan W, Bassani JW, Qi M, Ginsburg KS, Samarel AM, Bers DM (1997): Cardiac myocyte volume, Ca<sup>2+</sup> fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol* 272, H2425-2435

DeSantiago J, Maier LS, Bers DM (2002): Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 34, 975-984

Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balsler JR, Anderson ME (2000): Calmodulin kinase determines Ca<sup>2+</sup>-dependent facilitation of L-type-Ca<sup>2+</sup>-channels. *Nat Cell Biol* 2, 173-177

Edman CF, Schulman H (1994): Identification and characterization of  $\delta_B$ -CaM kinase and delta  $\delta_C$ -CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1221, 89-101

Eisner DA, George CH, Smith GL, Trafford AW, Venetucci LA (2010): How does CaMKII $\delta$  phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor contribute to inotropy? *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, E123; author reply E124

El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T (2004): Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 61, 87-93

Endoh M, Blinks JR (1988): Actions of sympathomimetic amines on the  $\text{Ca}^{2+}$  transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  mediated through  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors. *Circ Res* 62, 247-265

Fabiato A (1983):  $\text{Ca}^{2+}$ -induced release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245, C1-14

Fabiato A (1985): Simulated calcium current can both cause  $\text{Ca}^{2+}$  loading in and trigger  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85, 291-320

Fabiato A, Fabiato F (1975): Contractions induced by a  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249, 469-495

Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF (2010): Physiologic basis and pathophysiologic implications of the diastolic properties of the cardiac muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010, 807084

Follath F, Cleland JG, Just H, Papp JG, Scholz H, Peuhkurinen K, Harjola VP, Mitrovic V, Abdalla M, Sandell EP (2002): Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *Lancet* 360, 196-202

Gao L, Blair LA, Marshall J (2006): CaMKII-independent effects of KN-93 and its inactive analog KN-92: reversible inhibition of L-type- $\text{Ca}^{2+}$ -channels. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1606-1610

Gheorghide M, Gattis WA, Klein L (2003): OPTIME in CHF trial: rethinking the use of inotropes in the management of worsening chronic heart failure resulting in hospitalization. *Eur J Heart Fail* 5, 9-12

Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966): The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 184, 170-192

Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Pfeffer MA, Swedberg K (2003): Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet* 362, 772-776

Grueter CE, Abiria SA, Dzhura I, Wu Y, Ham AJ, Mohler PJ, Anderson ME, Colbran RJ (2006): L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel facilitation mediated by phosphorylation of the  $\beta$ -subunit by CaMKII. *Mol Cell* 23, 641-650

Guatimosim S, Dilly K, Santana LF, Saleet Jafri M, Sobie EA, Lederer WJ (2002): Local  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and EC coupling in heart:  $\text{Ca}^{2+}$ -sparks and the regulation of the  $[\text{Ca}^{(2+) } ]_i$  transient. *J Mol Cell Cardiol* 34, 941-950

Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP (1987): Abnormal intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61, 70-76

Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP (2000): Frequency-encoding Thr-17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser-16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 275, 22532-22536

Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995): Phosphorylation modulates the function of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem* 270, 2074-2081

Hasenfuss G (1998): Alterations of  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37, 279-289

Hasenfuss G, Pieske B (2002):  $\text{Ca}^{2+}$  cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 34, 951-969

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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75, 434-442

Hibberd MG, Jewell BR (1982):  $\text{Ca}^{2+}$ - and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *J Physiol* 329, 527-540

Hjalmarson A, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjekshus J, Wikstrand J, El Allaf D, Vitovec J, Aldershvile J (2000): Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *JAMA* 283, 1295-1302

Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (1999): Identification and expression of  $\delta$ -isoforms of the multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 84, 713-721

Hoppe U, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer H, Osterspey A, Schmaltz A, Erdmann E, in Zusammenarbeit mit der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft (2005): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* 94, 488–509

Hussain M, Drago GA, Colyer J, Orchard CH (1997): Rate-dependent abbreviation of  $\text{Ca}^{2+}$  transient in rat heart is independent of phospholamban phosphorylation. *Am J Physiol* 273, H695-706

Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1365

Inui M, Saito A, Fleischer S (1987): Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem* 262, 15637-15642

Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H (1995): A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 806-812

James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E (1989): Nature and site of phospholamban regulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 342, 90-92

Kao JP, Harootunian AT, Tsien RY (1989): Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* 264, 8179-8184

Kentish JC, Wrzosek A (1998): Changes in force and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration after length changes in isolated rat ventricular trabeculae. *J Physiol* 506 ( Pt 2), 431-444

Kentish JC, ter Keurs HE, Ricciardi L, Bucx JJ, Noble MI (1986): Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of  $Ca^{2+}$  concentrations on these relations. *Circ Res* 58, 755-768

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42, 254-261

Koch-Weser J, Blinks JR (1963): The Influence of the Interval between Beats on Myocardial Contractility. *Pharmacol Rev* 15, 601-652

Kohlhaas M: Die Bedeutung der subzellulären CaMKII $\delta$ -Überexpression auf den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Stoffwechsel in Herzmuskelzellen. Med. Diss. Göttingen 2006

Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM (2006): Increased sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 98, 235-244

Krum H, Roecker EB, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Coats AJ, Katus HA, Fowler MB, Packer M (2003): Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS Study. *JAMA* 289, 712-718

Kushnir A, Shan J, Betzenhauser MJ, Reiken S, Marks AR (2010): Role of CaMKII $\delta$  phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10274-10279

Lai Y, Nairn AC, Greengard P (1986): Autophosphorylation reversibly regulates the  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependence of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4253-4257

Lakowicz J (1999): Principles of Fluorescence Spectroscopy. Scanning, 128-139

Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG (1979): Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphorylations. Biochemistry 18, 5150-5157

Le Peuch CJ, Le Peuch DA, Demaille JG (1980): Phospholamban, activator of the cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump. Physicochemical properties and diagonal purification. Biochemistry 19, 3368-3373

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

Lichtman JW, Conchello JA (2005): Fluorescence microscopy. Nat Methods 2, 910-919

Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H (1986): Activation of the multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 9497-9501

Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG (1994): Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. Circ Res 75, 401-409

Maier LS (2009): Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart. Front Biosci 14, 486-496

Maier LS, Bers DM (2002):  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulin, and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. J Mol Cell Cardiol 34, 919-939

Maier LS, Bers DM (2007): Role of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. Cardiovasc Res 73, 631-640

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII $\delta_c$  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, 904-911

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, Marks AR (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-376

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosembliit N, Marks AR (2001): Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol* 153, 699-708

Mc Kee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB (1971): The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med* 285, 1441-1446

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

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990): Altered sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 85, 305-309

Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H (1992): Calmodulin trapping by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256, 1199-1202

Minsky M (1988): Memoir on inventing the confocal microscope. *Scanning* 10, 128-139

Minta A, Kao JP, Tsien RY (1989): Fluorescent indicators for cytosolic Ca<sup>2+</sup> based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 264, 8171-8178

Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR (1989): Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 65, 1441-1449

Mulieri LA, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen PD, Alpert NR (1992): Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 85, 1743-1750

Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schondube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010): CaMKII-dependent diastolic SR-Ca<sup>2+</sup>-leak and elevated diastolic Ca<sup>2+</sup> levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 106, 1134-1144

Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997): Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29, 265-272

Odermatt A, Kurzydowski K, MacLennan DH (1996): The V<sub>max</sub> of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban. *J Biol Chem* 271, 14206-14213

Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH (1996): The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 334, 1349-1355

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

Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations in intracellular Ca<sup>2+</sup> handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 1169-1178

Piot C, Lemaire S, Albat B, Seguin J, Nargeot J, Richard S (1996): High frequency-induced upregulation of human cardiac Ca<sup>2+</sup> currents. *Circulation* 93, 120-128

Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA (1993): Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261, 58-65

Reinecke H, Studer R, Vetter R, Holtz J, Drexler H (1996): Cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 31, 48-54

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 23

Ringer S, Buxton DW (1885): Concerning the Action of small quantities of  $\text{Ca}^{2+}$ , Sodium, and Potassium Salts upon the Vitality and Function of Contractile Tissue and the Cuticular Cells of Fishes. *J Physiol* 6, 154-161

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, 38593-38600

Schouten VJ (1990): Interval dependence of force and twitch duration in rat heart explained by  $\text{Ca}^{2+}$  pump inactivation in sarcoplasmic reticulum. *J Physiol* 431, 427-444

Schwinger RH, Bohm M, Koch A, Uhlmann R, Uberfuhr P, Kreuzer E, Reichart B, Erdmann E (1993): Force-frequency-relation in human atrial and ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem* 119, 73-78

Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR (1986): Reversible generation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent form of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem* 261, 8581-8584

Seidler T, Hasenfuss G, Maier LS (2007): Targeting altered calcium physiology in the heart: translational approaches to excitation, contraction, and transcription. *Physiology (Bethesda)* 22, 328-334

Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM (2003): Elevated sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circ Res* 93, 592-594

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittkopper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, El-Armouche A, Hasenfuss G, Maier LS (2010): Inhibition of elevated  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107, 1150-1161

Srinivasan M, Edman CF, Schulman H (1994): Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol* 126, 839-852

Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland. Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen, Fachserie 12, Reihe 4, Wiesbaden 2010a

Statistisches Bundesamt: Gesundheits- und Krankheitskosten 2002, 2004, 2006 und 2008, Fachserie 12, Reihe 7.2, Wiesbaden 2010b

Statistisches Bundesamt: Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschließlich Sterbe- und Stundenfälle), Fachserie 12, Reihe 6.2.1, Wiesbaden 2011

Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75, 443-453

Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, Hidaka H (1991): The newly synthesized selective  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 968-975

Tobimatsu T, Fujisawa H (1989): Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem* 264, 17907-17912

Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T (2010): Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122, 993-1003

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354

Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ (1995): Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by  $Mg^{2+}$  and phosphorylation. *Science* 267, 1997-2000

Valverde CA, Mundina-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Vittone L, Salas M, Palomeque J, Petroff MV, Mattiazzi A (2005): Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: a property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation. *J Physiol* 562, 801-813

Villari B, Sossalla S, Ciampi Q, Petruzzello B, Turina J, Schneider J, Turina M, Hess OM (2009): Persistent diastolic dysfunction late after valve replacement in severe aortic regurgitation. *Circulation* 120, 2386-2392

Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, Sowa T, Fabritz L, Kirchhof P, Bers DM (2009):  $Ca^{2+}$ /Calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 285-294

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH (2006):  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac  $Na^+$  channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3138

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004):  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, 61-70

Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Rosembli N (2003): FKBP12.6 deficiency and defective  $Ca^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 113, 829-840

Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR (1991): Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates  $Ca^{2+}$  channel activity. *J Biol Chem* 266, 11144-11152

Xu A, Hawkins C, Narayanan N (1993): Phosphorylation and activation of the Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 268, 8394-8397

Yang D, Zhu WZ, Xiao B, Brochet DX, Chen SR, Lakatta EG, Xiao RP, Cheng H (2007): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of ryanodine receptors suppresses Ca<sup>2+</sup>-sparks and Ca<sup>2+</sup> waves in cardiac myocytes. *Circ Res* 100, 399-407

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007): Modulation of the ryanodine receptor and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Annu Rev Biochem* 76, 367-385

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, 476-486

Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH (2003): The  $\delta_C$  isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912-919

Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H (2002): The cardiac-specific nuclear  $\delta_B$  isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277, 1261-1267

## 7. Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Sossalla S, **Fluschnik N**, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittkopper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, El-Armouche A, Hasenfuss G, Maier LS (2010): Inhibition of elevated  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107, 1150-1161, mit Editorial von Bers DM (2010): CaMKII inhibition in heart failure makes jump to human. *Circ Res* 107, 1044-1046

Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, **Fluschnik N**, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010): CaMKII-dependent diastolic SR- $\text{Ca}^{2+}$ -leak an elevated diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels in atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 106, 1134-1144

### Abstracts

**Fluschnik N**, Sossalla S, Ort K, Schotola H, Schmitto JD, Neef S, Maier LS (2009): CaMKII inhibition improves contractility in human failing myocardium. *Circulation* 120, 819-820

Sossalla S, **Fluschnik N**, Ort K, Neef S, Hasenfuss G, Maier LS: Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II ameliorates depressed contractility of human end-stage failing myocardium. Gehalten am 27. Januar 2010 in Les Diablerets, Schweiz, Heart Failure Winter Research Meeting 27.-30. Januar 2010

Sossalla S, **Fluschnik N**, Ort K, Neef S, Hasenfuss G, Maier LS: Mechanism of positive inotropic effect of  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II in human end-stage failing myocardium. *Clin Res Cardiol* 99, Suppl. 1

**Fluschnik N**, Sossalla S, Ort K, Neef S, Hasenfuss G, Maier LS (2010): Beneficial effects of CaMKII inhibition in the human failing heart. *Cardiovasc Res* 87, Suppl. 1, 89-135

Sossalla S, **Fluschnik N**, Schotola H, Ort K, Schmitto JD, Neef S, Hasenfuss G, Maier LS (2010): CaMKII inhibition leads to positive inotropic effects in the failing human. *Eur Heart J* 31 (Abstract Supplement), 895

## **Danksagung**

Meinen besonderen Dank möchte ich zum einen meinem Doktorvater Prof. Dr. Lars Maier und zum anderen meinem Betreuer Dr. Samuel Sossalla aussprechen. Vor allem für ihre hervorragende wissenschaftliche Betreuung gepaart mit sozialer Kompetenz möchte ich ihnen danken. Des Weiteren möchte ich mich für das Überlassen dieses Dissertationsthemas bedanken. Ausdrücklich möchte ich mich für ihr entgegengebrachtes Vertrauen und ihre fortwährende Unterstützung meiner Arbeit bedanken. Ihr Enthusiasmus und ihr Engagement am wissenschaftlichen Arbeiten übertrugen sich auf mich.

Mein weiterer Dank gilt den technischen Assistenten Timo Schulte, Thomas Sowa und Marijana Celso, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mich bei meiner experimentellen Arbeit unterstützten. Dr. Marks und Dr. Bers möchte ich für die Bereitstellung der Antikörper für die Western-Blot-Experimente danken.

Außerdem danke ich der herzchirurgischen Abteilung des Herzzentrums von Bad Oeynhausen für die Zusammenarbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden/-innen und den anderen „Postdocs“ für ihre Unterstützung, die Vermittlung der experimentellen Fähigkeiten, die nette Atmosphäre und die wissenschaftlichen Diskussionen bedanken. Namentlich erwähnen möchte ich hierbei Dr. Stefan Wagner, Dr. Can Martin Sag, Stefan Neef sowie Birte Kallmeyer, Ulrike Maurer, Katharina Ort und Nico Hartmann.

## **Lebenslauf**

Am 8. Oktober 1985 wurde ich als zweites Kind des Studienrats Thomas Fluschnik und der Lehrerin Sabine Rathmann-Fluschnik in Berlin geboren.

Nach dem Besuch der Johannes-Tews-Grundschule in Berlin-Zehlendorf (1992-1998) ging ich anschließend auf das Werner-von-Siemens-Gymnasium in Berlin, an dem ich im Juni 2005 die Allgemeine Hochschulreife (1,7) ablegte.

Zum Wintersemester 2005/2006 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf und legte am 19. September 2007 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“ ab. Parallel betreute ich als Tutorin Studenten im makroskopischen Kurs der Anatomie und später im Fach Biochemie. Im klinischen Studienabschnitt absolvierte ich meine Famulaturen unter anderem in Berlin, Wien und Auckland (Neuseeland). Seit Februar 2011 befinde ich mich in meinem Praktischen Jahr (PJ), welches ich in verschiedenen Krankenhäusern in Deutschland, in der Schweiz und in Australien verbringe.

Seit Februar 2008 bin ich Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes und erhielt für meine bisherigen Leistungen im Dezember 2009 das Kurzstipendium aus den Mitteln des Niedersächsischen Ministeriums für Wissenschaft und Kultur (verliehen von der Georg-August-Universität, Göttingen).

Im Wintersemester 2008/2009 begann ich meine experimentelle Doktorarbeit in der DFG-geförderten Forschergruppe von Prof. Dr. Maier (Abteilung Kardiologie und Pneumologie an der Georg-August-Universität, Göttingen). Seit September 2009 setzte ich studienbegleitend meine wissenschaftliche Tätigkeit in der Arbeitsgruppe als studentische Hilfskraft fort.

Die im Rahmen meiner Doktorarbeit erhobenen Ergebnisse konnte ich bei einer Posterpräsentation auf dem Kongress der American Heart Association (AHA) im November 2009 in Orlando (USA), auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) in Mannheim 2010 und bei einem Vortrag auf dem Kongress „Frontiers in Cardiovascular Biology“ der European Society of Cardiology (ESC) im Juli 2010 in Berlin präsentieren. Im Zuge dessen erhielt ich eine Reisekostenunterstützung durch das Projekt der Nachwuchsförderung der DGK und das Reisestipendium „EuGene Heart Travel Grant/ Poster Travel Assistance“ des ESC. Darüber hinaus wurde die Publikation mit dem Franz-

Maximilian-Groedel-Forschungspreis honoriert, der am 28. April 2011 anlässlich der Eröffnungsveranstaltung der 77. Jahrestagung der DGK in Mannheim verliehen wurde.