

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

---

## **Mechanismen Isoprenalin-induzierter Extrakontraktionen im humanen Vorhofmyokard**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dörte Schottky

aus  
Bremen

Göttingen 2011

**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel  
**I. Berichterstatter:** Prof. Dr. rer. nat. J. Kockskämper  
**II. Berichterstatter/in:** Priv.-Doz. Dr. med. Seipelt  
**III. Berichterstatter/in:** Prof. Dr. med. Oppermann  
**Tag der mündlichen Prüfung:** 31.07.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1 Vorhofflimmern .....	7
1.2 Elektromechanische Kopplung und Ca <sup>2+</sup> -Haushalt.....	8
1.3 Regulation der Herzfunktion durch sympathoadrenerge Stimulation.....	9
1.4 Bedeutung des Ryanodinrezeptors für die Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung .....	11
1.5 Änderungen der elektromechanischen Kopplung im insuffizienten Myokard .....	12
1.6 Unterschiede zwischen Vorhof- und Kammermyokard.....	12
1.7 Ziele, Fragestellungen .....	13
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Untersuchtes Gewebe .....	14
2.2 Transport und Präparation .....	15
2.3 Verwendete Materialien.....	16
2.4 Versuchsaufbau.....	16
2.4.1 Technische Geräte .....	16
2.4.2 Aufbau der Anlage .....	16
2.5 Versuchsablauf .....	18
2.6 Versuchsprotokolle.....	18
2.6.1 Nicht-insuffizientes Vorhofmyokard.....	18
2.6.2 Insuffizientes Vorhof- und Ventrikelmyokard.....	19
2.7 Verwendete Pharmaka.....	20
2.8 Statistische Auswertung und Darstellung .....	21
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>23</b>
3.1 Isoprenalin-induzierte Extrakontraktionen und positive Inotropie in nicht-insuffizientem Vorhofmyokard.....	23
3.1.1 Isoprenalin induziert spontane Extrakontraktionen (SEK) in nicht-insuffizientem Vorhofmyokard.....	23
3.1.2 Die Behandlung mit $\beta$ -Blockern verstärkt das Auftreten von spontanen Extrakontraktionen nach Isoprenalin-Gabe .....	24
3.1.3 Hemmung der Proteinkinase A (PKA) mittels H89 verringert das Auftreten Isoprenalin-induzierter Extrakontraktionen .....	27

3.1.4 Hemmung der CamKinase II mittels KN93 verringert das Auftreten Isoprenalin-induzierter Extrakontraktionen.....	28
3.1.4.1 KN92 zeigt keine Wirkung .....	28
3.1.5 H89 und KN93 reduzieren das Auftreten Isoprenalin-induzierter Extrakontraktionen .....	29
3.1.6 Ryanodin unterdrückt die Entstehung spontaner Kontraktionen und vermindert die Kontraktionskraft.....	30
3.1.7 Übersicht über die Wirkungen der einzelnen Pharmaka .....	31
3.1.8 Koffein erhöht die Wahrscheinlichkeit für spontane Extrakontraktionen .....	33
3.2 Vorhof- und Ventrikelgewebe aus terminal insuffizienten Herzen .....	33
3.2.1 Vorhofgewebe aus terminal insuffizienten Herzen zeigt kaum spontane Extrakontraktionen unter Isoprenalin und Koffein .....	33
3.2.2 Ventrikelgewebe aus terminal insuffizienten Herzen zeigt keine spontanen Extrakontraktionen unter Isoprenalin und Koffein .....	35
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>37</b>
4.1 Verwendetes Material .....	37
4.2 Wirkung von Ryanodin.....	37
4.3 Bedeutung der PKA .....	38
4.4 Bedeutung der CaMKII .....	39
4.5 PKA und CaMKII in der $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion .....	41
4.6 Sympathoadrenerge Stimulation am terminal insuffizienten Herzen .....	41
4.7 Pathophysiologische Bedeutung .....	42
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>43</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>45</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung des Versuchsstandes .....	17
Abb. 2 Originalregistrierung: Keine SEK nach Gabe von Isoprenalin. ....	24
Abb. 3 Originalregistrierung: Auftreten von SEK nach Gabe von Isoprenalin .....	24
Abb. 4 Kraftentwicklung vor und nach Isoprenalingabe in Trabekeln von Patienten mit und ohne $\beta$ -Blocker .....	25
Abb. 5 Anteil der Trabekel mit und ohne $\beta$ -Blocker, die nach Isoprenalingabe SEK entwickelten .....	25
Abb. 6 Isoprenalin-induzierte SEK in Trabekeln mit und ohne $\beta$ -Blocker- Vorbehandlung .....	25
Abb. 7 Anteil der Trabekel von mit $\beta$ -Blockern behandelten Patienten .....	26
Abb. 8 Originalregistrierung: Wirkung von H89 .....	27
Abb. 9 Originalregistrierung: Wirkung von KN93.....	28
Abb. 10 Originalregistrierung: Kombinierte Gabe von H89 und KN93. ....	29
Abb. 11 Originalregistrierung: Wirkung von Ryanodin .....	30
Abb. 12 Originalregistrierung: Wirkung von Koffein bei Gabe nach Ryanodin .....	30
Abb. 13 Effekt der Substanzen auf die basale Kraft .....	31
Abb. 14 Positiv-inotroper Effekt von Isoprenalin in den Substanzgruppen .....	31
Abb. 15 Anteil der Trabekel, die Isoprenalin-induzierte SEK entwickelten .....	32
Abb. 16 Anzahl der Isoprenalin-induzierten SEK in den Substanzgruppen.....	32
Abb. 17 Originalregistrierung: Wirkung von Koffein bei zusätzlicher Gabe nach Isoprenalin .....	33
Abb. 18 Konzentrationsabhängiger positiv-inotroper Effekt von Isoprenalin an Vorhofgewebe aus insuffizienten Herzen .....	34
Abb. 19 Positiv-inotroper Effekt von Isoprenalin $10^{-8}$ M an Vorhofgewebe aus insuffizienten Herzen .....	35
Abb. 20 Positiv-inotroper Effekt von Isoprenalin $10^{-6}$ M an Vorhofgewebe aus insuffizienten Herzen .....	35
Abb. 21 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin an Ventrikelgewebe aus insuffizienten Herzen .....	35
Abb. 22 Positiv-inotroper Effekt von Isoprenalin $10^{-8}$ M an Ventrikelgewebe aus insuffizienten Herzen .....	36
Abb. 23 Positiv-inotroper Effekt von Isoprenalin $10^{-6}$ M an Ventrikelgewebe aus insuffizienten Herzen .....	36

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AV-Knoten	Atrioventrikular-Knoten
BDM	2,3 Butandion-Monoxim
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion(en)
CaMKII	Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
FKBP12.6	FK506-bindendes Protein
H89	(selektiver Hemmstoff der PKA)
KHK	koronare Herzkrankheit
KN93	(selektiver Hemmstoff der CaMKII)
mAKAP	muskelspezifisches A-Kinase-Ankerprotein
mN	Millinewton
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion(en)
NCX	sarkolemmaler Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Antiport
pF	Pikofarad
PIE	Positiv-inotroper Effekt
PKA	Proteinkinase A
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2a	Proteinphosphatase 2a
RyR2	Ryanodinrezeptor Typ 2
SEK	Spontane Extraktion
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, Kalziumpumpe des SR
SR	sarkoplasmatisches Retikulum

# 1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen in den entwickelten Ländern zu den häufigsten Erkrankungen, sind ein wichtiger Verursacher notwendiger medizinischer Behandlung und, zusammengenommen, die häufigste Todesursache. Neben der koronaren Herzkrankheit (KHK) und ihrer Folge, dem Herzinfarkt, spielen hierbei die arrhythmischen Erkrankungen eine wesentliche Rolle. Diese können ihrerseits als Folge einer KHK oder einer anderen Grunderkrankung, aber auch unabhängig davon auftreten und sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden.

## 1.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist die häufigste arrhythmische Herzerkrankung. In Europa sind 1-2% der Bevölkerung betroffen; eine genaue Angabe ist nicht möglich, da viele Patienten mit asymptomatischem Vorhofflimmern nicht diagnostiziert sind. Es sind vor allem ältere Menschen betroffen, die Prävalenz unter den 80jährigen liegt bei ca. 5-15% (Stewart et al. 2001).

Definiert ist das Vorhofflimmern als schnelle, unregelmäßige elektrische Erregung der Vorhöfe mit einer Frequenz von  $>350/\text{min}$ . Dabei werden drei Formen unterschieden: Ein persistierendes Vorhofflimmern wird diagnostiziert, wenn es länger als 7 Tage besteht oder eine Kardioversion erforderlich macht. Erst wenn nach erfolglosen Therapieversuchen das Ziel der Kardioversion aufgegeben werden muss, wird als Diagnose ein permanentes Vorhofflimmern angegeben. Andererseits können auch Episoden auftreten, die innerhalb von 48 Stunden oder maximal 7 Tagen spontan sistieren. Dies wird paroxysmales Vorhofflimmern genannt und hat eine ähnliche Prognose wie ein länger bestehendes persistierendes oder ein permanentes Vorhofflimmern (Camm et al. 2010).

Ein Vorhofflimmern entsteht meistens auf der Grundlage einer anderen Grunderkrankung oder ist mit dieser assoziiert, insbesondere mit einer hypertensiven Herzerkrankung, einer Herzinsuffizienz oder anderen kardiovaskulären Erkrankungen. Ein wesentlicher prädisponierender Faktor ist, wie oben bemerkt, das Alter.

Die schnelle Erregungsfrequenz entsteht entweder durch sogenannte Mikro-Reentry-Mechanismen (kreisende Erregungen) oder durch ektope, hochfrequente Erregungs-

bildung insbesondere im Bereich der Pulmonalvenen (Haissaguerre et al. 1998). Bei ersterem breiten sich in vorgeschädigtem Vorhofmyokard Erregungswellen so langsam aus, dass sie immer wieder auf erregbares, nicht-refraktäres Gewebe treffen. Dieser Mechanismus ist meistens bei persistierendem oder permanentem Vorhofflimmern zu vermuten, wenngleich auch hier ektope Erregungsbildung eine Rolle spielen kann. Bei paroxysmalem Vorhofflimmern kann dagegen häufiger von einer ektope Erregungsbildung ausgegangen werden, insbesondere wenn dieses in Abwesenheit von anderen kardiovaskulären Erkrankungen oder sonstigen Risikofaktoren auftritt (sogenanntes „lone atrial fibrillation“).

Die Weiterleitung der Erregung an die Kammern über den AV-Knoten erfolgt unregelmäßig und häufig zu schnell (Tachyarrhythmie). Hinzu kommt, dass die Vorhöfe im gesunden Herzen für bis zu 20% der enddiastolischen Füllung verantwortlich sind; dies entfällt, da eine geordnete Kontraktion bei Vorhofflimmern nicht mehr stattfindet. So ist eine effektive Pumpleistung nicht mehr möglich, das Herzzeitvolumen sinkt. Klinisch findet sich häufig ein Pulsdefizit. Die Symptomatik variiert je nach Geschwindigkeit der Überleitung und verbliebenem Herzzeitvolumen. Es kann zu Atemnot, Schwäche oder Schwindel kommen, es können Brustschmerzen oder Palpitationen auftreten oder das Vorhofflimmern kann völlig asymptomatisch bleiben. Im letzten Falle kommt es jedoch nicht seltener zu Komplikationen. Vorhofflimmern ist für die Patienten mit einer erhöhten Mortalität verbunden, zum einen durch Verstärkung bestehender Grunderkrankungen, zum anderen durch das hohe Risiko von Thrombembolien, bedingt durch die Stase des Blutes in den Vorhöfen. Die antithrombotische Therapie ist deshalb ein wesentlicher Bestandteil der Behandlung und für das Überleben des Patienten entscheidend (Hylek et al. 2003). Die Therapieprinzipien der Rhythmuskontrolle und der Frequenzkontrolle sind hilfreich für die Behandlung der Symptomatik, konnten aber das langfristige Ergebnis kaum verbessern. Die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten hält darum an.

## **1.2 Elektromechanische Kopplung und $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt**

Für eine effiziente und koordinierte Kontraktion des gesamten Herzens muss in den einzelnen Herzmuskelzellen der vom Sinusknoten kommende elektrische Impuls in eine mechanische Kontraktion umgesetzt werden. Das zentrale Element dieser Umsetzung ist das  $\text{Ca}^{2+}$ . Wird die Zellmembran durch  $\text{Na}^+$ -Einstrom über die

schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanäle depolarisiert, so führt dies zum Öffnen der spannungsabhängigen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, und es strömt  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle. Die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sind in „Clustern“, also in Gruppen angeordnet. In räumlicher Nähe zu den L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, ebenfalls in Gruppen angeordnet, befinden sich die Ryanodinrezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), des größten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers (Bers 2008). Der Ryanodinrezeptor (RyR2) ist nach dem Pflanzenalkaloid Ryanodin benannt, das an ihn bindet, ist in seiner Funktion jedoch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert wird und dann sehr schnell große Mengen  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR ins Zytosol freisetzt ( $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung), so dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 100 nM auf 1  $\mu\text{M}$  steigt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden an den Myofibrillen ans Troponin C und bewirken eine Konformationsänderung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes, wodurch die Bindungsstelle am Aktin für das Myosin frei wird. Dieses bildet eine Querbrücke zum Aktin aus. Hierzu wird Energie benötigt in Form eines ATP-Moleküls, das dabei in  $\text{ADP}+\text{P}_i$  gespalten wird. Das Myosin ändert seine Konformation durch „Abknicken“ des Köpfchens, wodurch sich das Myosinfilament gegen das Aktinfilament verschiebt – das Sarkomer verkürzt sich, im vielfachen Ablauf dieses Vorgangs kontrahiert die Muskelzelle.

Der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels leitet aber gleichzeitig mit der Kontraktion auch deren Ende ein: Die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle werden durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg im Zytoplasma inaktiviert, so dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aufhört. Das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  wird größtenteils über die ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe (SERCA) wieder ins SR und über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) sowie zu einem kleinen Anteil über die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus der Zelle hinausbefördert (Bers 2002), so dass bei sinkendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel die Querbrückenbildung zwischen Aktin und Myosin wieder inhibiert wird. Die Muskelfaser relaxiert und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kreislauf ist abgeschlossen.

### **1.3 Regulation der Herzfunktion durch sympathoadrenerge Stimulation**

Bei emotionalem Stress wie auch bei körperlicher Belastung kann das Herz-Zeit-Volumen im Sinne einer „Angriff-oder-Flucht“-Reaktion physiologisch auf ein Vielfaches gesteigert werden, während gleichzeitig auch der Blutdruck steigt. Hierzu müssen neben der Herzfrequenz auch Schlagvolumen und Schlagkraft (Inotropie) steigen. Der wichtigste Mechanismus für die Vermittlung dieser Stressantwort ist die

sympathische Aktivierung mit der Freisetzung von Noradrenalin aus den sympathischen Varikositäten. Diese wirken an den Herzmuskelzellen über G-Proteingekoppelte  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren (Brodde et al. 2001). Über die  $G_s$ -Proteine wird die Adenylylzyklase aktiviert, welche cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) bildet. Der wichtigste und am besten bekannte Effekt von cAMP ist die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese erhöht die Kontraktilität auf vielfältige Weise (Ginsburg und Bers 2004). Die Phosphorylierung der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle erhöht deren Offenwahrscheinlichkeit und damit den initialen  $Ca^{2+}$ -Einstrom. Die Ryanodinrezeptoren erlangen durch die PKA-abhängige Phosphorylierung ebenfalls eine höhere Offenwahrscheinlichkeit und werden für  $Ca^{2+}$  sensitiviert, sie lassen so schneller  $Ca^{2+}$  ins Zytosol gelangen (Shan et al. 2010). Der Anstieg des  $Ca^{2+}$ -Transienten und damit die Kontraktion werden so beschleunigt. Das Troponin I der kontraktilen Fasern wird bemerkenswerterweise durch die PKA phosphoryliert und damit für  $Ca^{2+}$  desensitiviert. Bei erhöhten  $Ca^{2+}$ -Spiegeln wirkt sich dies jedoch nicht negativ auf die Kontraktilität aus, gleichzeitig sorgt eine schwächere Bindung des  $Ca^{2+}$  dafür, dass dieses schneller wieder abdiffundiert. Dadurch wird die Relaxation beschleunigt (sogenannter positiv lusitroper Effekt). Schließlich phosphoryliert die PKA auch Phospholamban. Dieses Protein hemmt normalerweise die SERCA, die das  $Ca^{2+}$  wieder aus dem Zytosol ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) pumpt. Eine Phosphorylierung des Phospholambans durch die PKA hebt diese Hemmung auf und kommt somit einer Aktivierung der SERCA gleich. Dies bewirkt eine schnellere Eliminierung des  $Ca^{2+}$  aus dem Zytosol, so dass die Relaxation beschleunigt abläuft. Dieser Mechanismus trägt ebenfalls zum positiv lusitropen Effekt bei. Darüberhinaus steigt der  $Ca^{2+}$ -Gehalt des SR, weil der Transport des  $Ca^{2+}$  aus der Zelle nicht im gleichen Maße zunimmt wie der Transport ins SR und auch weil mehr  $Ca^{2+}$  in die Zelle einströmt, so dass beim darauffolgenden Herzschlag mehr  $Ca^{2+}$  für die Freisetzung aus dem SR und damit die Kontraktion zur Verfügung steht (Bers 2002). Ein weiteres Effektormolekül der  $\beta$ -adrenergen Stimulation ist die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase CaMKII, wobei noch unklar ist, wie genau diese aktiviert wird. Eine Möglichkeit ist die Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Transienten durch die PKA. Eine andere Möglichkeit ist eine PKA-unabhängige Aktivierung, etwa über die cAMP-abhängige GTPase Epac (Pereira et al. 2007). Schließlich gibt es Hinweise darauf, dass  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren die CaMKII auch direkt aktivieren können, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht geklärt ist (Curran et al. 2007). Die

CaMKII hat z.T. ähnliche Ziele wie die PKA. Sie phosphoryliert u.a. den Ryanodinrezeptor und Phospholamban, allerdings an anderen Serin- oder Threonin-Resten.

#### **1.4 Bedeutung des Ryanodinrezeptors für die $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung**

Der Ryanodinrezeptor ist der zentrale Vermittler der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Diese unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen, daher ist der eigentliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal umgeben von mehreren regulatorischen Proteinen. Der makromolekulare Gesamtkomplex besteht aus vier transmembranalen Ryanodinrezeptor-Typ-2-Proteinen, die den Kanal bilden, sowie vier regulatorischen Calstabin-Proteinen (FKBP12.6), einem PKA-Anker-Protein (mAKAP) sowie den Phosphatasen PP1 und PP2A (Marx et al. 2000). Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch Phosphodiesterasen Teil dieses Multiproteinkomplexes sind (Lehnart et al. 2005).  $\text{Ca}^{2+}$ , das durch die spannungsabhängigen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einströmt, bindet an den Ryanodinrezeptor und induziert eine Konformationsänderung, so dass der Ionenkanal geöffnet wird und sehr schnell große Mengen  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol gelangen. Die Offenwahrscheinlichkeit ist zum einen abhängig vom intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ . Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des SR erhöht die Sensitivität für zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  und damit die Wahrscheinlichkeit für spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Entladungen, sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks, und die Bildung arrhythmogener  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen. Dies bedeutet, dass bei starker sympathischer Stimulation, vermittelt über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, die Entstehung RyR2-vermittelter,  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggelter Arrhythmien begünstigt wird. Eine gezielte Regulierung des Ryanodinrezeptors erfolgt andererseits über spezifische Phosphorylierungen insbesondere durch PKA am Serin-Rest 2809 und durch CaMKII am Serin-Rest 2815. Sowohl die Phosphorylierung am Serin 2809 als auch die am Serin 2815 erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors (Marx et al. 2000, Wehrens et al. 2004).

Die Verminderung der Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors mit Hilfe von Tetracain unterdrückt die Entstehung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks (Venetucci et al. 2006). Das  $\text{Ca}^{2+}$  wird aus dem junctionalen Spalt hauptsächlich über den sarkolemmalen  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$ -Antiport (NCX) aus der Zelle hinausbefördert. Da bei dem sekundär aktiven Transport ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion gegen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen getauscht wird, kommt es zu einem Netto-Einstrom von positiver Ladung, und diese Depolarisation kann bei Erreichen

des Schwellenwertes zu einem Aktionspotential führen (Pogwizd et al. 2001). Setzt sich dieses über benachbarte Zellen fort, so entsteht im Herzen eine Kontraktion nach ektopter Erregungsbildung.

### **1.5 Änderungen der elektromechanischen Kopplung im insuffizienten Myokard**

Herzinsuffizienz kann als Endpunkt einer Vielzahl unterschiedlicher kardiovaskulärer Erkrankungen auftreten. In der Regel kommt es dabei zu einer Überlastung des vorhandenen Myokards, sei es durch Untergang eines Teils der Muskelzellen infolge eines Infarktes oder sei es durch eine chronische Druck- oder Volumenbelastung. Die geringere Pumpleistung führt zu einer permanenten sympathischen Stimulation des Herzmuskels, der in der Folge weniger  $\beta$ -Rezeptoren exprimiert und so gegenüber der Stimulation desensitiviert wird. Dieser Vorgang ist jedoch langfristig maladaptiv und führt zu einer schlechteren Regulierbarkeit der Herzfunktion. Die Behandlung mit  $\beta$ -Blockern, die zunächst paradox erscheint, da sie die Kontraktionskraft zu Beginn der Behandlung noch weiter reduziert, führt zu einer Normalisierung der  $\beta$ -Rezeptoren-Dichte und zu einer Verbesserung der globalen Herzfunktion. Auf der zellulären Ebene ist bei Herzinsuffizienz mit chronischer  $\beta$ -Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt beeinträchtigt. Es konnte gezeigt werden, dass der Ryanodinrezeptor hyperphosphoryliert ist, so dass es zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust aus dem SR kommt und dadurch bedingt zu einem Verlust der Kontraktilität (Lehnart et al. 2004). Durch die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors auch in der Diastole zusammen mit einer gesteigerten Expression des NCX (Schotten et al. 2002, El-Armouche et al. 2006) begünstigt dies die Entstehung von  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerten Arrhythmien. Eine mögliche Rolle bei der Dysregulation des Ryanodinrezeptors spielt auch die CaMKII, die in insuffizienten Herzen verstärkt aktiv ist (Zhang et al. 2003).

### **1.6 Unterschiede zwischen Vorhof- und Kammermyokard**

Die Herzmuskelzellen von Vorhöfen und Kammern unterscheiden sich in ihrer Struktur und Funktion, u.a. der elektromechanischen Kopplung. Gegenüber den großen, quaderförmigen Zellen der Kammern sind die Vorhofzellen kleiner und schmaler. Das sarkoplasmatische Retikulum bildet in den Kammermyozyten ein regelmäßiges System aus längslaufenden L-Tubuli, das zusammen mit den querlaufenden Einstülpungen des Sarkolemm, den T-Tubuli, eine gleichmäßige

Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  in der gesamten Zelle gewährleistet (Cheng et al. 1993). Dieses System ist in den Vorhofzellen deutlich weniger stark ausgeprägt. Stattdessen besteht es hier aus einem subsarkolemmalen Teil, dem junctionalen SR, und einem zentral gelegenen Teil. Dieser liegt nicht in unmittelbarer Nähe zu den L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen der Zellmembran, so dass er vom einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$  nur durch Diffusion und  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem subsarkolemmalen SR erreicht werden kann (Kockskämper et al. 2001, Hatem et al. 1997, Carl et al. 1995). Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR ist somit inhomogener. In den Vorhofmyozyten ist die Membrankapazität mit 40-90 pF (Michailova et al. 2002) geringer als in den Kammermyozyten, wo sie 140-200 pF beträgt (Sato et al. 1996). Die Aktionspotentiale sind kürzer (Amos et al. 1996), sowohl Kontraktion als auch Relaxation laufen hier schneller ab (Maier et al. 2000).

### 1.7 Ziele, Fragestellungen

Ziele: Aufklärung der molekularen Mechanismen, die der arrhythmogenen Wirkung  $\beta$ -adrenerger Stimulation im humanen Vorhofmyokard zugrunde liegen. Dabei sollte die Hypothese geprüft werden, dass die arrhythmogene Wirkung durch eine Aktivierung der PKA und der CaMKII vermittelt wird und dass dabei die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch den RyR2 eine wichtige Rolle spielt.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob die sympathoadrenerge Stimulation an Vorhof- und Ventrikelgewebe von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz eine vergleichbare Wirkung hat wie am nicht-insuffizienten Vorhofgewebe.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Ist die arrhythmogene Wirkung von Isoprenalin abhängig von einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR über den RyR2?
- Kann die Hemmung von PKA oder CaMKII die arrhythmogene Wirkung von Isoprenalin hemmen?
- Hat die Hemmung von PKA oder CaMKII dabei Auswirkungen auf den positiv-inotropen Effekt?
- Wie wirkt Isoprenalin am insuffizienten Vorhof- und Kammermyokard hinsichtlich Inotropie und Arrhythmogenese?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Untersuchtes Gewebe

Für diese Arbeit wurden funktionelle Untersuchungen an isolierten humanen Myokardtrabekeln vorgenommen. Hierfür wurde einerseits Gewebe aus dem rechten Herzvorhof verwendet, welches von Patienten stammte, die im Rahmen einer Herzoperation an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen wurden, zum anderen Trabekel aus Vorhof und Kammer von explantierten, terminal insuffizienten Herzen (NYHA IV) aus Herztransplantations-Operationen. Die Operationen am nicht-insuffizienten Herzen, vorwiegend Bypass- und Herzklappenersatz-Operationen, wurden in der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Göttingen durchgeführt. Die explantierten, terminal insuffizienten Herzen wurden vom Herz- und Diabeteszentrum Bad Oeynhausen in Westfalen zur Verfügung gestellt. Alle Patienten hatten in die Entnahme und Verwendung des Gewebes zu wissenschaftlichen Zwecken eingewilligt. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Georg-August-Universität Göttingen geprüft und genehmigt (AZ 31/9/00 und 21/10/00).

Es konnten insgesamt 163 Trabekel von 59 Patienten ausgewertet werden. Dabei stammten 96 Trabekel von 44 nicht-herzinsuffizienten Patienten. Hiervon waren 37 Patienten männlich. Das Durchschnittsalter betrug  $68,2 \pm 1,7$  Jahre bei den Männern und  $72,7 \pm 3,9$  Jahre bei den Frauen; die im Ultraschall gemessene Ejektionsfraktion, soweit bekannt, war  $51,9 \pm 3,1$  % (Männer, n=26) bzw.  $50,0 \pm 4,7$  % (Frauen, n=6). Mit  $\beta$ -Blockern behandelt waren 85,7% (n=30) der Männer und 71,4% (n=5) der Frauen. Patienten mit bekannten Rhythmusstörungen des Vorhofes (z.B. Vorhofflimmern oder -flattern) wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Aus terminal insuffizienten Herzen konnten 67 Trabekel von 14 Patienten ausgewertet werden. Hiervon waren 12 Patienten männlich, das Durchschnittsalter lag insgesamt bei  $53,2 \pm 2,9$  Jahren, die Ejektionsfraktion bei  $26,0 \pm 2,5$  % (n=8).  $\beta$ -Blocker erhielten 86% (n=12) der Patienten.

Weitere Medikation:

Nicht-herzinsuffiziente Patienten	Diuretika	65,9 % n=29
ACE-Hemmer/		
AT1-Antagonisten 86,4 % n=38	Statine	77,3 % n=34
Ca-Antagonisten 22,7 % n=10	Glykoside	13,6 % n=6

Clopidogrel	25,0 % n=11	Statine	28,6 % n=4
ASS	61,4 % n=27		
Terminal herzinsuffiziente Patienten		Amiodaron	50,0 % n=7
ACE-Hemmer/		Glykoside	35,7 % n=5
AT1-Antagonisten	64,3 % n= 9	ASS	21,4 % n=3
Diuretika	92,9 % n=13		

## 2.2 Transport und Präparation

Das bei Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine entnommene Vorhofgewebe wurde vom Operateur unmittelbar nach der Entnahme in gekühlte Tyrodelösung gegeben, die zuvor mit einem Sauerstoff-Kohlendioxid-Gemisch (Carbogen, 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) begast worden sowie mit dem kardioplegischen 2,3-Butandion-Monoxim (BDM) versetzt war. BDM ist eine chemische Phosphatase, die die Querbrückeninteraktion zwischen Aktin und Myosin reversibel hemmt (Blanchard et al. 1990). Bei der Präparation des Gewebes kann es durch mechanischen Stress zu einem hohen Einstrom von Kalzium in die Muskelzellen kommen, hierbei verhindert BDM die Entstehung einer Kontraktur (Mulieri et al. 1989). Dieser Effekt ist nach Auswaschen des BDM vollständig reversibel (Fryer et al. 1988). Die BDM-Konzentration betrug 30 mM (entsprechend 3,0 g/l). Der Transport ins Labor dauerte nicht länger als 10 min. In dieser Lösung erfolgte auch die anschließende Präparation der Trabekel unter dem Stereoskop mit zehnfacher Vergrößerung mit mikrochirurgischen Scheren, wobei größte Sorgfalt darauf gelegt wurde, die Trabekel nicht zu dehnen oder zu verletzen. Es wurden vor allem Trabekel gesucht, die intakt und unverzweigt waren und einen Durchmesser von nicht mehr als 0,8 mm hatten. Der Weitertransport erfolgte wiederum in BDM-Tyrode-Lösung.

Die terminal insuffizienten, explantierten Herzen oder Teile davon wurden nach Entnahme in begaste und gekühlte Custodiol-Lösung gelegt. Es erfolgte die Entnahme von Muskelproben im Labor in Bad Oeynhausen und anschließend der Transport unter Eiskühlung nach Göttingen, Dauer ca. 2-3 Std, wo die Präparation wie oben beschrieben erfolgte.

## 2.3 Verwendete Materialien

Einwegbecher	Fa. Sarstedt AG, Urinbecher 100 ml
Schere	Verbandschere 145 mm spitz/stumpf
Pinzette	chirurgische Pinzette
Mikro-Schere	Fa. Storz Augeninstrumente, Typ 23140
Mikro-Pinzette	Fa. Storz Augeninstrumente, Typ 63150
Einwegpipette	Fa. Sarstedt AG, Transferpipette 5 ml
Stereomikroskop	Fa. Zeiss AG, 10x Vergrößerung

### Tyrode-Lösung

NaCl	127 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3 mM
KCl	2,3 mM	CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM	Glukose	11,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,6 mM	Altinsulin	5 I.E./l

## 2.4 Versuchsaufbau

### 2.4.1 Technische Geräte

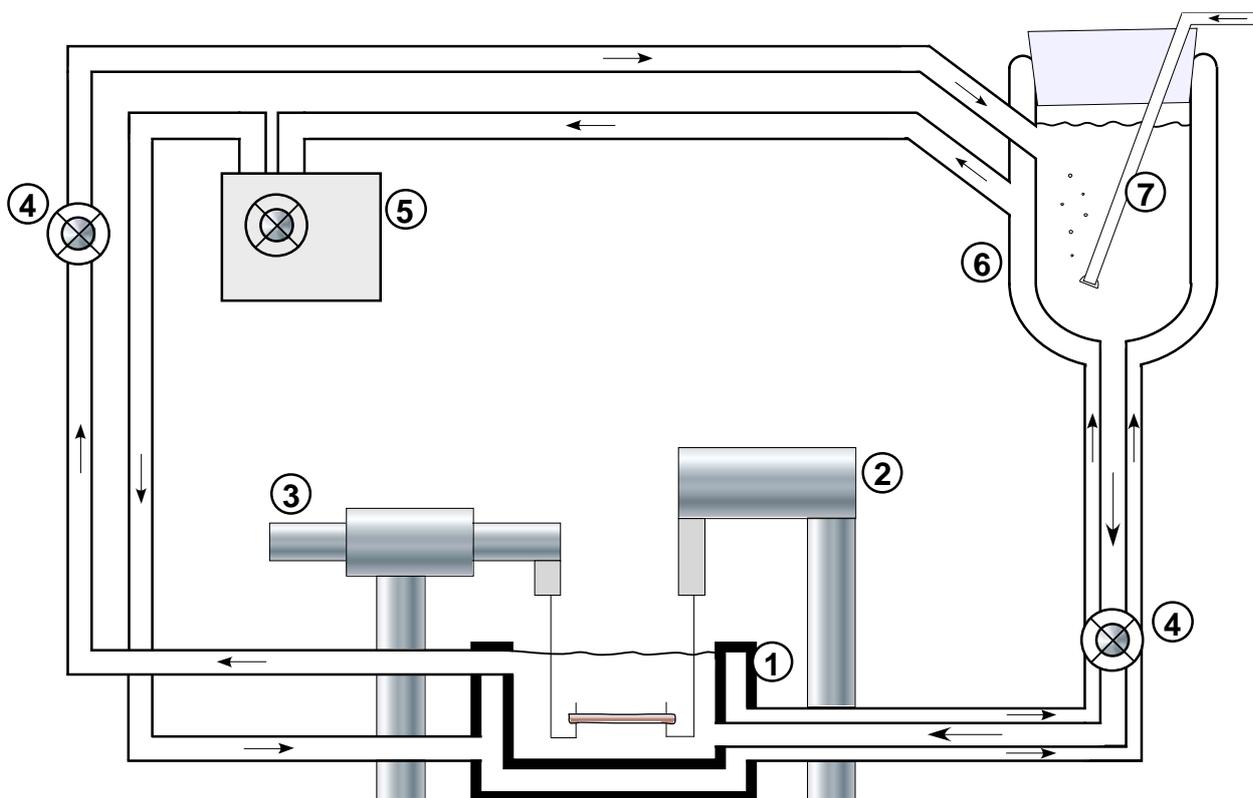
Kraftaufnehmer KG3	Scientific Instruments, Heidelberg
Verstärker OPT1L	Scientific Instruments, Heidelberg
Mikrometerschraube	Mituyo, Japan
Peristaltische Rollenpumpe ISM853	Ismatec, Zürich, Schweiz
Umwälzthermostat Haake K15	Haake, Karlsruhe
Thermometer Digi-Sense	Cole-Parmer, Vernon-Hills, USA
Stereomikroskop SD30	Olympus, Taiwan
Stimulationseinheit STM1	Scientific Instruments, Heidelberg
Labview Auswertungssoftware	National Instruments, Austin, USA
4-Kanal-Thermoschreiber Linearcorder WR 3320	Hugo Sachs, March-Hugstetten

### 2.4.2 Aufbau der Anlage

Der Versuchsstand ermöglichte es, funktionelle Untersuchungen parallel an vier Herzmuskelstreifen durchzuführen. Diese wurden dabei in einem Teflon-Organbad kontinuierlich mit Tyrodelösung umspült, welche im Gegenstromverfahren konstant auf 37°C erwärmt und im Vorratsbehälter mit Carbogen begast wurde; dies diente

nicht nur der Sauerstoffversorgung, sondern hielt auch den pH-Wert konstant bei 7,4. Die Abbildung zeigt den Aufbau schematisch für einen einzelnen der vier Versuchsstände. Um Flüssigkeitsverluste durch Verdampfung zu reduzieren, waren die Vorratsbehälter abgedeckt. Die Muskelstreifen wurden mit Platinnadeln im Bad spannungsfrei aufgehängt. Um dies zu realisieren, ließ sich der Abstand der Nadeln mit einer Mikrometerschraube bis zu einer Wegstrecke von 30  $\mu\text{m}$  variieren. Über die Platinnadeln erfolgte auch die elektrische Stimulation sowie die Messung der isometrischen Kontraktionskraft mit dem Kraftaufnehmer. Die Erfassung der Daten erfolgte einerseits über einen PC mit einem in Labview® (National Instruments, Austin, USA) geschriebenen Programm, andererseits über einen 4-Kanal-Thermoschreiber, der während des gesamten Versuchs mit einem Vorschub von 25 cm/Std oder 25 cm/ min die isometrischen Kontraktionen registrierte.

**Abb. 1 Schematische Darstellung des Versuchsstandes**



1. Organbad mit fixiertem Herzmuskelstreifen (Trabekel) 2. Kraftaufnehmer 3. Mikrometerschraube zur Veränderung des Abstandes der Platinnadeln 4. Rollenpumpe 5. Heizung (mit Pumpe) für die Heizflüssigkeit 6. doppelwandiger Vorratsbehälter mit Abdeckung und 7. Fritte zur Einleitung des Carbogens

## 2.5 Versuchsablauf

Zu Beginn der Messung wurde das System mit 100 ml Tyrodelösung befüllt. Die Trabekel wurden mit Hilfe einer Transferpipette unter Mitnahme einer geringen Menge BDM-Lösung in die Bäder transferiert und dort unter optischer Kontrolle bei 10-facher Vergrößerung des Stereomikroskops möglichst spannungsfrei aufgehängt. Die in diesem Zustand auf den Kraftaufnehmer noch wirkende Kraft wurde als diastolische Nullspannung definiert. Während des Einhängens musste die Zirkulation vorübergehend unterbrochen werden. Anschließend wurde das System mit 40 ml Tyrodelösung gespült, die dabei von den ursprünglich 100 ml Tyrodelösung verworfen wurden, um das BDM auszuwaschen. Dabei wurde bereits das Heizsystem eingeschaltet.

Die Kalzium-Konzentration der Tyrodelösung betrug initial nur 0,2 mM, um Kontraktionen während der Präparation, des Transportes und des Einhängens zu vermeiden. Sie wurde nun durch Zugabe von 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Stammlösung in Schritten von einmalig 0,3 mM, dann jeweils 0,5 mM, auf 2,5 mM erhöht, bevor mit der Stimulation begonnen wurde. Die Stimulation erfolgte mit einem Rechtecksignal von 5 ms bei einer Frequenz von 1 Hz. Die Spannung wurde langsam gesteigert, bis eine sichtbare Kontraktion erfolgte, und dann noch um 20-40% erhöht, bis die Kontraktionskraft nicht mehr zunahm. Die endgültige Stimulation erfolgte so bei 3-6 V und wurde für den Rest des Versuchsablaufes belassen. Nach der Stabilisierung der Kontraktionskraft begann die schrittweise Vordehnung, um über den Frank-Starling-Mechanismus eine maximale Kontraktionskraft zu erreichen. Die Stimulation wurde dann konstant über 30 min fortgeführt. Solche Trabekel, die in diesem Zeitraum spontane Kontraktionen entwickelten oder unter einer Kraftentwicklung von 4  $\text{mN/mm}^2$  blieben, wurden verworfen. An denjenigen Trabekeln, die während dieser Phase stabil blieben – also keine spontanen Kontraktionen zeigten und nur wenig an Kraft verloren – wurden die Versuchsprotokolle durchgeführt.

## 2.6 Versuchsprotokolle

### 2.6.1 Nicht-insuffizientes Vorhofmyokard

Es sollten die Wirkung von Isoprenalin, einem Agonisten  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren, und deren Modulation durch Substanzen untersucht werden, die die Proteinkinase A (PKA), die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK) oder den kardialen

Ryanodinrezeptor (RyR2) blockieren (s.u.). Hierzu wurde eine definierte Menge einer entsprechenden Stammlösung in das Vorratsbehältnis pipettiert. Es wurde 8-10 min gewartet, um der Substanz Zeit zu geben, sich nicht nur in der Tyrodelösung, sondern auch im Gewebe zu verteilen. Anschließend wurde  $10^{-7}$  M Isoprenalin zur Tyrodelösung zugegeben (durch Zugabe einer entsprechenden Menge einer  $10^{-3}$  M Stammlösung). Die Kontraktionskraft der Trabekel wurde vor Zugabe der Blocker-Substanz und vor Zugabe des Isoprenalins gemessen, zeitgleich auch an den parallel dazu untersuchten Kontrolltrabekeln, an denen nur die Isoprenalin-Wirkung gemessen wurde. Nach Zugabe des Isoprenalins wurde erneut die Kraftentwicklung der Trabekel erfasst sowie die spontanen Extraktionen ausgezählt. Hierfür wurde der Vorschub des Schreibers von 25 cm/Std auf 25 cm/min erhöht. Als spontane Extraktion wurde dabei jede messbare, nicht durch die elektrische Stimulation ausgelöste Kontraktion definiert. Nach weiteren 30 min wurde erneut die verbleibende Kraft gemessen, dann wurden 3 ml einer Koffeinelösung von 20 mM zugegeben, sodass die Koffein-Konzentration im Bad 1 mM war. Es wurden erneut die Kraftentwicklung und die spontanen Extraktionen nach weiteren 30 min erfasst. Anschließend wurden die Muskelstreifen für weitere biochemische und molekularbiologische Untersuchungen (die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.6.2 Insuffizientes Vorhof- und Ventrikelmyokard**

An den Trabekeln aus den terminal-insuffizienten, explantierten Herzen wurde die konzentrationsabhängige Wirkung des Isoprenalins auf die Kraftentwicklung und die Entstehung spontaner Extraktionen untersucht. Dabei wurden die folgenden Badkonzentrationen untersucht:  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M Isoprenalin. Isoprenalin wurde aus einer Stammlösung (s.u.) zugegeben, nachdem die Trabekel für 30 min mit konstanter Kraftentwicklung und ohne spontane Extraktionen geschlagen hatten. Kraftentwicklung und spontane Extraktionen wurden unmittelbar vor Isoprenalin-Gabe und während des maximalen Effekts von Isoprenalin gemessen. Nach 30 min in Gegenwart von Isoprenalin wurde Koffein (1 mM) zugegeben und erneut die Kraftentwicklung und die spontanen Extraktionen bestimmt. Schließlich wurden die Trabekel für weitere biochemische und molekularbiologische Untersuchungen (die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren) eingefroren.

## 2.7 Verwendete Pharmaka

Die folgenden Pharmaka wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt:

### **H-89** (Calbiochem 371963)

H-89 ist ein selektiver Hemmstoff der Proteinkinase A mit einem Molekulargewicht von 519,2 Da. Es wurde in 1 mg-Einheiten bezogen. Diese wurden in jeweils 193  $\mu$ l DMSO gelöst, so dass die Stammlösung eine Konzentration von  $10^{-2}$  M hatte. Sie wurde auf 60  $\mu$ l aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Versuch entstand durch Zugabe eines Aliquots zu 60 ml Tyrodelösung eine Konzentration von 10  $\mu$ M.

### **KN-93** (Calbiochem 422711)

KN-93 ist ein Hemmstoff der CaM-Kinase II mit einem Molekulargewicht von 599,0 Da. Es wurden Einheiten von 1 mg bezogen. Hieraus wurden, da er lichtempfindlich ist, im abgedunkelten Raum Stammlösungen von 3 mM und 10 mM in Aqua dest. hergestellt. Diese wurden auf 60  $\mu$ l aliquotiert und lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Konzentration im Versuch betrug 3 bzw. 10  $\mu$ M nach Zugabe eines Aliquots zu 60 ml Tyrodelösung.

### **KN-92** (Calbiochem 422709)

KN-92 ist ein Analogon von KN93 ohne Wirkung auf die CaMK. Es wurde folglich als Negativkontrolle eingesetzt, um unspezifische Wirkungen von KN-93 auszuschließen. Das Molekulargewicht beträgt 555,0 Da. Es wurde in 1 mg-Einheiten bezogen. In einem abgedunkelten Raum wurde eine Stammlösung von 10 mM in DMSO angesetzt, auf 60  $\mu$ l aliquotiert und lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Konzentration im Versuch betrug 10  $\mu$ M nach Zugabe eines Aliquots zu 60 ml Tyrodelösung.

### **Ryanodin** (Calbiochem 559276, Ryanodine High Purity)

Ryanodin bindet an den Ryanodinrezeptor (RyR), das ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal des SR, und hemmt seine Funktion. Es hat ein Molekulargewicht von 493,6 Da und ist lichtempfindlich. Das hochreine Ryanodin wurde in 500  $\mu$ g-Einheiten bezogen. Im abgedunkelten Raum wurde eine Stammlösung von 10 mM in Aqua dest. hergestellt, auf 60  $\mu$ l aliquotiert und lichtgeschützt bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Stammlösung wurde

innerhalb eines Monats nach Ansetzen verbraucht. Die Konzentration im Versuch betrug 1  $\mu\text{M}$  nach Zugabe eines Aliquots zu 60 ml Tyrodelösung.

### **Isoprenalin** (Sigma I-5627)

Isoprenalin ist ein Agonist der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren. Das Molekulargewicht beträgt 247,72 Da. Die Isoprenalin-Stammlösung wurde an jedem Versuchstag frisch hergestellt, da das Isoprenalin in Lösung nicht stabil ist. Als Oxidationsschutz wurde Ascorbinsäure zugegeben (s.u.). Für die Stammlösung mit 1 mM wurden 10 mg Isoprenalin in 400  $\mu\text{l}$  Aqua dest gelöst, davon wiederum 10  $\mu\text{l}$  zusammen mit 10  $\mu\text{l}$  Ascorbinsäurelösung 20 mM in 980  $\mu\text{l}$  Aqua dest gegeben. Bis zur Verwendung wurde die Lösung lichtgeschützt aufbewahrt. Für die Badkonzentration im Versuch wurden verschiedene Mengen der Stammlösung in die Tyrodelösung pipettiert. Für die Versuche mit Trabekeln aus nicht-insuffizienten Herzen wurde eine Konzentration von  $10^{-7}$  M verwendet. Für die Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei den Versuchen mit Trabekeln aus insuffizienten Herzen wurden folgende Konzentrationen verwendet:  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M.

### **Ascorbinsäure** (Sigma A-0278)

Ascorbinsäure diente als Antioxidans. Um eine 20 mM Ascorbinsäurelösung herzustellen, wurden 35 mg Ascorbinsäure in 10 ml Aqua dest. gelöst.

### **Koffein** (Merck 205548)

Die Koffeinlösung wurde an jedem Versuchstag frisch angesetzt. Es wurden 194 mg in 50 ml Aqua dest. gelöst, um eine Konzentration von 20 mM zu erreichen. Hiervon wurden im Versuch 3 ml in 60 ml Tyrodelösung pipettiert, so dass die Badkonzentration 1 mM betrug.

## **2.8 Statistische Auswertung und Darstellung**

Bei der Darstellung der Ergebnisse ist n stets die Anzahl der Trabekel. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Um zu überprüfen, ob es Unterschiede zwischen Gruppen gibt, wurde ein Student-t-Test (beim Vergleich zweier Gruppen) oder eine Varianzanalyse (beim Vergleich mehrerer Gruppen) durchgeführt. Beim Vergleich von Häufigkeiten wurde ein Chi-Quadrat-Test oder ein exakter Test nach Fisher verwendet, um auf Unterschiede zu

testen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde ein Unterschied als statistisch signifikant definiert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Isoprenalin-induzierte Extraktionen und positive Inotropie in nicht-insuffizientem Vorhofmyokard

#### 3.1.1 Isoprenalin induziert spontane Extraktionen (SEK) in nicht-insuffizientem Vorhofmyokard

Um zu untersuchen, ob der  $\beta$ -adrenerge Agonist Isoprenalin spontane Kontraktionen in nicht-insuffizientem Vorhofmyokard verursacht, wurde seine Wirkung auf regelmäßig kontrahierende humane Vorhofmyokardtrabekel untersucht. Die Zugabe von Isoprenalin in einer Badkonzentration von  $10^{-7}$  M führte regelhaft zu einer Zunahme der Kontraktionskraft, im Mittel um  $63 \pm 10\%$  ( $n=38$ ). In 67% der Fälle kam es dabei nach dem ersten Kraftanstieg zum Auftreten von spontanen Extraktionen (SEK).

Kontrolltrabekel, die während der gesamten Versuchsdauer stimuliert wurden, ohne dass Pharmaka zugegeben wurden, zeigten eine langsame, kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft („Rundown“) von  $5 \pm 1\%$  in 10 Minuten ( $n=38$ ) ohne das Auftreten von SEK.

**Abb. 2** zeigt die Originalregistrierung eines mit Isoprenalin behandelten Trabekels. Zu sehen sind isometrische Kontraktionskraftamplituden als Funktion der Zeit. Zu Beginn kontrahiert der Trabekel mit gleichmäßiger Kraft bei einer Stimulation von 1 Hz. Deutlich zu sehen ist der Kraftanstieg um 56% nach der Zugabe des Isoprenalins. Im Schnellvorlauf ist zu erkennen, dass die Kontraktionen gleichmäßig sind, es gibt keine spontane Aktivität.

**Abb. 3** dagegen zeigt einen Trabekel, der vor der Gabe des Isoprenalins ebenso gleichmäßig kontrahiert und zu diesem Zeitpunkt auch im Schnellvorauf erkennbar keine spontanen Kontraktionen zeigt. Nach der Isoprenaliningabe kommt es jedoch, nach einem initialen Kraftanstieg um 59%, zum Auftreten schnell aufeinander folgender, spontaner Kontraktionen, die zunächst ein regelmäßiges Bild zeigen, dann jedoch in unregelmäßigere, schwächere Kontraktionen übergehen.

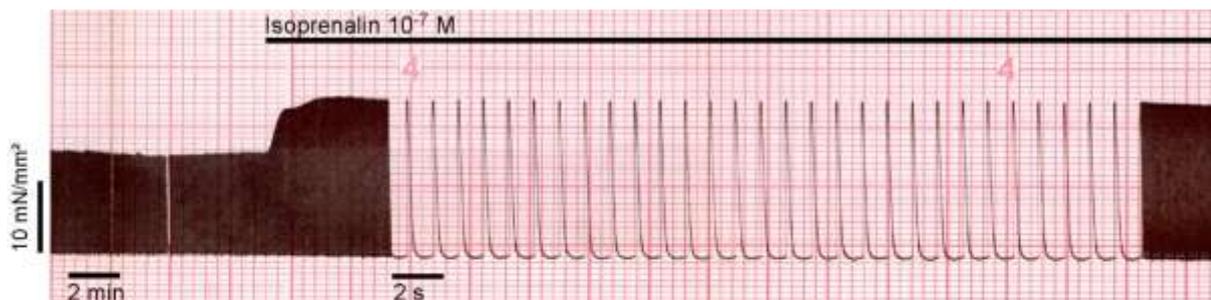


Abb. 2 Kraftanstieg nach der Gabe von Isoprenalin in einem nicht-insuffizienten Vorhoftrabekel.

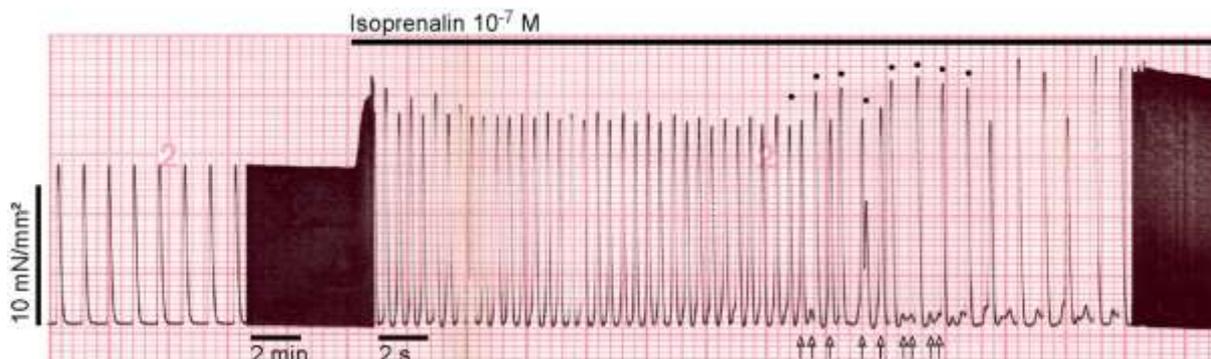


Abb. 3 Kraftanstieg und Auftreten von Extrakontraktionen nach der Gabe von Isoprenalin in einem nicht-insuffizienten Vorhoftrabekel. Punkte: Durch externe Stimulation ausgelöste Kontraktionen. Pfeile: Spontane Kontraktionen.

### 3.1.2 Die Behandlung mit $\beta$ -Blockern verstärkt das Auftreten von spontanen Extrakontraktionen nach Isoprenalin-Gabe

Die Behandlung eines Patienten mit  $\beta$ -Blockern führt zu einem besseren Ansprechen der Herzmuskelzellen auf Katecholamine. Ein Mechanismus hierfür ist das sogenannte Remodeling bzw. reverse Remodeling, also eine verstärkte Expression von  $\beta$ -Rezeptoren gegenüber unbehandelten Patienten, bei denen die Zahl der  $\beta$ -Rezeptoren meist aufgrund chronisch erhöhter Katecholaminspiegel vermindert ist (Brodde et al. 1992, Brodde et al. 1998). Da in dieser Arbeit die Wirkung des Isoprenalins bzw. die Modulation derselben durch pharmakologische Substanzen untersucht werden sollte, war die Empfindlichkeit des Gewebes für Isoprenalin von großer Bedeutung. Daher wurden die Trabekel, die ausschließlich mit Isoprenalin behandelt worden waren, aufgeteilt in zwei Gruppen, je nachdem, ob die Patienten  $\beta$ -Blocker erhalten hatten oder nicht. In der Gruppe der mit  $\beta$ -Blockern behandelten Patienten befanden sich 32 Trabekel von 31 Patienten, in der unbehandelten Gruppe 7 Trabekel von 6 Patienten.

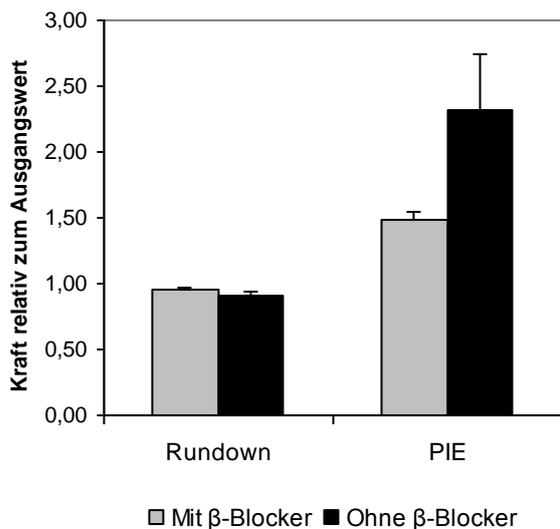


Abb. 4 Kraftentwicklung vor und nach Isoprenalingabe in Trabekeln von Patienten mit und ohne  $\beta$ -Blocker

Abb. 4 zeigt den Rundown sowie die Kraftzunahme (positiv-inotroper Effekt, PIE) nach Isoprenalin-Gabe im Vergleich der beiden Gruppen. Es bestand kein Unterschied im Rundown zwischen den beiden Gruppen ( $p=0,06$ ;

Student-t-Test). Unter gleichmäßiger elektrischer Stimulation ohne pharmakologische Behandlung verhielten sich also die Trabekeln von Patienten mit und ohne  $\beta$ -Blocker ähnlich. Der positiv inotrope Effekt (PIE) von Isoprenalin betrug  $48\pm 6\%$  in der Gruppe ohne  $\beta$ -Blocker und  $131\pm 43\%$  in der Gruppe mit  $\beta$ -Blocker. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $p=0,11$ ; Student-t-Test).

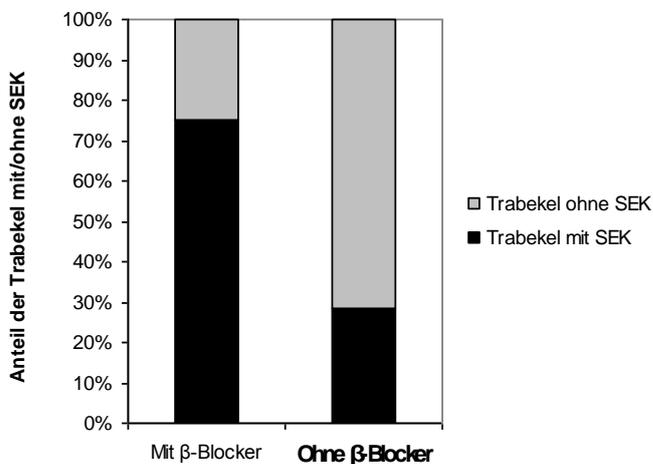


Abb. 5 Anteil der Trabekel, die nach Isoprenalingabe SEK entwickelten.

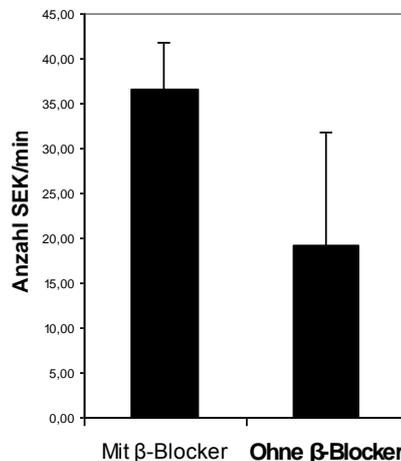


Abb. 6 Isoprenalin-induzierte SEK

Abb. 5 und 6 zeigen das Auftreten von Isoprenalin-induzierten SEK in den Gruppen mit und ohne  $\beta$ -Blocker. In Abb. 5 ist der Anteil an Trabekeln mit und ohne SEK innerhalb der jeweiligen Gruppen zu sehen. In der Gruppe, die nicht mit  $\beta$ -Blockern behandelt war, zeigten nur 29% (2 von 7) der Trabekeln spontane Kontraktionen; in der mit  $\beta$ -Blockern behandelten Gruppe waren es dagegen 75% (24 von 32) ( $p<0,05$ ;

exakter Test nach Fisher). Ebenso gab es einen Unterschied bei Betrachtung der Anzahl von spontanen Extraktionen pro Minute, zu sehen in Abb. 6. Unter  $\beta$ -Blockern traten  $36,5 \pm 5,2$  spontane Extraktionen pro Minute auf, ohne  $\beta$ -Blocker waren es dagegen nur  $19,1 \pm 12,6$  SEK pro Minute. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ( $p=0,24$ ; Student-t-Test).

Da es einen Trend gab, dass die Vorbehandlung mit  $\beta$ -Blockern sich auf die Empfindlichkeit der Trabekel für Isoprenalin auswirkt und es im Falle des Anteils der Trabekel, die SEK entwickelten, einen signifikanten Unterschied gab, könnte eine ungleiche Verteilung von Trabekeln mit und ohne  $\beta$ -Blocker auf die verschiedenen Versuchsgruppen (s.u.) das Ergebnis verzerren. Darum wurde geprüft, inwieweit diese Verteilung in den verschiedenen Gruppen voneinander abwich.

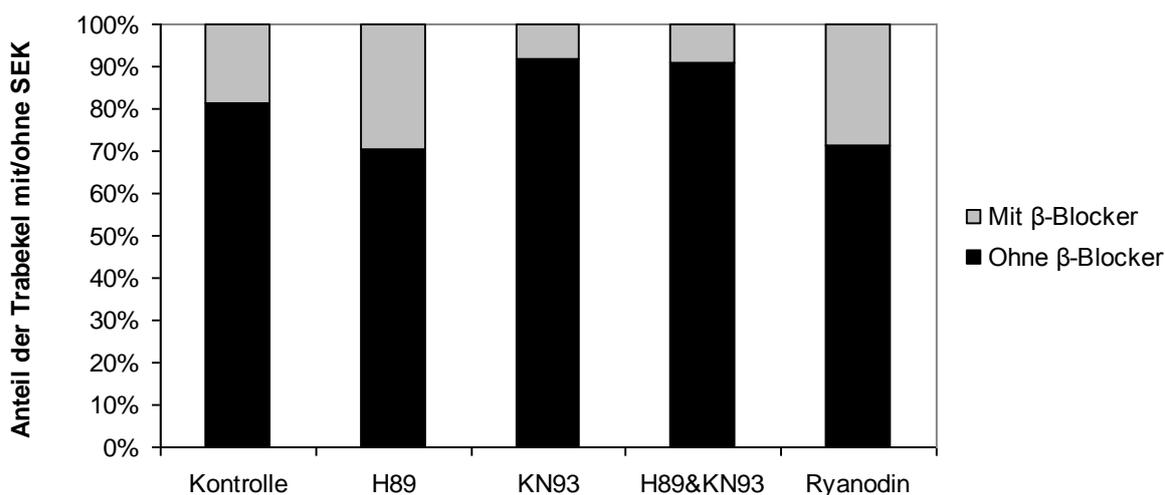


Abb. 7 Anteil der Trabekel von mit  $\beta$ -Blockern behandelten Patienten in den Substanzgruppen

**Abb. 7** zeigt den Anteil an Trabekeln in den jeweiligen Versuchsgruppen, die von Patienten stammten, die  $\beta$ -Blocker eingenommen hatten. Dieser Anteil lag zwischen 71% und 92%. Er war nicht statistisch signifikant unterschiedlich ( $p=0,51$ ; Chi-Quadrat-Test). Bei dieser Verteilung ist daher nicht von einer Verzerrung des Versuchsergebnisses durch einen unterschiedlichen Anteil an Trabekeln von Patienten mit und ohne  $\beta$ -Blocker auszugehen, so dass die Gruppen im Weiteren als gleichwertig betrachtet werden konnten.

Im Folgenden wurden mögliche Mechanismen untersucht, die den Isoprenalin-induzierten SEK in den Vorhoftrabekeln zugrunde liegen könnten. Dazu wurden Hemmstoffe der Proteinkinase A, der CaMKII und des RyR eingesetzt.

### 3.1.3 Hemmung der Proteinkinase A (PKA) mittels H89 verringert das Auftreten Isoprenalin-induzierter Extrakontraktionen

Die Zugabe von H89 ( $10^{-5}$  M), einem Hemmstoff der Proteinkinase A, führte zu einem negativ-inotropen Effekt. In Gegenwart von H89 kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um  $25 \pm 4\%$  ( $n=17$ ). In unbehandelten Trabekeln betrug der Rundown dagegen nur  $5 \pm 1\%$  ( $n=38$ ). Die positiv-inotrope Wirkung des Isoprenalins war nicht beeinträchtigt (siehe hierzu Abb. 13 und 14 unter 3.1.7.).

Unter H89 kam es in nur 29% der Trabekel zum Auftreten von SEK gegenüber 67% der Trabekel, die nur mit Isoprenalin behandelt wurden ( $p < 0,05$ ; exakter Test nach Fisher). Dies entspricht einer relativen Abnahme um 57%. Im Mittel betrug die Anzahl der Isoprenalin-induzierten SEK unter H89  $13,8 \pm 6,1$  pro Minute gegenüber  $33,4 \pm 4,9$  pro Minute in den nur mit Isoprenalin behandelten Trabekeln. Dies entspricht einer relativen Abnahme von 59%; der Unterschied war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ; Varianzanalyse; siehe hierzu Abb. 15 und 16 unter 3.1.7.).

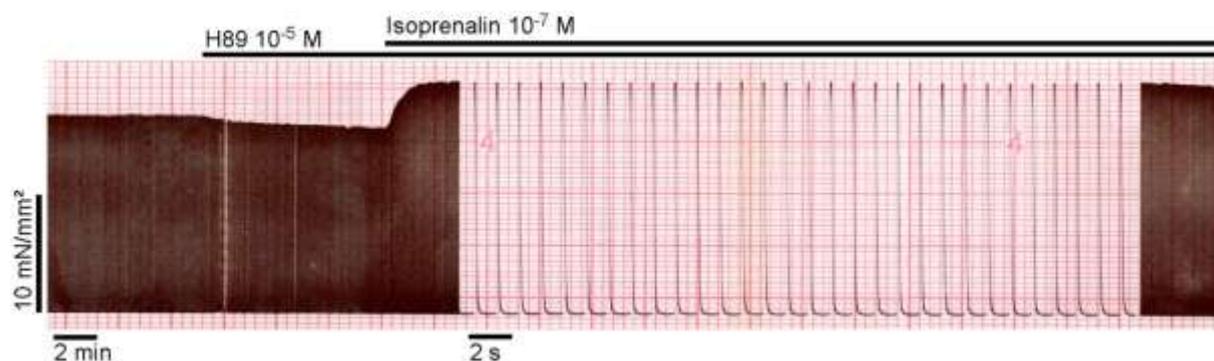


Abb. 8 Verminderung der basalen Kraft durch H89 und positiv inotrope Wirkung des Isoprenalins in einem nicht-insuffizienten Vorhoftrabekel.

**Abb. 8** zeigt eine Originalregistrierung eines Versuches mit H89. Zu sehen ist die stabile basale Kraftentwicklung zu Beginn, der Kraftabfall nach Zugabe des H89 und der positiv inotrope Effekt des Isoprenalins. Der schnellere Vorlauf zeigt, dass nach Zugabe des Isoprenalins keine SEK auftraten.

### 3.1.4 Hemmung der CamKinase II mittels KN93 verringert das Auftreten Isoprenalin-induzierter Extrakontraktionen

Nach der Zugabe von KN93, einem Hemmstoff der CaMKII, kam es nicht zu einem verstärkten Kraftabfall (s. Abb. 13 in 3.1.7). Das KN93 hatte somit keine Auswirkung auf die basale Kontraktionskraft der Myokardtrabekel. Auch die Kraftzunahme nach der Isoprenalin-Gabe war nicht verändert gegenüber den nur mit Isoprenalin behandelten Trabekeln (s. Abb. 14 in 3.1.7).

Unter KN93 traten in 33% der Trabekel SEK nach Gabe von Isoprenalin auf. Gegenüber der Kontrollgruppe mit 67% entspricht dies einer relativen Reduktion um 51% (s. Abb. 15). Diese Reduktion war statistisch signifikant ( $p=0,05$ ; exakter Test nach Fisher). Die Anzahl der spontanen Extrakontraktionen wurde reduziert von  $33,4 \pm 4,9$  pro Minute auf  $14,5 \pm 7,1$  pro Minute (s. Abb. 16). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $p=0,12$ ; Varianzanalyse; Abb. 16).

**Abb. 9** zeigt eine Originalregistrierung eines Versuches mit KN93. Die basale Kraftentwicklung wurde durch das KN93 nicht beeinflusst. Nach der Gabe des Isoprenalins kam es zu einem raschen Anstieg der Kontraktionskraft um 46%. Es kam nicht zum Auftreten von SEK, die Trabekel kontrahierten gleichmäßig und ausschließlich durch externe Stimulation.

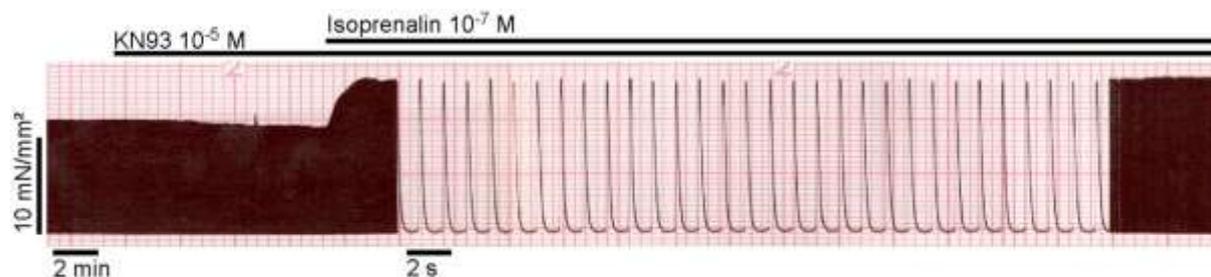


Abb. 9 *KN93 bleibt ohne Wirkung auf die basale Kraft; die positiv inotrope Wirkung des Isoprenalins ist nicht beeinträchtigt.*

#### 3.1.4.1 KN92 zeigt keine Wirkung

Parallel zu den Versuchen mit KN93 wurden auch 10 Versuche mit KN92 durchgeführt. KN92 ist ein Analogon des KN93, es hemmt die CaMKII jedoch nicht. Es diente als Negativkontrolle, um unspezifische Wirkungen des KN93 auszuschließen. KN92 hatte keinerlei Auswirkung auf den positiv inotropen Effekt des Isoprenalins ( $89 \pm 19\%$ ,  $n=10$ ) und auch nicht auf die Häufigkeit des Auftretens (50%) oder die Anzahl der spontanen Extrakontraktionen ( $23,8 \pm 8,7$  pro Minute,

n=10) im Vergleich zu Trabekeln, die nur mit Isoprenalin behandelt wurden (alle p=N.S.).

### 3.1.5 H89 und KN93 reduzieren das Auftreten Isoprenalin-induzierter Extrakontraktionen

Da sowohl H89 als auch KN93 die Isoprenalin-induzierten Extrakontraktionen teilweise reduzieren konnten, wurde überprüft, ob die gemeinsame Gabe des PKA- und des CaMKII-Hemmstoffes einen additiven Effekt hat. Die kombinierte Gabe von H89 und KN93 führte zu einer Abnahme der basalen Kraft um  $35\pm 4\%$  (Abb. 10, 13). Der positiv inotrope Effekt des Isoprenalins war nicht beeinträchtigt (Abb. 14). Es zeigten 36% der Trabekel Isoprenalin-induzierte SEK gegenüber 67% in der Isoprenalingruppe. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $p=0,09$ ; exakter Test nach Fisher). Die Anzahl der SEK betrug  $11,0\pm 5,9$  pro Minute in der Gruppe mit H89 und KN93 gegenüber  $33,4\pm 4,9$  pro Minute in der Gruppe, die nur mit Isoprenalin behandelt wurde (Abb. 15, 16). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p=0,05$ ; Varianzanalyse).

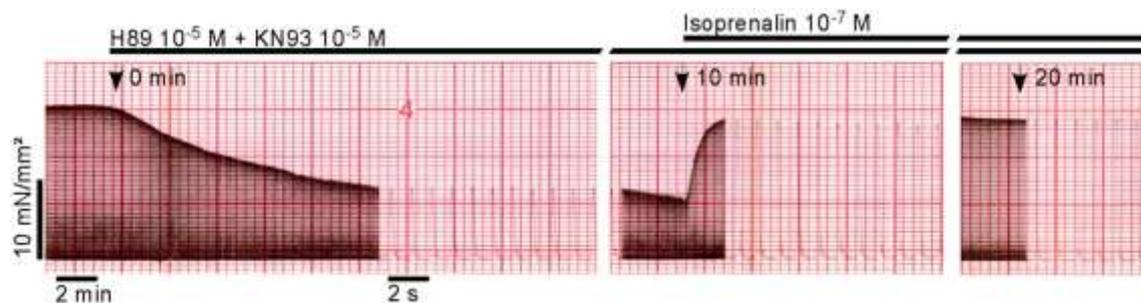


Abb. 10 *Negativ inotroper Effekt von H89 und KN93, anschließend positiv inotroper Effekt von Isoprenalin in einem nicht-insuffizienten Vorhoftrabekel. Es treten keine SEK auf.*

**Abb. 10** zeigt eine Originalregistrierung eines Versuches mit H89 und KN93. Bei einer stabilen basalen Kraft kam es nach der kombinierten Gabe der Pharmaka zu einem Kraftabfall um 57%. Das Isoprenalin hatte einen positiv-inotropen Effekt von 112%, der auch 10 min später stabil war. Weder direkt nach Gabe des Isoprenalins noch im späteren Verlauf kam es dabei zum Auftreten spontaner Extrakontraktionen.

### 3.1.6 Ryanodin unterdrückt die Entstehung spontaner Kontraktionen und vermindert die Kontraktionskraft

Ryanodin ist ein Hemmstoff des RyR und damit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Die Zugabe von Ryanodin bei einem stabil kontrahierenden Trabekel führte zu einer raschen Abnahme der basalen Kraft um  $79\pm 4\%$  (Abb. 13). Der positiv inotrope Effekt des Isoprenalins war zwar mit  $366\pm 103\%$  vergleichsweise stark, konnte den vorherigen Kraftverlust aber nicht kompensieren. Unter Ryanodin wurde durch Isoprenalin keine einzige spontane Extrakontraktion ausgelöst, die spontane Aktivität wurde also vollständig unterdrückt.

**Abb. 11** zeigt eine Originalregistrierung eines Versuches mit Ryanodin. Der rasche Kraftabfall nach Zugabe des Ryanodins ist deutlich zu sehen. Der relative Kraftanstieg um 81% nach Zugabe von Isoprenalin war stabil. Es kam zu einer verzögerten Entspannung des Trabekels, zu sehen am langsameren Abfall der Kraft während des schnellen Vorschubs. Spontane Extrakontraktionen traten im gesamten Versuchsverlauf nicht auf.

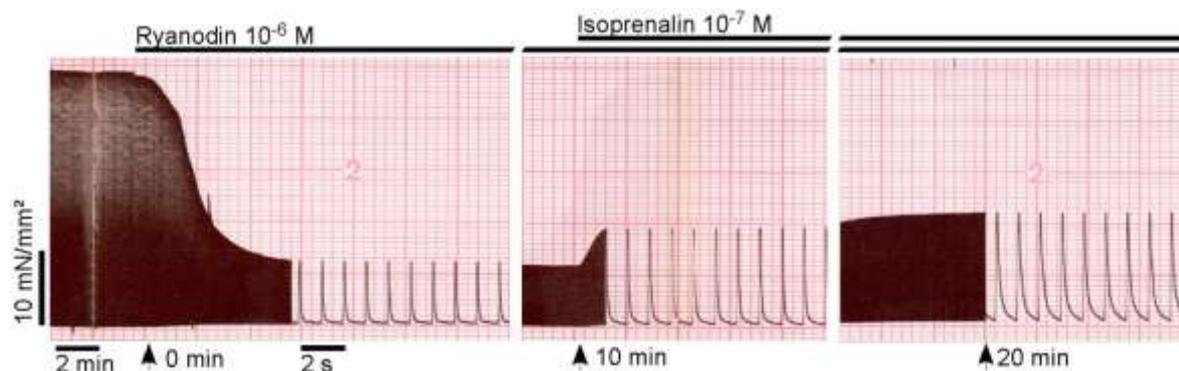


Abb. 11 Effekt des Ryanodins auf die basale Kraft und positiv-inotroper Effekt des Isoprenalins in einem nicht-insuffizienten Vorhoftrabekel.

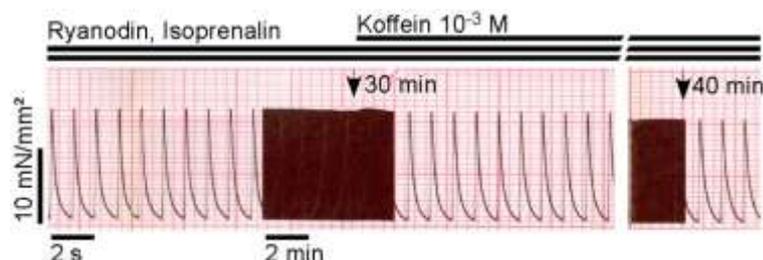


Abb. 12 Zugabe von Koffein nach 30 min zeigt kaum Effekt, nach 40 min weiterhin stabiler Verlauf

**Abb. 12** zeigt: Auch die Zugabe von Koffein ( $10^{-3}$  M), einem Stimulator des RyR2, konnte unter diesen Bedingungen keine spontanen Extrakontraktionen auslösen.

### 3.1.7 Übersicht über die Wirkungen der einzelnen Pharmaka

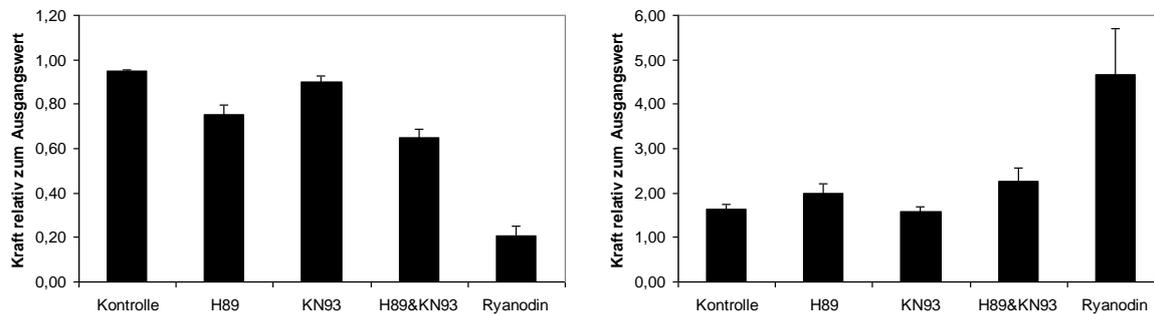


Abb. 13 Effekt der Substanzen auf die basale Kraft, Abb. 14 Positiv-inotroper Effekt von Isoprenalin. Die Überprüfung erfolgte mit einer Varianzanalyse, gefolgt von einem Test nach Dunnett mit den nur mit Isoprenalin behandelten Trabekeln als Kontrollgruppe (=Kontrolle).

**Abb. 13** stellt dar, inwieweit sich die pharmakologischen Substanzen auf die basale Kraft auswirkten. Die initiale Kraftentwicklung vor der Gabe eines Pharmakons wurde als Ausgangswert (=1) angenommen. Dargestellt ist der relative Wert der isometrischen Kontraktionskraft zehn Minuten nach Zugabe des entsprechenden Pharmakons. Ohne pharmakologische Einwirkung gab es eine leichte Abnahme der Kraft von  $5 \pm 1\%$  ( $n=38$ ) KN93 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale Kraft (Abnahme um  $10 \pm 3\%$ ,  $n=12$ ,  $p=0,82$ ) während H89 zu einer Verminderung auf  $75 \pm 4\%$  ( $n=17$ ,  $p<0,01$ ) führte. Wurden beide Substanzen gleichzeitig gegeben, war dieser Effekt mit einer Verminderung auf  $65 \pm 4\%$  ( $n=11$ ,  $p<0,01$ ) noch stärker ausgeprägt. Ryanodin reduzierte die Kraft auf  $21 \pm 4\%$  ( $n=7$ ,  $p<0,01$ ) des Ausgangswertes.

**Abb. 14** zeigt die Zunahme der isometrischen Kontraktionskraft nach Zugabe des Isoprenalins. Ausgangswert (=1) ist hier die Kraftentwicklung unmittelbar vor der Isoprenalingabe, dargestellt ist die maximale Kraftentwicklung nach Isoprenalin im Vergleich zum Ausgangswert. Isoprenalin vergrößerte in allen Gruppen die Kraftentwicklung. In den mit Kinase-Hemmstoffen behandelten Trabekeln war dieser positiv-inotrope Effekt etwa genauso groß wie in den Trabekeln, die nur mit Isoprenalin behandelt wurden (alle  $p=N.S.$ ). Der Effekt in der Ryanodin-Gruppe war besonders groß ( $p<0,01$  vs Isoprenalin allein). Nachdem die basale Kraft durch das Ryanodin jedoch stark reduziert worden war (vgl. Abb. 13), wurde die ursprüngliche Kraft trotz des großen positiv-inotropen Effekts nicht wieder erreicht.

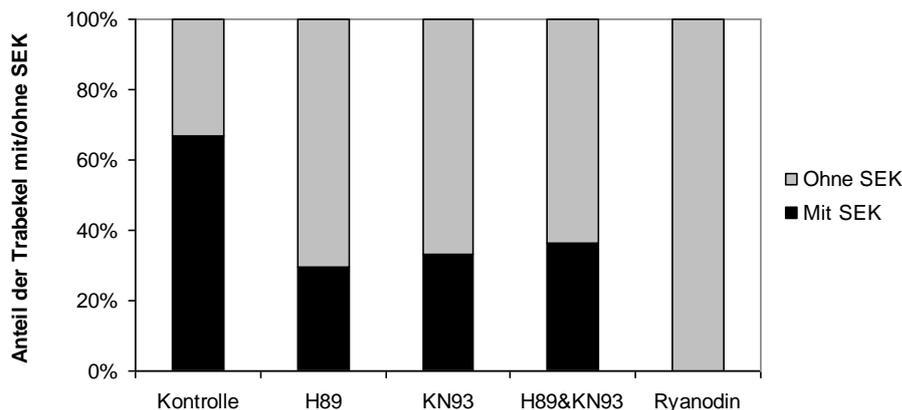


Abb. 15 Anteil der Trabekel in den Substanzgruppen, die Isoprenalin-induzierte SEK entwickelten

**Abb. 15** zeigt den Anteil an Trabekeln mit spontanen Extraktionen für die einzelnen Gruppen. Die Substanzen H89 und KN93 reduzierten die Anzahl der spontan kontrahierenden Trabekel in ähnlichem Maße (in beiden Fällen  $p \leq 0,05$ ). Auch die Kombination beider Substanzen führte zu einer ähnlichen Reduktion des Anteils an Trabekeln mit SEK, jedoch war diese nicht mehr statistisch signifikant ( $p=0,09$ ). Ryanodin hatte den stärksten Effekt. Es unterdrückte die SEK vollkommen ( $p < 0,01$ ).

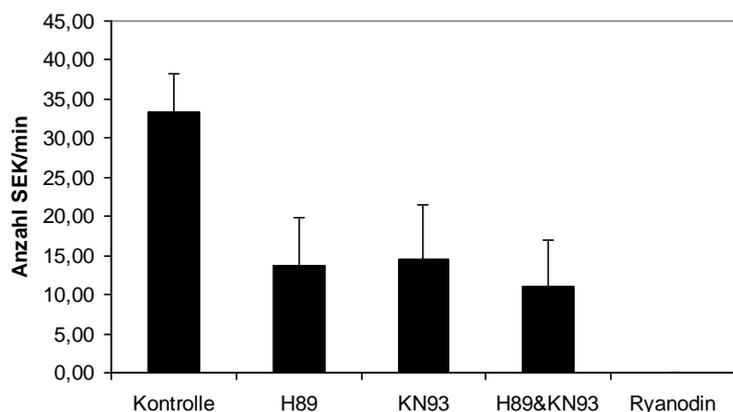


Abb. 16 Anzahl der Isoprenalin-induzierten SEK in den verschiedenen Substanzgruppen

**Abb. 16** zeigt die Anzahl an SEK/min. Isoprenalin allein induzierte  $33,4 \pm 4,9$  SEK pro Minute. In Gegenwart von H89, KN93 und der Kombination der beiden Kinase-Hemmstoffe waren die SEK vermindert auf 10-15 pro Minute. Dieser Effekt war für H89 und für H89 und KN93 signifikant (jeweils  $p \leq 0,05$ ), für KN93 allein nicht ( $p=0,12$ ). Ryanodin unterdrückte die SEK vollständig ( $p=0,01$ ).

### 3.1.8 Koffein erhöht die Wahrscheinlichkeit für spontane Extraktionen

Eine halbe Stunde nach dem Isoprenalin wurde Koffein zugegeben. Koffein sensitiviert den RyR2 für die Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  und erhöht so die Offenwahrscheinlichkeit des RyR2. Von den Trabekeln, die nur mit Isoprenalin behandelt waren und hierunter keine SEK gezeigt hatten, traten bei 78% unter Koffein SEK auf. In denjenigen Trabekeln, die bereits unter Isoprenalin SEK gezeigt hatten, stieg die Anzahl an SEK von  $50,1 \pm 4,5$  pro Minute auf  $64,0 \pm 4,4$  pro Minute ( $p < 0,05$ ; Student-t-Test).

**Abb. 17** zeigt eine Originalregistrierung eines zunächst nur mit Isoprenalin, nach 30 min dann zusätzlich mit Koffein behandelten Trabekels. Unter Isoprenalin kam es zu einem Anstieg der isometrischen Kraft; es treten jedoch keine SEK auf. Das Koffein führte in kurzer Zeit zum Auftreten von Extraktionen, ähnlich wie dies Isoprenalin in anderen Trabekeln tat (vgl. Abb. 3).

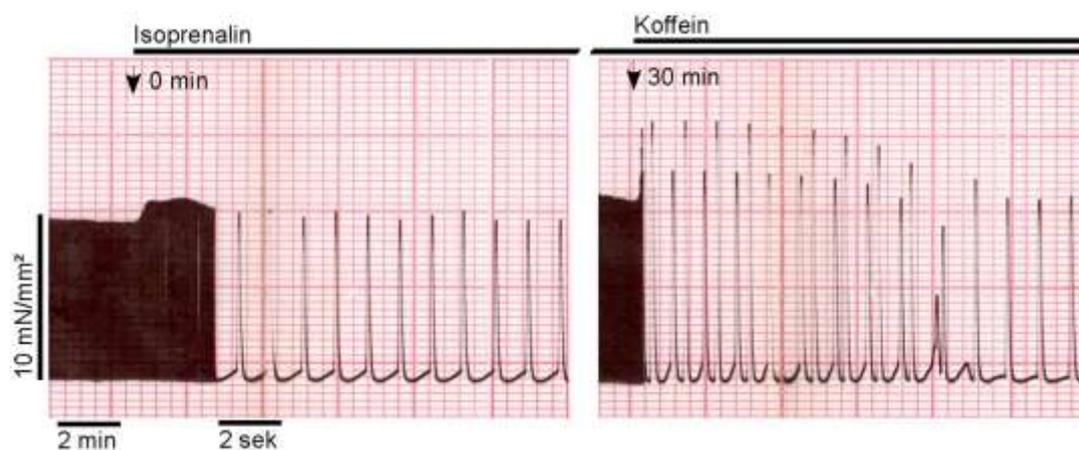


Abb. 17 Wirkung des Koffeins an einem Trabekel, der unter Isoprenalin keine SEK zeigte

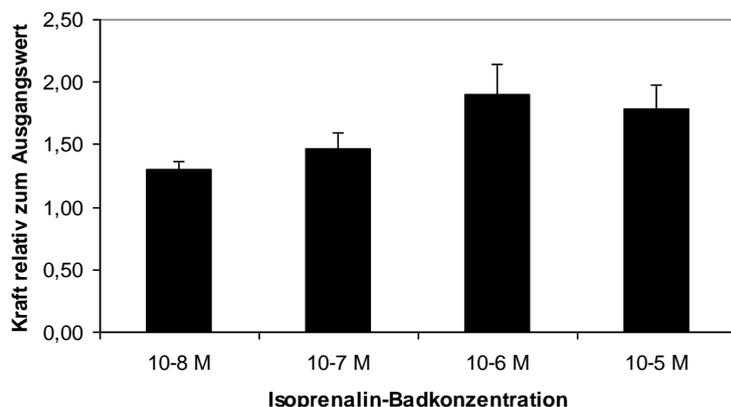
## 3.2 Vorhof- und Ventrikelgewebe aus terminal insuffizienten Herzen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung des Isoprenalins an Myokardtrabekeln aus Vorhöfen und Ventrikeln insuffizienter Herzen untersucht.

### 3.2.1 Vorhofgewebe aus terminal insuffizienten Herzen zeigt kaum spontane Extraktionen unter Isoprenalin und Koffein

An Vorhoftrabekeln aus humanen, insuffizienten Herzen wurden Isoprenalinkonzentrationen von  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-8}$  M eingesetzt.

**Abb. 18** zeigt den positiv inotropen Effekt des Isoprenalins bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger positiv inotroper Effekt, wobei die Wirkung mit steigender Konzentration zunahm und bei  $10^{-6}$  M bis  $10^{-5}$  M Isoprenalin maximal war.



*Abb. 18 Konzentrationsabhängiger positiv-inotroper Effekt von Isoprenalin an Vorhofgewebe aus insuffizienten Herzen*

Nur ein einziger von 22 Trabekeln (5%), die mit  $10^{-7}$  M bis  $10^{-5}$  M Isoprenalin behandelt wurden, zeigte nach der Gabe von Isoprenalin ( $10^{-6}$  M) spontane Extraktionen. Nach der zusätzlichen Gabe von Koffein (1 mM) taten dies insgesamt 6 von 22 Trabekeln (27%). Damit war der Anteil an Trabekeln, die nach Gabe von Isoprenalin spontane Extraktionen zeigten, im insuffizienten Vorhofmyokard deutlich niedriger als im nicht-insuffizienten Vorhofmyokard, sowohl in Gegenwart von Isoprenalin allein (5% vs 67%,  $p < 0,01$ ; exakter Test nach Fisher) als auch nach Zugabe von Koffein (27% vs 90%,  $p < 0,01$ ; exakter Test nach Fisher).

**Abb. 19 und 20** zeigen Originalregistrierungen von humanen, insuffizienten Vorhoftrabekeln vor und während der Gabe von  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M Isoprenalin. Bei der geringeren Konzentration kam es nur zu einem vergleichsweise geringen Anstieg der Kraft um 23%, während bei der hohen Konzentration der Anstieg 107% betrug. Auch ist der Anstieg der Kontraktionskraft bis zum Maximum bei der niedrigen Konzentration sehr viel langsamer. Bei beiden Konzentrationen kam es nicht zum Auftreten spontaner Extraktionen.

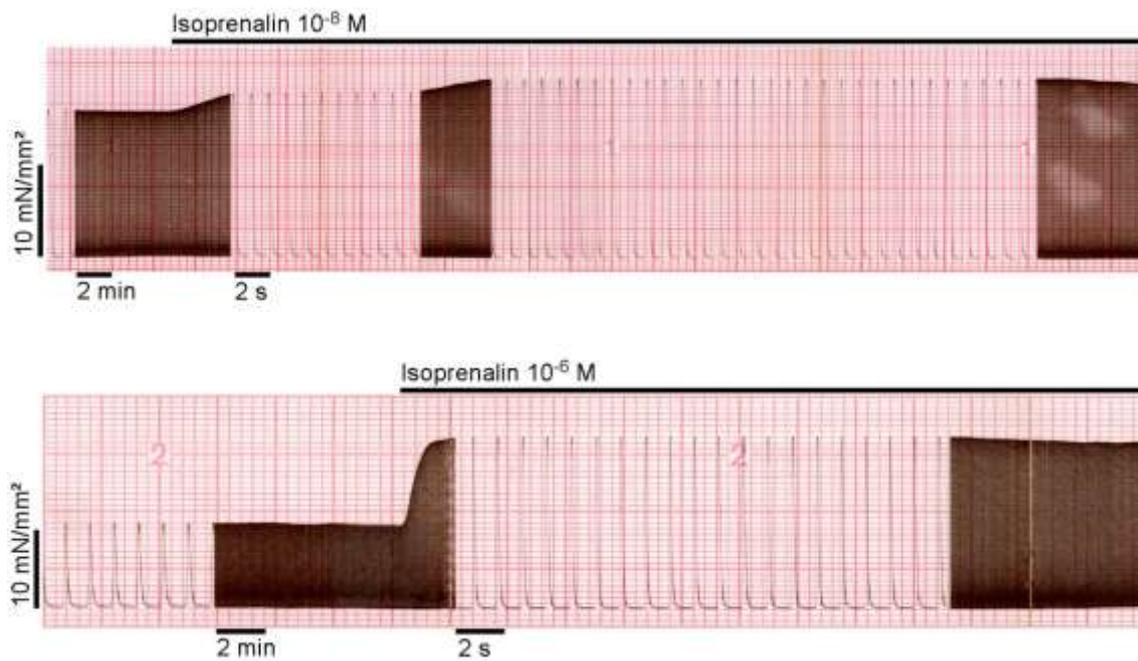


Abb. 19 und 20 *Unterschiedlich starker positiv inotroper Effekt des Isoprenalins am insuffizienten Vorhofgewebe in Abhängigkeit von der Konzentration*

### 3.2.2 Ventrikelgewebe aus terminal insuffizienten Herzen zeigt keine spontanen Extraktionen unter Isoprenalin und Koffein

An Trabekeln aus humanen, insuffizienten Ventrikeln wurden in dieser Versuchsreihe Isoprenalinkonzentrationen von 10<sup>-5</sup> M bis 10<sup>-9</sup> M eingesetzt. Einige Trabekel wurden ohne Isoprenalin-Behandlung belassen. Aus den Messungen des positiv inotropen Effektes wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt.

Kein einziger Trabekel aus Ventrikelgewebe zeigte unter Isoprenalin spontane Extraktionen.

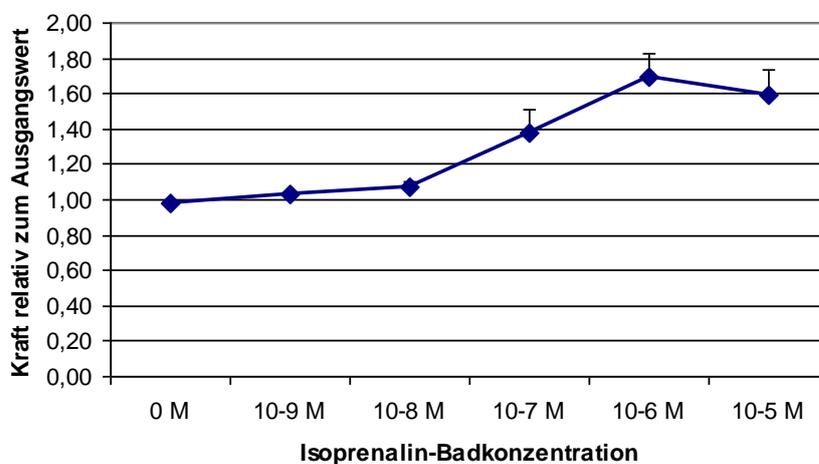
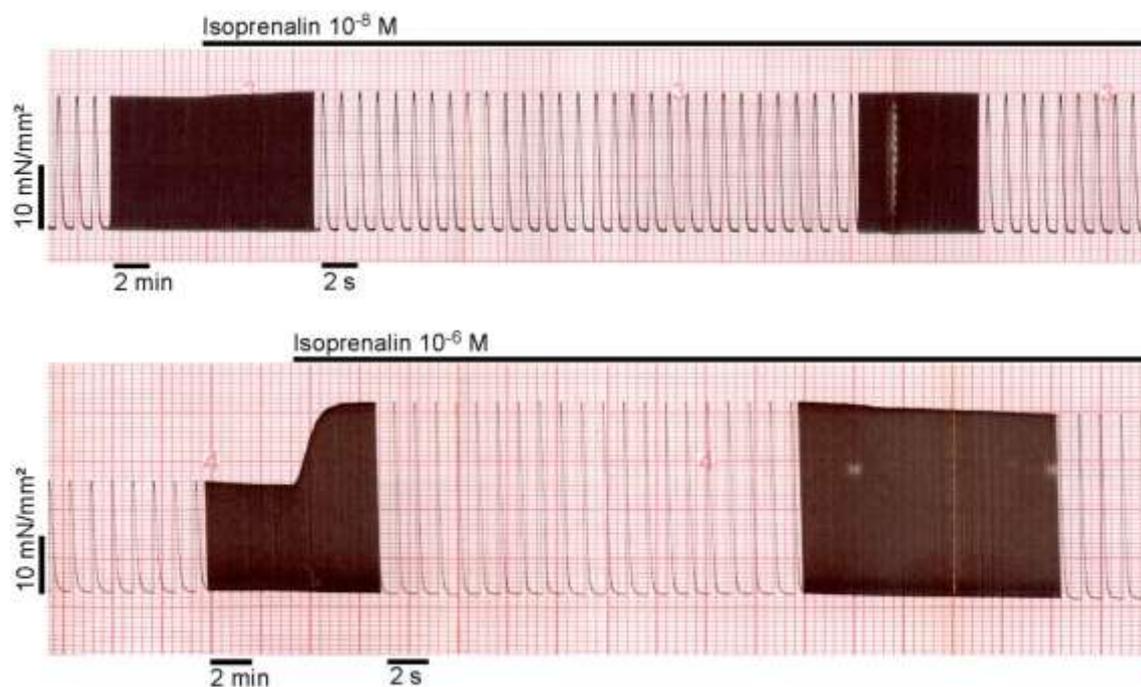


Abb. 21 *Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin an Ventrikelgewebe aus insuffizienten Herzen*

**Abb. 21** zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für den positiv-inotropen Effekt. Dargestellt sind die Mittelwerte der maximalen Kraft bei den verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen relativ zum Ausgangswert, der als 1 angenommen wurde. Der positiv inotrope Effekt wurde mit zunehmender Konzentration größer und erreichte bei  $10^{-6}$  M das Maximum von  $69\pm 14\%$  ( $n=11$ ). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Wirkung des Isoprenalins am insuffizienten Vorhofmyokard.



*Abb. 22 und 23 Unterschiedlich starker positiv inotroper Effekt des Isoprenalins am insuffizienten Ventrikelgewebe in Abhängigkeit von der Konzentration*

**Abb. 22 und 23** zeigen Originalregistrierungen von Versuchen mit Ventrikel-Trabekeln, bei denen Isoprenaline in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M eingesetzt wurde. Zu sehen ist die stabile basale Kraft vor Isoprenaline-Gabe und der jeweilige positiv inotrope Effekt des Isoprenalins. Bei der niedrigen Konzentration war der Effekt gering, der Kraftanstieg langsam im Vergleich zu dem raschen, starken Effekt der hohen Konzentration. Der positiv inotrope Effekt war in beiden Fällen stabil. Es traten keine spontanen Extraktionen auf, weder kurz nach der Gabe des Isoprenalins noch im weiteren Verlauf der Messungen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Verwendetes Material

In dieser Arbeit wurden isolierte Muskelstreifen aus dem humanen Vorhof und Ventrikel verwendet. Auf diese Weise konnte das Auftreten von spontanen Extrakontraktionen unter der Einwirkung verschiedener pharmakologischer Substanzen am natürlichen mehrzelligen Präparat untersucht werden. Dies ist insofern von Vorteil, als auch das Auftreten von Arrhythmien in vivo ein Geschehen im Zellverband des Herzmuskels ist; in dieser Versuchsanordnung konnten die Versuche jedoch unter kontrollierten Bedingungen wie gleichbleibende Temperatur, pH-Wert und Stimulationsfrequenz untersucht und die isometrische Kontraktionskraft direkt gemessen werden. Ein weiterer Vorteil bestand in der Verwendung humanen Herzgewebes, da die Ergebnisse aus Versuchen mit tierischem Material nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind.

### 4.2 Wirkung von Ryanodin

Ryanodin bindet an den Ryanodinrezeptor und bewirkt eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit. In mikromolaren Konzentrationen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden ( $10^{-6}$  M), arretiert es den Kanal in einem zum Teil geöffneten Zustand (Fill und Copello 2002). Es verhindert damit die geordnete,  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte und zeitlich definierte Öffnung. Die Funktion des Ryanodinrezeptors im  $\text{Ca}^{2+}$ -Zyklus der elektromechanischen Kopplung entfällt dadurch. Es kommt zu einer funktionellen Blockade des Ryanodinrezeptors bei einem gleichzeitigen Verlust von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die Zugabe von Ryanodin zum kontrahierenden Vorhoftrabekel reduzierte die basale Kraft auf ein Fünftel des Ausgangswertes. Dies ist dadurch erklärbar, dass für die Kontraktion das zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR nicht mehr zur Verfügung steht und das  $\text{Ca}^{2+}$ , das über die sarkolemmalen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einströmt, im Normalfall nur 20-25% des für die Kontraktion benötigten  $\text{Ca}^{2+}$  ausmacht.

Die Zugabe von Isoprenalin als  $\beta$ -adrenerger Agonist bewirkte auch unter Ryanodin eine unverändert große Zunahme der Inotropie, ließ jedoch keine Extrakontraktionen mehr entstehen. Dies belegt, dass die positiv-inotrope Wirkung des Isoprenalins zwar

über verschiedene Mechanismen erreicht wird, für die arrhythmogene Wirkung jedoch der Ryanodinrezeptor von zentraler Bedeutung ist.

Dies wird durch den Befund bestätigt, dass Koffein – zwar nicht unter Ryanodin – aber am ansonsten unbehandelten Trabekel auch nach Isoprenalin-Gabe noch zusätzliche Extraktionen auslösen konnte bzw. auch in den Trabekeln Extraktionen auslösen konnte, in denen Isoprenalin zuvor keine induziert hatte. Koffein erhöht die Sensitivität des Ryanodinrezeptors für  $\text{Ca}^{2+}$  (Fill und Copello 2002) und kann an isolierten Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks auslösen (Porta et al. 2011).

### 4.3 Bedeutung der PKA

Die PKA ist der am längsten und besten bekannte Vermittler der  $\beta$ -adrenergen Stimulation. Zur Wirkung der PKA auf zellulärer und molekularer Ebene gibt es daher inzwischen eine Reihe von Untersuchungen. So konnte gezeigt werden, dass die PKA nach der cAMP-vermittelten Aktivierung den Ryanodinrezeptor an Ser2809 phosphoryliert. Dies führt zur partiellen Dissoziation des stabilisierenden Calstabin (Marx et al. 2000). Die Dissoziation des Calstabins vom RyR2 nach dessen Phosphorylierung führt zu einer Instabilität des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und zu einer höheren Sensitivität für  $\text{Ca}^{2+}$ , und damit zu einer besseren Durchlässigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  in der Systole, aber eben auch zu diastolischen Lecks, die zu Membrandepolarisationen, sogenannten delayed after-depolarizations, führen (Lehnart et al. 2006). Ob diese zu Aktionspotentialen führen, hängt davon ab, wie groß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom ist. Bei zu geringer Beladung des SR mit  $\text{Ca}^{2+}$  (Zima et al. 2010, Sato und Bers 2011) oder bei einer zu kurzen Öffnung des RyR2 (Porta et al. 2011) entsteht keine ausreichend große  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Jedoch führt  $\beta$ -adrenerge Stimulation über die Aktivierung der SERCA auch zu einem Anstieg des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes, so dass die Entstehung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks und  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen bei Öffnung des RyR2 wahrscheinlicher wird (Venetucci et al. 2006). Die Bedeutung der RyR2-Phosphorylierung durch die PKA für die Entstehung von Arrhythmien ist jedoch nicht unumstritten. So konnten Curran et al. (2007) an isolierten Myozyten aus Kaninchen-Ventrikeln keine Unterdrückung des Isoprenalin-induzierten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks durch eine Hemmung der PKA feststellen.

Im vorliegenden Versuch löste Isoprenalin ( $10^{-7}$  M) in 26 von 39 Trabekeln spontane Extraktionen aus mit einer Frequenz von  $33,4 \pm 4,9$  pro Minute. Die Hemmung der PKA mit dem Hemmstoff H89 reduzierte die Anzahl der Isoprenalin-induzierten

Extrakontraktionen signifikant auf  $13,8 \pm 6,1$  pro Minute. Dies spricht dafür, dass die PKA-vermittelte Phosphorylierung im humanen Vorhofmyokard an der Entstehung von spontanen Depolarisationen und Extrakontraktionen beteiligt ist. Die Extrakontraktionen traten erst nach dem Anstieg der Kontraktionskraft auf. Das spricht dafür, dass sie erst bei einer stärkeren Beladung des SR mit Kalzium ausgelöst werden konnten.

Die Zugabe von H89 zu stabil kontrahierenden Trabekeln führte zu einer Abnahme der basalen Kraft. Dies kann heißen, dass eine Basis-Phosphorylierung auch in der nicht- $\beta$ -adrenerg stimulierten Zelle vorhanden sein muss und zur basalen Kontraktilität beiträgt (Hain et al. 1995). Jedoch war der positiv-inotrope Effekt der  $\beta$ -adrenergen Stimulation mit Isoprenalin durch H89 nicht beeinträchtigt. Dies entspricht nicht den Erwartungen, da eine Blockade der PKA auch die Phosphorylierung weiterer  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierender Proteine trifft und somit mit einer Einschränkung der Kontraktilität zu rechnen war, wie dies auch im Tierversuch mit transgenen Mäusen der Fall war (Shan et al. 2010). Möglicherweise ist der H89-Effekt konzentrationsabhängig und es hätte höherer Konzentration bedurft, um den positiv-inotropen Effekt des Isoprenalins zu reduzieren. Die H89-Konzentration war jedoch nicht höher gewählt, um unspezifische Effekte auszuschließen.

#### **4.4 Bedeutung der CaMKII**

Die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) hat auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ebenso vielseitige Wirkungen wie die PKA. Sie kann ebenfalls durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation aktiviert werden (Baltas et al. 1997, Curran et al. 2007). Im Herzen wird hauptsächlich die Isoform CaMKII $\delta$  exprimiert (Edman und Schulman 1994). Die CaMKII ist zunächst auto-inhibiert (Rosenberg et al. 2005). Erst durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiviertem Calmodulin und die daraus folgende Konformationsänderung wird die enzymatische Aktivität ermöglicht. Die Aktivität hängt somit von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ab. Jedoch ist die CaMKII auch autophosphorylierbar. Wenn die aktive CaMKII sich selbst phosphoryliert hat, bleibt sie auch nach dem Abdiffundieren des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulins noch aktiv. Daher wird bei häufigeren oder länger andauernden  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten sowohl direkt die Aktivierung der CaMKII durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin erhöht, als auch durch die Autophosphorylierung die CaMKII dauerhaft aktiviert. Die CaMKII kann ihrerseits die sarkolemmalen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle phosphorylieren, die dadurch schneller und

länger öffnen (Dzhura et al. 2000). Häufige und hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zum Beispiel bei einer erhöhten Herzfrequenz führen somit zu einem stärkeren und schnelleren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Wehrens et al. 2004). Dieser Mechanismus wird auch „facilitation“ genannt. Neben dem L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal phosphoryliert die CaMKII das Phospholamban am Thr17 und den Ryanodinrezeptor am Ser2815, also an anderen Orten als die PKA (Ser16 und Ser2809). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Phosphorylierung des Phospholambans am Thr17 (Wegener et al. 1989) als auch die des Ryanodinrezeptors am Ser2815 (Ferrero et al. 2007) nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation ansteigt. Darüberhinaus konnte auch durch Antikörper gegen die autophosphorylierte CaMKII eine Aktivierung nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation nachgewiesen werden (Hudmon und Schulman 2002).

Die Phosphorylierung des RyR2 durch CaMKII erhöht dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und Offenwahrscheinlichkeit (Wehrens et al. 2004). Bei transgenen Mäusen, die CaMKII überexprimieren, zeigen die RyR2 eine erhöhte Anzahl von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks, die sich durch CaMKII-Inhibitoren unterdrücken ließen (Maier et al. 2003). An isolierten Kaninchen-Myozyten, die durch Transfektion mit Adenoviren die CaMKII überexprimierten, zeigte sich eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz und ein Verringerung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes (Kohlhaas et al. 2006). Eine andere Arbeitsgruppe fand jedoch in einem ähnlichen Versuch mit Ratten den gegenteiligen Effekt (Yang et al. 2007).

Im vorliegenden Versuch am humanen Vorhofmyokard zeigten nach Hemmung der CaMKII mit KN93 signifikant weniger Muskelpräparate Isoprenalin-induzierte spontane Extraktionen. Dies korreliert mit den Befunden aus Versuchen mit tierischem Material. In der Gesamtschau lässt dies darauf schließen, dass die Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII für die Entstehung spontaner Aktivität im humanen Vorhofmyokard von Bedeutung ist.

Die Hemmung der CaMKII mit KN93 hatte dabei weder Einfluss auf die basale Kraft noch auf den positiv-inotropen Effekt von Isoprenalin. Offenbar spielt die CaMKII also für die basale Kontraktilität in Abwesenheit von  $\beta$ -adrenerger Stimulation sowie für den Isoprenalin-induzierten positiv-inotropen Effekt nur eine untergeordnete Rolle. Eine andere mögliche Erklärung für diese Befunde ist, dass eine höhere KN93-Konzentration notwendig gewesen wäre, um die möglichen Effekte auf die Kontraktilität zu hemmen.

#### **4.5 PKA und CaMKII in der $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion**

Da sowohl die Hemmung der PKA mittels H89 als auch die Hemmung der CaMKII mittels KN93 die Anzahl der Isoprenalin-induzierten spontanen Kontraktionen reduzieren aber nicht völlig unterdrücken konnte, stellte sich die Frage, ob es sich um eine parallele Stimulierung der beiden Kinasen handelt und ob folglich die gleichzeitige Gabe beider Hemmstoffe, H89 und KN93, zu einer stärkeren Unterdrückung der Spontanaktivität unter Isoprenalin führen würde. Dies war nicht der Fall, die kombinierte Gabe hatte keinen additiven Effekt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die CaMKII direkt oder indirekt über die PKA aktiviert wird, so dass es sich bei der Gabe von H89 und KN93 um eine doppelte Hemmung des selben Signalweges handeln würde. Hierfür spricht zum Beispiel, dass die gesteigerte Herzfrequenz als Auslöser schnellerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter Versuchsbedingungen entfällt. An Rattenherzen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Hemmung der PKA mittels H89 die Phosphorylierung von Phospholamban nicht nur am Ser16 sondern auch am Thr17 reduziert (Said et al. 2002). Curran et al. (2007) fanden jedoch keinen Einfluss einer selektiven PKA-Stimulierung durch Forskolin auf die CaMKII. Eine PKA-unabhängige, cAMP-abhängige Aktivierung der CaMKII ist nach den vorliegenden Ergebnissen daher eher unwahrscheinlich. Ein anderer Ansatz besteht darin, dass die CaMKII unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Rolle spielt und erst bei chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation in den Vordergrund rückt. 24-Stunden-Stimulation von Kardiomyozyten mit Norepinephrin zeigte eine Desensitivierung des PKA-Signalwegs und eine Zunahme der CaMKII-Aktivität (Wang et al. 2004), und es ist bekannt, dass es bei Herzinsuffizienz zu einer Überaktivierung der CaMKII kommt. Ob es dabei auch zu Veränderungen in der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion in Bezug auf die Stimulierung der PKA und der CaMKII kommt, ist jedoch offen.

#### **4.6 Sympathoadrenerge Stimulation am terminal insuffizienten Herzen**

Da es bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz zu Veränderungen der Herzmuskelzellen im Rahmen des strukturellen und elektrischen Remodeling kommt, wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit sich die Wirkung von Isoprenalin auf Kammer- und Vorhofmyokard aus insuffizienten Herzen voneinander und von der Wirkung auf nicht-insuffizientes Vorhofmyokard unterscheidet. Es zeigte sich, dass

im insuffizienten Myokard erst bei einer relativ hohen Isoprenalin-Konzentration von  $10^{-6}$  M ein maximaler positiv-inotroper Effekt zu erreichen war, entsprechend einer Desensibilisierung gegenüber  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Dies war in insuffizientem Vorhof- und Kammermyokard gleich, so dass es in dieser Hinsicht keinen Unterschied zwischen Vorhof- und Kammermyokard gibt.

Bei Herzinsuffizienz ist die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung verringert, u.a. aufgrund des RyR2-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks (Bers 2006). Trotz dieses bereits erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks ließen sich jedoch mit Isoprenalin keine (Kammer) oder fast keine (Vorhof) spontanen Kontraktionen auslösen. Bei einer bereits bestehenden PKA-Hyperphosphorylierung des RyR2 bei Herzinsuffizienz (Marx et al. 2000) kann durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation möglicherweise keine zusätzliche Phosphorylierung mehr ausgelöst werden, die sogleich zu Extrakontraktionen führen würde. Zusätzlich könnte der gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel und dabei vor allem die verminderte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung dazu beitragen, dass es im insuffizienten Myokard nicht zu Isoprenalin-induzierten Extrakontraktionen kommt. Dies ist ein weiterer indirekter Hinweis darauf, dass die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über den RyR2 eine entscheidende Rolle für die Entstehung der Isoprenalin-induzierten Extrakontraktionen spielt.

#### **4.7 Pathophysiologische Bedeutung**

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass im humanen multizellulären Vorhofpräparat die  $\beta$ -adrenerge Stimulation unter Vermittlung sowohl der PKA als auch der CaMKII zu RyR2-vermittelten und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen, spontanen Kontraktionen führt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die PKA und die CaMKII dabei nicht parallel, sondern vermutlich nacheinander aktiviert werden und Teil eines gemeinsamen Signalweges sein könnten. Die gezielte Hemmung der PKA und/oder der CaMKII sowie die Normalisierung der Funktion lecker Ryanodinrezeptoren könnten daher interessante therapeutische Ansätze für die Behandlung stressinduzierter tachykarder Vorhofarrhythmien sein.

## 5. Zusammenfassung

$\text{Ca}^{2+}$  ist der zentrale Vermittler der elektromechanischen Kopplung im Herzen. Fehlregulierungen im kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt sind maßgeblich an der Entstehung von Arrhythmien beteiligt. Daher ist die Aufklärung der zellulären und molekularen Mechanismen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Arrhythmien von hoher klinischer Relevanz. Spontane Depolarisationen und Aktionspotentiale einzelner Kardiomyozyten können entstehen, wenn der Ryanodinrezeptor, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), während der Diastole spontan öffnet und  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzt. Der Ryanodinrezeptor kann durch die Proteinkinase A (PKA) oder die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) phosphoryliert werden, was seine Offenwahrscheinlichkeit erhöht. Vermutlich werden beide Kinasen bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation aktiviert. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb geprüft werden, ob Isoprenalin-induzierte spontane Extraktionen im humanen, multizellulären Vorhofpräparat vermittelt werden von einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch den Ryanodinrezeptor und ob eine Hemmung der PKA und der CaMKII diese Extraktionen unterdrücken kann.

Die isolierten Vorhoftrabekel wurden dazu unter nahezu physiologischen Bedingungen fixiert. Sie wurden mit 1 Hz elektrisch stimuliert, und es wurden die isometrischen Kontraktionen gemessen. Vorhoftrabekel aus nicht-insuffizienten Herzen wurden mit dem PKA-Hemmstoff H89 ( $10^{-5}$  M), dem CaMKII-Hemmstoff KN93 ( $10^{-5}$  M) oder mit dem Ryanodinrezeptor-Hemmstoff Ryanodin ( $10^{-6}$  M) inkubiert und dann mit Isoprenalin stimuliert. Zum Vergleich wurden Trabekel ausschließlich mit Isoprenalin ( $10^{-7}$  M) behandelt. Zwei Drittel (26 von 39) der nur mit Isoprenalin behandelten Trabekel zeigten spontane Extraktionen, im Mittel  $33,4 \pm 4,9$  pro Minute. Koffein ( $10^{-3}$  M), ein Stimulator des Ryanodinrezeptors, erhöhte sowohl den Anteil an Trabekeln mit Extraktionen als auch die Anzahl der Extraktionen. Ryanodin konnte die Isoprenalin-induzierten Extraktionen vollständig unterdrücken, allerdings unter Verminderung der basalen Kontraktionskraft auf ein Fünftel des Ausgangswertes. Es zeigte sich weiterhin, dass KN93 und H89 die Anzahl der Trabekel, die unter Isoprenalin spontane Extraktionen zeigten, bzw. die Anzahl der Extraktionen signifikant senken konnten. Die Kombination aus beiden Hemmstoffen brachte jedoch keine stärkere Reduzierung der Extraktionen, es gab also keinen additiven Effekt.

Dies könnte bedeuten, dass die CaMKII direkt oder indirekt durch die PKA aktiviert wird.

In Vorhof- und Ventrikeltrabekeln aus terminal insuffizienten Herzen wurden keine Isoprenalin-induzierten Extraktionen beobachtet, möglicherweise aufgrund einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase.

Die Untersuchungen belegen die zentrale Bedeutung des Ryanodinrezeptors und damit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR für die Isoprenalin-induzierten spontanen Extraktionen. Sie zeigen, dass sowohl die PKA als auch die CaMKII an der Vermittlung der durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation ausgelösten Extraktionen im nicht-insuffizienten humanen Vorhofmyokard beteiligt sind, möglicherweise über eine Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors, die seine Offenwahrscheinlichkeit erhöht.

## Literaturverzeichnis

- Amos G J, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel H M, Ravens U (1996): Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol (Lond.)* 491 (Pt 1), 31–50.
- Baltas L G, Karczewski P, Bartel S, Krause E G (1997): The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase is activated in response to beta-adrenergic stimulation and becomes  $\text{Ca}^{2+}$ -independent in intact beating hearts. *FEBS Lett* 409 2, 131–136.
- Bers D M (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415 6868, 198–205.
- Bers D (2006): Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiol (Bethesda)* 21, 380–387.
- Bers D M (2008): Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70, 23–49.
- Blanchard E M, Smith G L, Allen D G, Alpert N R (1990): The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles. *Pflügers Arch (Pflügers Archiv: Eur J Physiol)* 416 1-2, 219–221.
- Brodde O E, Hundhausen H J, Zerkowski H R, Michel M C (1992): Lack of effect of chronic calcium antagonist treatment on beta 1- and beta 2-adrenoceptors in right atria from patients with or without heart failure. *Br J Clin Pharmacol* 33 3, 269–274.
- Brodde O E, Vogelsang M, Broede A, Michel-Reher M, Beisenbusch-Schäfer E, Hakim K, Zerkowski H R (1998): Diminished responsiveness of Gs-coupled receptors in severely failing human hearts: no difference in dilated versus ischemic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 4, 585–594.
- Brodde O E, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T (2001): Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Bas Res Cardiol* 96 6, 528–538.
- Camm A J, Kirchhof P, Lip G Y H, Schotten U, Savelieva I, Ernst S et al. (2010): Guidelines for the management of atrial fibrillation: The Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 31 19, 2369–2429.
- Carl S L, Felix K, Caswell A H, Brandt N R, Ball W J, Vaghy P L et al. (1995): Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J Cell Biol* 129 3, 673–682.
- Cheng H, Lederer W J, Cannell M B (1993): Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262 5134, 740–744.
- Curran J, Hinton M J, Ríos E, Bers D M, Shannon T R (2007): Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res* 100 3, 391–398.
- Dzhura I, Wu Y, Colbran R J, Balsler J R, Anderson M E (2000): Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol* 2 3, 173–177.

- Edman C F, Schulman H (1994): Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1221 1, 89–101.
- El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, Carrier L, Knaut M, Ravens U, Dobrev D (2006): Molecular determinants of altered Ca<sup>2+</sup> handling in human chronic atrial fibrillation. *Circulation* 114 7, 670–680.
- Ferrero P, Said M, Sánchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P et al. (2007): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca<sup>2+</sup>-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 43 3, 281–291.
- Fill M, Copello J A (2002): Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82 4, 893–922.
- Fryer M W, Gage P W, Neering I R, Dulhunty A F, Lamb G D (1988): Paralysis of skeletal muscle by butanedione monoxime, a chemical phosphatase. *Pflügers Arch* 411 1, 76–79.
- Ginsburg K S, Bers D M (2004): Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca<sup>2+</sup> load and Ca<sup>2+</sup> current trigger. *J Physiol (Lond.)* 556 Pt 2, 463–480.
- Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995): Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem* 270 5, 2074–2081.
- Haissaguerre M, Jais P, Shah D C, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G et al. (1998): Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 339 10, 659–666.
- Hatem S N, Bénardeau A, Rücker-Martin C, Marty I, Chamisso P de, Villaz M, Mercadier J J (1997): Different compartments of sarcoplasmic reticulum participate in the excitation-contraction coupling process in human atrial myocytes. *Circ Res* 80 3, 345–353.
- Hudmon A, Schulman H (2002): Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 364 Pt 3, 593–611.
- Hylek E, Go A, Chang Y, Jensvold N, Henault L, Selby J, Singer D (2003): Effect of intensity of oral anticoagulation on stroke severity and mortality in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 349 11, 1019–1026.
- Kockskämper J, Sheehan K A, Bare D J, Lipsius S L, Mignery G A, Blatter L A (2001): Activation and Propagation of Ca<sup>2+</sup> Release during Excitation- Contraction Coupling in Atrial Myocytes. *Biophys J* 81, 2590–2605.
- Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A et al. (2006): Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 98 2, 235–244.
- Lehnart S E, Wehrens X H T, Marks A R (2004): Calstabin deficiency, ryanodine receptors, and sudden cardiac death. *Biochem Biophys Res Commun* 322 4, 1267–1279.

- Lehnart S E, Wehrens X H T, Reiken S, Warriar S, Belevych A E, Harvey R D et al. (2005): Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123 1, 25–35.
- Lehnart S E, Terrenoire C, Reiken S, Wehrens X H T, Song L-S, Tillman E J et al. (2006): Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 20, 7906–7910.
- Maier L S, Barckhausen P, Weisser J, Aleksic I, Baryalei M, Pieske B (2000): Ca<sup>2+</sup> handling in isolated human atrial myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 3, H952-8.
- Maier L S, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown J H, Bers D M (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 8, 904–911.
- Marx S O, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks A R (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101 4, 365–376.
- Michailova A, DelPrincipe F, Egger M, Niggli E (2002): Spatiotemporal features of Ca<sup>2+</sup> buffering and diffusion in atrial cardiac myocytes with inhibited sarcoplasmic reticulum. *Biophys J* 83 6, 3134–3151.
- Mulieri L A, Hasenfuss G, Littleman F, Blanchard E M, Alpert N R (1989): Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 65 5, 1441–1449.
- Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R et al. (2007): The cAMP binding protein Epac modulates Ca<sup>2+</sup> sparks by a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol (Lond.)* 583 Pt 2, 685–694.
- Pogwizd S M, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers D M (2001): Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 88 11, 1159–1167.
- Porta M, Zima A V, Nani A, Diaz-Sylvester P L, Copello J A, Ramos-Franco J et al. (2011): Single ryanodine receptor channel basis of caffeine's action on Ca<sup>2+</sup> sparks. *Biophys J* 100 4, 931–938.
- Rosenberg O, Deindl S, Sung R-J, Nairn A, Kuriyan J (2005): Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell* 123 5, 849–860.
- Said M, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A (2002): The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflügers Arch* 444 6, 801–809.
- Sato D, Bers D M (2011): How does stochastic ryanodine receptor-mediated Ca leak fail to initiate a Ca spark? *Biophys J* 101 10, 2370–2379.
- Satoh H, Delbridge L M, Blatter L A, Bers D M (1996): Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys J* 70 3, 1494–1504.

- Schotten U, Greiser M, Benke D, Buerkel K, Ehrenteidt B, Stellbrink C et al. (2002): Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res* 53 1, 192–201.
- Shan J, Kushnir A, Betzenhauser M J, Reiken S, Li J, Lehnart S E et al. (2010): Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *J Clin Invest* 120 12, 4388–4398.
- Stewart S, Hart C L, Hole D J, McMurray J J (2001): Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study. *Heart* 86 5, 516–521.
- Venetucci L A, Trafford A W, Díaz M E, O'Neill S C, Eisner D A (2006): Reducing ryanodine receptor open probability as a means to abolish spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release and increase  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude in adult ventricular myocytes. *Circ Res* 98 10, 1299–1305.
- Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow M T, Xiao R-P, Cheng H (2004): Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res* 95 8, 798–806.
- Wegener A D, Simmerman H K, Lindemann J P, Jones L R (1989): Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 264 19, 11468–11474.
- Wehrens X H T, Lehnart S E, Reiken S R, Marks A R (2004):  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94 6, 61-70.
- Yang D, Zhu W-Z, Xiao B, Brochet D X P, Chen S R W, Lakatta E G et al. (2007):  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of ryanodine receptors suppresses  $\text{Ca}^{2+}$  sparks and  $\text{Ca}^{2+}$  waves in cardiac myocytes. *Circ Res* 100 3, 399–407.
- Zhang T, Maier L S, Dalton N D, Miyamoto S, Ross J, Bers D M, Brown J H (2003): The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92 8, 912–919.
- Zima A V, Bovo E, Bers D M, Blatter L A (2010):  $\text{Ca}^{2+}$  spark-dependent and -independent sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak in normal and failing rabbit ventricular myocytes. *J Physiol (Lond.)* 588 Pt 23, 4743–4757.

## Danksagung

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Jens Kockskämper, danke ich sehr herzlich für die freundliche und geduldige Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Pieske danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Den Chirurgen der Abteilung für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie danke ich für die Überlassung des Vorhofgewebes.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung während des Schreibens.