

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Über die differentielle Regulation
von Ionenkanälen
in spezifischen Nanodomänen
atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten**

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

vorgelegt von

Sören Brandenburg

aus Hoya (Weser)

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. med. S. E. Lehnart

Ko-Referent: Prof. Dr. med. Niels Voigt

Drittreferent: Prof. Dr. mult. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 29.06.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Über die differentielle Regulation von Ionenkanälen in spezifischen Nanodomänen atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 11.01.2017



.....
(Sören Brandenburg)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	4
1 Einleitung	5
1.1 Strukturelle Charakteristika atrialer und ventrikulärer Myozyten	7
1.2 Die elektromechanische Kopplung	9
1.3 Der sekretorische Pfad	11
2 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	13
2.1 Super-hub-Ca²⁺-Signalmechanismus in atrialen Myozyten	13
2.1.1 Tansversal-axiales Tubulusmembran-Netzwerk.....	13
2.1.2 Hochspezialisierte SR-Junktionen an axialen Tubulusmembranen	14
2.1.3 Axiale Tubuli steuern intrazelluläre Ca ²⁺ -Freisetzung.....	15
2.1.4 β -adrenerge Stimulation rekrutiert nicht-junktionale RyR2-Cluster.....	18
2.1.5 Subzelluläre Regulationsmechanismen atrialer Zellkontraktion	19
2.1.6 Pathomechanismen bei druckinduzierter atrialer Hypertrophie	20
2.2 Regulation der Erregbarkeit atrialer und ventrikulärer Myozyten durch differenziellen Transport von K_{ATP}-Kanalkomplexen	23
2.2.1 Proteinexpression von K _{ATP} -Untereinheiten in atrialen und ventrikulären Myozyten	23
2.2.2 Differentielle Glykosylierung reflektiert zelltypspezifische Transportmechanismen von SUR1-Kir6.2 K _{ATP} -Kanalkomplexen	25
2.2.3 Produktive Oberflächenexpression von ventrikulären SUR1-haltigen K _{ATP} -Kanälen durch PKA-Phosphorylierung von Kir6.2.....	26
2.2.4 Der Einfluss von ventrikulären SUR1-abhängigen K _{ATP} -Kanälen auf das kardiale Aktionspotential	30
3 Diskussion der Ergebnisse	31
3.1 Spezifische Mechanismen atrialer und ventrikulärer Myozyten	31
3.1.1 Implikationen der atrialen <i>Super-hub-Ca²⁺</i> -Freisetzung	31
3.1.2 Bedeutung des differentiellen K _{ATP} -Kanal-Transportes	32
3.2 TAC als Modell für progressives atriales <i>Remodeling</i>	33
3.3 Mögliche Konsequenzen für gültige Therapiekonzepte	35

3.4	Reaktionen auf publizierte Studien	37
3.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	38
4	<i>Literaturverzeichnis</i>	41
4.1	Zeitschriftenbeiträge.....	41
4.2	Internetquelle	52
5	<i>Publikationsliste</i>	53

Abkürzungsverzeichnis

AT	axialer Tubulus
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Ca ²⁺	ionisiertes Calcium
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca _v 1.2	spannungsabhängiger L-Typ Calcium-Kanal 1.2
Ca _v 1.3	spannungsabhängiger L-Typ Calcium-Kanal 1.3
Cav3	Caveolin-3
COPI	<i>coat protein complex I</i> , Mantelproteinkomplex I
COPII	<i>coat protein complex II</i> , Mantelproteinkomplex II
Endo H	Endoglycosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ISO	Isoproterenol
K ⁺	ionisiertes Kalium
K _{ATP}	ATP-sensitiver Kaliumkanal
K _{ir}	<i>inward-rectifier potassium channel</i> , einwärts gleichrichtender Kalium-Kanal
LTCC	<i>L-type Calcium channel</i> , L-Typ Calcium-Kanal
MgADP	Magnesium x Adenosin-5'-diphosphat
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
Na ⁺	ionisiertes Natrium
Na _v 1.5	spannungsabhängiger Natrium-Kanal 1.5
PKA	Proteinkinase A
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
RyR2	Ryanodinrezeptor-2-Calcium-Freisetzungskanal
RO	Rolipram
SERCA	sarkoendoplasmatische Calcium-ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STED	<i>stimulated-emission-depletion</i>
SUR	<i>sulfonyl urea receptor</i> , Sulfonylharnstoffrezeptor
TAC	<i>transverse aortic banding</i>
TAT-	tansversal-axiale Tubulus-
TT	transversaler Tubulus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cartoon zellspezifischer Organellen eines differenzierten atrialen Kardiomyozyten.	8
Abbildung 2: Das TAT-Netzwerk in atrialen Myozyten besteht hauptsächlich aus axialen Tubuli.	14
Abbildung 3: Differentielle Regulation der Phosphorylierung von RyR2-Clustern.	15
Abbildung 4: Intrazellulärer Ca^{2+} -Transient aktiviert durch axiale Tubuli und Sarkolemm.	16
Abbildung 5: Atriale Zellhypertrophie induziert eine Proliferation axialer Tubuli.	20
Abbildung 6: SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle sind in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten unterschiedlich lokalisiert.	25
Abbildung 7: Modell der Regulation von SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanälen in ventrikulären Kardiomyozyten.	28

1 Einleitung

Der Herzschlag der Vertebraten beginnt früh im Laufe der Embryogenese und hält bis zum Ende ihres Lebens an. Bereits der primitive, unpaar angelegte und geradlinige Herzschlauch beginnt mit rhythmischen Kontraktionen (E8 Maus, E22-23 Mensch) (Xin et al. 2013). Zu diesem Zeitpunkt besteht der primitive Herzschlauch aus einer einheitlichen Schicht von Kardiomyozyten (Myokard) und ist ausgekleidet von einem *Monolayer* Endothelzellen (Endokard) (Andrés-Delgado und Mercader 2016). Extrazelluläre Matrix wird zwischen Endo- und Myokard gebildet und fördert die weitere Entwicklung durch intrakardialen Druck (Nakamura und Manasek 1981). Erst im Laufe komplexer Prozesse der Schleifenbildung innerhalb der Perikardhöhle und anschließender Septierungsvorgänge entstehen zwei atriale und zwei ventrikuläre Herzhöhlen. Eine entscheidende Rolle für die weitere Differenzierung der einzelnen Herzhöhlen spielen die mit der Kammerseptierung einhergehenden hämodynamischen Veränderungen (Midgett und Rugonyi 2014). Mechanische Kräfte, die auf die unterschiedlichen Herzzellen einwirken, werden von Mechanosensoren wahrgenommen und induzieren Signalkaskaden (Mechanotransduktion), die die weitere Kardiogenese vorantreiben (Andrés-Delgado und Mercader 2016). Letztendlich entstehen zwei Vorhöfe und zwei Ventrikel, deren Myokard aus unterschiedlich differenzierten Herzzellen besteht, die als Organeinheit funktionieren. Den bei Weitem größten Massenanteil machen dabei die Kardiomyozyten aus, die weiter und hauptsächlich in atriale und ventrikuläre Myozyten unterteilt werden können.

Ausgehend von ca. 2500 differentiell regulierten Gentranskripten werden atriale und ventrikuläre Myozyten durch signifikant unterschiedliche molekulare Profile charakterisiert, welche ihre zellspezifischen strukturellen und funktionellen Eigenschaften ausmachen (Wu et al. 2013). Mit der spezifischen *in-vivo*-Ablation des Kernrezeptors *COUP-TFII* in Atrien konnte gezeigt werden, dass Zellgröße, Tubulusnetzwerk und die Form des Aktionspotentials hin zum ventrikulären Phänotyp verändert werden (Wu et al. 2013). Im Gegensatz dazu werden der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal ($\text{Ca}_v1.2$) sowie der Ryanodinrezeptor- (RyR2) Ca^{2+} -Freisetzungskanal, die beide sowohl für die Herzentwicklung als auch für die elektromechanische Kopplung essentiell sind (Takeshima 1998), auf ähnlichem

Niveau exprimiert (Gaborit et al. 2007). Trotzdem verlaufen intrazelluläre Ca^{2+} -Signale und Zellkontraktionen in beiden Zelltypen auf unterschiedliche Weise. Anders als den ventrikulären Myozyten wird den atrialen Zellen überdies eine wichtige hormonelle Aufgabe mit der Sekretion von atrialem natriuretischem Peptid zugeschrieben (Lang et al. 1985).

Gemäß dem Frank-Starling-Gesetz wird die systolische Auswurfleistung des Herzens durch die diastolische ventrikuläre Füllung bedingt (Hasenfuss et al. 1994). Indem die atriale Kontraktion die ventrikuläre Füllung verbessert, trägt sie bereits in Ruhe zu einem Anteil von ca. 10-20 % des linksventrikulären Schlagvolumens bei (Rahimtoola et al. 1975). Wenn unter körperlicher Belastung die Herzfrequenz ansteigt, erhöht sich der atriale Anteil am linksventrikulären Schlagvolumen auf ca. 20-30 % (Mitchell et al. 1965). Um den atrialen Anteil an der Auswurfleistung des Herzens zu beschreiben, wurde der Begriff „atrialer Kick“ gewählt. Umgekehrt ist die atriale Integrität davon abhängig, dass der Ventrikel einen adäquaten Teil seines diastolischen Füllungsvolumens auswirft. Durch eine Vielzahl von kardiovaskulären Risikofaktoren, hereditären oder erworbenen Erkrankungen sowie den Alterungsprozess per se werden auf Basis der ausdifferenzierten und nur zu sehr geringem Teil regenerationsfähigen Kardiomyozyten pathologische *Remodeling*-Mechanismen induziert. Das *Remodeling* bedingt Zellveränderungen, die zum Kontraktionsverlust des Myokards und/oder zur Störung der kardialen Erregung führen können. Kommt es in einer Herzhöhle zu einer systolischen oder diastolischen Funktionsstörung, kann dies zum Funktionsverlust einer vor- oder nachgeschalteten Herzhöhle führen. Ebenso können Herzrhythmusstörungen, die zumeist in den Atrien manifest werden, wie beispielsweise das Vorhofflimmern, die ventrikuläre Füllung kompromittieren (Schotten et al. 2011). Vorhofflimmern ist dabei mit einer Prävalenz von 2 % in der westlichen Gesamtbevölkerung und einer Prävalenz von 10-17 % der über 80-Jährigen die mit Abstand häufigste Herzrhythmusstörung (Zoni-Berisso et al. 2014). In den USA sind mehr als drei Millionen Patienten von Vorhofflimmern betroffen (Naccarelli et al. 2009; Go et al. 2014).

Auf dieser Grundlage ist es wichtig, weitgehend unverstandene und differentielle zellbiologische Mechanismen atrialer und ventrikulärer Myozyten herauszuarbeiten, um zelltypspezifische Ansatzpunkte zur Therapie kardialer

Erkrankungsbilder zu gewinnen. Bisherige medikamentöse antiarrhythmische Therapien beispielsweise beruhen im Allgemeinen auf dem unphysiologischen Block bestimmter Ionenkanäle. Folglich wird die Wirksamkeit antiarrhythmischer Medikamente signifikant durch ihre Nebenwirkungen, insbesondere durch Nebenwirkungen in den Ventrikeln, limitiert (Zimetbaum 2012). Ziel dieser Arbeit ist es, systemrelevante Unterschiede in zwei bedeutenden Bereichen der Biologie atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten herauszustellen: a) Wie lässt sich die elektromechanische Kopplung der beiden Zelltypen in Bezug auf Erregung, Ca^{2+} -Signalverhalten und Kontraktion voneinander abgrenzen? Zusätzlich sollen dabei pathologische *Remodeling*-Prozesse im Herzinsuffizienzmodell der druckinduzierten Hypertrophie untersucht werden. b) Welche Unterschiede atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten bestehen im regulierten Transport ATP-sensitiver K^+ -Kanäle (K_{ATP}), die die Erregbarkeit der Myozyten mit dem metabolischen Energiestatus koppeln?

Zum besseren Verständnis soll zuvor auf wesentliche Besonderheiten der Kardiomyozyten eingegangen werden.

1.1 Strukturelle Charakteristika atrialer und ventrikulärer Myozyten

Die Grundstruktur des Myokards wird aus einzelnen Herzmuskelfasern gebildet, die aus zueinander parallel angeordneten Kardiomyozyten bestehen. Schon durch das Lichtmikroskop ist ihre typische Querstreifung zu erkennen, die durch die regelmäßige Anordnung der Kontraktionseinheit, des sog. Sarkomers, mit seinem typischen Bandenmuster (elektronenmikroskopisch: Z-Linie, I-Bande, A-Bande, H-Zone, M-Linie) zustande kommt (Huxley 1961). Kardiomyozyten sind backsteinartig aufgebaute Zellen mit klar definierten Oberflächenregionen. Die längeren lateralen Wände werden durch die Oberflächenmembran, das sog. Sarkolemm, begrenzt. Die kürzeren Endregionen weisen stark verzahnte Membraneinfaltungen, die sog. *Disci intercalares* oder Glanzstreifen, auf (Sjostrand et al. 1958) (Abb. 1). Hier greifen benachbarte Myozyten mithilfe von Desmosomen und Intermediärfilamenten ineinander, um die Kraftentwicklung der Kontraktion auf das Gewebe übertragen zu können. Zudem beinhalten die *Disci intercalares Gap junctions*, aufgebaut aus Connexonen, die elektrochemische Signale zwischen unmittelbar benachbarten Myozyten ermöglichen und somit das myokardiale Synzytium auszeichnen (Makowski et al. 1977).

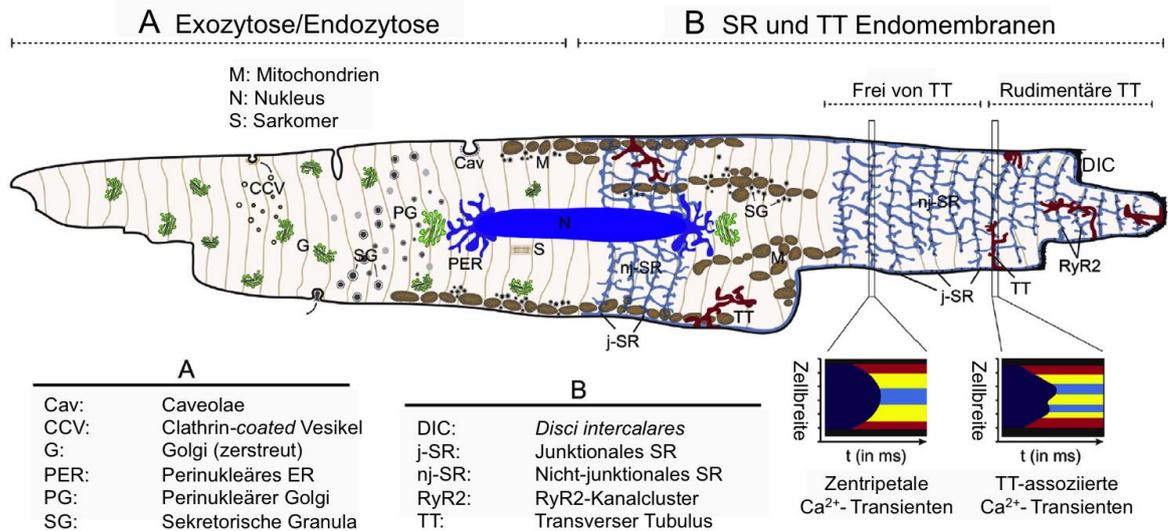


Abbildung 1: Cartoon zellspezifischer Organellen eines differenzierten atrialen Kardiomyozyten.

(A) Der atriale Myozyt zeigt typischerweise einen zentralen Nukleus, der an den Kernpolen mit perinukleärem ER und einem voluminösem perinukleärem Golgi-Apparat ausgestattet ist. Zusätzliche Golgi-Elemente sind in der Zelle verteilt. Desweiteren wurden im Zentrum der Zelle zahlreiche Atrien-spezifische Vesikel und sekretorische Granula mit elektronenmikroskopisch dichtem Inhalt von 0,2 bis 0,5 µm Durchmesser dokumentiert. Der Pfeil deutet auf ein einzelnes mit dem Sarkolemm fusioniertes Vesikel. Umgekehrt werden mit Clathrin ummantelte Vesikel nach Exozytose wieder aufgenommen. Zu sehen sind außerdem Caveolae an der Oberfläche. Submembranös liegt eine dichte Reihe von Mitochondrien, die sich jedoch auch im Zentrum der Zelle zwischen Myofibrillen befinden, sodass der atriale Myozyt mit sehr vielen Mitochondrien bestückt ist. (B) Nach klassischem Modell (Bootman et al. 2006) gibt es ein für atriale Myozyten spezifisches, peripheres nicht-junktionales SR, das regelmäßig entlang der Z-Linien angeordnet ist. Das junktionale SR ist mit der Oberflächenmembran assoziiert. Neuere konfokale Daten zeigen rudimentäre T-Tubuli als Invaginationen des Sarkolemm (Dibb et al. 2009; Lenaerts et al. 2009). Dementsprechend wird die Form des intrazellulären Ca²⁺-Transienten im atrialen Myozyten als U- oder W-förmig beschrieben. Abbildung modifiziert nach Brandenburg et al. 2016b.

Atriale Myozyten sind signifikant kleiner als ventrikuläre Zellen. Isolierte Mausmyozyten zeigen Dimensionen von ca. 110 x 15 µm für atriale und 150 x 30 µm für ventrikuläre Myozyten (Brandenburg et al. 2016a). Während atriale Zellen einen zentralen zigarrenförmigen Nukleus aufweisen (Abb. 1), zeigen ventrikuläre Zellen zwei bis drei separate Nuklei. An den Kernpolen schließt das raue endoplasmatische Retikulum an (ER), gefolgt von perinukleären Golgi-Komplexen (Abb. 1). Dagegen ist das sarkoplasmatische Retikulum (SR) ein zellweites kontinuierliches Netzwerk und dient den Myozyten als Ca²⁺-Speicher. Das SR wird weiterhin in junktionale und nicht-junktionale („freie“) Domänen gegliedert. Das junktionale SR liegt dem Sarkolemm und dessen Invaginationen, dem transversal-axialen Tubulussmembran- (TAT) Netzwerk, an (Abb.1B). Das TAT-Netzwerk ist aus axialen (AT) und transversalen (TT) Tubuli aufgebaut, wobei TT entlang der Z-Linie ca. alle 2 µm verlaufen. Im Aufbau des TAT-Netzwerkes unterscheiden sich atriale und ventrikuläre Myozyten wesentlich. Während ventrikuläre Myozyten ein regelhaft verzweigtes TAT-Netzwerk aufweisen (Wagner et al. 2012), werden

atriale Myozyten bisher typischerweise durch das Fehlen oder die Expression rudimentärer TT-Komponenten charakterisiert (Bootman et al. 2006; Kirk et al. 2003; Smyrnias et al. 2010). Neuere Studien belegen jedoch funktionell relevante TT-Komponenten in größeren Säugetieren (Dibb et al. 2013; Dibb et al. 2009; Lenaerts et al. 2009).

Neben dem perinukleären Golgi enthalten Kardiomyozyten gestreute Golgi-Elemente als Ausgangspunkt für zahlreiche sekretorische Granula (Abb. 1A) (Oddoux et al. 2013). In atrialen Myozyten wurden bis zu 600 sekretorische Granula gefunden, die sich hauptsächlich perinukleär, zwischen den Myofilamenten oder nahe dem Sarkolemm befinden (Jamieson und Palade 1964). Zwischen den Myofilamenten und nahe dem Sarkolemm sind ferner zahlreiche Mitochondrien in Strängen zu erkennen (McNutt und Fawcett 1969).

1.2 Die elektromechanische Kopplung

Der Begriff „elektromechanische Kopplung“ umfasst alle Prozesse von der elektrischen Erregung eines Myozyten bis zur Kontraktion. Ausgehend von der Depolarisation der Schrittmacherzellen im Sinusknoten erfolgt die Erregungsausbreitung über das gesamte Myokard. Durch Aktivierung spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle wird ein schneller Na^+ -Einstrom induziert, der die Zellmembran depolarisiert (Aufstrich des Aktionspotentials). Diese Membrandepolarisation aktiviert spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (LTCC), sodass Ca^{2+} in die Myozyten hineinströmt (Bers 2002) und die Plateauphase des Aktionspotentials beginnt. $\text{Ca}_v1.2$ wird als vorherrschender LTCC in atrialen und ventrikulären Zellen angesehen, wobei auch $\text{Ca}_v1.3$ in atrialen Myozyten eine funktionelle Rolle zugeschrieben wird (Zhang et al. 2005). LTCC kommen häufig an Kontaktstellen des Sarkolemms mit dem junktionalen SR vor, den sog. Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten (Prosser et al. 2010; Franzini-Armstrong et al. 1999). Diese SR-Kontaktstellen bilden Nanodomänen aus, die ein Attoliter großes zytoplasmatisches Kompartiment, die sog. dyadische Spalte, definieren (Prosser et al. 2010). In dieser Ca^{2+} -Freisetzungseinheit liegen LTCC unmittelbar gegenüber von Ryanodinrezeptor- (RyR2) Freisetzungskanälen verankert im junktionalen SR (Wehrens et al. 2005). So kann ein relativ kleiner Ca^{2+} -Einstrom via LTCC in der dyadischen Spalten die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration lokal erhöhen, was einen signifikant größeren Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR durch RyR2-Kanäle induziert.

Dieses Modell der Amplifikation wird „Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung“ oder „CIRC“ genannt.

RyR2-Cluster kommen in atrialen und ventrikulären Herzmuskelzellen regelmäßig entlang der Z-Linie vor. Während die Mehrheit der ventrikulären RyR2-Cluster direkt mit LTCC in den Membrantubuli des TAT-Netzwerkes in Verbindung stehen, sind gemäß bisheriger Modelle die meisten atrialen RyR2-Cluster im nicht-junktionalen SR lokalisiert (Bootman et al. 2006). Folglich würde die schnelle (elektrisch kontrollierte) intrazelluläre Ca²⁺-Ausbreitung durch junctionale RyR2-Cluster hauptsächlich an der Zelloberfläche aktiviert und sich über Diffusion und nicht-junctionale RyR2-Cluster bis ins Zentrum der Zelle ausbreiten. Daraus resultiert ein U-förmiger transversaler Ca²⁺-Transient, auch als zentripetale Ca²⁺-Ausbreitung beschrieben (Kockskämper et al. 2001; Thul et al. 2012) (Abb. 1B). Zudem soll die Ca²⁺-Ausbreitung durch oberflächennahe Mitochondrien und SR Ca²⁺-Pumpen (SERCA) weiter verzögert werden (Mackenzie et al. 2004). Studien in Rattenherzen zeigten, dass die Expression von SERCA2 in atrialen – verglichen mit ventrikulären Myozyten – erhöht ist, womit eine gesteigerte SR Ca²⁺-Aufnahme und ein höherer SR Ca²⁺-Gehalt erklärt wird (Minajeva et al. 1997).

Intrazellulär bindet Ca²⁺ an Troponin-C, was eine Konformationsänderung im Troponin-Tropomyosin-Komplex bewirkt, wodurch Myosin an Aktin bindet. Es kommt zur ATP-Hydrolyse durch Myosin, und Kontraktionskraft wird generiert (Fearnley et al. 2011). In Kardiomyozyten vom Hund, Kaninchen, Mehrschweinchen, von der Ratte und der Maus konnten höhere atriale als ventrikuläre Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten gemessen werden (Lüss et al. 1999). Interessanterweise exprimieren atriale Myozyten größere Mengen der Myosin-schweren-Kette- α -Isoform, die verglichen mit der β -Isoform eine höhere enzymatische Actomyosin-ATPase-Aktivität aufweist (Reiser und Kline 1998), was einen schnelleren atrialen Kontraktionszyklus erklärt. Von der Myosin-Leichtkette-2 sind generell zelltypspezifische atriale und ventrikuläre Isoformen bekannt, die unterschiedliche Ca²⁺-Sensitivitäten aufzeigen (Pawloski-Dahm et al. 1998).

Durch spannungsabhängige Aktivierung verzögerter K⁺-Ströme (*ultrarapid*, I_{Kur}; *rapid*, I_{Kr}; und *slow*, I_{Ks}) kommt es schließlich zur Repolarisation, und intrazelluläres Ca²⁺ wird wieder durch SERCA2 in SR-Speicher aufgenommen.

Kardiomyozyten exprimieren zusätzlich spannungsunabhängige K^+ -Kanäle, die die Erregbarkeit der Zelle energieabhängig beeinflussen können. Hierzu gehört die Familie der metabolisch sensitiven K_{ATP} -Kanäle. K_{ATP} -Kanäle werden durch die Bindung von MgADP an die Sulfonylharnstoffrezeptor- (SUR) Untereinheit aktiviert und koppeln so den metabolischen Status der Zelle mit der Membranspannung, was bei Energiearmut (Steigerung der ADP:ATP Ratio) beispielsweise in Stresssituationen zur Hyperpolarisation führt (Zingman et al. 2002). Auf diese Weise können K_{ATP} -Kanäle Kardiomyozyten in Phasen von Ischämien oder anhaltender β -adrenerger Stimulation vor unkontrolliertem Ca^{2+} -Einstrom und Verlängerung des Aktionspotentials schützen, wie in genetisch veränderten Mauslinien gezeigt wurde (Miki et al. 2002; Suzuki et al. 2002; Yamada et al. 2006).

1.3 Der sekretorische Pfad

Das raue ER als prinzipieller Ort der Proteinbiosynthese wird in Kardiomyozyten durch das perinukleäre ER repräsentiert. Für die SR-Proteine Calsequestrin, Junktin und Triadin konnte gezeigt werden, dass sie perinukleär synthetisiert und zellweit in das SR verteilt werden (McFarland et al. 2010; Sleiman et al. 2015). Es wurde jedoch nicht ausgeschlossen, dass auch das SR zur Proteinbiosynthese befähigt ist. Im Allgemeinen werden bestimmte Proteine im Anschluss an die Synthese im ER über ER-Austrittspunkte zum Golgi-Apparat transportiert. Hier sind Regulatorproteine, insbesondere die Proteinkomplexe COPII und COPI, für den anterograden bzw. retrograden Proteintransport zwischen ER und Golgi verantwortlich (Gürkan et al. 2006; Hsu et al. 2009). Die von ihnen zu transportierenden Proteine werden *Cargo*-Proteine genannt. Der Golgi-Apparat gliedert sich weiter in cis-, medial- und trans-Golgi-Netzwerke, in denen unterschiedliche posttranslationale Proteinmodifikationen wie Glykosylierungen stattfinden, die von spezifischen Glycosyltransferasen abhängig sind (Reynders et al. 2011). Das trans-Golgi-Netzwerk stellt eine wichtige Sortierstation dar, von der aus neu synthetisierte Proteine mittels distinkter Transportproteine an verschiedene Domänen der Zelle wie das Sarkolemm, den TT oder den Glanzstreifen befördert werden (Guo et al. 2014). Durch die zellweite Verteilung mehrerer Golgi-Elemente innerhalb des Myozyten (Oddoux et al. 2013) (Abb. 1A) könnte der Golgi-Apparat als Speichort für den regulierten Transport spezifischer Proteine dienen.

Etablierte Beispiele für den regulierten Transport von Proteinen in Kardiomyozyten sind der LTCC $Ca_v1.2$ und die *Gap junction*-Untereinheit Cx43, die zielgerichtet zu den TT bzw. zu den Glanzstreifen transportiert werden (Zhang und Shaw 2013). Kürzlich publizierte Studien zum spannungsabhängigen Na^+ -Kanal $Na_v1.5$ zeigen auf, wie der Ionenkanal entweder im Sarkolemm (Shy et al. 2014) oder in den Glanzstreifen verankert wird (Makara et al. 2014). Das Verständnis dieser Transportmechanismen ist potentiell von großer Bedeutung, um die Ursache bestimmter Ionenkanalerkrankungen, sog. Kanalopathien, zu verstehen und behandeln zu können (Curran und Mohler 2015). Für den Proteintransport metabolisch aktiver K_{ATP} -Kanäle, der im Folgenden näher analysiert werden soll, ist bekannt, dass er vom Membranporteinkomplex COPI und den zytosolischen 14-3-3-Proteinen abhängig ist (Michelsen et al. 2005; Heusser et al. 2006). Unklar ist jedoch, welche Relevanz die Regulation von K_{ATP} durch COPI/14-3-3 in terminal differenzierten Zellen wie atrialen und ventrikulären Myozyten hat.

2 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

2.1 *Super-hub-Ca²⁺*-Signalmechanismus in atrialen Myozyten

2.1.1 Tansversal-axiales Tubulumembran-Netzwerk

Das komplexe und regelartig organisierte ventrikuläre TAT-Netzwerk wurde mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie und Superresolution *Stimulated-Emission-Depletion* (STED) Nanoskopie in intakten Kardiomyozyten charakterisiert (Soeller und Cannell 1999; Wagner et al. 2012). Weitere Studien zeigten *Remodeling*-Veränderungen des TAT-Netzwerkes bei Hypertrophie nach induziertem Myokardinfarkt (Wagner et al. 2012). Um individuelle Komponenten des atrialen TAT-Netzwerkes optisch aufzulösen, entwickelten wir Protokolle, die a) eine kontrollierte Isolation atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten aus dem Mäuseherzen reproduzierbar ermöglichen, b) direkte Membranfärbungen für Fluoreszenz-Bildgebungen des TAT-Netzwerkes z.B. mithilfe des Styrolfarbstoffes di-8-ANEPPS gestatten sowie c) eine direkte quantitative Analyse bestimmter TAT-Strukturen zulassen (Wagner et al. 2014). Die Isolation atrialer Myozyten ist verglichen mit ventrikulären Zellen deutlich schwieriger. Das atriale Gewebe lässt sich durch Kollagenase-Lösung einerseits schlechter verdauen und ist andererseits im Mäuseherzen mit bloßem Auge nicht abgrenzbar. Darüber hinaus ist die atriale Myozytenmembran leichter verletzbar.

Auf Basis der oben genannten Protokolle konnte in allen untersuchten atrialen Herzmuskelzellen aus Maus oder Ratte ein komplexes, zellweites TAT-Netzwerk dargestellt werden (Abb. 2). Das atriale TAT-Netzwerk der Maus ist hauptsächlich aus axialen Tubuli (AT) aufgebaut, welche als dominanter Peak im Orientierungshistogramm sichtbar sind (Abb. 2). Axiale Tubuli sind dabei kontinuierlich mit dem Sarkolemm über wenige transversale Tubuli verbunden. Die TAT-Strukturen reichen tief ins Zentrum der Zelle und umschließen die Kernregion. Zellweit ist die TAT-Netzwerkdichte (pro μm^2) ca. ein Viertel niedriger als in ventrikulären Myozyten, was durch signifikant weniger transversale Tubuli erklärt wird, die das ventrikuläre TAT-Netzwerk dominieren.

Bereits bei konfokaler Vergrößerung erschien der Durchmesser axialer Tubuli in atrialen Zellen größer als in ventrikulären Myozyten. Mittels STED-Nanoskopie ließ sich nachweisen, dass atriale axiale Tubuli mit einem Durchmesser von ca.

300 nm rund 50 % größer als ventrikuläre Tubuli sind. Elektronentomographische Rekonstruktionen zeigten ebenfalls sehr voluminöse axiale Tubuli, die besonders große SR-Junktionen ausbilden. Diese AT-SR-Junktionen wiesen dabei den für Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten typischen Abstand von ca. 15 nm auf.

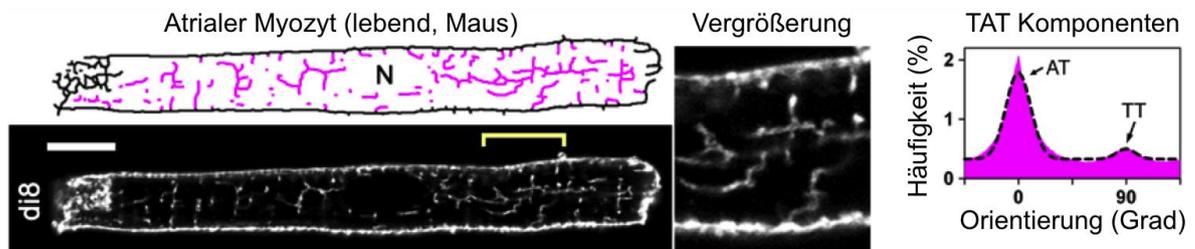


Abbildung 2: Das TAT-Netzwerk in atrialen Myozyten besteht hauptsächlich aus axialen Tubuli.

Konfokale Aufnahme eines di-8-ANEPPS (di8) gefärbten lebenden atrialen Myozyten. Das TAT-Membrannetzwerk wurde in Pink digitalisiert. Maßstab 10 µm. Der Bereich der Vergrößerung wird per Klammer im Übersichtsbild angedeutet. N, Nukleus. Das Histogramm zeigt die TAT-Komponenten als Ergebnis einer Orientierungsanalyse. Das Maximum bei 0° repräsentiert axiale Tubuli (AT), das Maximum bei 90° transversale Tubuli (TT). n = 36 atriale Myozyten. Abbildung modifiziert nach Brandenburg et al. 2016a.

2.1.2 Hochspezialisierte SR-Junktionen an axialen Tubulismembranen

Die Immunfärbung für RyR2-Kanäle zeigte in isolierten atrialen Myozyten der Maus eine streifenartige Anordnung von RyR2-Clustern entlang der Z-Linien der Sarkomere. Die Nächster-Nachbar-Analyse in STED-Aufnahmen ließ vermuten, dass atriale RyR2-Cluster in transversalen Streifen näher beieinander liegen als ventrikuläre RyR2-Cluster. Aber auch zwischen den Streifen waren unerwarteter Weise RyR2-Cluster zu erkennen. In der Co-Immunfärbung von RyR2 mit RyR2-pS2808 (Antikörper erkennt spezifisch das RyR2-Ser2808 PKA-phosphorylierte Epitop) wurde deutlich, dass atriale Myozyten perlschnurartig angeordnete axiale Reihen von PKA-hyperphosphorylierten RyR2-Clustern enthalten (Abb. 3A). Die Co-Immunfärbung von RyR2-pS2808 und Caveolin-3 (Cav3), einem Markerprotein des TAT-Netzwerkes (Abb. 1A), bestätigte die Vermutung, dass PKA-hyperphosphorylierte RyR2-Cluster mit axialen Tubuli assoziiert sind (Abb. 3B). Analoge *in-situ*-Experimente für RyR2-pS2814 zeigten, dass zusätzlich CaMKII-hyperphosphorylierte axiale RyR2-Cluster-Reihen vorliegen. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass atriale Myozyten zwei differentiell regulierte RyR2-Cluster-Populationen aufweisen: 1.) niedrigphosphorylierte nicht-junktionale RyR2-Cluster entlang transversaler Streifen und 2.) PKA- und/oder CaMKII-

hyperphosphorylierte funktionale RyR2-Cluster, assoziiert mit axialen Tubuli und dem Sarkolemm.

Andere Arbeitsgruppen konnten zuvor β -Adrenozeptoren und Adenylatcyclase-5/6-Signalstrukturen in ventrikulären TT belegen, die zu einer lokal begrenzten Synthese von cAMP beitragen (Nikolaev et al. 2010; Gao et al. 1997). Möglicherweise sorgen axialen Tubuli ebenfalls für eine lokalisierte Regulation von cAMP, welche eine Aktivierung der beiden Kinasen PKA und CaMKII und damit eine lokal begrenzte Phosphorylierung des RyR2-Kanals bewirkt. Bekannt ist ferner, dass sowohl die PKA-Phosphorylierung an RyR2-Ser2808 als auch die CaMKII-Phosphorylierung an RyR2-Ser2814 die Ca^{2+} -Sensitivität des RyR2-Kanals erhöhen (Lehnart et al. 2005; Wehrens et al. 2006; Wehrens et al. 2004), was die physiologische Relevanz der differentiellen RyR2-Cluster-Phosphorylierung aufzeigt.

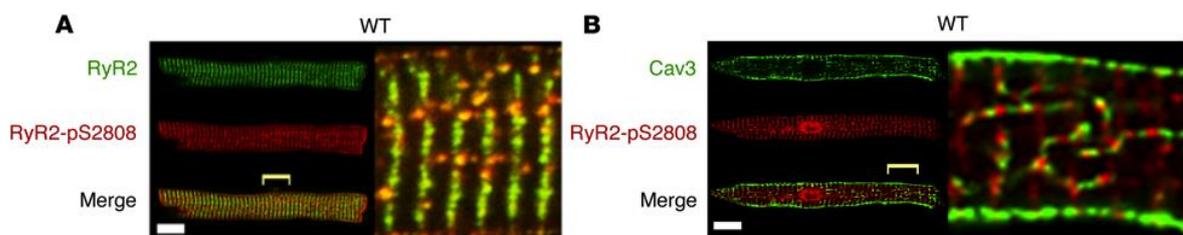


Abbildung 3: Differentielle Regulation der Phosphorylierung von RyR2-Clustern.

(A) Atrialer Myozyt immungefärbt für RyR2 (grün) und PKA-phosphoryliertes RyR2-Ser2808 (rot). Hyperphosphorylierte RyR2-Cluster (gelb) zeigen eine perlschnurartige zentrale Anordnung auf, während niedrigphosphorylierte RyR2-Cluster (grün) der Z-Streifung folgen. (B) Die Co-Färbung für Cav3 (grün) und PKA-phosphoryliertes RyR2-Ser2808 (rot) zeigt, dass hyperphosphorylierte RyR2-Cluster mit Cav3-Clustern auf axialen Tubulusstrukturen perlschnurartig alternieren. Die Bereiche der Vergrößerungen werden im Übersichtsbild durch Klammern angedeutet. WT, Wildtyp. Maßstab 10 μm . Abbildung modifiziert nach Brandenburg et al. 2016a.

2.1.3 Axiale Tubuli steuern intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung

Ohne Kenntnis der atrialen TAT-Architektur war bisher das Modell U-förmiger Ca^{2+} -Transienten gültig (Bootman et al. 2006) (s. Kapitel 1.2). Folglich stellte sich die Frage, wie das hier erstmals charakterisierte zellspezifische atriale TAT-Netzwerk und die assoziierten hyperphosphorylierten RyR2-Cluster funktionell auf das Ca^{2+} -Signalverhalten der atrialen Myozyten wirken.

Zunächst wurden LTCC ($\text{Ca}_v1.2$) auf axialen Tubuli nachgewiesen. Die Co-Immunfärbung $\text{Ca}_v1.2$ und Cav3 zeigte eine hohe Dichte von $\text{Ca}_v1.2$ -Clustern auf atrialen Tubulusstrukturen, die insgesamt häufiger in axialen als transversalen

Tubuli dokumentiert wurden. Anschließend wurde ein kombiniertes Protokoll angewendet, um Ca^{2+} -Transienten mithilfe des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffes fluo-4 in Kombination mit dem Membranfarbstoff di-8-ANEPPS zu messen (Wagner et al. 2012). Transversales *Line-Scanning* lebender atrialer Myozyten während elektrischer Stimulation zeigte ein robustes, von axialen Tubuli ausgehendes Ca^{2+} -Signal (Abb. 4). Die zeitliche Latenz des Ca^{2+} -Signals wurde systematisch für unterschiedliche Lokalisationen in den gemessenen Myozyten analysiert: axialer Tubulus, Sarkolemm und Membran-freies Zytosol. Bemerkenswerterweise stieg das Ca^{2+} -Signal am axialen Tubulus wenige Millisekunden vor dem Ca^{2+} -Signal des Sarkolemm an, ehe mit einer Latenz von mehr als 10 ms das Ca^{2+} -Signal im Membran-freien Zytosol folgte (Abb. 4). Ähnliche Ergebnisse wurden unter direkter Spannungskontrolle atrialer Zellen mithilfe von *Patch-clamp*-Messungen reproduziert. Der frühere Start des Ca^{2+} -Signals an axialen Tubuli kann u.a. durch die großvolumigen Dimensionen der TAT-Strukturen und hyperphosphorylierte junctionale RyR2-Cluster im Atrium erklärt werden.

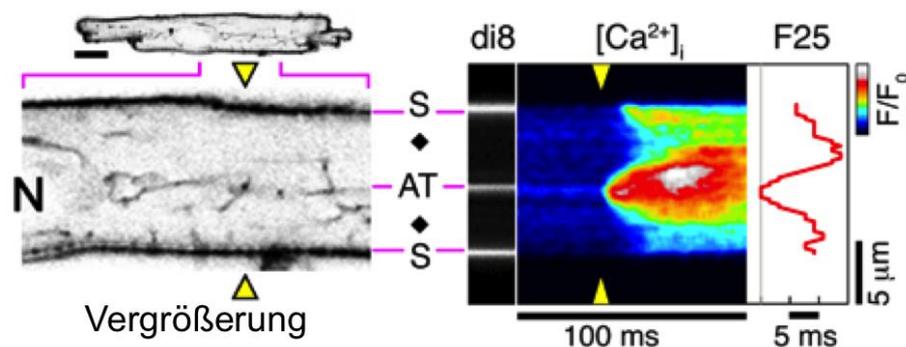


Abbildung 4: Intrazellulärer Ca^{2+} -Transient aktiviert durch axiale Tubuli und Sarkolemm.

Ausschnitt eines di-8-ANEPPS (di8) gefärbten lebenden atrialen Myozyten im Negativkontrast (links). Die gelben Pfeile markieren Stellen, an denen der Ca^{2+} -Transient in der Zelle (rechts), ausgelöst durch ein Feldpotential, mithilfe des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffes fluo-4 gemessen wurde. Der Ca^{2+} -Transient beginnt zunächst direkt am axialen Tubulus (AT), ehe das submembranöse (S) und zuletzt das zytologische Signal (schwarze Raute) folgen. F25, Ca^{2+} -Signalbeginn ab einer Schwelle von 25 % der Signalamplitude; F/F_0 , normalisierte Fluoreszenzintensität; N, Nucleus. Abbildung modifiziert nach Brandenburg et al. 2016a.

Daraufhin wurden atriale Ca^{2+} -Transienten auf die Parameter Amplitude, Ca^{2+} -Anstieg und Ca^{2+} -Abfallrate untersucht, die sich alle signifikant höher darstellten, verglichen zu Transienten aus ventrikulären Myozyten. Des Weiteren konnte mithilfe von Koffeinapplikation (10 mM) dokumentiert werden, dass das atriale SR signifikant höhere Ca^{2+} -Konzentration enthält. Über einen erhöhten Ca^{2+} -Gehalt in atrialen Myozyten war zuvor in Rattenmyozyten berichtet worden

(Walden et al. 2009), was mit einer erhöhten SERCA2-Expression im Atrium erklärt wird. Auch in meinen Experimenten zeigte sich eine mehr als doppelt so hohe SERCA2-Expression, verglichen zum ventrikulären Gewebe. Interessanterweise wurde zudem eine zehnfach niedrigere Proteinexpression von Phospholamban, einem Inhibitor der SERCA2-Pumpfunktion, gemessen (Brandenburg et al. 2016a).

Da axiale Tubuli einen signifikant größeren Durchmesser in atrialen Myozyten aufweisen (s. Kapitel 2.1.1) und daher mehr und womöglich größere junctionale RyR2-Cluster funktionell koppeln, die zudem hyperphosphoryliert sind und einem großen SR Ca^{2+} -Gradienten unterliegen, war anzunehmen, dass axiale Tubuli auch spontane Ca^{2+} -Signale, sog. Ca^{2+} -*Sparks*, beeinflussen (Cheng et al. 1993). Mithilfe des kombinierten Farbstoffprotokolls (fluo-4 und di-8-ANEPPS) zeigten sich nach 1 Hz-Feldstimulation ungewöhnlich große Ca^{2+} -*Sparks*, die wiederholt von axialen Tubuli generiert wurden. Um die LTCC-Aktivität zu kontrollieren, wurden atriale Myozyten unter *Patch clamp* fünfmal depolarisiert, um nach zellulärer Repolarisation auf -50 mV spontane intrazelluläre Ca^{2+} -Signale zu messen. Die *Spark*-Analyse konnte bestätigen, dass Ca^{2+} -*Sparks*, ausgehend vom Sarkolemm oder von nicht-junctionalen RyR2-Clustern, signifikant kleiner und deutlich seltener waren als solche, die lokal an axialen Tubuli generiert wurden. Somit werden an atrialen SR-Junctionen axialer Tubuli Ca^{2+} -*Macrosparks*, also besonders große lokale Ca^{2+} -Signale, generiert, die eine *Super-hub*-Funktion axialer Tubuli in Atrien unterstützen.

Um lokale und globale Ca^{2+} -Signale in atrialen Myozyten simulieren und funktionelle Konsequenzen mechanistisch vorhersagen zu können, wurde ein vorbestehendes mathematisches Modell mit den experimentell gewonnenen Parametern adaptiert (Wescott et al. 2016). Das atriale Computermodell stellt eine einzelne Z-Linie des atrialen Sarkomers aus RyR2-Clustern dar. Niedrig- oder hyperphosphorylierte RyR2-Cluster, die zufällig verteilt sind, enthalten jeweils 35 RyR2-Kanäle. Stochastische Modellierungen reproduzierten Ca^{2+} -*Macrosparks*, ausgehend von (AT-assoziierten) hyperphosphorylierten, aber nicht von niedrig-phosphorylierten RyR2-Clustern. Ein systematischer Vergleich bestätigte ferner, dass das atriale Modell die real gemessenen Ca^{2+} -*Spark*-Dimensionen vergleichbar reproduziert (Brandenburg et al. 2016a).

2.1.4 β -adrenerge Stimulation rekrutiert nicht-junktionale RyR2-Cluster

Im Kontrast zur funktionellen Bedeutung hyperphosphorylierter RyR2-Cluster für lokale Ca^{2+} -Signale atrialer Myozyten ist die überwiegende Zahl von RyR2-Clustern nicht-junktional und somit niedrigphosphoryliert. Deshalb wurde die Rekrutierung der niedrigphosphorylierten RyR2-Cluster während akuter β -adrenerger Stimulation mit dem β -Agonisten Isoproterenol (ISO, 1 μM) untersucht, indem die Intensität des RyR2-pS2808-Signals der RyR2-Cluster-Streifung unter Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 10, 20, 60 s) bestimmt wurde. Dazu wurden zwei gleich große zentrale und submembranöse Zellbereiche verglichen mit dem Resultat, dass bereits nach 20 s die Intensität des RyR2-pS2808-Signals in beiden Zellbereichen signifikant ansteigt, wobei der zentrale Zellbereich eine schnellere oder effizientere cAMP-abhängige Phosphorylierung von RyR2 zeigte. Um eine maximale Phosphorylierung von RyR2 zu erreichen, wurde zusätzlich der selektive Phosphodiesterase-4D-Inhibitor Rolipram ergänzt (RO, 10 μM). Die kombinierte ISO/RO-Behandlung für 10 min konvertierte sämtliche RyR2-Cluster in die hyperphosphorylierte Form. Ähnliche Ergebnisse wurden durch analoge Experimente hinsichtlich der RyR2-S2814-Phosphorylierungsstelle erzielt, auch wenn die Konversion der RyR2-pS2814-Intensität schwächer ausfiel. Intrazelluläre Ca^{2+} -Signalmessungen in atrialen Myozyten während kontinuierlicher β -adrenerger Stimulation (1 μM ISO/ 10 μM RO) zeigten ein verändertes Profil der gemessenen Ca^{2+} -Transienten unter 0,5 Hz Stimulation, was durch eine beschleunigte Aktivierung nicht-junktionaler Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten erklärt wird. Während der Beginn des Ca^{2+} -Signals unverändert von axialen Tubuli ausging, zeigte sich zusammenfassend ein signifikant beschleunigtes Verhalten der Membran-freien zytosolischen Ca^{2+} -Freisetzung und des gesamten Ca^{2+} -Transientenprofils.

β -adrenerge Stimulation aktiviert eine Signalkaskade, die zum Anstieg von intrazellulärem cAMP führt. cAMP wird in diesem Signalweg nachweislich durch TT-gebundene Adenylatcyclase-5/6 in ventrikulären Myozyten generiert (Gao et al. 1997). Auf Proteinebene konnte ich zeigen, dass die Adenylatcyclase-5/6 in atrialem und ventrikulärem Gewebe auf ähnlichem Niveau exprimiert wird. Anders verhält es sich mit der Proteinexpression der katalytischen Untereinheit der PKA, die zweifach stärker im Atrium exprimiert wird. Eine funktionelle Rolle höherer PKA-Expression wird durch biochemische Daten belegt, welche eine erhöhte

atriale Kapazität für die cAMP-abhängige Regulation von RyR2-Clustern unterstützen. Immunoblots zeigten, dass der maximale Phosphorylierungsgrad von RyR2 durch PKA und CaMKII während β -adrenerger Stimulation in atrialem Herzmuskelgewebe höher ist als in ventrikulärem Gewebe.

2.1.5 Subzelluläre Regulationsmechanismen atrialer Zellkontraktion

Unter basalen Bedingungen zeigten isolierte atriale Myozyten eine schnellere Kontraktionskinetik als ventrikuläre Myozyten. Sowohl die Amplitude der maximalen Sarkomerverkürzung als auch die Kontraktionsgeschwindigkeit waren in atrialen Zellen signifikant höher als in ventrikulären Myozyten. Bei β -adrenerger Stimulation wurden in atrialen und ventrikulären Zellen gesteigerte Kontraktionsparameter erreicht, aber die absoluten Werte waren stets höher in atrialen Myozyten. Im Gegensatz dazu löste die Behandlung mit dem PKA-Inhibitor H89 (1 μ M) eine deutlich reduzierte Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit in atrialen Myozyten aus. Um den Phosphorylierungseffekt von RyR2 auf die Zellkontraktion spezifisch zu testen, wurden atriale Muskelzellen von RyR2-S2808A^{+/+}- bzw. RyR2-S2814^{+/+}-Knockin Mäusen analysiert, bei denen die PKA- bzw. CaMKII-Phosphorylierungsstelle am RyR2-Kanal mittels Austausch von Serin zu Alanin abladiert wurde (Wehrens et al. 2006; Chelu et al. 2009). Tatsächlich zeigten beide Knockin-Mauslinien eine signifikante Reduktion der atrialen Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit, wobei sich der Effekt von RyR2-S2808A^{+/+} signifikant größer im Vergleich zu RyR2-S2814^{+/+} darstellte. Aufgrund des größeren RyR2-S2808A^{+/+}-Effektes auf die zelluläre Kontraktion wurden RyR2-S2808A^{+/+}-Mäuse durch linksatriale Echokardiographie untersucht, um die Kontraktionsergebnisse *in vivo* zu bestätigen. Zwar entwickelten RyR2-S2808A^{+/+}-Mäuse normale linksatriale diastolische Parameter, doch die fraktionale Verkürzung in der Systole war um ca. 25 % reduziert. Zusammengefasst führt die genetische Ablation der PKA-Phosphorylierungsstelle Ser2808 im RyR2-Kanal zu einer verminderten atrialen Kontraktion.

Da atriale Myozyten ein heterogenes Ca²⁺-Transientenprofil zeigten, stellte sich die Frage, ob schnelle Ca²⁺-Freisetzung an axialen Tubuli und die damit verbundene Verzögerung im Membran-freien Zytosol subzellulär auch die Kontraktion beeinflusst. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde eine Knockin-Mauslinie herangezogen, bei der das Sarkomerprotein Titin am C-terminalen Ende

mit GFP fusioniert ist (da Silva Lopes et al. 2011), sodass die M-Bande in lebenden atrialen Kardiomyozyten konfokal visualisiert werden kann. Vergleichende Untersuchungen der Kontraktion sarkolemmaler und zentraler Zellbereiche zeigten, dass oberflächliche Zellbereiche mit einer mittleren Latenz von etwa 7 ms langsamer kontrahieren als zentrale Bereiche. Dieses unterschiedliche transversale Kontraktionsverhalten war bisher nicht bekannt und kann durch die zellspezifischen axialen Tubuli und eine schnelle zentrale Ca^{2+} -Freisetzung erklärt werden. Dagegen war unter β -adrenerger Stimulation die subzelluläre Kontraktionslatenz nicht mehr nachweisbar, was durch die Rekrutierung nicht-junktionaler RyR2-Cluster via PKA-/CaMKII-Phosphorylierung erklärbar ist (s. Kapitel 2.1.4).

2.1.6 Pathomechanismen bei druckinduzierter atrialer Hypertrophie

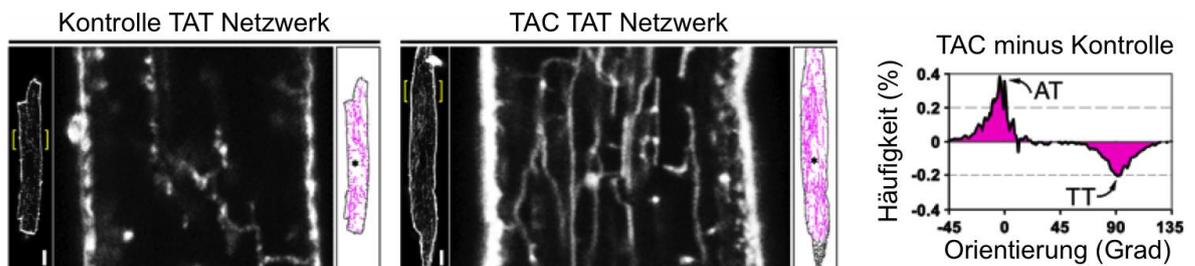


Abbildung 5: Atriale Zellhypertrophie induziert eine Proliferation axialer Tubuli.

Konfokale Lebendzellbilder des TAT-Netzwerkes mithilfe von di-8-ANEPPS in linksatrialen Myozyten von Kontroll- und TAC-Mäusen verdeutlicht, dass axiale Tubuli in hypertrophierten Zellen nach TAC proliferieren. Das TAT-Membranskelett wurde in Pink visualisiert. Die Bereiche der Vergrößerungen werden im Übersichtsbild durch Klammern angedeutet. Maßstab 10 μm . *, Nukleus. Das Histogramm visualisiert die Subtraktionanalyse der TAT-Komponenten aus den jeweiligen Orientierungshistogrammen (TAC - Kontrolle), um die Veränderungen nach TAC zu zeigen: Die Menge an axialen Tubuli (0°) nimmt zugunsten von transversalen Tubuli (90°) zu. n = 34 Sham und 44 TAC Zellen von 3/4 Herzen. Abbildung modifiziert nach Brandenburg et al. 2016a.

Die Hypertrophie atrialer Myozyten und die damit einhergehenden *Remodeling*-Prozesse werden als zentrale Ursachen reduzierter atrialer Kontraktilität diskutiert (Ramadeen et al. 2012). Zudem stellen sie entscheidende Risikofaktoren für die Entstehung von Vorhofflimmern dar (Schotten et al. 2011). Die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen atrialer Hypertrophie, kontraktile Dysfunktion und Vorhofflimmern sind bislang jedoch nicht hinreichend erklärt. Zur Induktion einer zellulären atrialen Hypertrophie wurde in dieser Arbeit das Modell der druckinduzierten Hypertrophie verwendet (*transaortic constriction*, TAC) (adaptiert nach Toischer et al. 2010). Das TAC-Mausmodell führt durch

chirurgische transaortale Konstriktion zwischen dem *Truncus brachiocephalicus* und der *Arteria carotis communis sinistra* primär zur erhöhten Nachlast des linken Ventrikels, der eine systolische Funktionsstörung entwickelt und, so unsere Hypothese, sekundär die Druckbelastung auf das linke Atrium überträgt. Vier Wochen nach TAC zeigten sich in TAC-operierten Mäusen echokardiographisch vergrößerte diastolische Parameter und eine signifikant reduzierte fraktionale systolische Verkürzung des linken Atriums verglichen zu Kontrolltieren. Es stellte sich die Frage, welche zellulären Veränderungen mit dem kontraktile Funktionsverlust des linken Atriums nach TAC einhergehen (Brandenburg et al. 2016a).

Nach Isolation wiesen linksatriale TAC-Myozyten eine signifikante zelluläre Hypertrophie mit einer Zunahme der planaren xy-Zellfläche auf etwa 130 % auf. In der Membranfärbung zur Darstellung der TAT-Strukturen zeigte sich überdies eine signifikante Proliferation axialer Tubuli (Abb. 5), was auch zu einer Zunahme der TAT-Netzwerkdichte führte. Die axiale Tubulusproliferation führte in der TAC-Zelle zu veränderten Ca^{2+} -Transienten, die eine geringere Membran-freie zytosolische Ca^{2+} -Freisetzung zeigten. Biochemische Analysen ergaben zusätzlich eine Reduktion der RyR2-Gesamtproteinmenge nach TAC, die allerdings mit einer erhöhten PKA-Phosphorylierung von RyR2-S2808 einherging. Im Gegensatz dazu konnte für die CaMKII-Phosphorylierungsstelle RyR2-S2814 keine Veränderung festgestellt werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinexpression von SERCA2 nach TAC signifikant reduziert ist, was eine verminderte SR Ca^{2+} -Aufnahme belegt. Zusammengenommen ist eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität des RyR2-Kanals durch gesteigerte PKA-Phosphorylierung als auch eine herabgesetzte SR Ca^{2+} -Aufnahme durch reduzierte SERCA2-Proteinexpression zu erwarten. Somit wäre die Wahrscheinlichkeit einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung nach TAC-Hypertrophie gesteigert, was in der Folge Arrhythmien durch Ca^{2+} -Wellen triggern könnte.

Interessanterweise zeigte die RyR2-Cluster-Analyse in Übereinstimmung mit den biochemischen Daten eine geringere zellweite Dichte von RyR2-Clustern nach TAC bei einem gleichzeitig signifikant erhöhten Anteil an hyperphosphorylierten RyR2-pS2808-Clustern. Zusammenfassend ergibt sich, dass in hypertrophierten linksatrialen Myozyten vier Wochen nach TAC eine signifikante Proliferation

axialer Tubuli mit einer Zunahme PKA-hyperphosphorylierter RyR2-Cluster einhergeht, was insgesamt zu einer früheren Ca^{2+} -Freisetzung durch nicht-junktionale RyR2-Cluster und zu chronisch veränderten Ca^{2+} -Signalen führt.

2.2 Regulation der Erregbarkeit atrialer und ventrikulärer Myozyten durch differentiellen Transport von K_{ATP} -Kanalkomplexen

2.2.1 Proteinexpression von K_{ATP} -Untereinheiten in atrialen und ventrikulären Myozyten

K_{ATP} -Kanäle bestehen aus heteromultimeren Membranproteinkomplexen, die aus jeweils vier porenbildenden α -Untereinheiten Kir6.1 (*KCNJ8*) oder Kir6.2 (*KCNJ11*) und vier Sulfonylharnstoffrezeptor- (β -) Untereinheiten SUR1 (*ABCC8*) oder SUR2 (*ABCC9*) aufgebaut sind (Nichols 2006). Bei der Untereinheit SUR2 existieren zusätzlich zwei *Splice*-Varianten, SUR2A und SUR2B. Die Koexpression beider Kanaluntereinheiten ist notwendig, um die funktionale Oberflächenexpression von K_{ATP} -Kanälen zu erzielen (Tucker et al. 1997). Nur durch Assemblierung eines vollständigen heterooktameren Membrankomplexes werden ER-Retentionssignale von Kir6.2 und SUR1 maskiert, welche den anterograden Proteintransport verhindern (Zerangue et al. 2001). Dabei wurden der *Coat protein complex I* (COPI) und zytosolische 14-3-3-Isoformen als putative Gegenspieler eines regulierten K_{ATP} -Transportes in heterologen Expressionssystemen identifiziert, die ER-Retentionssignale erkennen und K_{ATP} im sekretorischen Pfad effizient zurückhalten bzw. antagonistisch eine Oberflächenexpression ermöglichen (Michelsen et al. 2005; Heusser et al. 2006).

K_{ATP} -Kanäle koppeln die elektrische Erregbarkeit der Zelle mit dem metabolischen Status, wodurch diverse physiologische Funktionen in verschiedenen Geweben reguliert werden. Der Pankreas-spezifische Kanalkomplex SUR1-Kir6.2 stellt beispielsweise einen Mechanismus zur Ausschüttung von Insulin bei erhöhten Blutzuckerspiegeln dar und ist Angriffspunkt der antidiabetisch wirksamen Sulfonylharnstoffe. Im Myokard führt die Aktivierung von K_{ATP} bei Energiemangel zur Hyperpolarisation von Kardiomyozyten, was vor exzessivem Ca^{2+} -Einstrom schützt (Zingman et al. 2002) (s. Kapitel 1.2). Alle vier K_{ATP} -Kanaluntereinheiten wurden im Herzen identifiziert (Philip-Couderc et al. 2008). Studien mit Knockout-Mäusen zeigten, dass SUR2A und Kir6.2 wichtige Komponenten ventrikulärer K_{ATP} -Kanäle darstellen, während SUR1 und Kir6.2 im Atrium vorkommen (Flagg et al. 2008).

Ausgehend von Membranpräparationen aus atrialem und ventrikulärem Gewebe der Maus wurde die Proteinexpression der K_{ATP} -Untereinheiten SUR1, SUR2A

und Kir6.2 im Immunoblot untersucht. Während substantielle Mengen SUR1 und Kir6.2 überraschenderweise in beiden Gewebetypen zu finden waren (Abb. 6), konnte SUR2A nur im Ventrikel nachgewiesen werden. Konfokale Immunfärbungen bestätigten frühere Ergebnisse, dass SUR2A-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle in ventrikulären Myozyten auf dem Sarkolemm und in T-Tubuli exprimiert werden (Korchev et al. 2000).

Sowohl SUR1 als auch SUR2A sind Glykoproteine; für SUR1 wurden Asn10 und Asn1050 als N-Glycosylierungsstellen nachgewiesen (Conti et al. 2002), für SUR2 werden die Positionen Asn9 und Asn330 als potentielle N-Glycosylierungsstellen vorhergesagt. Durch enzymatische Analyse von Glykosylierungsprodukten lässt sich der regulierte Transportweg von Glykoproteinen innerhalb der Zelle nachvollziehen. Eine schrittweise Proteinglykosylierung von K_{ATP} basiert auf verschiedenen Enzymen in unterschiedlichen Kompartimenten des sekretorischen Pfades. Glykane, die im ER angefügt werden (Kern-Glykosylierung), können durch Behandlung mit Endoglycosidase H (Endo H) entfernt werden, während komplexere Glykanstrukturen aus dem Golgi Endo H resistent sind. Das Enzym Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) spaltet hingegen alle Typen der N-Glykosylierung ab. Darüber hinaus reflektiert der Glykosylierungsstatus von SUR auch die Komplexbildung mit Kir6: Bleiben ER-Retentionssignale von SUR aufgrund mangelnder Verfügbarkeit von Kir6 exponiert, verbleibt das Membranprotein im ER, wird lediglich Kern-glykosyliert und ist somit weiter Endo H sensitiv (Zerangue et al. 2001).

In Herzen von *Kcnj11*^{-/-} Mäusen (Kir6.2-Knockout) zeigten sich SUR1 (Abb. 6A) und SUR2A im Gegensatz zu Wildtyp-Proben nur Kern-glykosyliert, was nahelegt, dass Kir6.2 die zugrundeliegende α -Untereinheit für die Komplexbildung mit kardialen SUR1 und ventrikulärem SUR2A ist. Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinexpression von atrialem und ventrikulärem Kir6.2 in *Abcc8*^{-/-}-Mäusen (SUR1-Knockout) signifikant reduziert ist. Folglich werden in Wildtyp-Mäusen vollständig assemblierte SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle in atrialen und ventrikulären Myozyten exprimiert.

2.2.2 Differentielle Glykosylierung reflektiert zelltypspezifische Transportmechanismen von SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanalkomplexen

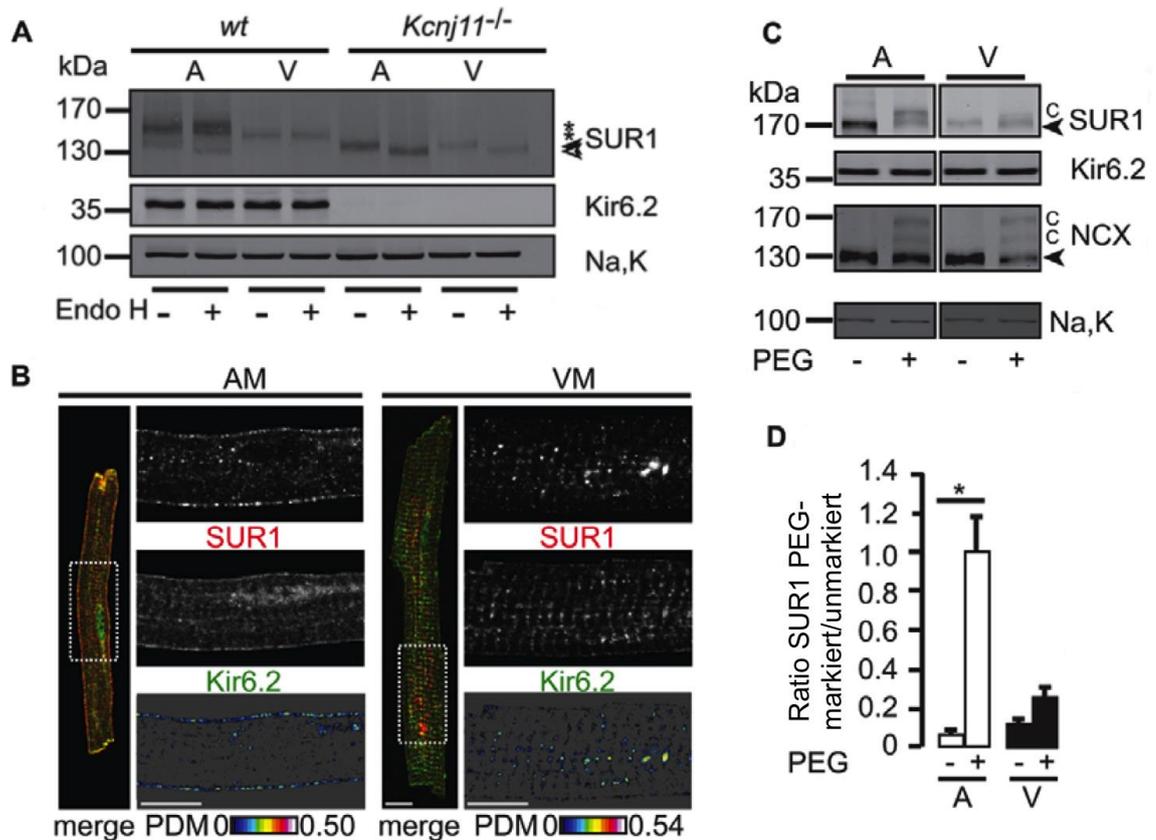


Abbildung 6: SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle sind in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten unterschiedlich lokalisiert.

(A) Western Blots für SUR1, Kir6.2 und die Na^+K^+ -ATPase (Na,K) von Membranpräparationen aus atrialem (A) und ventrikulärem (V) Gewebe von Wildtyp- oder *Kcnj11*^{-/-}-Mäusen. Unten angezeigt wird die Behandlung mit oder ohne Endoglycosidase H (Endo H); offener Pfeil, deglykosyliertes; ausgefüllter Pfeil, Kernglykosyliertes; und *, komplex-glykosyliertes SUR1. (B) Vergleichende konfokale Analyse immungefärbter atrialer (AM) und ventrikulärer (VM) Myozyten. SUR1 (rot) und Kir6.2 (grün) sind entsprechend der Markierung im Übersichtsbild vergrößert. Das nukleäre Kir6.2 Signal ist unspezifisch (kontrolliert durch den Knockout *Kcnj11*^{-/-}). PDM (*product from the differences of the mean*) quantifiziert den Grad der Co-Lokalisation durch Intensitätskorrelationsanalyse (Li 2004). Maßstab 10 μ m. (C) Zelloberflächen-PEGylierung in intakten Mäuseherzen bestätigt die Oberflächenexpression von SUR1 in atrialen (A) im Gegensatz zu ventrikulären (V) Myozyten. Modifizierte Banden sind mit C markiert. Ausgefüllter Pfeil, nicht markiertes Produkt. (D) Das Säulendiagramm visualisiert die Ratio von PEGyliertem zu nicht markiertem SUR1 für atriales (A) und ventrikuläres (V) Gewebe. *, $p < 0,05$. Abbildung modifiziert nach Arakel et al. 2014.

Interessanterweise zeigte die ventrikuläre Bande des komplex-glykosylierten SUR1 im Immunoblot eine etwas schnellere Migration als die atriale SUR1-Bande (Abb. 6A). Dennoch war ventrikuläres SUR1 Endo H insensitiv und ließ sich durch PNGase F spalten. Deshalb wurde angenommen, dass sich atriales und ventrikuläres SUR1 im Grad der Komplex-Glykosylierung unterscheiden. In konfokalen Co-Immunfärbungen von SUR1 und Kir6.2 wurde deutlich, dass SUR1-haltige K_{ATP} -Kanäle in den beiden Zelltypen unterschiedlich lokalisiert sind

(Abb. 6B): Während atriales SUR1 und Kir6.2 oberflächlich im Sarkolemm co-lokalisieren, ist ventrikuläres SUR1 hauptsächlich in intrazellulären Strukturen mit Kir6.2 co-lokalisiert. Dieser wichtige Befund wurde mithilfe einer komplementären biochemischen Methode bestätigt: Durch Markieren von extrazellulären Cysteinen mit konjugierenden Polyethylenglykolketten (PEGylierung) wurde die Oberflächenexposition der Membranproteine quantifiziert (Abb. 6A und B). Atriales SUR1 zeigte sich in diesem Experiment mindestens dreimal stärker PEGyliert als ventrikuläres SUR1, was eine Retention von ventrikulärem SUR1 in intrazellulären Strukturen nahelegt.

Knockout-kontrollierte Co-Immunfärbungen von SUR1 mit dem cis-Golgi-Marker p115 (Nakamura et al. 1997) zeigten, dass die Mehrheit der SUR1-positiven K_{ATP} -Kanäle im Golgi lokalisiert ist. Durch Behandlung von SUR1 mit Neuraminidase, einer Sialinsäure-spaltenden Glycosidase, wurde die atriale SUR1-Bande im Immunoblot in etwa auf die Höhe der ventrikulären Spezies gebracht. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass atriales SUR1 mit zusätzlichen Sialinsäureresten glykosyliert ist. Da Sialyltransferasen im medial- und trans-Golgi-Kompartiment vorkommen (Zhao et al. 2006), kann abgeleitet werden, dass ventrikuläre SUR1-positiv K_{ATP} -Kanäle bis zum medialen Golgi gelangen, wo sie vermutlich von COPI erkannt und retrograd transportiert werden.

2.2.3 Produktive Oberflächenexpression von ventrikulären SUR1-haltigen K_{ATP} -Kanälen durch PKA-Phosphorylierung von Kir6.2

Da in ventrikulären Myozyten komplett assemblierte SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle im Golgi gespeichert nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, welcher Mechanismus zur funktionellen Oberflächenexpression dieses K_{ATP} -Pools führt. Zingman *et al.* konnten zeigen, dass K_{ATP} -Kanäle zur Verkürzung des kardialen Aktionspotentials bei β -adrenerger Stimulation beitragen (Zingman et al. 2002). Die genaue SUR-Komposition der verantwortlichen K_{ATP} -Kanäle blieb jedoch ungeklärt. Isolierte ventrikuläre Myozyten aus intakten Mäuseherzen, die mit dem β -Agonisten Isoproterenol (ISO 10 μ M) in Kombination mit dem Phosphodiesterase-4D-Inhibitor Rolipram (10 μ M RO) perfundiert wurden, wiesen nach 1 h ein eindeutig reorganisiertes SUR1-Signalmuster auf, das hauptsächlich der Sarkomerstreifung folgte. Eine Co-Immunfärbung von SUR1 und dem Na^+/Ca^{2+} -Austauscher NCX1, ein Marker für das ventrikuläre TT-System,

erbrachte eine relevante Co-Lokalisation der beiden Membranproteine nach ISO/RO-Behandlung, sodass eine cAMP-abhängige Translokation von SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanälen hin zu TT-Membranen wahrscheinlich schien. In *Patch-clamp*-Messungen ventrikulärer Myozyten bestätigte sich mithilfe des SUR1-spezifischen K^+ -Kanalöffners Diazoxid (300 μ M) ein signifikant erhöhter K_{ATP} -Strom nach ISO/RO-Behandlung.

Damit wurde gezeigt, dass β -adrenerge Stimulation ein ausreichender Stimulus für die Oberflächentranslokation von SUR1-Kir6.2 Komplexen darstellt. Als zellulärer Mechanismus erschien denkbar, dass eine direkte PKA-Interaktion zur Oberflächenexpression des SUR1-Kir6.2 Membrankomplexes beiträgt. Deshalb wurde eine Immunopräzipitation mit einem Antikörper durchgeführt, der spezifisch phosphorylierte PKA-Zielmotive erkennt. Diese Immunopräzipitation reicherte viel mehr Kir6.2-Protein aus solubilisierten Membranpräparationen ISO/RO-behandelter Ventrikel an als aus Kontrollgewebe. Weitere Affinitätsanreicherungen bestätigten eine PKA-Phosphorylierung von Kir6.2. Somit konnte angenommen werden, dass β -adrenerge Stimulation die PKA-abhängige Phosphorylierung von ventrikulärem Kir6.2 induziert.

In-vitro-Experimente zeigten ferner, dass ein rekombinant hergestelltes Kir6.2-Peptid der C-terminalen 36 Aminosäuren durch das endogene kardiale PKA-Enzym phosphoryliert wird. Eine frühere Studie mit rekombinanten K_{ATP} -Untereinheiten konnte nachweisen, dass Kir6.2 an Ser372 phosphoryliert wird (Beguin et al. 1999), welches interessanterweise an ein Arg-basiertes ER-Retentionssignal angrenzt. Entsprechend reduzierte die PKA-Phosphorylierung des C-terminalen Kir6.2-Peptids signifikant die Bindung von COPI und 14-3-3, die unter Kontrollbedingungen stabil an das dephosphorylierte Kir6.2-Kontrollpeptid banden. Diese Daten legen folglich nahe, dass die PKA-Phosphorylierung von Kir6.2 ventrikuläre SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle vor COPI-abhängiger ER-Retention schützt, wodurch eine Translokation vom frühen Golgi zur TT-Oberflächenmembran möglich wird (Abb. 7). Zusätzlich schirmt PKA-Phosphorylierung von Kir6.2 den SUR1-Kir6.2 Komplex vor Interaktion mit freien 14-3-3-Proteinen ab.

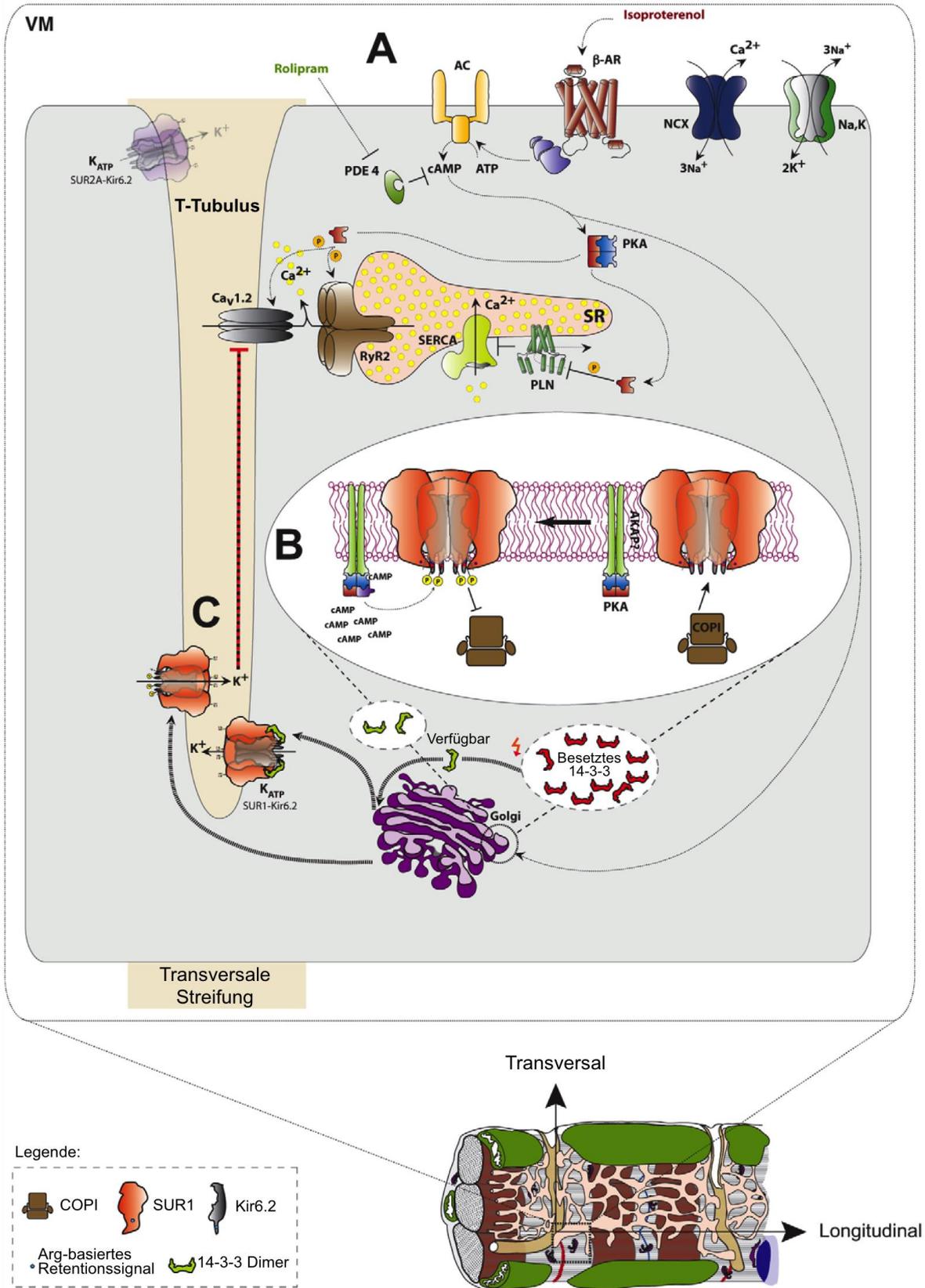


Abbildung 7: Modell der Regulation von SUR1-Kir6.2 K_{ATP}-Kanälen in ventrikulären Kardiomyozyten.

(A) Selektive Aktivierung des β-Adrenorezeptors (β-AR) durch Isoproterenol stimuliert die Adenylatcyclase (AC) mithilfe des stimulatorischen G-Proteins, was einen cAMP-Anstieg und die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) verursacht. Die Degradation von cAMP wird durch den selektiven Phosphodiesterase-4- (PDE 4) Inhibitor Rolipram gehemmt. PKA phosphoryliert u.a. den spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanal Ca_v1.2 sowie

den Ryanodinrezeptor Ca^{2+} -Freisetzungskanal RyR2, sodass die systolische Ca^{2+} -Konzentration durch einen gesteigerten extrazellulären Einstrom und eine erhöhte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gesteigert wird. Durch Phosphorylierung von Phospholamban (PLN) wird die Inhibition der SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) aufgehoben. Zur Vereinfachung wurde das PKA Holoenzym zytosolisch und nicht membrangebunden dargestellt. NCX, Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher; Na,K, Na^+ - K^+ -ATPase. (B) Die PKA-abhängige Phosphorylierung von Ser372 direkt angrenzend an das Arg-basierte ER-Retentionssignal von Kir6.2 entlässt im Golgi gespeicherte SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle aus der COPI-Bindung, was zur verstärkten Oberflächenexpression der K_{ATP} -Kanäle führt. Ein hypothetisches *kinase anchoring protein* (AKAP) lokalisiert PKA in die Nähe der K_{ATP} -Kanäle. (C) Transport von SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanälen vom Golgi zur TT-Membran. Zusätzlich ist denkbar, dass die Signalkaskade den freien Pool an 14-3-3-Proteinen beeinflusst und auf diese Weise die Oberflächenexpression von 14-3-3-Substraten wie K_{ATP} -Kanäle fördert. Abbildung modifiziert nach Arakel et al. 2014.

Es stellte sich nun die Frage, warum ventrikuläre 14-3-3-Proteine nicht unabhängig von äußeren Stimuli die Oberflächenexpression von SUR1-Kir6.2 Komplexen befördern. Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene zeigten, dass die Menge aller sechs in Kardiomyozyten exprimierten 14-3-3-Isoformen im Ventrikel relativ zum Atrium deutlich reduziert ist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Menge an verfügbarem 14-3-3 in terminal differenzierten Zellen wie ventrikulären Kardiomyozyten die Oberflächenexpression bestimmter *Cargo*-Proteine limitieren könnte. Atriale Myozyten scheinen im Gegensatz dazu ausreichend 14-3-3-Proteine zu exprimieren, sodass SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle die Zelloberfläche unter basalen Bedingungen erreichen können. Dieser differentielle Mechanismus könnte für weitere Proteine eine wichtige Rolle spielen. Für die 14-3-3-abhängigen *Cargo*-Proteine TASK-1 und ADAM22 konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie in der Abwesenheit von 14-3-3-Proteinen in cis- oder medial-Golgi-Kompartimenten akkumulieren (Zuzarte et al. 2009; Gödde et al. 2006). Bei TASK-1 führen zwei unterschiedliche Phosphorylierungsstellen entweder zur Reduktion der COPI- oder 14-3-3-Bindung (Kilisch et al. 2016).

Anders als SUR1-haltige K_{ATP} -Kanäle werden ventrikuläre SUR2A-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle trotz limitiertem 14-3-3 konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert. Möglicherweise ist dieser Unterschied dadurch erklärt, dass SUR2 ein deutlich schwächeres Arg-basiertes ER-Retentionssignal (-RKQ-) aufweist als SUR1 (-RKR-) und die Kanaluntereinheit SUR2A damit weit weniger von 14-3-3-Interaktionen abhängig ist (Konstas et al. 2002; Michelsen et al. 2005; Zerangue et al. 2001). Verglichen mit SUR2A ist SUR1 deutlich sensitiver für Aktivierung durch MgADP, sodass die passagere Oberflächenexpression von SUR1-Kir6.2 die Herzmuskelzelle empfindlicher für potentiell schädliche Energiedefizite macht (Masia et al. 2005).

2.2.4 Der Einfluss von ventrikulären SUR1-abhängigen K_{ATP} -Kanälen auf das kardiale Aktionspotential

Gemäß publizierter Daten können K_{ATP} -Kanäle bei anhaltender β -adrenerger Stimulation zur Verkürzung der Aktionspotentialdauer von Kardiomyozyten beitragen (Zingman et al. 2002). In den genannten Untersuchungen wurde allerdings nur die Rolle von Kir6.2 als entscheidende α -Untereinheit nachgewiesen, während bezüglich der regulatorischen SUR-Komponente keine Aussage getroffen wurde. Da oben aufgeführte Daten zeigten, dass ventrikuläre SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle unter β -adrenerger Stimulation auf TT-Membranen exprimiert werden, wurden Aktionspotentialmessungen mithilfe von *Optical Mapping* an Wildtyp- und *Abcc8*^{-/-}-Ventrikeln (SUR1-Knockout) unter Kontrollbedingungen, Behandlung mit ISO/RO sowie unter ISO/RO-Behandlung mit gleichzeitiger Anwesenheit von Glibenclamid (10 μ M) durchgeführt. Glibenclamid ist ein unspezifischer K_{ATP} -Kanal-Inhibitor und soll als Kontrolle einen K_{ATP} -Effekt unterbinden. Während sowohl in *Abcc8*^{-/-}-Herzen unter ISO/RO-Behandlung als auch in Wildtyp-Herzen unter ISO/RO- plus Glibenclamid-Behandlung keine Veränderungen auftraten, wurde in Wildtyp-Herzen unter ISO/RO-Behandlung eine signifikante Verkürzung der Aktionspotentialdauer gemessen. Diese Ergebnisse belegen somit eine physiologische Funktion PKA-regulierter Oberflächentranslokation von SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanälen unter β -adrenerger Stimulation in intakten Mäuseherzen.

3 Diskussion der Ergebnisse

3.1 Spezifische Mechanismen atrialer und ventrikulärer Myozyten

3.1.1 Implikationen der atrialen *Super-hub*-Ca²⁺-Freisetzung

Die dargestellten Ergebnisse unterstützen ein neuartiges Modell der Ca²⁺-Signalverarbeitung in atrialen Myozyten, das konzeptionell als *Super-hub Ca²⁺ Signaling* beschrieben wurde. Ausgangspunkt des intrazellulären atrialen Ca²⁺-Signals sind axiale Tubuli, die die Myozyten als Teil des zellweiten TAT-Netzwerkes durchziehen. Innovative Bildgebungsverfahren wie STED und Elektronentomographie belegen ein signifikant größeres Volumen der axialen im Vergleich zu transversalen Tubuli. Axiale Tubuli koppeln funktionell besonders ausgedehnte zentrale RyR2-Cluster, die zusätzlich durch PKA- und CaMKII-Phosphorylierung als maßgebliche Trigger für eine hochlokalisierte intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung agieren. Dabei bildet die besondere Form des atrialen Ca²⁺-Transienten die Grundlage für eine schnellere Zellkontraktion, die aus dem Zentrum der Zelle über axiale Tubuli initiiert wird. Nicht-junktionale, niedrigphosphorylierte RyR2-Cluster sind dagegen Teil der regulierten inotropen Reserve. Dies ermöglicht atriale Myozyten, die Zellkontraktion effektiv zu beschleunigen und adäquat auf die Anforderungen β -adrenerger Stimulation zu antworten.

Die Erarbeitung der hier dargestellten Daten wurde durch eine geeignete Isolationstechnik atrialer Myozyten und neue hochauflösende Bildgebungsverfahren ermöglicht (Wagner et al. 2014). Über die „Signalplattform“ des axialen Tubulus wird dabei das physiologische Verständnis atrialer Myozyten neu definiert. Ohne die Kenntnis des TAT-Netzwerkes in atrialen Myozyten wurde bisher von einer durch Diffusion getragenen Ca²⁺-Signalausbreitung ausgegangen (Bootman et al. 2006), die jedoch die schnelleren atrialen im Gegensatz zu ventrikulären Kontraktionsparametern nicht erklärt (Lüss et al. 1999). Eine subsarkolemmale Lücke zwischen oberflächennahen und zentralen RyR2-Clustern (Mackenzie et al. 2004) kann durch hier gezeigte Immunfärbungen bestätigt werden, doch eine Verzögerung der atrialen Ca²⁺-Transienten wird durch diese Lücke aufgrund des zellweiten TAT-Netzwerkes nicht erreicht. Axiale Tubuli aktivieren hochphosphorylierte RyR2-Cluster für eine schnelle Kontraktion zentraler Myofilamente, was durch U-förmige Ca²⁺-Transienten mit einer

Verzögerung bis zu 100 ms (Kirk et al. 2003) nicht erklärt werden kann. Zudem zeigen die Resultate, dass sich atriale und ventrikuläre Myozyten nicht nur durch Zellgröße sondern auch durch funktionelle Mechanismen grundlegend unterscheiden, die für die propagierte Erregungsausbreitung im Myokard bis in subzelluläre Strukturen verantwortlich sind. Bisher wurde vermutet, dass atriale Myozyten aufgrund ihrer geringeren Zellgröße im Vergleich zu ventrikulären Myozyten kein TAT-Netzwerk für die elektromechanische Kopplung benötigen (Thul et al. 2012). Einer Korrelation zwischen Zellgröße und TAT-Netzwerkdichte muss entsprechend den oben aufgeführten Ergebnissen jedoch widersprochen werden.

Mithilfe des mathematischen Simulationsmodells der Ca^{2+} -Ausbreitung in atrialen Myozyten können zellspezifische Mechanismen der Ca^{2+} -Signalverarbeitung und potentielle arrhythmogene Ursachen weiter herausgearbeitet werden (Wescott et al. 2016). Zukünftige Forschungsvorhaben können aufbauend auf den hier erarbeiteten zellspezifischen Charakteristika translationale Grundlagenforschung hin zu klinischen Interventionen z.B. bei Vorhofflimmern entwickeln. Außerdem tragen die Erkenntnisse möglicherweise dazu bei, dass das Verständnis von der Ca^{2+} -Freisetzung ventrikulärer Myozyten überdacht wird. Beispielsweise standen bisher T-Tubuli im Zentrum der kardiovaskulären Forschung, obwohl publizierte Daten belegen, dass auch ventrikuläre Zellen robuste axiale Tubuli ausbilden (Wagner et al. 2014). Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass axiale Tubuli in ventrikulären Myozyten $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle enthalten, die mit RyR2-Clustern colokalisieren (Asghari et al. 2009) als Hinweis für funktionelle Kopplung.

3.1.2 Bedeutung des differentiellen K_{ATP} -Kanal-Transportes

Die differentielle Expression verschiedener K_{ATP} -Kanalkomplexe in atrialen und ventrikulären Myozyten ist ein wichtiges und neues Beispiel für den regulierten Transport von Ionenkanälen, um die beiden Zelltypen mit unterschiedlichen metabolischen und elektrischen Funktionen auszustatten. Durch konstitutive Oberflächenexpression von SUR1-Kir6.2 weisen atriale Myozyten K_{ATP} -Kanäle auf, die verglichen mit SUR2A-Kir6.2 wesentlich sensitiver für metabolische Veränderungen sind (Masia et al. 2005). Ventrikuläre Myozyten hingegen können mit der konstitutiven Oberflächenexpression von SUR2A-Kir6.2 und dem passageren Einsatz von SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanälen flexibel auf unterschiedliche

zelluläre Stressbedingungen reagieren. Eine entscheidende Funktion haben dabei die in den relativ großen Herzmuskelzellen verteilten Golgi-Elemente. Eine ausschließlich vom perinukleären Golgi ausgehende Reaktion auf β -adrenerge Stimulation wäre möglicherweise verlangsamt oder ineffektiv. Würden ventrikuläre Myozyten dagegen auf vesikulär gespeicherte SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle verzichten und stattdessen auf die ständige Assemblierung der K_{ATP} -Kanäle angewiesen sein, wäre eine Stressregulation vermutlich ebenso nur verzögert möglich.

Mit den aufgezeigten Daten wurde zudem der funktionelle Antagonismus zwischen dem Proteinkomplex COPI einerseits und 14-3-3-Proteinen andererseits in einem terminal differenzierten, adulten Zellesystem bestätigt. In heterologen Expressionssystemen dagegen ist weder die Menge an 14-3-3-Proteinen physiologisch titriert, noch muss das vorhandene 14-3-3 einem so großen Pool unterschiedlicher *Cargo*-Proteine gleichzeitig gerecht werden wie in ventrikulären Myozyten, sodass die Relevanz der Mechanismen nur in terminal differenzierten Zellen zum Tragen kommt. Der COPI-abhängige Speichermechanismus im Golgi könnte für weitere Proteine bedeutsam sein. Bemerkenswerterweise befinden sich neben vielen bisher charakterisierten Arg-basierten Retentionssignalen anderer Proteine ähnlich wie bei Kir6.2 flankierende Serin-Motive, von denen manche als Phosphorylierungsstelle identifiziert wurden (Arakel et al. 2014). Gelingt es, unterschiedliche COPI-abhängige *Cargo*-Proteine zu charakterisieren und systematische Angriffspunkte der Proteinregulation zu manipulieren, könnten sich effektive Therapiestrategien für unterschiedliche medizinische Bereiche ableiten lassen.

3.2 TAC als Modell für progressives atriales *Remodeling*

Das TAC Modell wurde 1991 erstmals angewendet (Rockman et al. 1991). Seither ist es eines der am weitesten verbreiteten Nagermodelle zur Induktion einer linksventrikulären Hypertrophie (Lygate 2006). Die Drucküberbelastung bei TAC induziert rasch die Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie, doch kann die linksventrikuläre Pumpfunktion in den ersten zwei Wochen kompensiert werden (Nakamura et al. 2001). Später führen maladaptive *Remodeling*-Prozesse zur linksventrikulären Dilatation und systolischen Insuffizienz (Toischer et al. 2010; Liao et al. 2002). Obwohl die Aortenkonstriktion bei TAC in etwa die

Aortenklappenstenose beim Menschen nachstellt, ist die plötzliche Induktion eines transaortalen Gradienten von ca. 80 mmHg nur eingeschränkt mit der langsameren Entwicklung einer Aortenklappenstenose beim Menschen vergleichbar (Patten und Hall-Porter 2009).

In dieser Arbeit wurden linksatriale Myozyten der Maus nach TAC untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass es vier Wochen nach TAC zur linksatrialen systolischen Insuffizienz und diastolischen Dysfunktion sowie zur zellulären Hypertrophie mit signifikanter Proliferation axialer Tubuli und Zunahme hyperphosphorylierter RyR2-Cluster kommt. Funktionell ergibt sich daraus ein eindeutig pathologisches Ca^{2+} -Signalverhalten der hypertrophierten linksatrialen Myozyten. Somit kann eine reproduzierbare TAC-Intervention auch für Untersuchungen atrialer Hypertrophie- und *Remodeling*-Mechanismen angewandt werden. Der Einsatz von Mäusen, insbesondere der Einsatz genetisch veränderter Linien, macht TAC für Untersuchungen atrialer Pathomechanismen besonders attraktiv, da bislang auf Großtiermodelle wie Hund oder Schaf zurückgegriffen werden musste (Dibb et al. 2009; Lenaerts et al. 2009; Yeh et al. 2008; Vest 2005). Während bezweifelt wurde, dass supraventrikuläre Arrhythmien wie Vorhofflimmern in Säugetieren nicht induziert werden können („Kritische Masse“-Hypothese) (Winfree 1994), wurde vor Kurzem eine Mauslinie beschrieben, die aufgrund einer Mutation im Na^+ -Kanal $\text{Na}_v1.5$ spontan Vorhofflimmern entwickelt (Wan et al. 2015).

Ein Vergleich der hier dargestellten atrialen *Remodeling*-Mechanismen nach TAC mit anderen Tiermodellen aus der Literatur zeigt zum Teil übereinstimmende, aber auch kontroverse Ergebnisse. In atrialen Myozyten von Kaninchen, die fünf Tage mit schneller atrialer Stimulation behandelt wurden, zeigte sich eine Reduktion der RyR2-Proteinexpression um etwa 50 % (Greiser et al. 2014), was gut mit den hier beschriebenen Veränderungen nach TAC (RyR2-Proteinexpression um ca. 40 % reduziert) korreliert. Greiser *et al.* entwickelten basierend auf dieser Studie das Konzept der physiologischen antiarrhythmischen Adaptation, was besagt, dass eine Abnahme von RyR2-Kanälen und Cluster-Dichte der Ca^{2+} -Instabilität in atrialen Herzmuskelzellen entgegenwirkt (Greiser et al. 2014). Zwar zeigte sich auch hier die Anzahl von RyR2-Clustern nach TAC erniedrigt, zeitgleich stieg

jedoch die Anzahl hyperphosphorylierter und damit Ca^{2+} -sensitiverer RyR2-Cluster.

Während im Modell des persistierenden Vorhofflimmerns in Schafen der Verlust atrialer TAT-Strukturen beschrieben wurde (Dibb et al. 2009; Lenaerts et al. 2009), kam es vier Wochen nach TAC zu einer offensichtlichen Proliferation axialer Tubuli (Abb. 5). Eine elektronenmikroskopische Studie von 1975 differenzierte den Grad der zellulären Veränderungen bei linksventrikulären Biopsien von Patienten unterschiedlicher kardialer Erkrankungen und konnte darlegen, dass leicht veränderte Zellen eine Zunahme an T-Tubuli aufweisen, während moderat oder stark veränderte Myozyten einen Verlust an T-Tubuli zeigen (Maron et al. 1975). Hieraus ergibt sich, dass sowohl in Tiermodellen als auch Patientenproben zukünftig der zeitliche Verlauf atrialer *Remodeling*-Prozesse genauer nachzuvollziehen ist. Erst wenn es gelingt, frühe von späten Mechanismen besser zu differenzieren, können der Beginn des Krankheitsprozesses und die entscheidenden Interventionszeitpunkte für neue Therapiestrategien rational gewählt werden.

Im Einklang mit einer signifikant erhöhten Anzahl hyperphosphorylierter RyR2-Cluster nach TAC fand sich in Patienten mit chronischem Vorhofflimmern eine erhöhte PKA-Phosphorylierung von RyR2, die als ein arrhythmogener Mechanismus postuliert wurde (Vest 2005). Da schon gesunde atriale Myozyten eine relevante Anzahl hyperphosphorylierter RyR2-Cluster aufzeigen, die für das Ca^{2+} -Signal und die zelluläre Kontraktion eine wichtige Rolle spielen, stellt sich die Frage, ob transient hoch- oder chronisch hyperphosphorylierte RyR2-Cluster prinzipiell arrhythmogen wirken. Andersherum betrachtet ließe sich fragen, wie atriale Myozyten potentielle arrhythmogene Effekte hyperphosphorylierter RyR2-Cluster kompensieren. Interessant wäre zudem, ob es auch in ventrikulären Myozyten im Rahmen von TAT-Netzwerkveränderungen zur differentiellen Regulation von RyR2-Clustern kommt.

3.3 Mögliche Konsequenzen für gültige Therapiekonzepte

Pharmakologische Substanzen, die auf K_{ATP} -Kanäle wirken, sind klinisch verbreitet. Hierzu gehört die große Gruppe der Sulfonylharnstoffe, die als erste orale Antidiabetika in drei Generationen aufgeteilt werden können: 1. Generation – z.B. Tolbutamid; 2. Generation – z.B. Glibenclamid; 3. Generation – z.B.

Glimepirid. Sie hemmen u.a. den pankreatischen SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanal, sodass die β -Zelle schneller depolarisiert und vermehrt Insulin freisetzt (insulinotroper Effekt). Die Zulassung von Sulfonylharnstoffen beschränkt sich ausschließlich auf Patienten mit Diabetes mellitus Typ II. Da Sulfonylharnstoffe zugelassen wurden, als für Patienten mit Diabetes mellitus Typ II alternativ nur die subkutane Insulininjektion in Frage kam, wurden sie häufig verordnet. Klinische Studien konnten jedoch zeigen, dass Sulfonylharnstoffe das kardiovaskuläre Risiko bei Diabetes mellitus Typ II erhöhen (Garratt et al. 1999). Der nachteilige Effekt von Sulfonylharnstoffen auf kardiovaskuläre Ereignisse kann auf Grundlage der hier dargebrachten Daten insbesondere mit der konstitutiven und zum Teil passageren Oberflächenexpression von K_{ATP} -Kanälen auf Kardiomyozyten erklärt werden. Auch die später entwickelte Gruppe der Glinide wie z.B. Repaglinid wirkt auf den Sulfonylharnstoffrezeptor und inhibitiert K_{ATP} -Kanäle. Da ein zusätzlicher Nutzen von Gliniden in klinischen Studien nicht klar belegt werden konnte, hat der Gemeinsame Bundesausschuss (höchstes Gremium der gemeinsamen Selbstverwaltung im Gesundheitswesen Deutschlands) darauf hingewirkt, dass Glinide ab dem 01.07.2016 nur noch in medizinisch begründeten Einzelfällen zulasten der gesetzlichen Krankenversicherung in Deutschland verordnet werden können (Gemeinsamer Bundesausschuss 2016). In den letzten Jahren ist eine Vielzahl neuer oraler Antidiabetika zugelassen worden, bei denen in großen klinischen Studien eine eindeutige Prognoseverbesserung bei Diabetes mellitus Typ II gezeigt werden konnte, wie z.B. Metformin als Biguanid (UKPDS Group 1998) oder Empagliflozin als Natrium-Glucose-Cotransporter-2- (SGLT2) Inhibitor (Zinman et al. 2015). Für Empagliflozin konnte sogar ein positiver Effekt betreffend primärer kardiovaskulärer Ereignisse nachgewiesen werden (Zinman et al. 2015). Deshalb stellt sich grundsätzlich die Frage, warum angesichts der kontroversen Datenlage auf Sulfonylharnstoffe oder Glinide zurückgegriffen werden sollte.

Bezüglich β - (Adrenorezeptor-) Blockern, die als Medikament der ersten Wahl bei arterieller Hypertonie in den europäischen Leitlinien empfohlen (Mancia et al. 2014) und gleichzeitig nach akutem Myokardinfarkt (Task Force STEMI ESC 2012) und in der Herzinsuffizienztherapie ab Stadium NYHA II (Ponikowski et al. 2016) eingesetzt werden, ist bekannt, dass sie den PKA-Phosphorylierungsstatus von RyR2 reduzieren (Reiken et al. 2003). Fraglich ist allerdings, ob β -Blocker ebenfalls die Phosphorylierung zentraler junctionaler RyR2-Cluster in atrialen

Myozyten beeinflussen, die bereits in Abwesenheit β -adrenerger Stimulation einen intrinsisch hohen Phosphorylierungsgrad aufweisen. Die spezifischen atrialen Wirkmechanismen von Betablockern, die auch als Antiarrhythmika bei tachykarden Herzrhythmusstörungen wie beispielsweise bei tachykardem Vorhofflimmern eingesetzt werden, sollten diesbezüglich weiter untersucht werden. Interessanterweise konnten für den RyR-Inhibitor Dantrolen kürzlich antiarrhythmische Effekte bei atrialen Myozyten aus humanen Vorhofflimmerproben nachgewiesen werden (Hartmann et al. 2016). Hartmann *et al.* zeigten eine signifikante Reduktion proarrhythmischer SR Ca^{2+} -Sparks, verzögerter Nachdepolarisationen und des diastolischen SR Ca^{2+} -Leaks bei Dantrolen behandelten atrialen Myozyten (Hartmann et al. 2016). Wegweisende klinische Studien bezüglich (supraventrikulärer) Arrhythmien stehen für den Wirkstoff Dantrolen allerdings noch aus. Möglicherweise gelingt es zukünftig, zellspezifische antiarrhythmische Strategien auf Basis der hier dargestellten Resultate zu entwickeln.

3.4 Reaktionen auf publizierte Studien

Die 2014 im Journal of Cell Science publizierte Studie „*Tuning the electrical properties of the heart by differential trafficking of K_{ATP} ion channel complexes*“ (Arakel et al. 2014) wurde seit ihrer Veröffentlichung in 17 weiteren Publikationen zitiert. Darunter sind jeweils acht Original- und Übersichtsartikel sowie eine Methodenarbeit zu finden. Die meisten Zitationen werden im Zusammenhang mit der Regulation von K_{ATP} genannt. Aber auch spezifische Regulationsmechanismen von $\text{Na}_v1.5$ und TASK-1/3 werden mit den hier dargestellten Ergebnissen verknüpft. Insbesondere die kürzlich publizierten Daten zur Phosphorylierung von TASK-1 und der damit einhergehenden Regulation der COPI-/14-3-3-Bindung zeigen (Kilisch et al. 2016), dass das hier für SUR1-Kir6.2 K_{ATP} vorgeschlagene Regulationsmodell auf weitere Proteine übertragbar sein könnte.

Die Veröffentlichung „*Axial tubule junctions control rapid calcium signaling in atria*“ erfolgte im September 2016 im Journal of Clinical Investigation (Brandenburg et al. 2016a). Mit der Publikation wurde gleichzeitig ein Kommentar der US-amerikanischen Physiologen Thomas J. Hund und Peter J. Mohler herausgegeben. Hierin wird die Studie als „experimenteller Kraftakt“ gewürdigt, der „ein

fundamentales, aber bisher vernachlässigtes Feld kardiovaskulärer Biologie erschließt“ (Hund und Mohler 2016).

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Atriale Myozyten exprimieren ein zellweites TAT-Netzwerk, welches hauptsächlich aus großvolumigen axialen Tubuli aufgebaut ist. Wenige transversale Tubuli stellen die Verknüpfung des Tubulusnetzwerkes mit dem Sarkolemm her. Bei Membrandepolarisation aktivieren axiale Tubuli über $Ca_v1.2$ -Kanäle ausgedehnte zentrale PKA- und CaMKII-hochphosphorylierte RyR2-Cluster, wodurch eine hochlokalisierte und schnelle intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung bedingt wird. Atriale Myozyten weisen, verglichen mit ventrikulären Zellen, zudem einen signifikant höheren SR Ca^{2+} -Gehalt auf, der zusätzlich zur Phosphorylierung zentraler RyR2-Cluster spontane intrazelluläre Ca^{2+} -*Macrosparks* triggert. Die hochphosphorylierten junctionalen RyR2-Cluster stellen die Grundlage für eine schnelle atriale Zellkontraktion dar, die aus dem Zentrum der Zelle initiiert wird. Durch Rekrutierung nicht-junctionaler niedrigphosphorylierter RyR2-Cluster im Rahmen β -adrenerger Stimulation kann die Kontraktion atrialer Myozyten effizient beschleunigt werden. Linksatriale Zellhypertrophie nach TAC induziert die Proliferation axialer Tubuli und führt zu einem signifikanten Anstieg hochphosphorylierter junctionaler RyR2-Cluster, woraus sich ein pathologisches zytosolisches Ca^{2+} -Signalverhalten ergibt. Dies geht mit einer systolischen Insuffizienz des linken Atriums nach TAC einher.

Die neuen Daten zum *Super-hub Ca^{2+} Signaling* ergänzen bestehende Erkenntnisse zur Biologie atrialer und ventrikulärer Myozyten und implizieren neue Fragestellungen, die zukünftig adressiert werden müssen (Hund und Mohler 2016):

a) Inwiefern lassen sich axiale und transversale Tubuli in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Protein- und Lipidbestandteile unterscheiden? Unter anderem gilt es, die Funktion wichtiger Anker- und Strukturproteine wie Ankyrin-B (Curran und Mohler 2015) oder Junctophilin-2 (Beavers et al. 2014) am axialen Tubulus zu analysieren. Die Untersuchung der molekularen Bestandteile der distinkten Tubulusmembranen könnte nicht nur das Verständnis der differentiellen Regulation der SR- Ca^{2+} -Freisetzung verbessern, sondern auch neue Therapieziele zur Kontrolle der atrialen Erregbarkeit offenlegen.

b) Gibt es weitere Ionenkanäle in atrialen *Super-hub*-Strukturen, die das lokale Signalverhalten beeinflussen? Insbesondere die Rolle der spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle erscheint in diesem Kontext interessant, da neue Daten belegen, dass die CaMKII-abhängige Regulation von $\text{Na}_v1.5$ pathophysiologische Veränderungen im Rahmen lokaler β -adrenerger Stimulation bedingt (Hund et al. 2010; Koval et al. 2012; Glynn et al. 2015).

c) Welche Mechanismen führen zur intrinsischen Phosphorylierung atrialer junctionaler RyR2-Cluster bei fehlender β -adrenerger Stimulation? Lokal erhöhte cAMP-Konzentrationen oder lokal regulierte Phosphodiesterase- oder Phosphatase-Aktivitäten könnten dabei eine entscheidende Rolle spielen (Chiang et al. 2014).

d) Besitzen hyperphosphorylierte junctionale RyR2-Cluster in Atrien eine arrhythmogene Komponente und wie wird diese durch atriale *Super-hubs* kompensiert? Hyperphosphorylierung von RyR2-Kanälen durch PKA und CaMKII wurde mit subzellulärer Arrhythmogenität in Bezug auf Vorhofflimmern in Verbindung gebracht (Vest 2005; Chelu et al. 2009).

e) Wie verändert sich das atriale TAT-Netzwerk im Rahmen physiologischer oder pathophysiologischer Stresssituationen? Während hier vier Wochen nach TAC eine Proliferation axialer Tubuli dokumentiert wurde, zeigten frühere Studien einen Verlust von transversalen Tubuli im Großtiermodell von persistierendem Vorhofflimmern (Dibb et al. 2009; Lenaerts et al. 2009).

Weiter zeigen die hier dargestellten Daten neue Einblicke in zelluläre Mechanismen der Lokalisation und des Transportes von K_{ATP} -Kanälen in atrialen und ventrikulären Myozyten. SUR1-haltige K_{ATP} -Kanäle werden konstitutiv auf der Zelloberfläche atrialer Myozyten exprimiert, was mit einer großen Menge an 14-3-3-Proteinen im Atrium korreliert, die notwendig ist, um COPI-abhängige ER-Retentionssignale von Kir6.2 und SUR1 zu überwinden. Im Gegensatz dazu werden ventrikuläre SUR1-Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle im Golgi-Apparat gespeichert und erreichen erst unter anhaltender β -adrenerger Stimulation die TT-Membranen. Ventrikuläre SUR2A-positive K_{ATP} -Kanäle dagegen werden konstitutiv auf TT-Membranen exprimiert, was möglicherweise durch ein schwächeres ER-Retentionssignal bedingt ist. Nach Phosphorylierung durch PKA können COPI und 14-3-3-Proteine nicht mehr an Kir6.2 binden, wodurch die COPI- und 14-3-3-

abhängige Kontrolle von SUR1-Kir6.2 im Ventrikel aufgehoben wird. Die funktionale Oberflächenexpression von SUR1-positiven K_{ATP} -Kanälen, die sensitiver für metabolische Veränderungen sind als SUR2A-haltige Kanäle, führt im Ventrikel zu einer signifikanten Verkürzung des Aktionspotentials und nimmt damit eine physiologische Funktion in der cAMP-abhängigen *fight-or-flight*-Reaktion des Herzens ein.

Auch in Hinblick auf die differentielle Regulation von K_{ATP} -Kanälen in Kardiomyozyten ergeben sich interessante Fragen, die in zukünftigen Studien analysiert werden sollten:

a) Gibt es neben der β -adrenergen Stimulation andere Mechanismen, die zur Oberflächenexpression der Kir6.2-SUR1 K_{ATP} -Kanäle führen? Vorstellbar wäre z.B. ein alternativer Weg zur Aktivierung der PKA-abhängigen Phosphorylierung von Kir6.2.

b) Ist die Limitation von 14-3-3-Proteinen in ventrikulären Myozyten relevant für weitere *Cargo*-Proteine und beeinflussen spezifische Signalwege den verfügbaren Pool von 14-3-3? Der K^+ -Kanal TASK-1 könnte eines der Proteine sein, die durch limitierte 14-3-3-Expression in ventrikulären Myozyten beeinträchtigt werden (Kilisch et al. 2016).

c) Ist der COPI-/14-3-3-abhängige Transportmechanismus übertragbar auf andere *Cargo*-Proteine, die ebenso im früheren sekretorischen Pfad gespeichert und nach (hormoneller) Stimulation der Zelle transloziert werden?

d) Spielen die diskutierten K_{ATP} -Regulationsmechanismen eine entscheidende Rolle im Rahmen kardialer *Remodeling*-Prozesse? Ergebnisse einer früheren Arbeit zeigen, dass eine induzierte metabolische Dysregulation von K_{ATP} -Kanälen zur Pathophysiologie der Herzinsuffizienz beiträgt (Hodgson 2003).

Hierauf basierende Studien werden das aktuelle Verständnis der kardialen Biologie erweitern und können möglicherweise zur Entdeckung neuer Therapiestrategien kardialer Krankheitsbilder führen.

4 Literaturverzeichnis

4.1 Zeitschriftenbeiträge

Andrés-Delgado L, Mercader N (2016): Interplay between cardiac function and heart development. *Biochim Biophys Acta* 1863, 1707–1716

Arakel EC, Brandenburg S, Uchida K, Zhang H, Lin Y-W, Kohl T, Schrul B, Sulkin MS, Efimov IR, Nichols CG, et al. (2014): Tuning the electrical properties of the heart by differential trafficking of KATP ion channel complexes. *J Cell Sci* 127, 2106–2119

Asghari P, Schulson M, Scriven DRL, Martens G, Moore EDW (2009): Axial tubules of rat ventricular myocytes form multiple junctions with the sarcoplasmic reticulum. *Biophys J* 96, 4651–4660

Beavers DL, Landstrom AP, Chiang DY, Wehrens XHT (2014): Emerging roles of junctophilin-2 in the heart and implications for cardiac diseases. *Cardiovasc Res* 103, 198–205

Beguín P, Nagashima K, Nishimura M, Gonoï T, Seino S (1999): PKA-mediated phosphorylation of the human KATP channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J* 18, 4722–4732

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

Bootman MD, Higazi DR, Coombes S, Roderick HL (2006): Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. *J Cell Sci* 119, 3915–3925

Brandenburg S, Kohl T, Williams GSB, Gusev K, Wagner E, Rog-Zielinska EA, Hebisch E, Dura M, Didié M, Gotthardt M, et al. (2016a): Axial tubule junctions control rapid calcium signaling in atria. *J Clin Invest* 126, 3999–4015

Brandenburg S, Arakel EC, Schwappach B, Lehnart SE (2016b): The molecular and functional identities of atrial cardiomyocytes in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1863, 1882–1893

Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort RJ, Skapura DG, Li N, Santonastasi M, Müller FU, Schmitz W, et al. (2009): Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest* 119, 1940–51

- Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB (1993): Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262, 740–744
- Chiang DY, Li N, Wang Q, Alsina KM, Quick AP, Reynolds JO, Wang G, Skapura D, Voigt N, Dobrev D, Wehrens XHT (2014): Impaired local regulation of ryanodine receptor type 2 by protein phosphatase 1 promotes atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 103, 178–187
- Conti LR, Radeke CM, Vandenberg CA (2002): Membrane Targeting of ATP-sensitive Potassium Channel. Effects of Glycosylation on Surface Expression. *J Biol Chem* 277, 25416–25422
- Curran J, Mohler PJ (2015): Alternative Paradigms for Ion Channelopathies: Disorders of Ion Channel Membrane Trafficking and Posttranslational Modification. *Annu Rev Physiol* 77, 505–524
- Dibb KM, Clarke JD, Horn MA, Richards MA, Graham HK, Eisner DA, Trafford AW (2009): Characterization of an Extensive Transverse Tubular Network in Sheep Atrial Myocytes and its Depletion in Heart Failure. *Circ Heart Fail* 2, 482–489
- Dibb KM, Clarke JD, Eisner DA, Richards MA, Trafford AW (2013): A functional role for transverse (t-) tubules in the atria. *J Mol Cell Cardiol* 58, 84–91
- Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD (2011): Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004242
- Flagg TP, Kurata HT, Masia R, Caputa G, Magnuson MA, Lefer DJ, Coetzee WA, Nichols CG (2008): Differential Structure of Atrial and Ventricular KATP: Atrial KATP Channels Require SUR1. *Circ Res* 103, 1458–1465
- Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V (1999): Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J* 77, 1528–1539
- Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S (2007): Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart: Regional ion channel subunit gene expression in the human heart. *J Physiol* 582, 675–693
- Gao T, Puri TS, Gerhardstein BL, Chien AJ, Green RD, Hosey MM (1997): Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium

channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272, 19401–19407

Garratt KN, Brady PA, Hassinger NL, Grill DE, Terzic A, Holmes DR (1999): Sulfonylurea drugs increase early mortality in patients with diabetes mellitus after direct angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 33, 119–124

Glynn P, Musa H, Wu X, Unudurthi SD, Little S, Qian L, Wright PJ, Radwanski PB, Gyorke S, Mohler PJ, Hund TJ (2015): Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo. *Circulation* 132, 567–577

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, et al. (2014): Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2014 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 129, 399–410

Gödde NJ, D'Abaco GM, Paradiso L, Novak U (2006): Efficient ADAM22 surface expression is mediated by phosphorylation-dependent interaction with 14-3-3 protein family members. *J Cell Sci* 119, 3296–3305

Greiser M, Kerfant B-G, Williams GSB, Voigt N, Harks E, Dibb KM, Giese A, Meszaros J, Verheule S, Ravens U, et al. (2014): Tachycardia-induced silencing of subcellular Ca²⁺ signaling in atrial myocytes. *J Clin Invest* 124, 4759–4772

Guo Y, Sirkis DW, Schekman R (2014): Protein Sorting at the *trans* -Golgi Network. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 169–206

Gürkan C, Stagg SM, LaPointe P, Balch WE (2006): The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 727–738

Hartmann N, Pabel S, Herting J, Schatter F, Renner A, Gummert J, Schotola H, Danner BC, Maier LS, Frey N, et al. (2016): Antiarrhythmic effects of dantrolene in human diseased cardiomyocytes. *Heart Rhythm* [Epub ahead of print]

Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann HP, Astheimer K, Pieske B, Just H (1994): Influence of the force-frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with non-failing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 15, 164–170

Heusser K, Yuan H, Neagoie I, Tarasov AI, Ashcroft FM, Schwappach B (2006):

Scavenging of 14-3-3 proteins reveals their involvement in the cell-surface transport of ATP-sensitive K⁺ channels. *J Cell Sci* 119, 4353–4363

Hodgson DM, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Bienengraeber M, Ozcan C, Gumina RJ, Pucar D, O'Coilain F, Mann DL, et al. (2003): Cellular remodeling in heart failure disrupts KATP channel-dependent stress tolerance. *EMBO J* 22, 1732–1742

Hsu VW, Lee SY, Yang J-S (2009): The evolving understanding of COPI vesicle formation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 360–364

Hund TJ, Mohler PJ (2016): Atrial-specific pathways for control of intracellular signaling and myocyte function. *J Clin Invest* 126, 3731–3734

Hund TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, Qian L, Snyder JS, Gudmundsson H, Kline CF, Davidson NP, Cardona N, et al. (2010): A βIV-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* 120, 3508–3519

Huxley HE (1961): The contractile structure of cardiac and skeletal muscle. *Circulation* 24, 328–335

Jamieson JD, Palade GE (1964): Specific Granules in Atrial Muscle Cells. *J Cell Biol* 23, 151–172

Kilisch M, Lytovchenko O, Arakel EC, Bertinetti D, Schwappach B (2016): A dual phosphorylation switch controls 14-3-3-dependent cell surface expression of TASK-1. *J Cell Sci* 129, 831–842

Kirk MM, Izu LT, Chen-Izu Y, McCulle SL, Wier WG, Balke CW, Shorofsky SR (2003): Role of the transverse-axial tubule system in generating calcium sparks and calcium transients in rat atrial myocytes. *J Physiol* 547, 441–451

Kockskämper J, Sheehan KA, Bare DJ, Lipsius SL, Mignery GA, Blatter LA (2001): Activation and propagation of Ca²⁺ release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys J* 81, 2590–2605

Konstas A-A, Koch J-P, Tucker SJ, Korbmacher C (2002): Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-dependent Up-regulation of Kir1.1 (ROMK) Renal K⁺ Channels by the Epithelial Sodium Channel. *J Biol Chem* 277, 25377–25384

- Korchev YE, Negulyaev YA, Edwards CR, Vodyanoy I, Lab MJ (2000): Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell. *Nat Cell Biol* 2, 616–619
- Koval OM, Snyder JS, Wolf RM, Pavlovicz RE, Glynn P, Curran J, Leymaster ND, Dun W, Wright PJ, Cardona N, et al. (2012): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-based regulation of voltage-gated Na⁺ channel in cardiac disease. *Circulation* 126, 2084–2094
- Lang RE, Thölken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger T (1985): Atrial natriuretic factor--a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 314, 264–266
- Lehnart SE, Wehrens XHT, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin S-LC, Conti M, Marks AR (2005): Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123, 25–35
- Lenaerts I, Bito V, Heinzl FR, Driesen RB, Holemans P, D'hooge J, Heidbuchel H, Sipido KR, Willems R (2009): Ultrastructural and Functional Remodeling of the Coupling Between Ca²⁺ Influx and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release in Right Atrial Myocytes From Experimental Persistent Atrial Fibrillation. *Circ Res* 105, 876–885
- Li Q (2004): A Syntaxin 1, G_o, and N-Type Calcium Channel Complex at a Presynaptic Nerve Terminal: Analysis by Quantitative Immunocolocalization. *J Neurosci* 24, 4070–4081
- Liao Y, Ishikura F, Beppu S, Asakura M, Takashima S, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Kuzuya T, et al. (2002): Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1703-1708
- Lüss I, Boknik P, Jones LR, Kirchhefer U, Knapp J, Linck B, Lüss H, Meissner A, Müller FU, Schmitz W, et al. (1999): Expression of Cardiac Calcium Regulatory Proteins in Atrium v Ventricle in Different Species. *J Mol Cell Cardiol* 31, 1299–1314
- Lygate C (2006): Surgical models of hypertrophy and heart failure: Myocardial infarction and transverse aortic constriction. *Drug Discov Today Dis Models* 3,

283–290

Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ, Conway SJ, Bootman MD (2004): The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction. *J Cell Sci* 117, 6327–6337

Makara MA, Curran J, Little SC, Musa H, Polina I, Smith SA, Wright PJ, Unudurthi SD, Snyder J, Bennett V, et al. (2014): Ankyrin-G Coordinates Intercalated Disc Signaling Platform to Regulate Cardiac Excitability In Vivo. *Circ Res* 115, 929–938

Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA (1977): Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol* 74, 629–645

Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, et al. (2014): 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press* 23, 3–16

Maron BJ, Ferrans VJ, Roberts WC (1975): Ultrastructural features of degenerated cardiac muscle cells in patients with cardiac hypertrophy. *Am J Pathol* 79, 387–434

Masia R, Enkvetchakul D, Nichols C (2005): Differential nucleotide regulation of K channels by SUR1 and SUR2A. *J Mol Cell Cardiol* 39, 491–501

McFarland TP, Milstein ML, Cala SE (2010): Rough endoplasmic reticulum to junctional sarcoplasmic reticulum trafficking of calsequestrin in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 49, 556–564

McNutt NS, Fawcett DW (1969): The ultrastructure of the cat myocardium. II. Atrial muscle. *J Cell Biol* 42, 46–67

Michelsen K, Yuan H, Schwappach B (2005): Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep* 6, 717–722

Midgett M, Rugonyi S (2014): Congenital heart malformations induced by hemodynamic altering surgical interventions. *Front Physiol* 5, 287

Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H, Seino S (2002): Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med* 8, 466–472

Minajeva A, Kaasik A, Paju K, Seppet E, Lompré AM, Veksler V, Ventura-Clapier

- R (1997): Sarcoplasmic reticulum function in determining atrioventricular contractile differences in rat heart. *Am J Physiol* 273, H2498-2507
- Mitchell JH, Gupta DN, Payne RM (1965): Influence of Atrial Systole on Effective Ventricular Stroke Volume. *Circ Res* 17, 11–18
- Naccarelli GV, Varker H, Lin J, Schulman KL (2009): Increasing Prevalence of Atrial Fibrillation and Flutter in the United States. *Am J Cardiol* 104, 1534–1539
- Nakamura A, Manasek FJ (1981): An experimental study of the relation of cardiac jelly to the shape of the early chick embryonic heart. *J Embryol Exp Morphol* 65, 235–256
- Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, Yee RR, Simpson PC, Grossman W, Foster E (2001): LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H1104-1112
- Nakamura N, Lowe M, Levine TP, Rabouille C, Warren G (1997): The Vesicle Docking Protein p115 Binds GM130, a cis-Golgi Matrix Protein, in a Mitotically Regulated Manner. *Cell* 89, 445–455
- Nichols CG (2006): KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470–476
- Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J (2010): Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* 327, 1653–1657
- Oddoux S, Zaal KJ, Tate V, Kenea A, Nandkeolyar SA, Reid E, Liu W, Ralston E (2013): Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J Cell Biol* 203, 205–213
- Patten RD, Hall-Porter MR (2009): Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circ Heart Fail* 2, 138–144
- Pawloski-Dahm CM, Song G, Kirkpatrick DL, Palermo J, Gulick J, Dorn GW, Robbins J, Walsh RA (1998): Effects of Total Replacement of Atrial Myosin Light Chain-2 With the Ventricular Isoform in Atrial Myocytes of Transgenic Mice. *Circulation* 97, 1508–1513

Philip-Couderc P, Tavares NI, Roatti A, Lerch R, Montessuit C, Baertschi AJ (2008): Forkhead Transcription Factors Coordinate Expression of Myocardial KATP Channel Subunits and Energy Metabolism. *Circ Res* 102, e20–e35

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC), Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 37, 2129–2200

Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ (2010): Subcellular Ca²⁺ signaling in the heart: the role of ryanodine receptor sensitivity. *J Gen Physiol* 136, 135–142

Rahimtoola SH, Ehsani A, Sinno MZ, Loeb HS, Rosen KM, Gunnar RM (1975): Left atrial transport function in myocardial infarction. Importance of its booster pump function. *Am J Med* 59, 686–694

Ramadeen A, Connelly KA, Leong-Poi H, Hu X, Fujii H, Van Krieken R, Laurent G, Holub BJ, Bazinet RP, Dorian P (2012): N-3 polyunsaturated fatty acid supplementation does not reduce vulnerability to atrial fibrillation in remodeling atria. *Heart Rhythm Off J Heart Rhythm Soc* 9, 1115–1122.e4

Reiken S, Wehrens XHT, Vest JA, Barbone A, Klotz S, Mancini D, Burkhoff D, Marks AR (2003): beta-Blockers Restore Calcium Release Channel Function and Improve Cardiac Muscle Performance in Human Heart Failure. *Circulation* 107, 2459–2466

Reiser PJ, Kline WO (1998): Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species. *Am J Physiol* 274, H1048-1053

Reynders E, Foulquier F, Annaert W, Matthijs G (2011): How Golgi glycosylation meets and needs trafficking: the case of the COG complex. *Glycobiology* 21, 853–863

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J, Chien KR (1991): Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac

hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8277–8281

Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A (2011): Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 91, 265–325

Shy D, Gillet L, Ogrodnik J, Albesa M, Verkerk AO, Wolswinkel R, Rougier J-S, Barc J, Essers MC, Syam N, et al. (2014): PDZ domain-binding motif regulates cardiomyocyte compartment-specific NaV1.5 channel expression and function. *Circulation* 130, 147–160

da Silva Lopes K, Pietas A, Radke MH, Gotthardt M (2011): Titin visualization in real time reveals an unexpected level of mobility within and between sarcomeres. *J Cell Biol* 193, 785–798

Sjostrand FS, Andersson-Cedergren E, Dewey MM (1958): The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *J Ultrastruct Res* 1, 271–287

Sleiman NH, McFarland TP, Jones LR, Cala SE (2015): Transitions of protein traffic from cardiac ER to junctional SR. *J Mol Cell Cardiol* 81, 34–45

Smyrniak I, Mair W, Harzheim D, Walker SA, Roderick HL, Bootman MD (2010): Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation-contraction coupling and inotropic stimulation. *Cell Calcium* 47, 210–223

Soeller C, Cannell MB (1999): Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circ Res* 84, 266–275

Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marbán E, Nakaya H (2002): Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest* 109, 509–516

Takekuma H (1998): Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J* 17, 3309–3316

Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC), Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blömsström-Lundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K,

- Ducrocq G, et al. (2012): ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 33, 2569–2619
- Thul R, Coombes S, Roderick HL, Bootman MD (2012): Subcellular calcium dynamics in a whole-cell model of an atrial myocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2150–2155
- Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, et al. (2010): Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122, 993–1003
- Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM (1997): Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 387, 179–183
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998): Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. *Lancet Lond Engl* 352, 854–865
- Vest JA, Wehrens XHT, Reiken S, Lehnart SE, Dobrev D, Chandra P, Danilo P, Ravens U, Rosen MR, Marks AR (2005): Defective Cardiac Ryanodine Receptor Regulation During Atrial Fibrillation. *Circulation* 111, 2025–2032
- Wagner E, Lauterbach MA, Kohl T, Westphal V, Williams GSB, Steinbrecher JH, Streich J-H, Korff B, Tuan H-TM, Hagen B, et al. (2012): Stimulated Emission Depletion Live-Cell Super-Resolution Imaging Shows Proliferative Remodeling of T-Tubule Membrane Structures After Myocardial Infarction. *Circ Res* 111, 402–414
- Wagner E, Brandenburg S, Kohl T, Lehnart SE (2014): Analysis of Tubular Membrane Networks in Cardiac Myocytes from Atria and Ventricles. *J Vis Exp* 92, e51823
- Walden AP, Dibb KM, Trafford AW (2009): Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 46, 463–473
- Wan E, Abrams J, Weinberg RL, Katchman AN, Bayne J, Zakharov SI, Yang L, Morrow JP, Garan H, Marx SO (2015): Aberrant sodium influx causes cardiomyopathy and atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest* 126, 112–122

- Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70
- Wehrens XHT, Lehnart SE, Marks AR (2005): Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol* 67, 69–98
- Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR (2006): Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 511–518
- Wescott AP, Jafri MS, Lederer WJ, Williams GSB (2016): Ryanodine receptor sensitivity governs the stability and synchrony of local calcium release during cardiac excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 92, 82–92
- Winfrey AT (1994): Electrical turbulence in three-dimensional heart muscle. *Science* 266, 1003–1006
- Wu S, Cheng C-M, Lanz RB, Wang T, Respress JL, Ather S, Chen W, Tsai S-J, Wehrens XHT, Tsai M-J, Tsai SY (2013): Atrial Identity Is Determined by a COUP-TFII Regulatory Network. *Dev Cell* 25, 417–426
- Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R (2013): Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 529–541
- Yamada S, Kane GC, Behfar A, Liu X-K, Dyer RB, Faustino RS, Miki T, Seino S, Terzic A (2006): Protection conferred by myocardial ATP-sensitive K⁺ channels in pressure overload-induced congestive heart failure revealed in KCNJ11 Kir6.2-null mutant. *J Physiol* 577, 1053–1065
- Yeh Y-H, Wakili R, Qi X-Y, Chartier D, Boknik P, Kaab S, Ravens U, Coutu P, Dobrev D, Nattel S (2008): Calcium-Handling Abnormalities Underlying Atrial Arrhythmogenesis and Contractile Dysfunction in Dogs With Congestive Heart Failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1, 93–102
- Zerangue N, Malan MJ, Fried SR, Dazin PF, Jan YN, Jan LY, Schwappach B (2001): Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 98, 2431–2436
- Zhang S-S, Shaw RM (2013): Multilayered regulation of cardiac ion channels.

Biochim Biophys Acta 1833, 876–885

Zhang Z, He Y, Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Zhang Q, Glatter KA, Xu Y, Shin H-S, Low R, Chiamvimonvat N (2005): Functional roles of Cav1.3(alpha1D) calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice. *Circulation* 112, 1936–1944

Zhao W, Chen T-LL, Vertel BM, Colley KJ (2006): The CMP-sialic acid transporter is localized in the medial-trans Golgi and possesses two specific endoplasmic reticulum export motifs in its carboxyl-terminal cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 281, 31106–31118

Zimetbaum P (2012): Antiarrhythmic drug therapy for atrial fibrillation. *Circulation* 125, 381–389

Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, et al. (2002): Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13278–13283

Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, et al. (2015): Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 373, 2117–2128

Zoni-Berisso M, Lercari F, Carazza T, Domenicucci S (2014): Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin Epidemiol* 6, 213-220

Zuzarte M, Heusser K, Renigunta V, Schlichthörl G, Rinné S, Wischmeyer E, Daut J, Schwappach B, Preisig-Müller R (2009): Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins: Intracellular traffic of TASK-1 and TASK-3. *J Physiol* 587, 929–952

4.2 Internetquelle

Gemeinsamer Bundesausschuss: G-BA setzt Verordnungseinschränkung für Glinide in Kraft (2016)

<https://www.g-ba.de/institution/presse/pressemitteilungen/604/> [Zugriff 23.10.2016]

5 Publikationsliste

Dieser kumulativen Dissertation werden folgende vier Publikationen zugrunde gelegt, die abschließend als Volltext im Dokument aufgeführt werden:

Arakel EC*, **Brandenburg S***, Uchida K, Zhang H, Lin Y-W, Kohl T, Schrul B, Sulkin MS, Efimov IR, Nichols CG, et al. (2014): Tuning the electrical properties of the heart by differential trafficking of KATP ion channel complexes. *J Cell Sci* 127, 2106–2119

<http://jcs.biologists.org/content/127/9/2106>

Brandenburg S, Kohl T, Williams GSB, Gusev K, Wagner E, Rog-Zielinska EA, Hebisch E, Dura M, Didié M, Gotthardt M, et al. (2016a): Axial tubule junctions control rapid calcium signaling in atria. *J Clin Invest* 126, 3999–4015

<http://dx.doi.org/10.1172/JCI88241>

Brandenburg S, Arakel EC, Schwappach B, Lehnart SE (2016b): The molecular and functional identities of atrial cardiomyocytes in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1863, 1882–1893

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.025>

Wagner E*, **Brandenburg S***, Kohl T, Lehnart SE (2014): Analysis of Tubular Membrane Networks in Cardiac Myocytes from Atria and Ventricles. *J Vis Exp* 92, e51823

<http://www.jove.com/video/51823>

* geteilte Erstautorenschaft

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich meinen Betreuern Professor Dr. Stephan E. Lehnart und Professorin Dr. Blanche Schwappach aussprechen, die meine Begeisterung für medizinische Grundlagenforschung geweckt und mich während dieser Arbeit intensiv und professionell begleitet haben. Insbesondere in schwierigen Phasen haben sie mir mit Rat und Tat bei Problemen im Labor und darüber hinaus zur Seite gestanden. Ohne ihre ideelle und finanzielle Förderung hätte ich keinen so spannenden Einstieg in die Wissenschaft gehabt.

Aus der Arbeitsgruppe der Translationalen Kardiologie danke ich vor allem Dr. Tobias Kohl und Dr. Eva Wagner, die mich bei den vielen zellbiologischen, tierexperimentellen und bildgebenden Verfahren ausgesprochen geduldig unterstützt haben. Ich danke Birgit Schumann, Brigitte Korff und Kirsten Koschel für ihren exzellenten technischen Support sowie Dr. Konstantin Gusev für seine Hilfe bei der Durchführung und Analyse von Calciummessungen.

Im Institut für Molekularbiologie habe ich mit Dr. Eric C. Arakel einen ausgezeichneten Lehrer für diverse biochemische Methoden gehabt, wofür ich ihm außerordentlich danke. Zudem gilt mein Dank Kirsten Unthan-Fechner für ihre technische Unterstützung.

Allen anderen Kollegen und Freunden aus den Arbeitsgruppen danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre und die schöne gemeinsame Zeit.

Ich danke Professor Dr. Gerd Hasenfuß, durch dessen Engagement diese disziplinübergreifenden Projekte im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB 1002 „Modulatorische Einheiten bei Herzinsuffizienz“ möglich geworden sind. Danke für Ihr stetes Interesse an meiner Arbeit und für Ihre Förderung.

Zudem danke ich Professor Dr. W. Jon Lederer, Professor Dr. George S.B. Williams, Professor Dr. Christopher W. Ward, Prof. Dr. Peter Kohl und Professor Dr. Colin G. Nichols für die äußerst intensive und gewinnbringende Zusammenarbeit.

Als Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes, des Otto-Hess-Promotionsstipendiums der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und des Jacob-Henle-Programms der Universitätsmedizin Göttingen bedanke ich mich für die unkomplizierte ideelle und finanzielle Förderung.