

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
(Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Effekte einer chronischen
 β -Adrenozeptor-Blockade auf die Aktivität
der Calcium-Calmodulin-Kinase II in der
Herzinsuffizienz**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Matthias Dewenter

aus

Warburg

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
Referent: Prof. Dr. med. A. El-Armouche
Ko-Referent: PD Dr. med. K. Toischer
Promotor: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 23.01.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Effekte einer chronischen β -Adrenozeptor-Blockade auf die Aktivität der Calcium-Calmodulin-Kinase II in der Herzinsuffizienz" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Physiologie des Herzens.....	1
1.2 Die β -adrenerge Signalkaskade.....	2
1.3 Herzinsuffizienz.....	4
1.4 β -adrenerge Signalprozesse und elektromechanische Kopplung in der Herzinsuffizienz.....	5
1.5 Betablocker.....	6
1.6 Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII)	8
1.7 CaMKII in der Herzinsuffizienz.....	10
1.8 Crosstalk zwischen β -adrenerger Signalkaskade und CaMKII-Aktivierung.....	11
1.9 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Humane Proben	15
2.2 Mausmodell	15
2.3 Zucht der Versuchstiere.....	16
2.4 Genotypisierung	16
2.5 Metoprolol-Applikation.....	18
2.6 Dobutamin Dosis-Wirkungs-Kurven.....	19
2.7 Echokardiographie	19
2.8 Blutdruckmessung.....	22
2.9 Langzeit-EKG Aufnahmen	22
2.10 Überlebensstudie	19
2.11 Organentnahme und biometrische Daten.....	24
2.12 Proteinanalytik	24
2.12.1 Probenvorbereitung	24
2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	24
2.12.3 Western Blot.....	25
2.12.4 Pulldown-Assay	27
2.13 Histologie.....	28
2.14 Statistik.....	29

2.15	Verwendete Materialien.....	29
2.15.1	Primer.....	29
2.15.2	Pufferzusammensetzungen.....	29
2.15.3	Verwendete Substanzen.....	30
2.15.4	Hilfsmittel und Geräte.....	32
2.15.5	Software.....	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Effekte einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und - Autophosphorylierung bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz.....	36
3.2	Effekte einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und - Autophosphorylierung bei primär nicht herzinsuffizienten Patienten.....	38
3.3	Etablierung einer effektiven Betablockade im Mausmodell.....	41
3.4	Effekte einer Betablockertherapie auf den kardialen Pänotyp CaMKII δ_C -transgener Mäuse.....	44
3.4.1	Überlebensstudie.....	44
3.4.2	Kardiale Kontraktilität und Herzfrequenz.....	45
3.4.3	Blutdruck.....	46
3.4.4	Kardiale Hypertrophie und Lungenstauung.....	47
3.4.5	Histologische Analyse der kardialen Hypertrophie und Fibrose.....	48
3.4.6	Arrhythmien.....	49
3.5	Effekte einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Aktivität und die Phosphorylierung von CaMKII- und PKA-Zielproteinen.....	50
3.5.1	CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung.....	50
3.5.2	CaMKII-Aktivitätsassay.....	51
3.5.3	Phosphorylierung der PKA- und CaMKII-Zielproteine.....	51
4	Diskussion.....	54
4.1	Fragestellung.....	54
4.2	Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und - Autophosphorylierung in humanen Proben.....	54
4.3	Etablierung einer effektiven Betablockertherapie im Mausmodell.....	56
4.4	Effekte einer chronischen Betablockade auf die kardiale Dysfunktion in CaMKII δ_C - transgenen Mäusen.....	57
4.5	Effekte einer chronischen Betablockade auf die Arrhythmieneigung in CaMKII δ_C - transgenen Mäusen.....	60
4.6	Effekte einer chronischen Betablockade auf die CaMKII-Aktivität in CaMKII δ_C - transgenen Mäusen.....	61
4.7	Limitationen.....	62
4.7.1	Mausmodell.....	62
4.7.2	Analyse der CaMKII-Aktivierung.....	63
4.8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	63
4.9	Klinische Relevanz.....	65
5	Zusammenfassung.....	66

6	Literaturverzeichnis	68
6.1	Internetquellen	82
7	Anhang	83
7.1	Eigene Publikationen.....	83
7.1.1	Originalarbeiten	83
7.1.2	Übersichtsartikel	84
7.1.3	Kongressbeiträge	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: β -adrenerge Signalkaskade	3
Abbildung 2: Strukturelle Domänen der CaMKII	9
Abbildung 3: Dilatative Kardiomyopathie und kontraktile Dysfunktion in CaMKII δ_C - transgenen Mäusen	10
Abbildung 4: Crosstalk zwischen β -adrenerger Signalkaskade und CaMKII-Aktivierung	12
Abbildung 5: Exemplarisches CaMKII δ_C Genotypisierungsergebnis	18
Abbildung 6: Exemplarische echokardiographische Aufnahmen mit Darstellung der Messparameter.....	21
Abbildung 7: Übersicht über ventrikuläre Arrhythmien in telemetrischen EKG- Aufzeichnungen	23
Abbildung 8: Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und - Autophosphorylierung in ventrikulärem Gewebe von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz	37
Abbildung 9: Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und - Autophosphorylierung in ventrikulärem Gewebe bei primär nicht herzinsuffizienten Patienten.....	40
Abbildung 10: Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und - Autophosphorylierung in atrialem Gewebe bei primär nicht herzinsuffizienten Patienten.....	41
Abbildung 11: Einfluss verschiedener Metoprolol-Dosierungen auf den Herzfrequenzanstieg unter katecholaminerger Stimulation.....	42
Abbildung 12: Einfluss verschiedener Metoprolol-Dosierungen auf die PLB-Ser16 Phosphorylierung.....	43
Abbildung 13: Einfluss einer Betablockertherapie auf die Mortalität der CaMKII δ_C -TG	44
Abbildung 14: Echokardiographische Analyse der Herzfunktion in CaMKII δ_C -TG und WT mit und ohne Betablockertherapie.....	46
Abbildung 15: Tail-cuff-Messung des Blutdrucks in CaMKII δ_C -TG und WT mit und ohne Betablockertherapie	47
Abbildung 16: Kardiale Hypertrophie und Lungenstauung in CaMKII δ_C -TG im Vergleich zum WT mit und ohne Betablockertherapie.....	47
Abbildung 17: Histologische Analyse der kardialen Hypertrophie und Fibrose in CaMKII δ_C - TG im Vergleich zum WT mit und ohne Betablockertherapie.....	48
Abbildung 18: Spontane Arrhythmien in CaMKII δ_C -TG mit und ohne Betablockertherapie im Vergleich zum WT.....	49
Abbildung 19: CaMKII-Expression und CaMKII-Autophosphorylierung in CaMKII δ_C -TG und WT mit und ohne Betablockertherapie.....	50
Abbildung 20: CaMKII-Aktivität im Pulldown-Assay in CaMKII δ_C -TG mit und ohne Betablockertherapie	51
Abbildung 21: PLB-Phosphorylierung an den PKA- und CaMKII-Phosphorylierungsstellen in CaMKII δ_C -TG und WT mit und ohne Betablockertherapie.....	52
Abbildung 22: RyR2-Phosphorylierung an den PKA- und CaMKII-Phosphorylierungsstellen in CaMKII δ_C -TG und WT mit und ohne Betablockertherapie	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die PCR zur Genotypisierung der CaMKII δ_c	17
Tabelle 2: PCR-Programm zur Genotypisierung der CaMKII δ_c	17
Tabelle 3: Echokardiographische Messparameter.....	20
Tabelle 4: Abgeleitete echokardiographische Parameter.....	21
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper.....	26
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper.....	26
Tabelle 7: Charakteristika der Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz.....	36
Tabelle 8: Charakteristika der primär nicht herzinsuffizienten Patienten (1).....	38
Tabelle 9: Charakteristika der primär nicht herzinsuffizienten Patienten (2).....	39

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
α -AR	α -Adrenozeptor
AC	Adenylylzyclase
AC3-I	<i>Autocamtide-3 derived inhibitory peptide</i>
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
AIP	<i>Autocamtide-2 related inhibitory peptide</i>
AKB	Aortokoronarer Bypass
AKE	Aortenklappenersatz
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Area _d	Linksventrikuläre innere (intraendokardiale) Fläche in der Diastole
Area _s	Linksventrikuläre innere (intraendokardiale) Fläche in der Systole
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit
AV	Atrioventrikulär
AWTh _d	<i>Anterior wall thickness diastole</i> , Linksventrikuläre Vorderwanddicke in der Diastole
AWTh _s	<i>Anterior wall thickness systole</i> , Linksventrikuläre Vorderwanddicke in der Systole
β -AR	β -Adrenozeptor
bp	Basenpaare
bpm	<i>Beats per minute</i> , Schläge pro Minute
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaM	Calmodulin
CaMK	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	<i>Cardiac output</i> , Herzminutenvolumen
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CSQ	Calsequestrin
d	Tag
DAD	<i>Delayed afterdepolarization</i> , Späte Nachdepolarisation
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	Einfach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

DTT	Dithiothreitol
EAD	<i>Early afterdepolarization</i> , Frühe Nachdepolarisation
ED ₅₀	Mittlere effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
Epi _d	Linksventrikuläre äußere (intraepikardiale) Fläche in der Diastole
FAS	<i>Fractional Area Shortening</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
for	<i>Forward</i>
FS	<i>Fractional Shortening</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G _i	Inhibierendes GTP-bindendes Protein
G _s	Stimulierendes GTP-bindendes Protein
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HCN-Kanal	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HF	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
I-1	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1
I _{Ca}	Ca ²⁺ -Strom
I _f	<i>Funny current</i> , Na ⁺ -Einwärtsstrom durch HCN-Kanäle
I _K	K ⁺ -Strom
I _{Na}	Na ⁺ -Strom
i.p.	Intraperitoneal
K ⁺	Kalium-Ion
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
l	Liter
L _d	Linksventrikulärer Längsdurchmesser in der Diastole
L _s	Linksventrikulärer Längsdurchmesser in der Systole
LTCC	L-Typ-Calcium-Kanal
LuG	Lungengewicht
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	Linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVID _d	Linksventrikulärer innerer Querdurchmesser in der Diastole

LVID _s	Linksventrikulärer innerer Querdurchmesser in der Systole
LVW	Linksventrikuläres Gewicht
m	Meter
M	Mol/l
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEF2	<i>Myocyte-specific enhancer factor 2</i>
min	Minute
MKR	Mitralklappenreparatur
MyBP-C	Myosin-bindendes Protein C
Na ⁺	Natrium-Ion
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	Octylphenoxypolyethoxyethanol
NYHA	New York Heart Association
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Protein-Phosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWTh _d	Linksventrikuläre Hinterwandwanddicke in der Diastole
PWTh _s	Linksventrikuläre Hinterwandwanddicke in der Systole
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rev	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RR _{Dia}	Diastolischer Blutdruck
RR _{Sys}	Systolischer Blutdruck
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde

SERCA	Sarkoplasmatische Calcium-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV	Schlagvolumen
TAC	Transverse Aortenkonstriktion
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Transgen
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TiL	Tibiallänge
TnC	Troponin C
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TnI	Troponin I
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
VES	Ventrikuläre Extrasystole
vol	Volumen
VT	Ventrikuläre Tachykardie
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Physiologie des Herzens

Das Herz stellt das zentrale Organ des Blutkreislaufs dar und gewährleistet als sich autonom kontrahierendes muskuläres Hohlorgan die Blutversorgung des gesamten Organismus. Der Kontraktionszyklus des Herzens besteht aus einer ständigen Abfolge von myokardialer Anspannungs- und Austreibungsphase (Systole) und nachfolgender Relaxations- und Füllungsphase (Diastole). Die Kontraktion des Myokards erfolgt dabei auf der Grundlage einer elektrischen Erregung der Herzmuskelzellen. Ausgehend von spontan aktiven Schrittmacherzellen des Sinusknotens breiten sich Aktionspotentiale über die Vorhöfe zum AV-Knoten, von dort aus über die His-Bündel, Tawaraschenkel und Purkinjefasern in das Kammermyokard aus. Die Ausbreitung dieser elektrischen Erregung hat eine koordinierte Kontraktion der Herzmuskulatur zur Folge, sodass im funktionellen Zusammenspiel mit den Herzklappen ein gerichteter Blutstrom von den Vorhöfen in die Ventrikel und von dort in die Aorta bzw. in den *Truncus pulmonalis* stattfindet.

Der Zusammenhang zwischen elektrischer Erregung und Kontraktion der Herzmuskelzelle wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Die Depolarisation der Zellmembran führt zu einer Öffnung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen (LTCC), was einen Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in das Cytosol zur Folge hat. Dies triggert die Öffnung von Ryanodinrezeptoren Typ 2 (RyR2) in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), sodass zusätzlich Ca^{2+} aus dem SR als intrazellulärem Speicher in das Cytosol freigesetzt wird. Der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer vermehrten Ca^{2+} -Bindung an Troponin C (TnC), was eine Konformationsänderung des Troponin/Tropomyosin-Komplexes zur Folge hat. Dies ermöglicht die molekulare Interaktion zwischen Myosinköpfen und Aktinfilamenten, sodass sich in der Folge die Myofilamente gegeneinander verschieben und damit eine Kontraktion der Herzmuskelzelle stattfindet. Die Relaxation des Myokards erfolgt bei anschließender Erniedrigung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Das cytosolische Ca^{2+} wird zum einen durch die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) zurück ins SR befördert. Zum anderen erfolgt durch den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher NCX in der Plasmamembran ein Ca^{2+} -Transport in den Extrazellulärraum (Bers 2002).

1.2 Die β -adrenerge Signalkaskade

Um die Sauerstoffversorgung an körperliche Belastungssituationen anpassen zu können, unterliegt die Herzaktion der Regulation des vegetativen Nervensystems. Adrenalin und Noradrenalin sind die Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems und entfalten ihre Wirkung am Herzen über die Bindung an β -Adrenozeptoren (β -AR) in der Plasmamembran. Kardial werden hauptsächlich die beiden Subtypen β_1 und β_2 exprimiert, physiologisch im Verhältnis von 70 % zu 30 % im Atrium und im Verhältnis von 80 % zu 20 % im Ventrikel (Brodde et al. 2006). Eine Stimulation des β -AR bewirkt über gekoppelte stimulierende GTP-bindende (G_s -) Proteine eine Aktivierung der Adenylylzyklase (AC), was eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonosphosphat (cAMP) zur Folge hat. Dies führt zum einen über eine Modulation von *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels* (HCN-Kanälen) zu einer erhöhten Frequenz von Aktionspotentialen in kardialen Schrittmacherzellen. Zum anderen erfolgt eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche die Aktivität verschiedener Effektorproteine, die u.a. an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind, reguliert. Die aktivierte PKA phosphoryliert LTCC (u.a. an Ser-1928 in der α_{1C} -Untereinheit) und RyR2 (an Serin 2808), erhöht dadurch deren Offenwahrscheinlichkeiten und damit den systolischen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum bzw. aus dem SR ins Cytosol. Daneben erfolgt eine Phosphorylierung des SERCA-hemmenden Proteins Phospholamban (PLB; an Serin 16), dessen inhibitorische Wirkung durch Phosphorylierung aufgehoben wird, was einen verstärkten Rücktransport von Ca^{2+} in das SR zur Folge hat. Über eine Phosphorylierung der mit dem Sarkomer assoziierten Proteine Troponin I (TnI; an Serin 23/24) und Myosin-bindendes Protein C (MyBP-C; u.a. an Serin 282) werden außerdem Kontraktionskraft und Relaxation moduliert. Daneben führt eine PKA-abhängige Phosphorylierung von Phospholemman zu einer Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase in der Plasmamembran. Über diese Regulationsmechanismen bewirkt der Sympathikus sowohl eine Steigerung der Herzfrequenz (positive Chronotropie) und Erregungsleitungsgeschwindigkeit (positive Dromotropie) als auch der Kontraktionskraft (positive Inotropie) und Relaxationsgeschwindigkeit (positive Lusitropie) (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Eine Übersicht über die β -adrenerge Signalkaskade ist in Abbildung 1 dargestellt.

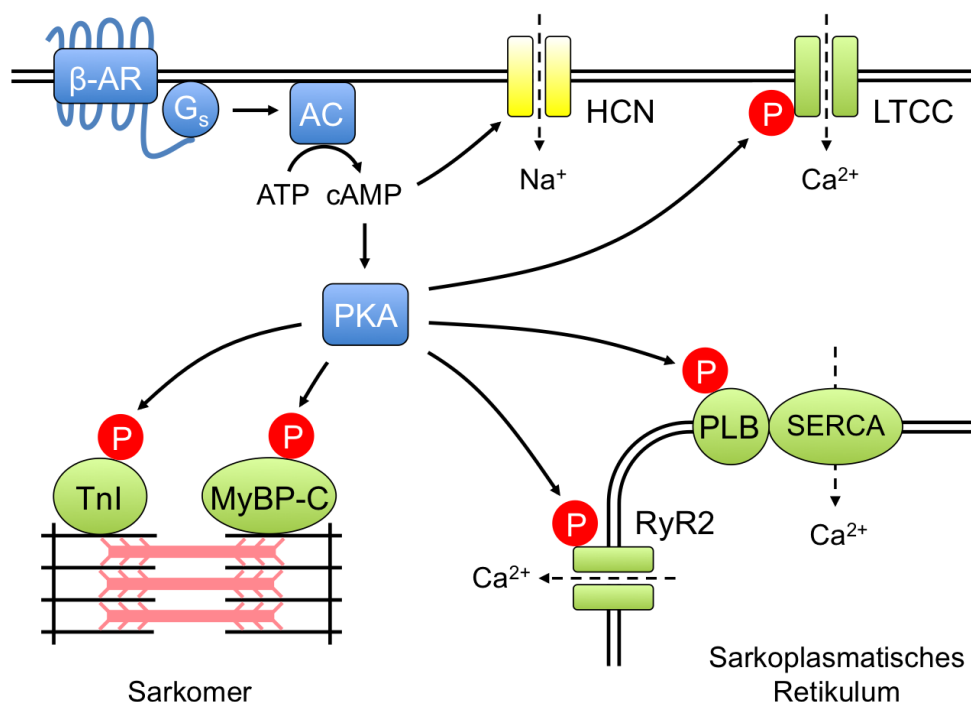


Abbildung 1: β -adrenerge Signalkaskade. Nach Stimulation des β -AR erfolgt eine G_s -Protein-vermittelte Aktivierung der AC. Durch den anschließenden Anstieg von cAMP werden zum einen HCN-Kanäle und zum anderen die PKA aktiviert. Diese phosphoryliert verschiedene Zielproteine wie LTCC, TnI, MyBP-C, RyR2 und PLB. Nach El-Armouche und Eschenhagen 2009.

Als Gegenregulatoren der β -adrenergen Signalkaskade spielen insbesondere Phosphodiesterasen (PDE) und Protein-Phosphatasen (PP) eine wichtige Rolle. Während PDEs den *second messenger* cAMP degradieren, dephosphorylieren PP die Zielproteine der PKA. PDEs und PP unterliegen wiederum verschiedenen Regulationsmechanismen. Die PDE1 wird beispielweise durch Ca^{2+} /Calmodulin stimuliert, während PDE2 und 3 in ihrer Aktivität durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) moduliert werden und die PDE4 im Sinne einer negativen Rückkopplung durch die PKA aktiviert wird (Omori und Kotera 2007). Die wichtigsten kardialen PP sind PP1, PP2A und PP2B (Calcineurin). Während PP2B Ca^{2+} -abhängig aktiviert wird, unterliegt die Aktivität von PP1 und PP2A u.a. der Modulation durch inhibitorische Proteine (Heijman et al. 2013). Ausführlich charakterisiert ist hierbei insbesondere der PP1-Inhibitor-1 (I-1), welcher zum einen durch PKA-abhängige Phosphorylierung im Sinne eines positiven Verstärkungsmechanismus aktiviert und zum anderen durch PP2A und PP2B gehemmt wird (Wittköpper et al. 2011).

Für β_2 -AR ist neben der dargestellten G_s -Kopplung mit konsekutiver PKA-Aktivierung auch eine Kopplung mit inhibitorischen GTP-bindenden (G_i -) Proteinen beschrieben

worden. Eine Aktivierung dieses alternativen Signalwegs führt zum einen zu einer Hemmung der AC, zum anderen wird die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Die Aktivierung PI3K-abhängiger Signalwege wird in diesem Zusammenhang u.a. mit antiapoptotischen Effekten in Verbindung gebracht (Perez-Schindler et al. 2013).

Daneben sind β_3 -AR, die physiologisch eine wichtige Rolle bei der Lipolyse und Thermogenese im Fettgewebe spielen, im Herzen identifiziert worden. Ihre physiologische Relevanz im kardiovaskulären Kontext ist bisher allerdings wenig charakterisiert (Brodde et al. 2006). Es wurden u.a. durch G_i - und Stickstoffmonoxid (NO)-abhängige Signalwege vermittelte negativ inotrope und vasodilatorische Effekte beschrieben (Gauthier et al. 2011).

1.3 Herzinsuffizienz

Aktuelle Schätzungen gehen davon aus, dass weltweit ca. 26 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz erkrankt sind, wobei mit einer steigenden Prävalenz zu rechnen ist (Ponikowski et al. 2014). In Deutschland ist diese Erkrankung der häufigste Grund für stationäre Behandlungen und eine der führenden Mortalitätsursachen (Statistisches Bundesamt 2014). Sie ist gekennzeichnet durch das Unvermögen des Herzens, eine ausreichende Perfusion und damit Sauerstoffversorgung des Organismus zu gewährleisten. Ursächlich sind in den meisten Fällen eine koronare Herzkrankheit mit daraus resultierender myokardialer Ischämie und eine zusätzliche oder singuläre arterielle Hypertonie (Ho et al. 1993). Daneben können u.a. nicht-ischämische Kardiomyopathien, myokardiale Entzündungen und strukturelle Herzerkrankungen wie z.B. Klappenvitien zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen. Klinisch äußert sich die Herzinsuffizienz in einer verminderten körperlichen Belastbarkeit, Dyspnoe und Flüssigkeitsretention, welche bei Linksherzinsuffizienz pulmonal in Form eines Lungenödems und bei Rechtsherzinsuffizienz typischerweise in Form von Beinödemen auftritt. Der Grad der Dyspnoe bei körperlicher Belastung ist dabei die Grundlage der klinischen Einteilung der Herzinsuffizienz in die NYHA-Stadien.

Pathophysiologisch spielt die Aktivierung neurohumoraler Systeme eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz. Im Vordergrund stehen dabei zum einen eine vermehrte Aktivität des sympathischen Nervensystems und zum anderen eine verstärkte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Dadurch werden im Sinne eines Kompensationsmechanismus die Herzfrequenz, die myokardiale

Kontraktilität und der Blutdruck erhöht, was initial die Herzleistung und Gewebepfusion aufrechterhält. Langfristig führt die neurohumorale Aktivierung jedoch zu *remodeling*-Prozessen, welche durch eine zunehmende Fibrosierung und einen Funktionsverlust des Herzgewebes gekennzeichnet sind (El-Armouche und Eschenhagen 2009).

Die derzeitigen prognoseverbessernden Therapieansätze zur Behandlung der Herzinsuffizienz zielen auf eine Hemmung eben dieser neurohumoralen Systeme ab. Betablocker, ACE-Hemmer und Aldosteronrezeptor-Antagonisten stellen neben der symptomatischen Behandlung mit Diuretika die zentralen Medikamente in der leitliniengerechten Therapie der Herzinsuffizienz dar (McMurray et al. 2012).

Insgesamt hat die Herzinsuffizienz jedoch trotz des Erfolgs dieses Therapiekonzeptes bezüglich Mortalität und Lebensqualität weiterhin eine schlechte Prognose. Nach wie vor versterben 50 % der Patienten innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung (Go et al. 2013).

1.4 **β -adrenerge Signalprozesse und elektromechanische Kopplung in der Herzinsuffizienz**

In der Herzinsuffizienz lässt sich zum einen eine Desensitivierung β -adrenerger Signalprozesse, zum anderen eine pathologische Aktivitätsänderung von Effektoren der elektromechanischen Kopplung mit konsekutiver Dysbalance der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase beobachten.

Die β -adrenerge Desensitivierung äußert sich in einer verminderten Kontraktilitätssteigerung des Herzens in Reaktion auf katecholaminerge Stimulation. Grundlagen dieses Desensitivierungsprozesses sind u.a. eine Herunterregulation von β_1 -AR (Bristow et al. 1982), eine Entkopplung von β -AR von G_s -Proteinen (Ungerer et al. 1993) und ein gesteigertes G_i -Signaling (Neumann et al. 1988). Außerdem wurden eine gesteigerte SR-assoziierte Aktivität von PP1 (Neumann et al. 1997) und eine geringere Expression und Phosphorylierung von I-1 (El-Armouche et al. 2004) festgestellt. Diese Desensitivierungsprozesse scheinen einen Schutzmechanismus des Herzens gegen einen erhöhten Sympathikotonus, welcher sich in erhöhten Plasmakonzentrationen von Katecholaminen bei Herzinsuffizienzpatienten äußert (Benedict et al. 1996; Thomas und Marks 1978), zu bieten. Entsprechend konnte in experimentellen Modellen eine Induktion der β -adrenergen Desensitivierung durch katecholaminerge Überstimulation hervorgerufen werden (Boknik et al. 2000; El-Armouche et al. 2007a; Eschenhagen et al. 1992).

Die Veränderung dieser Signalprozesse in der Herzinsuffizienz hat jedoch nicht eine globale Aktivitätsminderung aller Effektoren der β -adrenergen Signalkaskade zur Folge. So konnte zwar eine verminderte Phosphorylierung von TnI (Bodor et al. 1997), MyBP-C (El-Armouche et al. 2007b) und PLB (Bartel et al. 1996) festgestellt werden, die Aktivität bzw. Phosphorylierung von LTCC (Schroder et al. 1998) und RyR2 (Marx et al. 2000) sind jedoch erhöht.

Die verminderte PLB-Phosphorylierung führt im Zusammenhang mit einer geringeren SERCA-Expression zu einem verminderten Ca^{2+} -Transport in das SR. Daneben hat die RyR2-Hyperphosphorylierung einen vermehrten diastolischen Ca^{2+} -Verlust aus dem SR im Sinne eines SR-„Lecks“ zur Folge. Dies führt in der Summe zu einer erniedrigten SR- Ca^{2+} -Beladung, was für die kontraktile Dysfunktion in der Herzinsuffizienz verantwortlich gemacht wird (Neef und Maier 2007). Zum anderen ist die Hyperphosphorylierung des RyR2 mit einer erhöhten Anfälligkeit für Arrhythmien assoziiert (Lehnart und Marks 2007). Pathophysiologisch führen hierbei die vermehrten Ca^{2+} -Leckströme zu einer verstärkten NCX-Aktivität, was einen vermehrten Na^+ -Einstrom zur Folge hat und damit das Auftreten von späten Nachdepolarisationen (DAD) triggert (Bers 2014).

Die verminderten PLB-, TnI- und MyBP-C-Phosphorylierungen werden darüber hinaus mit der in der Herzinsuffizienz zu beobachtenden myokardialen Relaxationsstörung assoziiert (El-Armouche und Eschenhagen 2009).

1.5 Betablocker

Die Hauptwirkungen von Betablockern auf das Herz-Kreislaufsystem sind eine Verringerung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs durch eine Reduktion der Herzleistung (durch negativ chronotrope und negativ inotrope Effekte), ein Schutz vor Arrhythmien (u.a. durch Automatie-supprimierende Effekte) und eine Senkung des Blutdrucks (u.a. durch eine Abnahme des Herzzeitvolumens, Resetting der Barorezeptoren und Hemmung der Reninsekretion) (Aktories et al. 2013). Es lassen sich unselektive Betablocker wie Propranolol, die sowohl auf β_1 - als auch β_2 -AR blockierend wirken, von β_1 -selektiven Betablockern wie Metoprolol und Bisoprolol unterscheiden. Der unselektive Betablocker Carvedilol vermittelt zusätzlich durch einen Antagonismus an α_1 -Adrenozeptoren (α_1 -AR) eine vasodilatierende Wirkung (Frishman 2007). Auch der β_1 -selektive Betablocker Nebivolol hat zusätzliche vasodilatierende Effekte, welche durch eine Stimulation der NO-Produktion vermittelt werden (Rehsia und Dhalla 2010).

Die Rationale hinter der therapeutischen Anwendung von Betablockern in der Herzinsuffizienz besteht in einer Blockierung eines überaktiven sympathischen Nervensystems. In verschiedenen Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression von Komponenten der β -adrenergen Signalkaskade wie β_1 - (Engelhardt et al. 1999) und β_2 -AR (Du et al. 2000), der G_s -alpha-Untereinheit ($G\alpha_s$) (Iwase et al. 1997) und der PKA (Antos et al. 2001) mit kontraktile Dysfunktion, kardialem *remodeling* und einer erhöhten Arrhythmieanfälligkeit assoziiert ist. Die Herzinsuffizienzentwicklung konnte dabei durch Betablockertherapie in $G\alpha_s$ -transgenen Mäusen verhindert werden (Asai et al. 1999). Übereinstimmend wurde gezeigt, dass sich ein genetischer AC5-Knockout (KO) protektiv in der Nachlast- und β -adrenerg induzierten Herzinsuffizienz auswirkt (Okumura et al. 2003; Okumura et al. 2007). Auch ein genetischer KO des PKA-Verstärkers I-1 schützt vor kardialer Hypertrophie und Arrhythmien bei katecholaminerger Überstimulation (El-Armouche et al. 2008). Außerdem wurde eine Prävention hinsichtlich Angiotensin-induzierter kardialer Dysfunktion durch KO der katalytischen β -Untereinheit der PKA beschrieben (Enns et al. 2010). Im Gegensatz dazu konnte allerdings auch gezeigt werden, dass sich eine partielle Resensitivierung der β -adrenergen Signalkaskade durch Überexpression der AC6 nach experimentell induziertem Herzinfarkt positiv auf die Herzfunktion auswirkt (Lai et al. 2008).

Die klinische Wirksamkeit von Betablockern hinsichtlich einer Mortalitätsreduktion bei Herzinsuffizienzpatienten wurde in mehreren klinischen Studien für Metoprolol (MERIT-HF 1999), Bisoprolol (CIBIS-II 1999) und Carvedilol (Packer et al. 1996; Packer et al. 2001) belegt. Auch Nebivolol hat sich in der Herzinsuffizienz als wirksam erwiesen, mit der Besonderheit, dass es bei einem Patientenkollektiv ≥ 70 Jahren getestet wurde (Flather et al. 2005).

Die genauen Mechanismen des protektiven Effekts von Betablockern sind jedoch in vielerlei Hinsicht unklar. Die Blockade eines an sich kontraktionsfördernden Signalwegs in der Herzinsuffizienz ist kontraintuitiv und es erscheint unter therapeutischen Gesichtspunkten paradox, dass eine Betablockertherapie die Herzleistung zunächst herabsetzt (Eichhorn 1992). Entsprechend ist der Einsatz von Betablockern bei akuter kardialer Dekompensation kontraindiziert. Bei chronischer Herzinsuffizienz führen Betablocker allerdings im Therapieverlauf zu einer verbesserten Herzleistung (Hall et al. 1995). Dabei konnte beobachtet werden, dass eine dauerhafte Blockade der β -AR zum einen zur Resensitivierung β -adrenerger Signalprozesse führt (Heilbrunn et al. 1989) und zum anderen eine Normalisierung von Effektoren β -adrenergen Signalings wie eine

Stabilisierung der RyR2-Funktion zur Folge hat (Reiken et al. 2003). Der positive Effekt einer Betablockade beruht also nicht auf einer globalen Dämpfung, sondern auf einer funktionellen Verbesserung der pathologisch veränderten β -adrenergen Signalingkaskade. Darüber hinaus wurden protektive Effekte von Betablockern hinsichtlich oxidativer, apoptotischer und inflammatorischer Prozesse beschrieben (Kawai et al. 2004; Prabhu et al. 2000). Verschiedene Signalwege werden diskutiert, die möglicherweise zusätzlich zur klassischen G_s /AC/cAMP-Kaskade durch Betablocker moduliert werden. Diese umfassen u.a. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), PI3K, Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3), β_3 -AR-vermittelte Prozesse und Transkriptionsregulation über *cAMP response element-binding protein* (CREB), *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und Histon-Deacetylasen (HDACs) (Yang J et al. 2014).

Ein genaueres Verständnis, welche Signalwege durch β -adrenerge Blockade moduliert werden, könnte somit helfen, wesentliche mechanistische Grundlagen ihres klinischen Benefits zu erklären damit Ansatzpunkte für die Charakterisierung neuer therapeutischer Interventionsmöglichkeiten in der Herzinsuffizienz bieten.

1.6 Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII)

Die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche strukturell ein Holoenzym darstellt, das aus zwei hexameren Ringen besteht. Jedes der zwölf Monomere besitzt drei Domänen: eine katalytische, eine regulatorische und eine Verbindungsdomäne. Es sind bisher vier CaMKII-Isoformen beschrieben worden (α , β , γ , δ), die unterschiedliche Gewebeverteilungen aufweisen. Im Herzen wird insbesondere die Isoform CaMKII δ exprimiert, wobei die Splicevarianten δ_B und δ_C existieren (Anderson et al. 2011). Eine Aktivierung der CaMKII erfolgt bei einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an die regulatorische Domäne. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Enzyms, sodass in der Folge die katalytische Domäne freigelegt wird. Daneben spielt die Autophosphorylierung an Thr286 bzw. 287 (abhängig von der Isoform) eine wichtige Rolle bei der Aktivitätsregulation des Enzyms. Diese Autophosphorylierung tritt nach erhöhter Frequenz von Ca^{2+} /Calmodulin-Bindung auf und erhöht zum einen die Affinität für Ca^{2+} /Calmodulin, sodass die Enzymaktivität bei Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erhalten bleibt. Zum anderen kann die CaMKII unabhängig von Ca^{2+} /Calmodulin autonom aktiv bleiben, indem die Autoinhibition der CaMKII verhindert wird (Anderson et al. 2011; Hudmon und Schulman 2002) (Abbildung 2). Die CaMKII-Aktivität unterliegt im Zusammenhang mit

der Autophosphorylierung auch einer negativen Regulation durch PP, indem diese die autophosphorylierte CaMKII dephosphorylieren (Zhang T und Brown 2004).

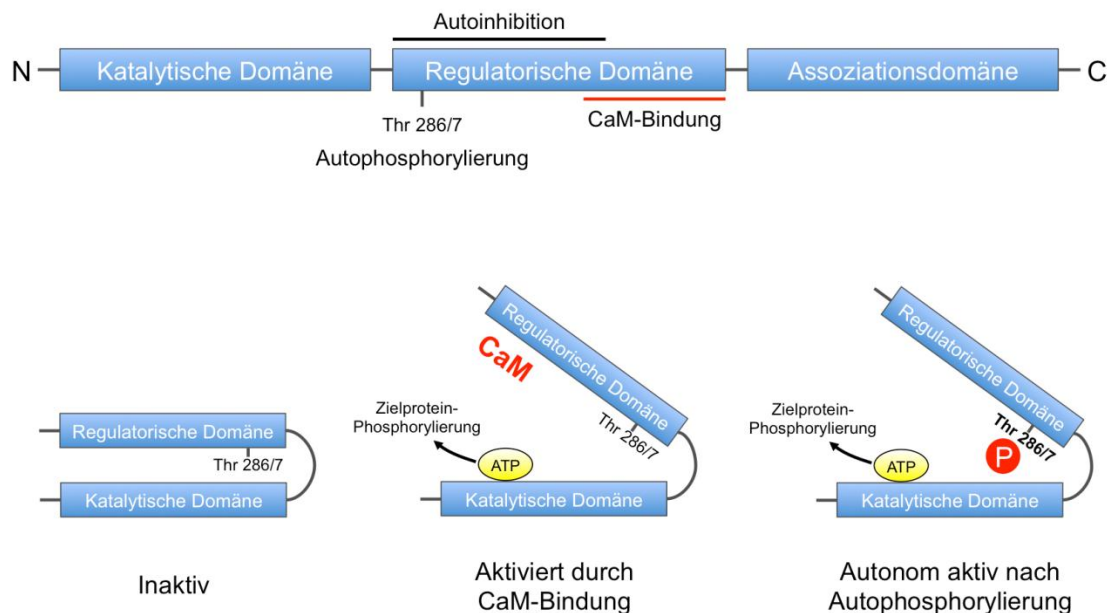


Abbildung 2: Strukturelle Domänen der CaMKII. Jedes Monomer des CaMKII-Holoenzym besitzt drei strukturelle Domänen: eine katalytische, eine regulatorische und eine Assoziationsdomäne. Durch CaM-Bindung an die regulatorische Domäne wird das Enzym aktiviert, indem eine Konformationsänderung stattfindet, die eine Phosphorylierung von Zielproteinen ermöglicht. Durch Autophosphorylierung an Threonin-286/7 bleibt die CaMKII autonom aktiv, unabhängig von CaM-Bindung. Nach Anderson et al. 2011 und Maier und Bers 2002.

Darüber hinaus kann eine Aktivierung der CaMKII durch Oxidation an Met281/282 erfolgen, wobei auch hier - ähnlich wie bei der Autophosphorylierung - eine von Ca^{2+} /Calmodulin-Bindung autonome Aktivität beobachtet werden konnte (Erickson et al. 2008). Als weitere Aktivationsmöglichkeiten der CaMKII wurden Glykosylierung (Erickson et al. 2013) und Nitrosylierung (Gutierrez et al. 2013) beschrieben.

Die myokardiale CaMKII spielt eine regulatorische Rolle bei der elektromechanischen Kopplung, der zellulären Elektrophysiologie und der Genexpression. Substrate der aktivierten CaMKII hinsichtlich des zellulären Ca^{2+} -cyclings und kontraktile Prozesse sind u.a. LTCC, PLB und RyR2. So wird beispielsweise die SR- Ca^{2+} -Aufnahme und -Freisetzung durch Phosphorylierung von PLB (an Threonin 17) und RyR2 (an Serin 2814) moduliert. Bezüglich der Modulation kardialer Ionenkanäle wurde eine Regulation von Ca^{2+} -Strömen durch Phosphorylierung von LTCC, von Na^+ -Strömen durch Interaktion mit $\text{Na}_v1.5$ -

Kanälen und von K^+ -Strömen durch Beeinflussung von $K_v1.4$ und $K_v4.3$ -Kanälen beschrieben (Anderson et al. 2011). Als Mechanismen der Regulation der Genexpression wurden u.a. eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (Sheng et al. 1991) und von HDACs (Backs et al. 2006) identifiziert.

1.7 CaMKII in der Herzinsuffizienz

Eine vermehrte Expression und Aktivierung der myokardialen CaMKII konnte sowohl in der menschlichen als auch in der experimentellen Herzinsuffizienz beobachtet werden (Fischer et al. 2014; Kirchhefer et al. 1999; Zhang T et al. 2003). Die Rolle der CaMKII in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz wurde in verschiedenen Tiermodellen untersucht. Eine herzspezifische Überexpression der CaMKII δ_C im Mausmodell ist mit der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie mit massiver kontraktile Dysfunktion (siehe Abbildung 3), einer erhöhten Anfälligkeit für Arrhythmien und einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert (Maier et al. 2003; Zhang T et al. 2003).

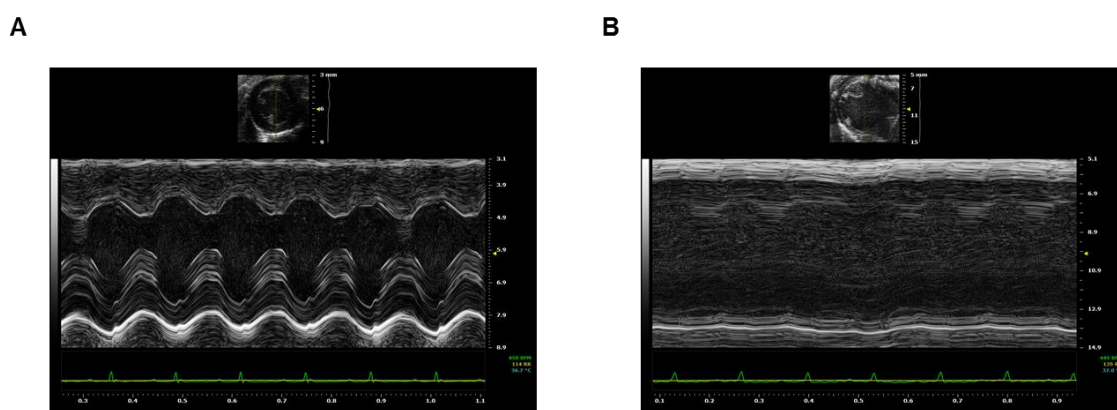


Abbildung 3: Dilatative Kardiomyopathie und kontraktile Dysfunktion in CaMKII δ_C -transgenen Mäusen. Vergleichende echokardiographische M-Mode Aufnahmen einer Wildtyp- (A) und CaMKII δ_C -transgenen Maus (B) im Alter von 10 Wochen. Es zeigt sich eine deutliche Dilatation (zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achse) und Kontraktionseinschränkung des linken Ventrikels in den CaMKII δ_C -transgenen Tieren.

Als Grundlage für diesen Phänotyp wird u.a. eine pathologische Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase angenommen. In den CaMKII δ_C -transgenen Mäusen konnte zum einen eine verringerte SERCA- und PLB-Expression, zum anderen eine erhöhte Aktivität des NCX und eine Hyperphosphorylierung des RyR2 beobachtet werden. Diese CaMKII-abhängige Hyperphosphorylierung ist mit einem vermehrten diastolischen

Ca^{2+} -Verlust aus dem SR im Sinne eines „lecken“ RyR2 assoziiert. Die RyR-Dysfunktion wird zusammen mit einer verminderten SERCA-Aktivität als Ursache für die eingeschränkte Kontraktilität auf der Grundlage eines verringerten SR- Ca^{2+} -Gehalts angesehen. Das vermehrte SR- Ca^{2+} -Leck wird außerdem im Zusammenhang mit der erhöhten NCX-Aktivität für die erhöhte Arrhythmieneigung in diesem Modell verantwortlich gemacht (Maier 2005).

Neben diesen Effekten auf die Prozesse der elektromechanischen Kopplung scheint die CaMKII an der Aktivierung von Genen beteiligt zu sein, welche die Entwicklung einer Herzinsuffizienz begünstigen. Als Mechanismus wurde beispielsweise eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsrepressors HDAC4 beschrieben. Die Phosphorylierung von HDAC4 hat eine vermehrte Expression von mit Hypertrophie und *remodeling* assoziierten Genen unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors MEF2 zur Folge (Backs et al. 2006).

Dem gegenüber hat sich eine Hemmung der myokardialen CaMKII in verschiedenen experimentellen Herzinsuffizienzmodellen als protektiv erwiesen. Es wurde u.a. gezeigt, dass sich eine CaMKII-Inhibition nach Myokardinfarkt schützend gegenüber kontraktiler Dysfunktion, Störungen der Ca^{2+} -Homöostase und kardialen *remodeling*-Prozessen auswirkt (Zhang R et al. 2005). Im Ischämie-Reperfusionmodell wurde außerdem ein verringertes Auftreten apoptotischer Prozesse unter mitochondrialer Inhibition der CaMKII festgestellt (Joiner et al. 2012). Daneben sind für einen genetischen KO der CaMKII δ protektive Effekte hinsichtlich Hypertrophie- und Fibroseentwicklung im Modell der Nachlast-induzierten Herzinsuffizienz durch transverse Aortenkonstriktion (TAC) beschrieben worden (Ling et al. 2009).

1.8 Crosstalk zwischen β -adrenerger Signalkaskade und CaMKII-Aktivierung

Es gibt zunehmende Evidenz für einen pathophysiologisch relevanten *crosstalk* zwischen einer Stimulation der β -adrenergen Signalkaskade und Aktivierung der CaMKII. So konnte eine vermehrte Phosphorylierung von PLB und RyR2 an den CaMKII-Phosphorylierungsstellen Thr17 bzw. Ser2814 nach β -adrenerger Stimulation festgestellt werden (Ferrero et al. 2007; Kuschel et al. 1999). Verschiedene *crosstalk*-Mechanismen werden diskutiert. Zum einen wird ein Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch PKA-abhängige Aktivierung von LTCC und RyR2 als Ursache für die Steigerung der

CaMKII-Aktivität angenommen. Zum anderen wird die Autophosphorylierungsstelle der CaMKII durch PP1 reguliert. PP1 unterliegt wiederum einer inhibitorischen Regulation durch I-1, welcher durch PKA-abhängige Phosphorylierung (an Thr35) aktiviert wird, sodass eine PKA-abhängige vermehrte Autophosphorylierung der CaMKII möglich ist (Grimm M und Brown 2010). Ein möglicher alternativer *crosstalk* Mechanismen besteht in einer cAMP-abhängigen Aktivierung von Epac, welches via Phospholipase C ϵ (PLC ϵ) / Proteinkinase C ϵ (PKC ϵ) oder Interaktion mit β -Arrestin die CaMKII aktiviert (Mangmool et al. 2010; Oestreich et al. 2009). Darüber hinaus wird eine CaMKII-Aktivierung durch Oxidation als Antwort auf vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Stimulation der β -adrenergen Signalkaskade angenommen (Curran et al. 2014).

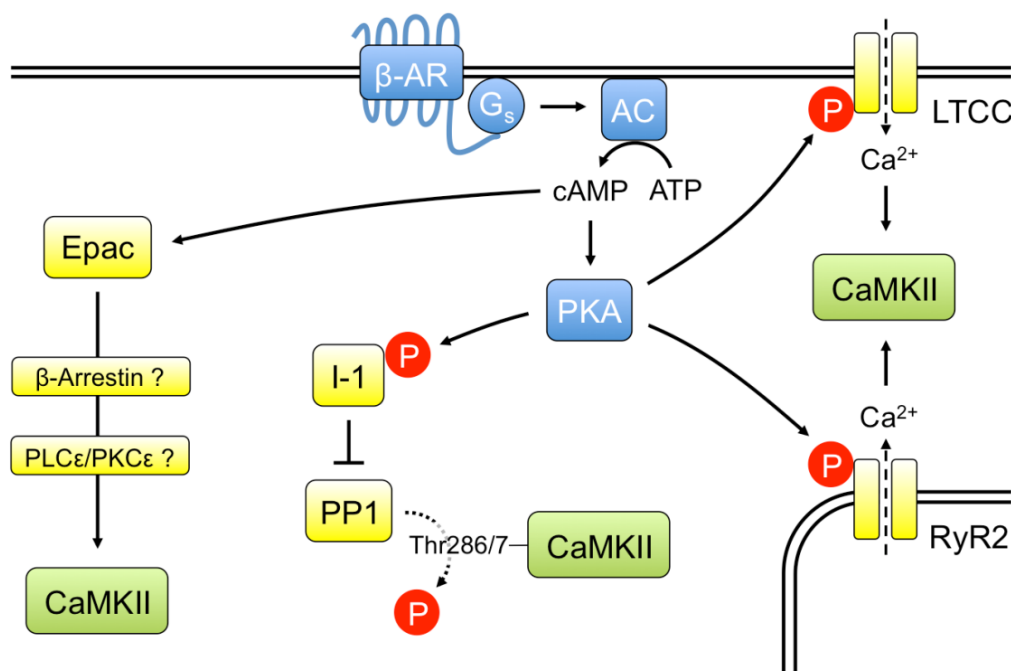


Abbildung 4: Crosstalk zwischen β -adrenerger Signalkaskade und CaMKII-Aktivierung. Zu den diskutierten Mechanismen gehören u.a. eine PKA-abhängige Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration via LTCC und RyR2-Aktivierung mit konsekutiver CaMKII-Aktivierung über Ca^{2+} /Calmodulin, eine cAMP-abhängige Epac-Aktivierung mit nachfolgender Stimulation der CaMKII möglicherweise unter Vermittlung von β -Arrestin oder PLC ϵ /PKC ϵ und eine Inhibition der PP1-abhängigen Dephosphorylierung der CaMKII-Autophosphorylierungsregion (Thr286/7) durch PKA-vermittelte I-1-Phosphorylierung. Nach Grimm M et al. 2011 und Grimm M und Brown 2010.

Mehrere experimentelle Befunde weisen darauf hin, dass schädliche Effekte einer β -adrenergen Überstimulation auf die kardiale Morphologie und Funktion durch die CaMKII

vermittelt werden. So wurde u.a. gezeigt, dass katecholaminerge Überaktivierung CaMKII-abhängig zu vermehrter myokardialer Apoptose führt (Zhu WZ et al. 2003). Hinsichtlich der Ca^{2+} -Homöostase konnte nach β -adrenerger Stimulation ein vermehrtes SR-Leck auf der Grundlage einer CaMKII-abhängige Hyperphosphorylierung des RyR2 beobachtet werden (Grimm M et al. 2015).

Übereinstimmend konnte ein Schutz vor Isoprenalin-induziertem kardialem *remodeling* durch eine Inhibition der CaMKII beobachtet werden (Zhang R et al. 2005). Außerdem ist eine Reduktion katecholaminerg induzierter Arrhythmien durch CaMKII-Hemmung beschrieben worden (Sag et al. 2009).

Die experimentellen Hinweise zum einen hinsichtlich des *crosstalks* zwischen β -adrenerger Signalkaskade und CaMKII-Aktivierung und zum anderen bezüglich der CaMKII-medierten schädlichen Effekte unter β -adrenerger Stimulation lassen vermuten, dass die protektiven Effekte einer Betablockertherapie in der Herzinsuffizienz zum Teil auf einer Hemmung CaMKII-abhängiger maladaptiver Prozesse beruhen.

Inwieweit eine Betablockertherapie tatsächlich die kardiale CaMKII-Aktivität und CaMKII-abhängige Signalwege beeinflusst, wurde jedoch bisher in keiner Studie untersucht.

1.9 Zielsetzung

Ein wesentliches pathophysiologisches Merkmal der Herzinsuffizienz ist eine Überaktivierung des sympathischen Nervensystems. Betablocker stellen eine der Hauptsäulen in der Therapie der Herzinsuffizienz dar, wobei jedoch viele Mechanismen ihres klinischen Benefits nach wie vor unklar sind. Es gibt zunehmende Hinweise darauf, dass die CaMKII ein Effektor pathologisch überaktivierter β -adrenerger Signalwege ist. In dieser Arbeit soll analysiert werden, wie sich eine chronische Betablockertherapie auf die Aktivität der CaMKII auswirkt. Dadurch ließe sich beurteilen, ob die protektive Betablockerwirkung in der Herzinsuffizienz partiell durch eine Modulation der CaMKII-Aktivität erklärbar ist.

Im Einzelnen sollen die folgenden Aspekte untersucht werden:

- Bestimmung der CaMKII-Aktivität in menschlichen Herzproben von Patienten mit und ohne Betablockertherapie
- Etablierung einer Betablockertherapie in $\text{CaMKII}\delta_c$ -transgenen Mäusen - einem

experimentellen Modell der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz - und anschließende Analyse des Effekts einer chronischen Betablockade auf den kardialen Phänotyp und die CaMKII-Aktivität in diesem Mausmodell

2 Material und Methoden

2.1 Humane Proben

Die Proben von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz stammen aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen (AG Prof. Lars Maier, AG Prof. Samuel Sossalla). Das ventrikuläre Myokardgewebe wurde im Rahmen von Herztransplantationsoperationen entnommen. Die Gewebeentnahme erfolgte unter dem Ethikantrag „Funktionelle, biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von Gewebeproben aus explantierten menschlichen Herzen“ (Antragsnummer 31/9/00).

Die atrialen Proben von primär nicht herzinsuffizienten Patienten stammen aus der Klinik für Innere Medizin und Kardiologie der Technischen Universität Dresden (Prof. Ruth Strasser) und der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen (AG Prof. Lars Maier, AG Prof. Samuel Sossalla). Die Probenentnahme erfolgte im Rahmen von Herzoperationen (Bypass- und/oder Aortenklappenersatz- und/oder Mitralklappenreparaturoperation) unter den Ethikanträgen „Einfluss von chronischem Vorhofflimmern auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Vorhofs bei Patienten mit KHK oder Herzklappenfehlern“ (Bearbeitungsnummer EK 446122011), „Funktionelle, biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von menschlichem Vorhofmyocard anhand von Gewebeproben aus dem rechten Vorhof“ (Antragsnummer 21/10/00) und „Assoziation struktureller, proteinbiochemischer und funktioneller Veränderungen in Vorhofmyokard mit Auftreten von Vorhofflimmern“ (Antragsnummer 14/9/11). Eine tabellarische Übersicht über die anonymisierten Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht, Ejektionsfraktion (EF) und Begleitmedikation befindet sich im Ergebnisteil.

Die Gewebeproben wurden im Rahmen dieser Arbeit für Proteinanalytik verwendet.

2.2 Mausmodell

Für die Experimente dieser Arbeit wurde eine transgene Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression der CaMKII δ_c verwendet. Die Generierung dieser Mauslinie wurde von Zhang *et al.* beschrieben (Zhang T *et al.* 2003). Für die Versuche in dieser Arbeit wurden heterozygot CaMKII δ_c -transgene Männchen auf Black Swiss Hintergrund mit weiblichen

Wildtyp-Mäusen auf Bl6/J Hintergrund verpaart. Alle Experimente wurden an den CaMKII δ_c -transgenen Mäusen (TG) und Wildtyp (WT)-Wurfgeschwistern der F1-Generation mit gemischtem Black Swiss (50 %) x Bl6/J (50 %) Hintergrund durchgeführt.

2.3 Zucht der Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet und untergebracht. Die Experimente wurden im Rahmen des Tierversuchsantrags „Auswirkungen eines genetischen Knockouts von Inhibitor-1 auf die Herzinsuffizienzprogression und Arrhythmie-Neigung in CaMKII-Transgenen und RyR2474S-Knockin Mäusen und direkter Vergleich mit einer oralen Betablocker-Therapie“ (Aktenzeichen 33.14-42502-04-11/0579) durchgeführt.

2.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mit genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien ca. 5 Tage alter Mäuse. Jede Probe wurde mit 250 μ l Digestionspuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 0,5 % SDS, pH 8,0) und 400 μ g/ml Proteinase K über Nacht bei 55 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 250 μ l DNA-Isolationsreagenz für genomische DNA (Appllichem). Nach 5 min Inkubation wurde die DNA mit 500 μ l abs. Ethanol gefällt, die Proben für 11 min mit 11.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach wurde das DNA-Pellet zweimal mit 250 μ l Ethanol 95 % gewaschen und jeweils für 1 min bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand danach jeweils abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde 1 h an der Luft trocknen gelassen, anschließend in 50 μ l LowTE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die DNA-Amplifikation erfolgte mittels PCR. Dabei wurden die DreamTaqTM Green DNA Polymerase und 10 x DreamTaqTM Green Buffer mit 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde wie in Tabelle 1 aufgeführt pipettiert. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die PCR zur Genotypisierung der CaMKII δ_c . Es wurde ein Gesamtvolumen von 50 μ l eingesetzt.

Substanz	Volumen (μ l)
CaMK <i>forward</i> (for) Primer	1
CaMK <i>reverse</i> (rev) Primer	1
PCR-Puffer 10 x	5
dNTPs (25 mM)	1
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,4
DNA-Template	2
<i>Aqua ad injectabilia</i>	39,6

Tabelle 2: PCR-Programm zur Genotypisierung der CaMKII δ_c .

PCR-Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit (min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	5	1
Denaturierung	94	1	} 35
Hybridisierung	63	1	
Elongation	72	2	
Finale Elongation	72	10	1
Kühlung	4	∞	

Die DNA wurde anschließend in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde ein 1,5 % Agarose-Gel durch Aufkochen von Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,5) hergestellt. In dieses Gel wurden 0,2 μ l/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Die horizontale Gelelektrophorese erfolgte für 60 min bei 100 V. Als Marker wurde GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht am GelDocTM XR System (Bio-Rad) sichtbar gemacht und fotografiert.

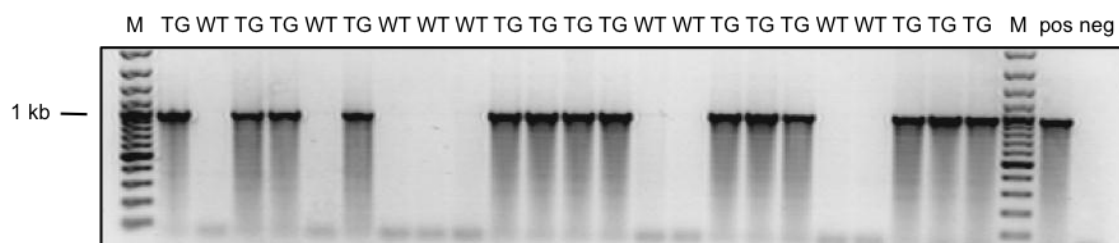


Abbildung 5: Exemplarisches CaMKII δ C Genotypisierungsergebnis. Die PCR-Produkte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. M: Marker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA ladder); TG: CaMKII δ C-transgen; WT: Wildtyp; pos: Positivkontrolle; neg: Negativkontrolle.

Die Genotypisierungen wurden von Ursula Leonhardt (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsmedizin Göttingen), Kim Hansing (Klinik für Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen) oder mir durchgeführt.

2.5 Metoprolol-Applikation

Für die Tierversuche dieser Arbeit wurde Metoprolol als β_1 -selektiver Betablocker verwendet. Dieser Betablocker wurde unter folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- Metoprolol ist der aktuell in Deutschland am meisten verschriebene Betablocker (Arzneimittelreport 2015)
- Die orale Applikation von Metoprolol in Mäusen ist etabliert (Harding et al. 2001; Thireau et al. 2012)
- Es gibt experimentelle Hinweise, dass die CaMKII β_1 -AR-spezifisch aktiviert wird (Yoo et al. 2009)

Metoprolol (Sigma-Aldrich) wurde im Trinkwasser der Versuchstiere gelöst und dieses in lichtundurchlässige Trinkflaschen gefüllt. Für die Experimente zur Dosisetablierung wurde Metoprolol in verschiedenen Dosierungen angewandt und für die weiteren Versuche in der Dosierung 270 mg/kg/d verabreicht. Bei der Konzentrationsberechnung des Metoprolols im anzusetzenden Trinkwasser wurde eine durchschnittliche Trinkmenge von 3,2 ml/d für eine 30 g schwere Maus angenommen (Jelinek 2013). Die Metoprolol-Konzentration im Trinkwasser (X) lässt sich für eine gewünschte Tagesdosis (TD) damit berechnen als:

$$X \left(\frac{g}{l} \right) = \frac{TD \left(\frac{mg}{kg \cdot d} \right) \cdot 30 g}{3,2 \frac{ml}{d} \cdot 1000}$$

2.6 Dobutamin Dosis-Wirkungs-Kurven

Die Experimente wurden an WT-Mäusen im Alter von ca. 10 Wochen durchgeführt. Vorausgehend waren die Tiere für mindestens eine Woche mit der entsprechenden oralen Metoprolol-Dosierung behandelt worden. Die Herzfrequenzmessung erfolgte mit einem Vevo[®] 2100 Echokardiographie-System (Visual Sonics). Die Mäuse wurden mit Isofluran (2 vol%, 1 l O₂ / min) anästhesiert und in Rückenlage auf dem Maustisch des Echokardiographie-Systems fixiert. Über diesen Tisch erfolgte eine EKG-Ableitung an den Extremitäten der Maus. Die gesamte Messung wurde unter Maskennarkose mit Isofluran (1,5 vol%, 1 l O₂ / min) unter Konstanthaltung der Körpertemperatur der Versuchstiere mittels Wärmeplattenfunktion des Maustisches und Temperaturmessung per Rektalsonde durchgeführt. Dobutamin wurde in aufsteigenden Dosierungen (0,03 mg/kg bis 100 mg/kg) intraperitoneal injiziert und der für jede Dosis maximale Herzfrequenzanstieg gemessen.

2.7 Überlebensstudie

Für die Überlebensstudie wurden mit dem Programm GraphPad Prism Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Dabei wurden Tiere, die am Ende des Beobachtungszeitraums noch nicht gestorben waren, als zensierte Daten einberechnet.

2.8 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden mit einem Vevo[®] 2100 Echokardiographie-System (Visual Sonics) durchgeführt. Die Messungen erfolgten einmal vor Beginn der Betablockertherapie im Alter von 4 Wochen und zu mehreren Zeitpunkten nach Beginn der Metoprolol-Behandlung (Tag 3, Tag 10, Tag 24, Tag 38). Die Tiere wurden mit 2 vol% Isofluran (in 1 l O₂ / min) in einer Induktionskammer anästhesiert und anschließend an den Extremitäten in Rückenlage auf dem Maustisch des Echokardiographie-Systems fixiert. Die gesamten Messungen erfolgten unter Maskennarkose mit 1,5 vol% Isofluran (in 1 l O₂ / min) unter Konstanthaltung der

Körpertemperatur, welche per Rektalsonde detektiert wurde, und der Herz- und Atemfrequenz, welche über die Elektroden des Maustisches gemessen wurden (unter Verwendung von SignaGel[®] Elektrodengel). Nach Enthaarung des ventralen Thorax der Mäuse mittels Haarentfernungsspray (Veet[®] Easy-Spray) wurde vorgewärmtes Ultraschallgel (EcoGel 100 Imaging Ultrasound) auf den Thorax aufgetragen. Die Aufnahmen wurde mit einem 30 MHz Schallkopf durchgeführt. Zunächst erfolgte die Aufnahme der parasternalen Längsachse im B-Mode mit Darstellung des linken Ventrikels von der Herzspitze bis zum linksventrikulären Ausflusstrakt mit Aortenklappe und Übergang in die Aorta. Anschließend wurde der Schallkopf um 90° gedreht und in der parasternalen kurzen Achse der linke Ventrikel in der midpapillären Ebene dargestellt. Der Aufnahme im B-Mode wurde eine M-Mode-Aufnahme in der parasternalen kurzen Achse in gleicher Ebene angeschlossen. Die aus den echokardiographischen Bildern bestimmten Parameter sind in Tabelle 3 und Abbildung 6 dargestellt. Tabelle 4 bietet eine Übersicht über die davon abgeleiteten Parameter.

Tabelle 3: Echokardiographische Messparameter.

Parasternale Längsachse:	
Abkürzung	Parameter
L _d	Linksventrikulärer Längsdurchmesser in der Diastole
L _s	Linksventrikulärer Längsdurchmesser in der Systole
Parasternale kurze Achse:	
Abkürzung	Parameter
LVID _d	Linksventrikulärer innerer Querdurchmesser in der Diastole
LVID _s	Linksventrikulärer innerer Querdurchmesser in der Systole
AWTh _d	Linksventrikuläre Vorderwanddicke in der Diastole
AWTh _s	Linksventrikuläre Vorderwanddicke in der Systole
PWTh _d	Linksventrikuläre Hinterwandwanddicke in der Diastole
PWTh _s	Linksventrikuläre Hinterwandwanddicke in der Systole
Area _d	Linksventrikuläre innere (intraendokardiale) Fläche in der Diastole
Area _s	Linksventrikuläre innere (intraendokardiale) Fläche in der Systole
Epi _d	Linksventrikuläre äußere (intraepikardiale) Fläche in der Diastole

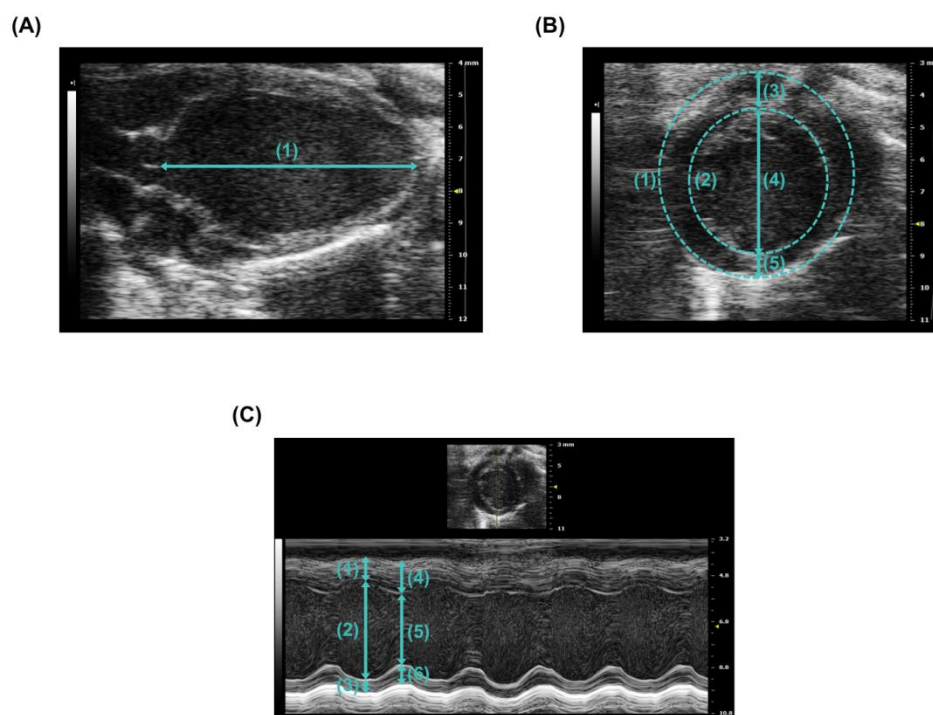


Abbildung 6: Exemplarische echokardiographische Aufnahmen mit Darstellung der Messparameter. (A) Aufnahme der parasternalen Längsachse im B-Mode mit (1) linksventrikulärem Längsdurchmesser (L). (B) Aufnahme der parasternalen kurzen Achse im B-Mode mit (1) Umrandung der linksventrikulären äußeren (intraepikardialen) Fläche, (2) Umrandung der linksventrikulären inneren (intraendokardialen) Fläche (Area), (3) linksventrikulärer Vorderwanddicke (AWTh), (4) linksventrikulärem innerem Querdurchmesser (LVID), (5) linksventrikulärer Hinterwanddicke (PWTh). (C) Aufnahme der parasternalen kurzen Achse im M-Mode mit (1) linksventrikulärer Vorderwanddicke in der Diastole (AWTh_d), (2) linksventrikulärem innerem Querdurchmesser in der Diastole (LVID_d), (3) linksventrikulärer Hinterwanddicke in der Diastole (PWTh_d), (4) linksventrikulärer Vorderwanddicke in der Systole (AWTh_s), (5) linksventrikulärem innerem Querdurchmesser in der Systole (LVID_s), (6) linksventrikulärer Hinterwanddicke in der Systole (PWTh_s).

Tabelle 4: Abgeleitete echokardiographische Parameter.

Abkürzung	Parameter	Berechnung
FS (%)	<i>Fractional shortening</i>	$(LVID_d - LVID_s) / LVID_d \times 100$
FAS (%)	<i>Fractional area shortening</i>	$(Area_d - Area_s) / Area_d \times 100$
LVEDV (μl)	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen	$5/6 \times L_d \times Area_d$

LVESV (μl)	Linksventrikuläres endsystolisches Volumen	$5/6 \times L_s \times \text{Area}_s$
SV (μl)	Schlagvolumen	LVEDV - LVESV
EF (%)	Ejektionsfraktion	$(\text{LVEDV} - \text{LVESV}) / \text{LVEDV} \times 100$
CO (ml/min)	Herzminutenvolumen	SV x Herzfrequenz / 1000
LVW (mg)	Linksventrikuläres Gewicht	$1,05 \times 5/6 \times [\text{Epi}_d \times (L_d + (\text{AWTh}_d + \text{PWTh}_d) / 2)) - 5/6 \text{Area}_d \times L_d]$ Durch den Faktor 1,05 wird hierbei das spezifische Gewicht des Herzmuskels berücksichtigt

Die Echokardiographischen Messungen wurden von Roland Blume und Marcel Zoremba (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt und von mir ausgewertet.

2.9 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessungen erfolgten nicht-invasiv mit einem CODA[®] Tail-cuff System (Kent Scientific) bei 12-14 Wochen alten Mäusen (nach 8-10 Wochen Betablockerbehandlung). Die Mäuse wurden im wachen Zustand auf einer Wärmeplatte in einer Tierhalterung (Plexiglasröhre) positioniert, die aufblasbare Druckmanschette proximal und der Pulssensor distal am Schwanz der Tiere angebracht. Nach einer Gewöhnungszeit von 10 min wurden bei jedem Tier 5 aufeinanderfolgende Werte des systolischen (RR_{Sys}), diastolischen (RR_{Dia}) und mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) für die Berechnung eines jeweiligen Mittelwertes gemessen.

2.10 Langzeit-EKG Aufnahmen

Die EKG-Aufnahmen wurden mit einem PhysioTel[™] Telemetriesystem der Firma Data Sciences International (DSI) an wachen, sich frei bewegenden Mäusen im Alter von 12-14 Wochen (nach 8-10 Wochen Betablockerbehandlung) durchgeführt. Für die Messungen wurden den Tieren im Alter von ca. 10 Wochen EKG-Transmitter (TA11-ETA-F10, DSI) subkutan implantiert. Dazu wurden die Mäuse in einer Induktionskammer mit Isofluran (2 vol% in 1 l O₂ / min) anästhesiert und auf einer Wärmeplatte positioniert. Die intraoperative Narkose erfolgte über Maskenbeatmung mit 1,5-2 vol% Isofluran (in

1 l O₂ / min). Nach Enthaarung (mittels Enthaarungsspray Veet® Easy-Spray) und alkoholischer Desinfektion des ventralen Thorax wurde eine ca. 1,5 cm lange mediane thorakale Hautinzision durchgeführt. Anschließend wurde das unter der Haut liegende Gewebe präpariert, der EKG-Transmitter in eine subkutane Tasche auf dem Rücken der Maus vorgeschoben, die Negativelektrode rechts thorakal auf dem *Musculus pectoralis* und die Positivelektrode ca. 1 cm links des *Processus xiphoidens* mit je 2 Nähten an der Muskelfaszie fixiert. Im Anschluss wurde der thorakale Hautschnitt durch Einzelknopfnähte verschlossen. Die Schmerztherapie erfolgte durch Metamizolapplikation über das Trinkwasser (300 mg/kg, begonnen 2 Tage vor und fortgeführt bis 7 Tage nach der Operation) und eine subkutane Injektion von Buprenorphin (0,05 mg/kg) vor Beginn der Operation. Nach einer postoperativen Erholungszeit von 2 Wochen wurden EKG-Aufnahmen für 12 Stunden über Nacht durchgeführt. Die EKG-Aufzeichnung und -Analyse erfolgte mit der Software Ponemah (DSI). Die EKG-Aufnahmen wurden manuell nach arrhythmischen Ereignissen wie ventrikulären Extrasystolen (VES), ventrikulären Salven und ventrikulären Tachykardien (VTs) durchsucht. Die Arrhythmie-Klassifikation erfolgte nach den Lambeth Conventions (Walker et al. 1988). Demnach werden 2-3 aufeinander folgende VES als Salve und ≥ 4 aufeinander folgende VES als VT bezeichnet. Beispiele für arrhythmische Ereignisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

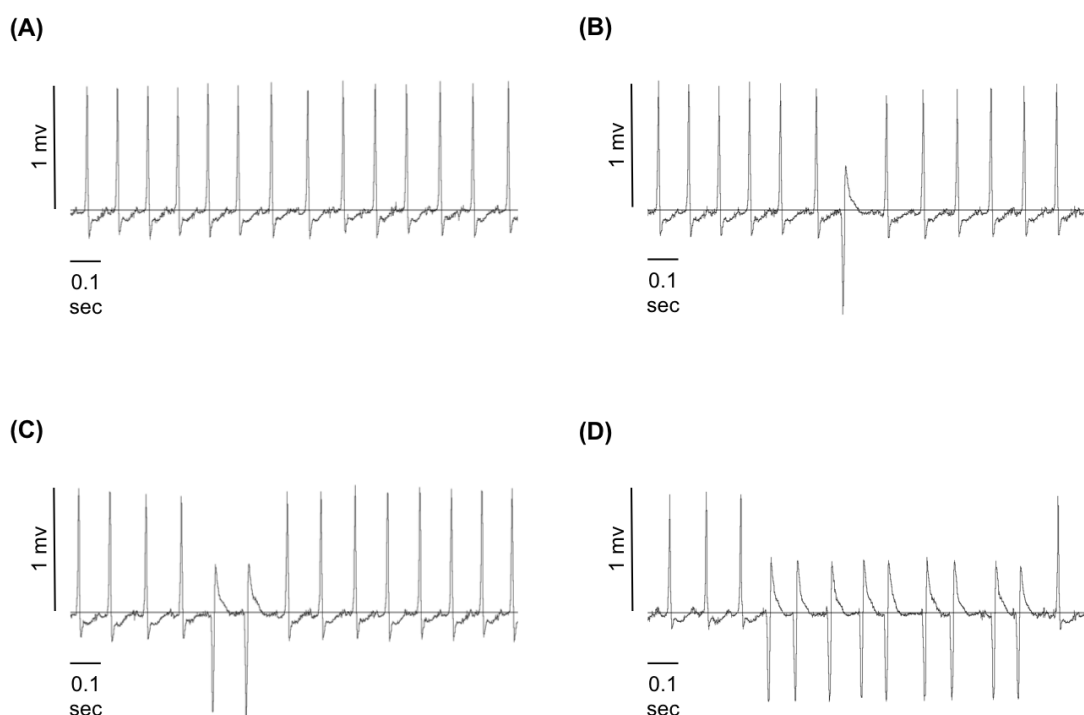


Abbildung 7: Übersicht über ventrikuläre Arrhythmien in telemetrischen EKG-Aufzeichnungen. (A) Regulärer Sinusrhythmus. (B) VES: charakteristisch sind ein frühzeitiger Einfall

des Kammerkomplexes, eine Verbreiterung und Deformierung des Kammerkomplexes und eine auf den Kammerkomplex folgende kompensatorische Pause. (C) Salve (2-3 aufeinander folgende VES). (D) VT (≥ 4 aufeinander folgende VES).

2.11 Organentnahme und biometrische Daten

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation nach vorheriger Narkotisierung mit Isofluran getötet. Zur Erfassung biometrischer Daten wurden die Herzen und Lungen 12-14 Wochen alter Mäuse (nach 8-10 Wochen Betablockerbehandlung) entnommen, abgetupft, gewogen und auf die Tibialänge, welche mit einem Messschieber bestimmt wurde, normiert. Ventrikuläres Gewebe für Proteinanalytik wurde mit NaCl gespült und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ventrikuläres Gewebe für histologische Analysen wurde mit PBS gespült und anschließend in 4 % PFA fixiert.

2.12 Proteinanalytik

2.12.1 Probenvorbereitung

Das bei -80° C gelagerte myokardiale Gewebe wurde tiefgefroren pulverisiert und anschließend in Kraniaspuffer (30 mmol/L Tris/HCl, pH 8,8, 5 mmol/L EDTA, 30 mmol/L NaF, 3 % SDS, 10 % Glycerol + Protease Inhibitor Cocktail + Phosphatase Inhibitor Cocktail) gelöst. Dazu wurde das Gewebe 1:10 mit Kraniaspuffer versetzt und mit Hilfe von Stahlkugeln im Tissue Lyser 3 x 30 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend zentrifugiert (für 10 min, 13.000 rpm bei Raumtemperatur) und der Überstand für die Proteinanalytik verwendet. Die Proteinkonzentrationsbestimmung in den Lysaten erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford 1976). Dazu wurde am Photometer eine Standardkurve mit bovinem IgG (Sigma-Aldrich) erstellt, die Extinktion der Proben bei 595 nm gemessen und die jeweilige Proteinkonzentration anhand der Standardkurve berechnet.

2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach der Lämmli-Methode (Laemmli 1970). Zunächst wurden die Proben 6:1 in 6-fach Lämmli-Puffer (40 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 100 mM DTT, 0,01 % Bromphenolblau) aufgenommen. Anschließend erfolgte die Denaturierung für 5 min bei

95 °C bzw. für die RyR2 Western Blots für 15 min bei 40 °C. Die Auftrennung in der SDS-PAGE erfolgte in Polyacrylamidgelen, bestehend aus Sammelgel mit einem Acrylamid/Bis-Acrylamid-Anteil von 5 % (125 mM Tris-Base, pH 6,8, 5 % Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,08 % TEMED) und Trenngel mit einem Acrylamid/Bis-Acrylamid-Anteil von 6-18 %, je nach Proteingröße (375 mM Tris-Base, pH 8,8, 6-18 % Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,03 % TEMED). Von jeder Probe wurden 15 µg Protein auf das Gel geladen und die Elektrophorese im Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) bei 80 V für 15 min und anschließend bei 120 V durchgeführt. Die Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgte anhand des auf dem Gel mitgeführten Molekulargewichtsmarkers (Precision Plus ProteinTM Standard, Bio-Rad).

2.12.3 Western Blot

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte im Nassblotverfahren in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) bei 400 mA für 75-90 min (je nach Proteingröße). Dabei wurden für die PLB Western Blots PVDF-Membranen (0,2 µm Porengröße) verwendet, für alle anderen Proteine Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm Porengröße). Die PVDF-Membran wurden vor dem Transfer 30 sec mit Methanol aktiviert, danach 3 min mit ddH₂O gewässert und mindestens 10 min in Transferpuffer vorkalibriert. Nach durchgeführtem Blot wurden die Membranen zur Transferkontrolle mit Ponceau-S-Lösung (0,1 % Ponceau-S, 5 % Essigsäure) reversibel gefärbt und anschließend mit TBS-T-Puffer (50 mM Tris-Base, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) wieder entfärbt. Es erfolgte eine Blockierung der Membranen mit 5 % Milchpulver-Lösung (Milchpulver in TBS-T-Puffer) oder Roti[®]-Block für eine Stunde bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Daraufhin wurden die Membranen mit den entsprechenden Erstantikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 5). Anschließend wurden die Membranen viermal für 7 min mit TBS-T-Puffer gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den jeweiligen Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 5, 6) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T-Puffer für 15 min wurden die Membranen mit Entwicklerlösung (SuperSignalTM West Dura oder Femto, Thermo Scientific) inkubiert und die Chemolumineszenz mit einem VersaDocTM Imaging System (Bio-Rad) gemessen und dokumentiert. Die Auswertung der Signale erfolgte mit den Programmen Quantity One (Bio-Rad) und Fusion-Capt (Vilber Lourmat).

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper. Die Antikörper wurden mit TBS-T verdünnt.

Antikörper	Hersteller, Artikelnummer	Verdünnung	Sekundärantikörper
PLB-total	Badrilla, A010-14	1:5000	anti-Maus
P-PLB-Ser16	Badrilla, A010-12	1:5000	anti-Kaninchen
P-PLB-Thr17	Badrilla, A010-13	1:5000	anti-Kaninchen
CaMKII-total	BD Bioscience, 611293	1:5000	anti-Maus
P-CaMKII	Thermo Scientific, PA5-35501	1:2500	anti-Kaninchen
RyR2-total	Thermo Scientific, MA3-925	1:1000	anti-Maus
P-RyR2-2808	Badrilla, A010-30	1:5000	anti-Kaninchen
P-RyR2-2814	Badrilla, A010-31	1:5000	anti-Kaninchen
GAPDH	Santa Cruz, sc-365062	1:1000	anti-Maus
Calsequestrin (CSQ)	Thermo Scientific, PA1-913	1:2500	anti-Kaninchen

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper. Die Antikörper wurden mit TBS-T verdünnt.

Antikörper	Hersteller, Artikelnummer	Verdünnung
anti-Kaninchen	Sigma-Aldrich, A0545	1:5000-1:10000
anti-Maus	Sigma-Aldrich, A3682	1:5000-1:10000

Die in dieser Arbeit gezeigten Western Blots wurden zum Teil nicht von mir selbst durchgeführt. Die in Abbildung 8 gezeigten repräsentativen Western Blots stammen von Dr. rer. nat. Christiane Vettel (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg). Die in Abbildung 10 und 19 gezeigten repräsentativen Western Blots wurden von Dr. rer. nat. Simon Lämmle (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Technische Universität

Dresden) und die in Abbildung 21 gezeigten repräsentativen Western Blots von Thomas Sowa (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt.

2.12.4 Pulldown-Assay

HDAC4 besitzt eine CaMKII-Bindungsdomäne, an welche diese aktivitätsabhängig bindet (Bacs et al. 2006). Für die Aktivitätsbestimmung der CaMKII im Pulldown-Assay wurden in Insektenzellen hergestellte HDAC4-Fragmente (Aminosäuren 419-670) mit GST-Tag benutzt, die an Gluthation-Sepharose-Beads (GE Healthcare) gekoppelt wurden.

Das ventrikuläre myokardiale Gewebe wurde in niedrig-Salz GST-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl + 1:100 PMSF + Protease Inhibitor Cocktail) aufgenommen und mit dem Polytron 3 x 30 sec homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4 °C mit 0,5 % NP-40 inkubiert, dreimal durch eine 25G-Kanüle gepresst und zentrifugiert (für 15 min, 13.000 rpm bei 4 °C). Der Überstand wurde danach weiterverwendet und die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Ein Volumen mit 50 µg Protein wurde anschließend in 100 µl hoch-Salz GST-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 750 mM NaCl) mit 1 µg HDAC4-gebundenen GST-Beads für 2 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach Zentrifugation (2 min, 1500 rpm bei 4° C) wurde der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde zweimal mit 0,5 ml hoch-Salz GST-Puffer und einmal mit 0,5 ml niedrig-Salz GST-Puffer gewaschen, dabei jedesmal 2 min mit 1500 rpm bei 4° C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Anschließend wurden zu jeder Probe 30 µl 1 x Lämmli-Puffer (anders als oben beschrieben: 60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % β -Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau) gegeben und die Proben dann für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die gefällte CaMKII, HDAC4, CaMKII-total und GAPDH wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mittels Antikörpern gegen CaMKII (BD Bioscience, 611293; 1:1000), H92 (HDAC4) (Santa Cruz, sc-11418; 1:1000) und GAPDH (Sigma-Aldrich, sc-365062; 1:10000) detektiert. Die gefällte CaMKII wurde auf HDAC4 und CaMKII-total auf GAPDH normalisiert.

Der Pulldown-Assay wurde von Dr. rer. nat. Sylvia Katz (Abteilung Molekulare Kardiologie und Epigenetik, Universitätsklinikum Heidelberg) durchgeführt. Von ihr stammen die Daten und repräsentativen Western Blots für Abbildung 20.

2.13 Histologie

Das in 4 % PFA fixierte Gewebe wurde für 3 Tage in 70 % Ethanol inkubiert und daraufhin mittels einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (je 1 h in 80 %, 90 %, 96 % und 100 % Ethanol) dehydriert. Nach 30 min Inkubation in einem 1:1 Toluol/Ethanol-Gemisch und anschließender 1 h Inkubation in Toluol wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Dazu wurde das Gewebe über Nacht in flüssigem Paraffin bei 65 °C gelagert und anschließend bei 4 °C ausgehärtet. Daraufhin wurden mit einem Mikrotom 3 µm dicke transversale Schnitte des ventrikulären Myokards hergestellt. Anschließend erfolgten die Entparaffinisierung der Schnitte mit Xylol und einer absteigenden Ethanol-Reihe (je 1 min in 100 %, 96 %, 90 %, 80 % und 70 % Ethanol) und eine Rehydrierung in dH₂O.

Zur Beurteilung der myokardialen Hypertrophie wurde eine WGA (*Wheat Germ Agglutinin*)-FITC-Färbung durchgeführt, bei der eine Markierung der Zellmembranen erfolgt. Dazu wurden die Schnitte für 5 min in PBS gewaschen und anschließend abgedunkelt über Nacht mit 20 µg/ml Lektin-WGA-FITC (Sigma-Aldrich) gefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und mit ProLong[®] Gold Antifade Mountant (Invitrogen) eingedeckt. Mit dem Mikroskop IX70 (Olympus) wurden anschließend Bilder von zufällig verteilten Bereichen aufgenommen. Mit dem Programm ImageJ wurden je 150 Zellquerschnittsflächen gemessen und die durchschnittliche Zellquerschnittsfläche berechnet.

Zur Beurteilung des Fibrosegrades des myokardialen Gewebes wurde eine Sirius-Red-Färbung durchgeführt, bei welcher eine Rotfärbung des Kollagens erfolgt. Dazu wurden die Schnitte für 1 h mit Pikro-Sirius-Red Lösung (0,1 % Direct Red 80 in gesättigter wässriger 1,3 % Pikrinsäurelösung) gefärbt und anschließend mit 0,5 % Essigsäure gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Dehydrierung mittels 100% Ethanol. Die Schnitte wurden mit Xylol geklärt und mit Eukitt[®] quick-hardening mounting medium (Sigma-Aldrich) eingedeckt. Die Bilder wurden am digitalen Mikroskop IX70 (Olympus) aufgenommen und mit dem Programm ImageJ quantifiziert.

Die histologischen Färbungen und Auswertungen wurden von PD Dr. rer. nat. Laura Zelarayan (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt. Von ihr stammen die Daten und repräsentativen mikroskopischen Bilder für Abbildung 17.

2.14 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Die einzelnen Gruppen wurden mittels ungepaartem t-Test (Abbildung 8, 9, 10, 12, 20), Extra sum-of-squares F-Test (Abbildung 11), Log-rank (Mantel-Cox) Test (Abbildung 13), two-way-ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test (Abbildung 14), one-way-ANOVA mit Newman-Keuls Post-hoc-Test (Abbildung 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22) oder Chi-Quadrat-Test (Abbildung 18) verglichen. Die verwendeten statistischen Tests und n-Zahlen sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen angegeben. Die Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. p-Werte $<0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

2.15 Verwendete Materialien

2.15.1 Primer

Primersequenzen (5'-3'):

CaMK for: TTGAAGGGTGCCATCTTGACA

CaMK rev: GGTCATGCATGCCTGGAATC

Die Primer wurden von Eurofins Genomics bezogen.

2.15.2 Pufferzusammensetzungen

DNA-Analytik:

Digestionspuffer: 50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 0,5 % SDS, pH 8,0

LowTE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0

PCR-Puffer: im DreamTaq Green DNA Polymerase Set enthalten (Thermo Scientific, EP0711)

TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,5

Proteinanalytik:

Kranias-Puffer: 30 mmol/L Tris/HCl, pH 8,8, 5 mmol/L EDTA, 30 mmol/L NaF, 3% SDS, 10% Glycerol

1 x Lämmli-Puffer:	40 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerol, 100 mM DTT, 0,01% Bromphenolblau
Elektrophorese-Puffer:	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
Transfer-Puffer:	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol
TBS-T-Puffer:	50 mM Tris-Base, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20
Ponceau-S-Färbelösung:	0,1 % Ponceau-S, 5 % Essigsäure
GST-Puffer, niedrig-Salz:	20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl
GST-Puffer, hoch-Salz:	20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 750 mM NaCl

2.15.3 Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller, Artikelnummer
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (29:1)	Roth, A124.2
Agarose	Thermo Scientific, 16500-500
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, 161-0700
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun, 00088992
β -Mercaptoethanol	Applichem, A1108
Bradford-Reagenz Roti [®] -Nanoquant	Roth, K880.1
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, B8026
Buprenorphin Temgesic [®] Injection 1 ml (enthält 300 μ g Buprenorphin)	Reckitt Benckiser, 15394
Direct Red 80	Sigma-Aldrich, 365548
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, A1101
DNA-Isolationsreagenz für genomische DNA	Applichem, A3418
dNTP Mix (25 mM)	Thermo Scientific, R1121
Dobutamin 250 mg / 50 ml	Hamel Pharma Plus, 225055
DreamTaq [™] Green DNA Polymerase (5 U/ μ l)	Thermo Scientific, EP0711

EDTA	Applichem, A1104
Eisigsäure	Roth, 6755.2
Elektrodengel SignaGel®	Parker Labs, 15-25
Entwicklerlösung SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, 34075
Entwicklerlösung SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, 34095
Ethanol	Roth, 5054.1
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, E1510
Eukitt® quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, 03989
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific, SM0321
Glutathion-Sepharose Beads	GE Healthcare, 17-0756-01
Glycin	Applichem, A1067
Immunglobulin G (IgG), bovin	Sigma-Aldrich, I5506
Isofluran Forene® 100 % (V/V)	AbbVie Deutschland, 10182054
Isopropanol	Roth, 6752.5
Lektin-WGA-FITC	Sigma-Aldrich, L4895
Metamizol Novaminsulfon 500 mg/ml	Zentiva Pharma, 04443361
Methanol	Roth, 8388.6
Metoprololtartrat	Sigma-Aldrich, M5391
Milchpulver	Applichem, A0830
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, 3957.2
Natriumchlorid 0,9 % Lösung	Braun, 06063042
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, A2572
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, S7920
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, 6771.1
Nonidet™ P 40 (NP-40)	Sigma-Aldrich, 56741

Paraffin (Paraplast)	Roth, X880.1
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, P6148
PBS (10x) Gibco®	Thermo Scientific, 70011036
Phosphatase Inhibitor Cocktail (PhosSTOP™)	Roche, 04 906 837 001
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, P6744
PMSF	Thermo Scientific, 36978
Ponceau-S	Applichem, A1405
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Marker	Bio-Rad, 1610374
ProLong® Gold Antifade Mountant	Thermo Scientific, P36930
Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete™)	Roche, 11 836 170 001
Proteinase K	Roth, 7528.2
Roti®-Block	Roth, A151.3
Salzsäure (HCl)	Applichem, A0659
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, 1610801
Toluol	Roth, 9558.1
Tris-Base	Applichem, A1086
Tris-HCl	Applichem, A1087
Tween 20	Roth, 9127.1
Ultraschallgel EcoGel 100 Imaging Ultrasound Gel	Eco-Med, 30GB
Veet® Easy-Spray Haarentfernungsspray	Reckitt Benckiser
Xylol	Roth, 9713.1

2.15.4 Hilfsmittel und Geräte

Hilfsmittel bzw. Gerät	Hersteller
Analysenwaage Talent TE214S	Sartorius

Anästhesie-Setup Vevo Compact Anesthesia System TM	Visual Sonics
CODA [®] Animal Holder	Kent Scientific
CODA [®] Occlusion Cuff	Kent Scientific
CODA [®] VPR Sensor	Kent Scientific
Echokardiographiegerät Vevo [®] 2100	Visual Sonics
Einmalkanülen Sterican [®]	B. Braun
Einwegspritzen Injekt [®]	B. Braun
EKG-Telemetrieanlage PhysioTel TM System	Data Sciences International
EKG-Transmitter TA11-ETA-F10	Data Sciences International
Elektrophorese-Spannungsgerät PowerPac TM Basic	Bio-Rad
Gel Doc TM XR Imager	Bio-Rad
GeneAmp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems
Isofluranverdampfer Dräger-Vapor [®] 19.3	Dräger
Kippwippe Rocking Platform WT15	Biometra
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt
Magnetrührer Ikamag [®] Reo	Ika
Mikroskop IX70	Olympus
Mikrotom VT1000 S	Leica
Molecular Imager VersaDoc TM MP 4000	Bio-Rad
Nahtmaterial PROLENE [®]	Ethicon
Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porengröße) Whatman [®] Protran [®]	GE Healthcare/Whatman
Objektträger SuperFrost [®]	Menzel/Thermo Scientific
Operationsbesteck	Fine Science Tools

pH-Meter inoLab [®] pH Level 1	InoLab
Photometer BioPhotometer [®] 6131	Eppendorf
Pipetten Research [®] plus, Reference [®] 2, Multipette [®] M4	Eppendorf
Pipetten serologisch	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter Biosphere [®]	Sarstedt
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph
Polytron [®] PT 1300 D	Kinematica
PVDF-Membran Amersham Hybond-P (0,2 µm Porengröße)	GE Healthcare
Reaktionsgefäße Eppendorf Tubes [®] , Eppendorf PCR Tubes	Eppendorf
SDS-PAGE Zelle Mini-PROTEAN [®]	Bio-Rad
Stahlkugeln Ø 5 mm für Tissue-Lyser	Qiagen
Sub-Cell [®] GT Agarose-Gelelektrophorese System	Bio-Rad
Tail-Cuff Blutdruckmessgerät CODA [®]	Kent Scientific
Tissue-Lyser II	Qiagen
Vortexer	Heidolph
Waage ED153-CW	Sartorius
Wärmeplatte Hot Plate 062	Labotect
Western Blot Zelle Mini Trans-Blot [®]	Bio-Rad
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt

2.15.5 Software

Software	Hersteller
FusionCapt Advance v. 16.11.0.0	Vilber Lourmat
ImageJ v. 1.45	Wayne Rasband
Image Lab v. 5.1	Bio-Rad
Ponemah v. 5.2	Data Science International
Prism v. 5.0.1	GraphPad
Quantity One v. 4.6.9	Bio-Rad
Vevo 2100 Software v. 1.6.0	Visual Sonics

3 Ergebnisse

3.1 Effekte einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz

Um den Einfluss einer chronischen β -adrenergen Blockade auf die CaMKII-Aktivität in der Herzinsuffizienz zu untersuchen, wurde zunächst die Expression und Autophosphorylierung der CaMKII, welche als *readout* für die Enzymaktivität dient (Grimm M und Brown 2010), in ventrikulärem Gewebe von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (NYHA \geq III, EF \leq 37 %) mit und ohne Betablockertherapie im Western Blot analysiert. Die myokardialen Proben dieser Patienten wurden im Rahmen von Herztransplantationsoperationen entnommen. Eine Übersicht über die Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht und Begleitmedikation befindet sich in Tabelle 7.

Tabelle 7: Charakteristika der Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz. Ventrikuläres Gewebe dieser Patienten wurde für Western Blot-Analytik der CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung (Abbildung 8) verwendet. Geschl.: Geschlecht; EF: Ejektionsfraktion; Antiarr.: Antiarrhythmikum; ICM: ischämische Kardiomyopathie; DCM: dilatative Kardiomyopathie; k.A.: keine Angaben.

Patienten-Nr.	Alter	Geschl.	Diagnose	NYHA-Klasse	EF (%)	Beta-blocker	Anti-arr.	Calcium-Antagonist	RAAS-Hemmer	Dopamin/Dobutamin	Steroide	Nitrate	Digitalis
1	64	m	ICM	4	15	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja	nein
2	43	m	DCM	4	20	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja
3	49	m	ICM	4	15	nein	ja	nein	ja	ja	ja	nein	nein
4	57	w	ICM	k.A.	23	ja	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein
5	66	m	ICM	3-4	25	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja
6	53	m	DCM	3	37	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
7	57	m	ICM	4	15	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja
8	46	m	ICM	3	15-20	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein
9	55	m	ICM	k.A.	20	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
10	52	w	ICM	3-4	25	nein	ja	ja	ja	nein	nein	nein	nein
11	58	m	DCM	3-4	25	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein

12	24	m	DCM	3-4	19	ja	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein
----	----	---	-----	-----	----	----	------	------	----	------	------	----	------

Im Western Blot ließen sich keine Unterschiede sowohl in der CaMKII-Expression als auch in der CaMKII-Autophosphorylierung zwischen der Betablocker-Gruppe und der Nicht-Betablocker-Gruppe detektieren (Abbildung 8).

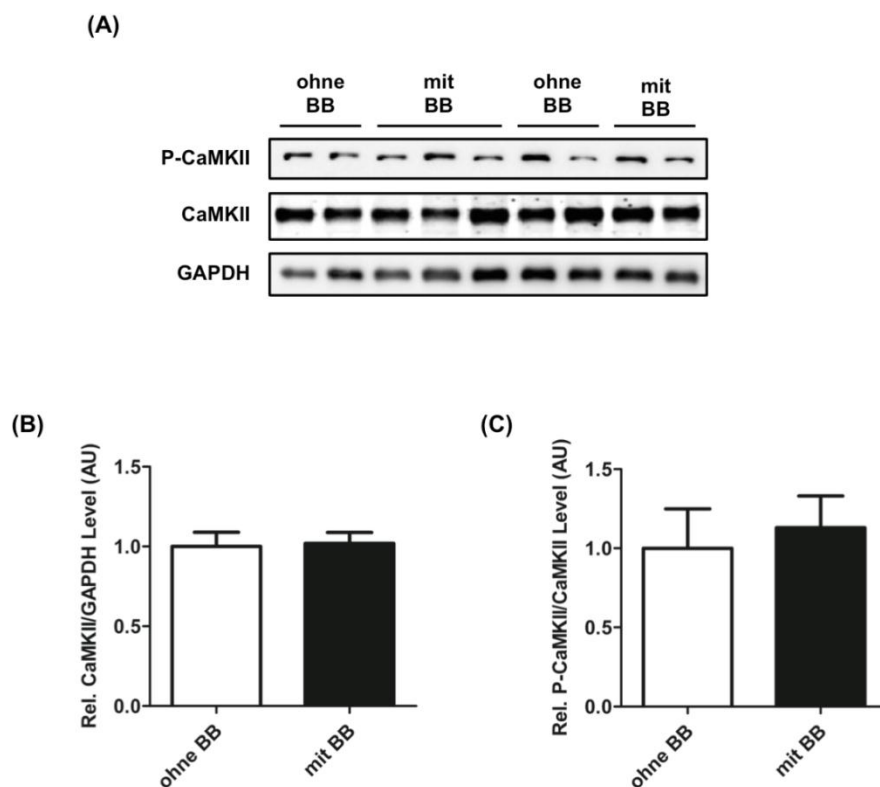


Abbildung 8: Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung in ventrikulärem Gewebe von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz. (A) Repräsentativer Western Blot von autophosphorylierter CaMKII (P-CaMKII), CaMKII-total und GAPDH, (B) Quantifizierung von CaMKII-total normalisiert auf GAPDH und (C) Quantifizierung von P-CaMKII normalisiert auf CaMKII-total. BB: Betablocker. n=6. Statistik: ungepaarter t-Test.

Um diesen Befund in einem weiteren Patientenkollektiv mit größerer n-Zahl zu reevaluieren, wurden anschließend Vorhofproben von primär nicht herzinsuffizienten Patienten, die sich einer herzchirurgischen Operation unterzogen, hinsichtlich der CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung unter Betablockertherapie untersucht.

3.2 Effekte einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung bei primär nicht herzinsuffizienten Patienten

Das für die Proteinanalytik der CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung verwendete Gewebe wurde im Rahmen von herzchirurgischen Operation (Bypass- und/oder Aortenklappenersatz- und/oder Mitralklappenreparaturoperation) entnommen.

Es wurde arteriales Herzgewebe bei zwei Kollektiven primär nicht herzinsuffizienter Patienten untersucht. Eine Übersicht über die Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht, EF und Begleitmedikation befindet sich in Tabelle 8 und 9.

Tabelle 8: Charakteristika der primär nicht herzinsuffizienten Patienten (1). Atriales Gewebe dieser Patienten wurde für Western Blot-Analytik der CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung (Abbildung 9) verwendet. Geschl.: Geschlecht; EF: Ejektionsfraktion; Antiarr.: Antiarrhythmikum; OP: durchgeführte Operation; SR: Sinusrhythmus; AKE: Aortenklappenersatz; AKB: Aortokoronarer Bypass; MKR: Mitralklappenreparatur; k.A.: keine Angaben.

Patienten-Nr.	Alter	Geschl.	Rhythmus	EF (%)	Beta-blocker	Anti-arr.	Calcium-Antagonist	RAAS-Hemmer	Digitalis	Statin	Diabetes mellitus	OP
1	45	m	SR	65	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	AKE
2	50	m	SR	50	ja	nein	nein	ja	nein	ja	nein	k.A.
3	51	m	SR	60	ja	nein	nein	ja	nein	ja	nein	AKB
4	81	m	SR	k.A.	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	AKE
5	70	w	k.A.	65	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	AKB
6	77	m	SR	38	ja	nein	nein	ja	nein	nein	ja	AKB
7	69	m	SR	78	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	AKB
8	64	m	SR	60	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	AKE+AKB+MKR
9	65	m	SR	70	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	AKB
10	71	m	SR	55	ja	nein	ja	ja	nein	ja	nein	AKB
11	58	m	k.A.	65	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	AKE
12	69	m	SR	52	ja	nein	nein	ja	nein	nein	ja	AKB
13	49	m	SR	93	ja	nein	nein	nein	nein	nein	k.A.	AKB
14	80	m	SR	40	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	AKE+AKB
15	72	m	SR	k.A.	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja	AKE+AKB

16	73	w	SR	64	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	AKB
17	73	m	SR	55	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	AKE
18	69	m	SR	35	ja	nein	nein	ja	nein	ja	nein	AKB
19	73	m	SR	82	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	AKB
20	74	w	SR	60	ja	nein	ja	ja	nein	ja	nein	AKE
21	59	m	SR	>60	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	AKB
22	75	m	SR	50	ja	nein	nein	nein	nein	ja	ja	AKB

Tabelle 9: Charakteristika der primär nicht herzinsuffizienten Patienten (2). Atriales Gewebe dieser Patienten wurde für Western Blot-Analytik der CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung (Abbildung 10) verwendet. Geschl.: Geschlecht; EF: Ejektionsfraktion; Antiarr.: Antiarrhythmikum; OP: durchgeführte Operation; SR: Sinusrhythmus; AKE: Aortenklappenersatz; AKB: Aortokoronarer Bypass; MKR: Mitralklappenreparatur; k.A.: keine Angaben.

Patienten-Nr.	Alter	Geschl.	Rhythmus	EF (%)	Beta-blocker	Anti-arr.	Calcium-Antagonist	RAAS-Hemmer	Statin	Diabetes mellitus	OP
1	m	77	SR	45-50	nein	nein	nein	ja	ja	ja	AKE+AKB
2	m	64	SR	>65	ja	nein	nein	nein	ja	k.A.	AKB
3	m	55	SR	66	ja	nein	nein	ja	nein	k.A.	AKB
4	w	54	SR	k.A.	ja	nein	nein	ja	ja	k.A.	AKB
5	m	71	SR	45	ja	nein	nein	nein	ja	ja	AKB+MKR
6	w	71	SR	55	nein	nein	nein	ja	ja	nein	AKB
7	m	55	SR	56	nein	nein	nein	ja	ja	k.A.	AKB
8	m	73	SR	35	ja	nein	nein	ja	nein	k.A.	AKB
9	m	61	SR	36	ja	nein	nein	ja	ja	k.A.	AKB
10	m	70	SR	80	nein	nein	ja	nein	nein	nein	MKR
11	w	67	SR	k.A.	nein	nein	nein	ja	nein	k.A.	AKB
12	w	83	SR	>60	ja	nein	nein	ja	ja	nein	AKB
13	m	71	SR	60	nein	nein	k.A.	k.A.	ja	k.A.	AKB
14	w	70	SR	>55	ja	nein	nein	nein	nein	ja	AKE
15	m	83	SR	k.A.	ja	nein	nein	ja	ja	k.A.	AKE
16	w	79	SR	66	nein	nein	k.A.	ja	k.A.	nein	AKB
17	w	75	SR	35-40	ja	nein	nein	ja	ja	ja	AKB
18	w	75	SR	k.A.	ja	nein	nein	ja	ja	ja	AKB+MKR
19	m	68	SR	64	nein	nein	nein	ja	ja	nein	AKB
20	m	83	SR	k.A.	nein	nein	nein	ja	nein	ja	AKB

21	w	71	SR	45	nein	nein	nein	ja	ja	nein	AKB
22	w	61	SR	k.A.	nein	nein	nein	ja	nein	ja	AKB
23	w	73	SR	38	nein	nein	nein	ja	ja	nein	AKB

Im Western Blot ließen sich auch in diesen beiden Patientenkollektiven keine Unterschiede zwischen der Betablocker-Gruppe und der Nicht-Betablocker-Gruppe hinsichtlich der CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung nachweisen (Abbildung 9, 10).

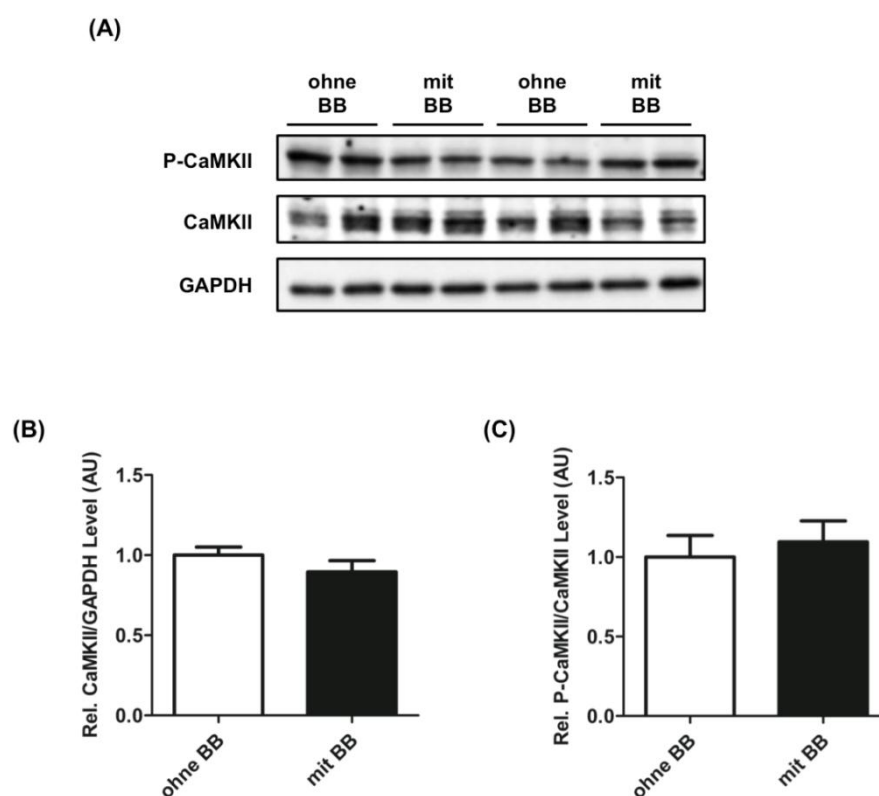


Abbildung 9: Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung in atrialem Gewebe bei primär nicht herzinsuffizienten Patienten (1). (A) Repräsentativer Western Blot von P-CaMKII, CaMKII-total und GAPDH, (B) Quantifizierung von CaMKII-total normalisiert auf GAPDH und (C) Quantifizierung von P-CaMKII normalisiert auf CaMKII-total. BB: Betablocker. $n \geq 10$. Statistik: ungepaarter t-Test.

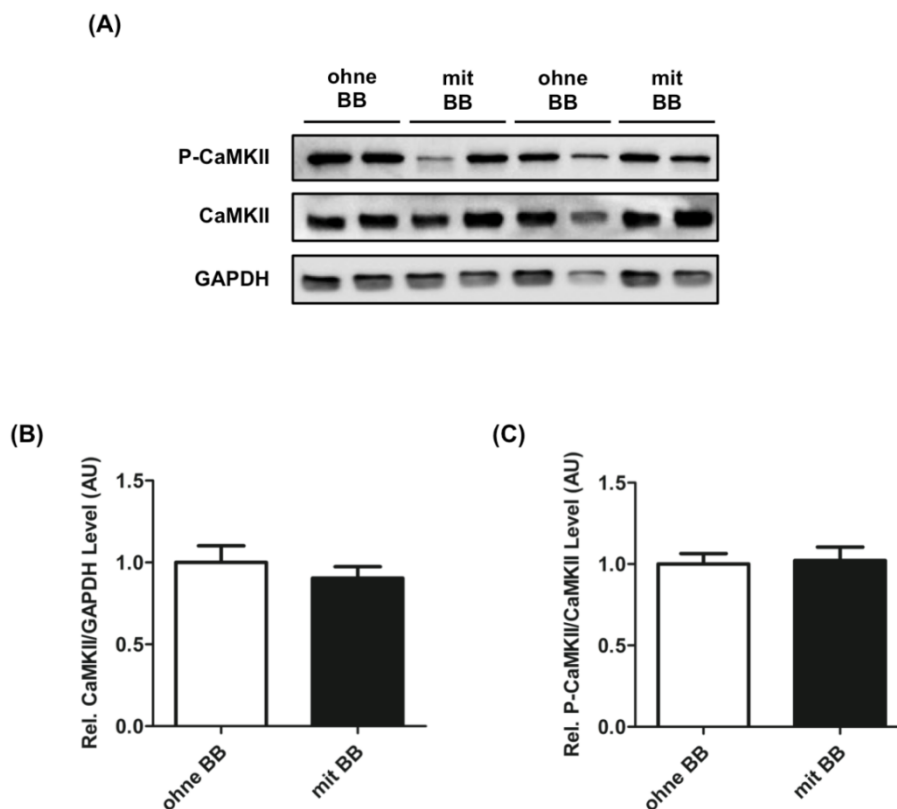


Abbildung 10: Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung in atrialem Gewebe bei primär nicht herzinsuffizienten Patienten (2). (A) Repräsentativer Western Blot von P-CaMKII, CaMKII-total und GAPDH, (B) Quantifizierung von CaMKII-total normalisiert auf GAPDH und (C) Quantifizierung von P-CaMKII normalisiert auf CaMKII-total. BB: Betablocker. $n \geq 11$. Statistik: ungepaarter t-Test.

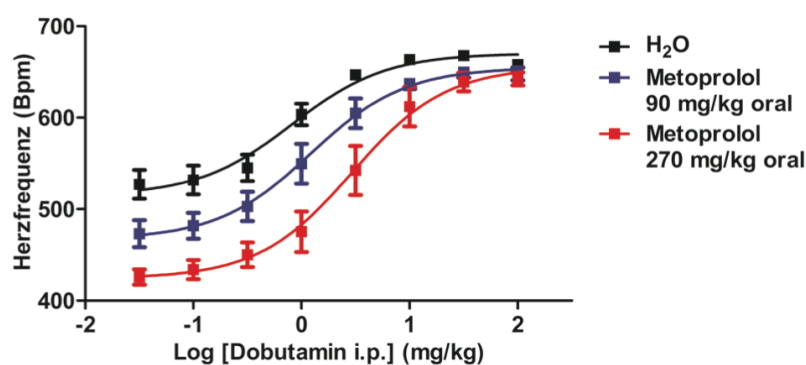
In allen untersuchten Patientengruppen ließ sich somit kein Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Aktivität feststellen. Die Analyse humaner Proben unterliegt jedoch einigen Limitationen wie z.B. teilweise unkontrollierten bzw. nicht dokumentierten Komorbiditäten und Begleitmedikationen der Patienten, was häufig mit hohen Varianzen der gemessenen Parameter einhergeht. Daher wurde der überraschende Befund einer unter Betablockertherapie unveränderten CaMKII-Aktivität im Tiermodell genauer untersucht. Dazu wurde zunächst eine Betablockertherapie in einem Mausmodell der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz (Maier et al. 2003; Zhang T et al. 2003) etabliert.

3.3 Etablierung einer effektiven Betablockade im Mausmodell

WT-Mäuse der F1-Generation wurden für mindestens eine Woche vor Beginn der Messungen mit verschiedenen Metoprolol-Dosierungen behandelt. Um eine effektive

Betablockade zu erzielen, wurden sowohl *in vivo* Effekte als auch molekulare Effekte der verschiedenen Metoprolol-Dosierungen untersucht. Als *in vivo readout* diente dabei der Herzfrequenzanstieg in Reaktion auf katecholaminerge Stimulation mit Dobutamin. Dazu wurde Dobutamin in aufsteigenden Dosierungen intraperitoneal injiziert und der maximale Herzfrequenzanstieg unter jeder einzelnen Dosierung gemessen. Die sich daraus ergebenden Dosis-Wirkungskurven und deren Normalisierungen zur Visualisierung der mittleren effektiven Dosis (ED_{50}) sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Behandlung mit Metoprolol 270 mg/kg/d über das Trinkwasser führte zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Dobutamin Dosis-Wirkungskurve (ED_{50} 2,55 mg/kg gegenüber 0,96 mg/kg in der H₂O-Gruppe). Für geringere orale Dosierungen ließ sich keine signifikante Rechtsverschiebung beobachten.

(A)



(B)

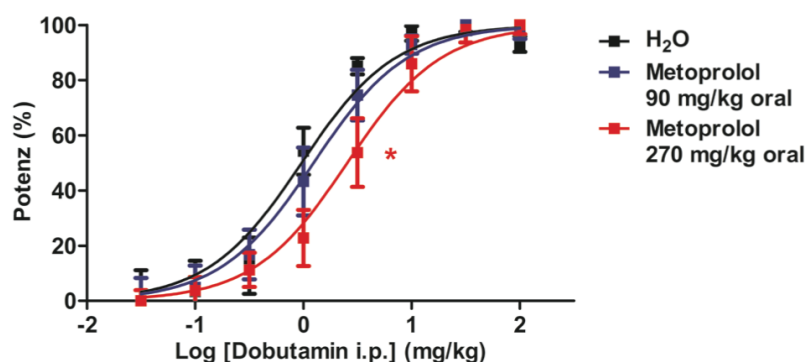


Abbildung 11: Einfluss verschiedener Metoprolol-Dosierungen auf den Herzfrequenzanstieg unter katecholaminerger Stimulation. (A) Dobutamin-Dosis-Wirkungskurven für die Kontrollgruppe (H₂O) und zwei verschiedene Metoprolol-Dosierungen, (B) Normalisierung der Dosis-Wirkungskurven. n=8. *p<0,01 für logED₅₀ Metoprolol 270 mg/kg gegenüber H₂O. Statistik: Extra sum-of-squares F-Test.

Als molekulares *readout* einer effektiven β -AR-Blockade wurde die PLB-Phosphorylierung an der PKA-Phosphorylierungsstelle Serin16, einem *downstream target* der β -adrenergen Signalkaskade, untersucht. Die Western Blot Analyse zeigte eine signifikante Reduktion der PLB-Ser16 Phosphorylierung unter der Behandlung mit Metoprolol 270 mg/kg/d ($-82,1 \pm 20,1 \%$), nicht jedoch bei geringeren Dosierungen (Abbildung 12).

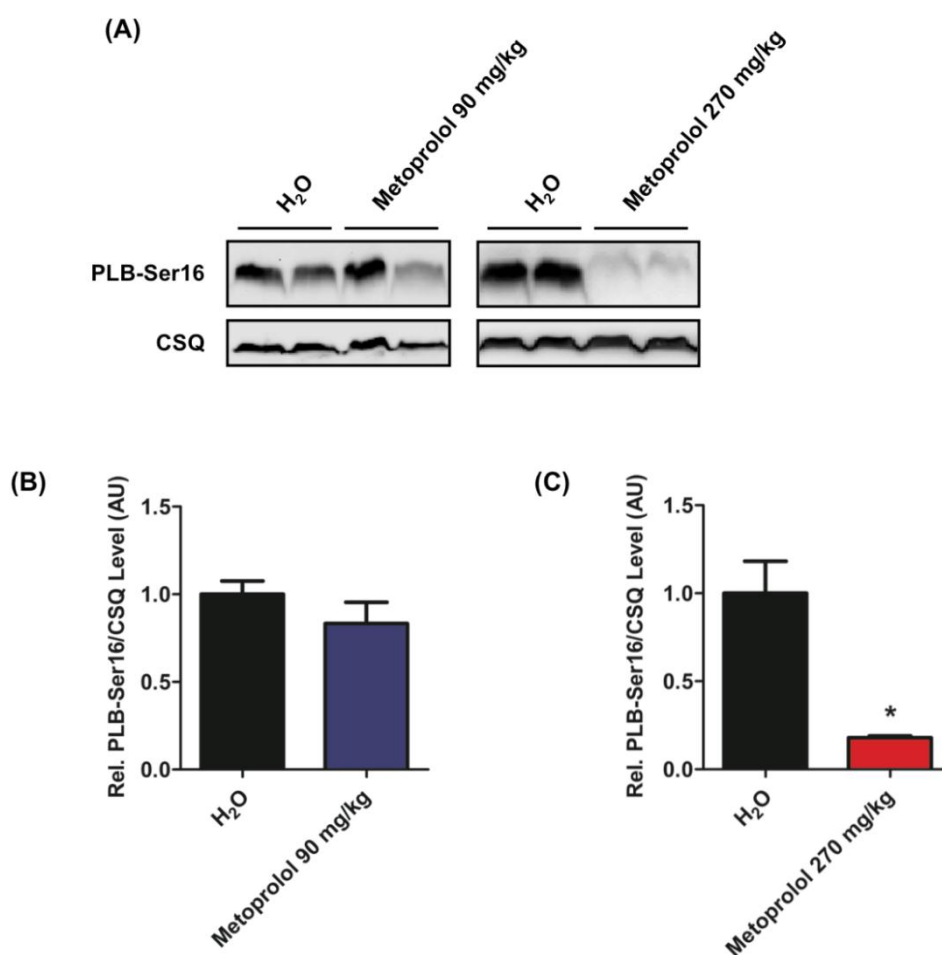


Abbildung 12: Einfluss verschiedener Metoprolol-Dosierungen auf die PLB-Ser16 Phosphorylierung. (A) Repräsentative PLB-Ser16 und Calsequestrin (CSQ) Western Blots, (B) Quantifizierung von PLB-Ser16 in der Gruppe Metoprolol 90 mg/kg/d im Vergleich zur Kontrollgruppe (H₂O), (C) Quantifizierung von PLB-Ser16 in der Gruppe Metoprolol 270 mg/kg/d im Vergleich zur Kontrollgruppe (H₂O). PLB-Ser16 wurde auf CSQ normalisiert. $n \geq 5$. * $p < 0,01$ gegenüber H₂O. Statistik: ungepaarter t-Test.

Für die Dosierung Metoprolol 270 mg/kg/d konnten also *in vivo* und auf molekularer Ebene signifikante Effekte hinsichtlich der gewählten *readouts* beobachtet werden, sodass diese Dosierung für die weiteren Experimente verwendet wurde. Offensichtliche toxische Wirkungen ließen sich durch Beobachtung des Ernährungs- und Verhaltenszustandes der

behandelten Tiere nicht feststellen. Die dauerhafte Applikation von Metoprolol im Trinkwasser führte außerdem zu keiner Einschränkung der Trinkmenge im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren.

3.4 Effekte einer Betablockertherapie auf den kardialen Phänotyp CaMKII δ_c -transgener Mäuse

Nach den Etablierungsversuchen erfolgte die Langzeitbehandlung der CaMKII δ_c -TG und WT-Geschwistertiere mit Metoprolol 270 mg/kg/d. Die Behandlung wurde in einem Alter von 4 Wochen begonnen. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die TG bereits Anzeichen einer kontraktilen Dysfunktion (vgl. Abbildung 14), befanden sich allerdings noch nicht in einer Phase der dekompensierten Herzinsuffizienz.

3.4.1 Überlebensstudie

Die TG zeigten eine im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe deutlich verkürzte Lebenserwartung mit einem medianen Überleben von 13 Wochen. Die Behandlung mit Metoprolol führte dabei zu einer signifikant verlängerten Überlebensdauer von im Median 18 Wochen (Abbildung 13).

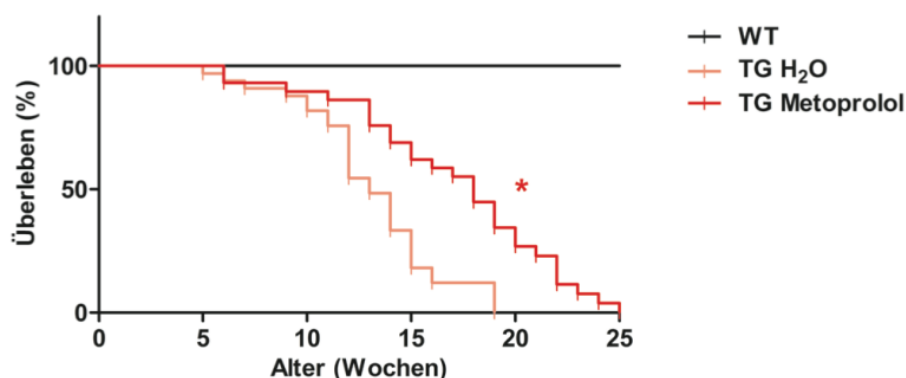


Abbildung 13: Einfluss einer Betablockertherapie auf die Mortalität der CaMKII δ_c -TG. Kaplan-Meier-Kurven von WT, TG und mit Metoprolol 270 mg/kg/d behandelten TG. $n \geq 29$ für TG. * $p < 0,01$ TG Metoprolol gegenüber TG H₂O. Statistik: Log-rank (Mantel-Cox) Test.

Um den Hintergrund dieses Überlebensvorteils unter Betablockertherapie genauer zu analysieren, wurden verschiedene klinische Parameter u.a. echokardiographisch und

telemetrisch gemessen und eine histologische und proteinanalytische Untersuchung des Herzgewebes durchgeführt.

3.4.2 Kardiale Kontraktilität und Herzfrequenz

Zunächst wurde eine echokardiographische Analyse der Herzfunktion zu mehreren Messzeitpunkten über einen Zeitraum von 6 Wochen durchgeführt. Die erste Messung erfolgte im Alter von 4 Wochen vor Beginn der Metoprolol-Applikation, anschließend wurden Echokardiographien an Tag 3, 10, 24 und 38 nach Beginn der Betablockertherapie durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die TG eine massive kontraktile Dysfunktion entwickelten (FAS $-74,2 \pm 4,9$ % gegenüber WT an Tag 38) (Abbildung 14). Durch Metoprolol-Behandlung ließ sich die Entwicklung der kardialen Dysfunktion in den TG nicht aufhalten. Jedoch konnten bei den behandelten Tieren typische klinische Betablockereffekte festgestellt werden wie initial negativ inotrope Effekte (FAS $-22,7 \pm 9,1$ % TG Metoprolol gegenüber TG H₂O an Tag 3 der Behandlung) und eine signifikante Herzfrequenzreduktion ($-13,1 \pm 2,3$ % WT Metoprolol gegenüber WT H₂O und $-13,9 \pm 1,8$ % TG Metoprolol gegenüber TG H₂O) während des gesamten Beobachtungszeitraumes (Abbildung 14).

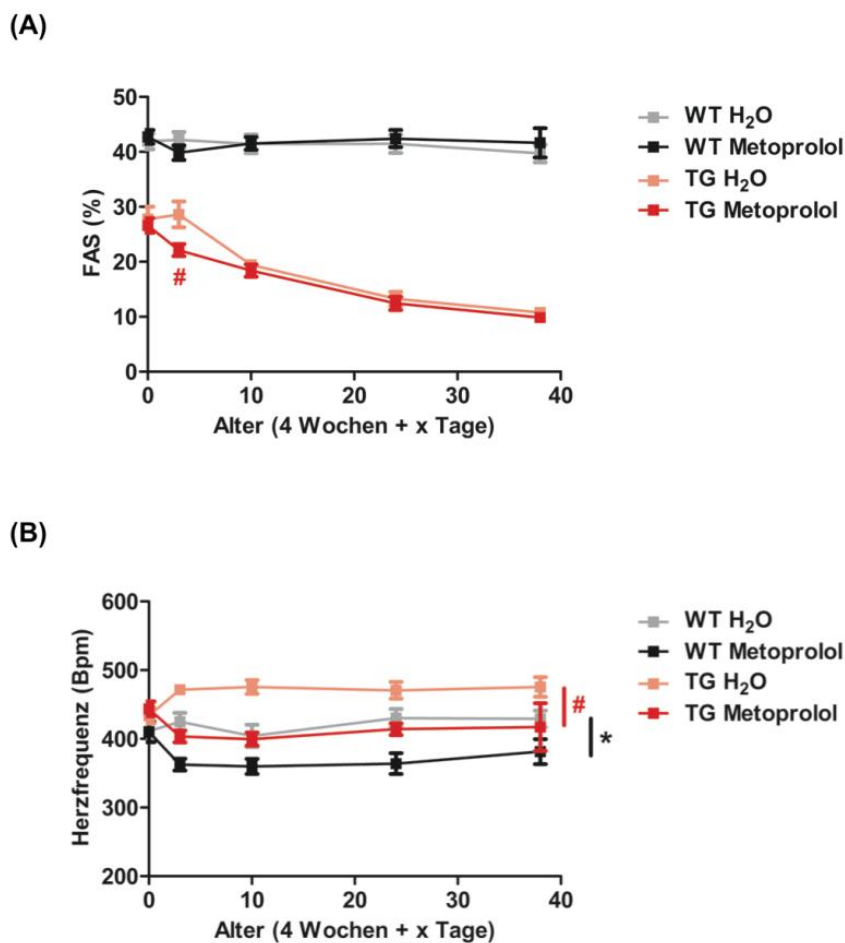


Abbildung 14: Echokardiographische Analyse der Herzfunktion in CaMKII δ -TG und WT mit und ohne Betablockertherapie. (A) Kontraktilität gemessen als *fractional area shortening* (FAS), (B) Herzfrequenz während der Behandlung mit Metoprolol bei WT und TG und in den jeweiligen Kontrollgruppen ohne Betablockertherapie. $n \geq 9$. * $p < 0,05$ gegenüber WT H₂O, # $p < 0,05$ gegenüber TG H₂O. Statistik: two-way-ANOVA.

3.4.3 Blutdruck

Als weiterer klinischer Parameter wurde der Blutdruck im Alter von 12-14 Wochen nicht invasiv mittels Tail-cuff-Methode gemessen. Die Metoprolol-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks sowohl in den WT ($RR_{\text{Sys}} -15,9 \pm 4,5 \%$, $RR_{\text{Dia}} -11,6 \pm 4,2 \%$, $MAP -13,2 \pm 4,0 \%$ WT Metoprolol gegenüber WT H₂O) als auch in den TG ($RR_{\text{Sys}} -12,6 \pm 4,4$, $RR_{\text{Dia}} -11,0 \pm 2,4 \%$, $MAP -12,8 \pm 4,7 \%$ TG Metoprolol gegenüber TG H₂O) (Abbildung 15).

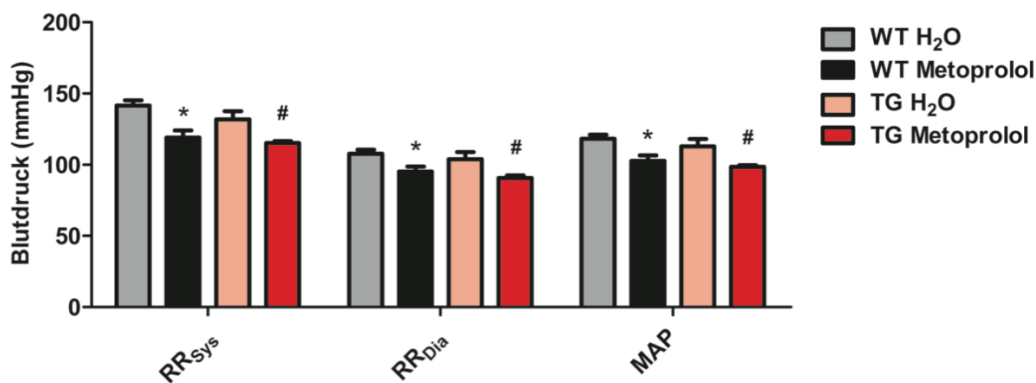


Abbildung 15: Tail-cuff-Messung des Blutdrucks in CaMKII δ -TG und WT mit und ohne Betablockertherapie. Systolischer (RR_{sys}), diastolischer (RR_{dia}) und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP). n=5. *p<0,05 gegenüber WT H₂O, #p<0,05 gegenüber TG H₂O. Statistik: one-way-ANOVA.

3.4.4 Kardiale Hypertrophie und Lungenstauung

Um die kardiale Hypertrophie und Lungenstauung zu beurteilen, wurden die Herzen und Lungen im Alter von 12-14 Wochen explantiert, gewogen und auf die Tibialänge normiert. Die TG zeigten deutlich vergrößerte Herz- und Lungengewichte in im Vergleich zum WT (Abbildung 16). Die Behandlung mit Metoprolol wirkte sich dabei protektiv sowohl auf die kardiale Hypertrophieentwicklung (Herzgewicht/Tibialänge $-13,8 \pm 5,8$ % TG Metoprolol gegenüber TG H₂O) als auch auf die Lungenstauung (Lungengewicht/Tibialänge $-15,0 \pm 6,6$ % TG Metoprolol gegenüber TG H₂O) aus.

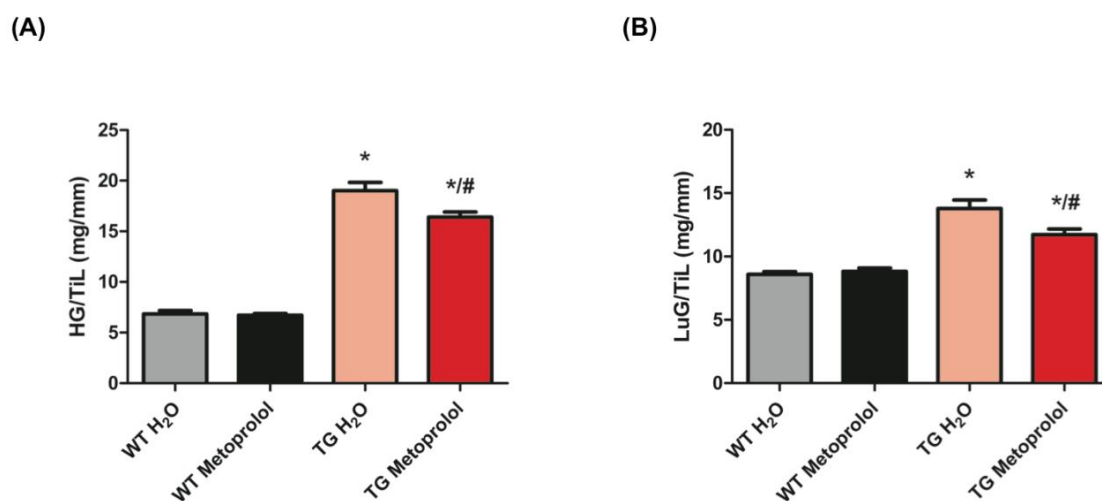


Abbildung 16: Kardiale Hypertrophie und Lungenstauung in CaMKII δ -TG im Vergleich zum WT mit und ohne Betablockertherapie. (A) Herzgewicht (HG) normalisiert auf Tibialänge

(TiL), (B) Lungengewicht (LuG) normalisiert auf Tibiallänge (TiL). $n \geq 9$. $*p < 0,05$ gegenüber WT H₂O, $\#p < 0,05$ gegenüber TG H₂O. Statistik: one-way-ANOVA.

3.4.5 Histologische Analyse der kardialen Hypertrophie und Fibrose

Anschließend wurde eine histologische Analyse von myokardialen Gewebeschnitten zur Beurteilung der kardialen Hypertrophie und Fibrose durchgeführt. Die Hypertrophie wurde in einer WGA-FITC-Färbung untersucht. In den TG ließ sich eine 1,5- bis 2-fache Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche im Vergleich zum WT beobachten (Abbildung 17). Die Metoprolol-Therapie führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellgröße in den TG (Zellquerschnittsfläche $-18,7 \pm 8,6$ % TG Metoprolol gegenüber TG H₂O). Damit bestätigte sich der Hypertrophie-abschwächende Effekt der Betablocker-Behandlung auch in der histologischen Analyse. Die kardiale Fibroseentwicklung wurde in einer Sirius-Red-Färbung untersucht. Dabei ließ sich nur in den TG ohne Metoprolol-Behandlung eine signifikant vermehrte Kollagenfärbung feststellen (Abbildung 17).

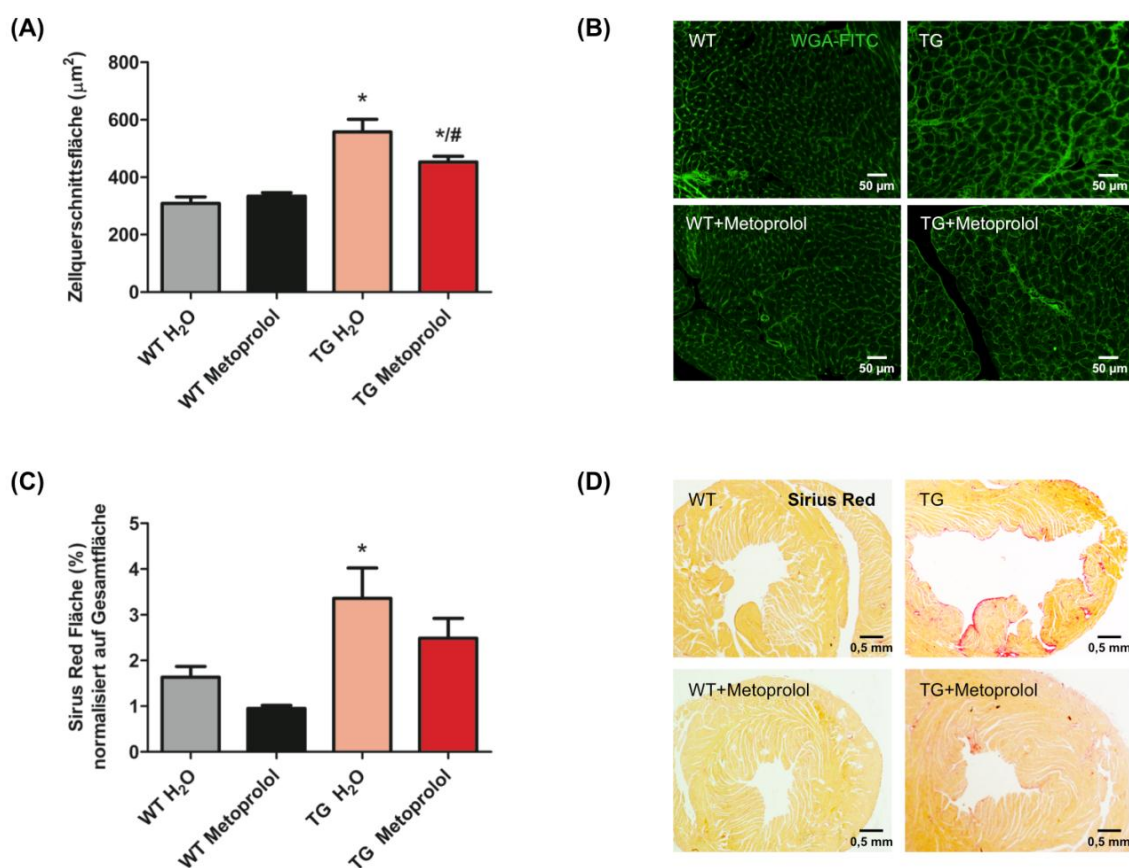


Abbildung 17: Histologische Analyse der kardialen Hypertrophie und Fibrose in CaMKII δ _C-TG im Vergleich zum WT mit und ohne Betablockertherapie. (A) Kardiale Hypertrophie gemessen als Zellquerschnittsfläche, (B) repräsentative mikroskopische Bilder der

WGA-FITC-Färbung, (C) kardiale Fibrose gemessen als % Sirius Red Fläche, (D) repräsentative mikroskopische Bilder der Sirius-Red-Färbung. $n \geq 8$. $*p < 0,05$ gegenüber WT H₂O, $#p < 0,05$ gegenüber TG H₂O. Statistik: one-way-ANOVA.

3.4.6 Arrhythmien

Als zusätzlicher klinischer Parameter wurde die Auswirkung der Betablockertherapie auf die Arrhythmieeigung in den CaMKII δ_C -TG untersucht. Dazu wurden im Alter von 12-14 Wochen telemetrische Langzeit-EKG-Aufzeichnungen durchgeführt (12 Stunden über Nacht). Die TG zeigten ein deutlich vermehrtes spontanes Auftreten von VES im Vergleich zum WT (Abbildung 18). Unter der Therapie mit Metoprolol ließ sich eine signifikante Reduktion von VES beobachten ($-69,6 \pm 22,3$ %). Daneben zeigte nur eine der mit Metoprolol behandelten TG spontane VTs, während sich bei 80 % der unbehandelten TG VTs feststellen ließen (Abbildung 18).

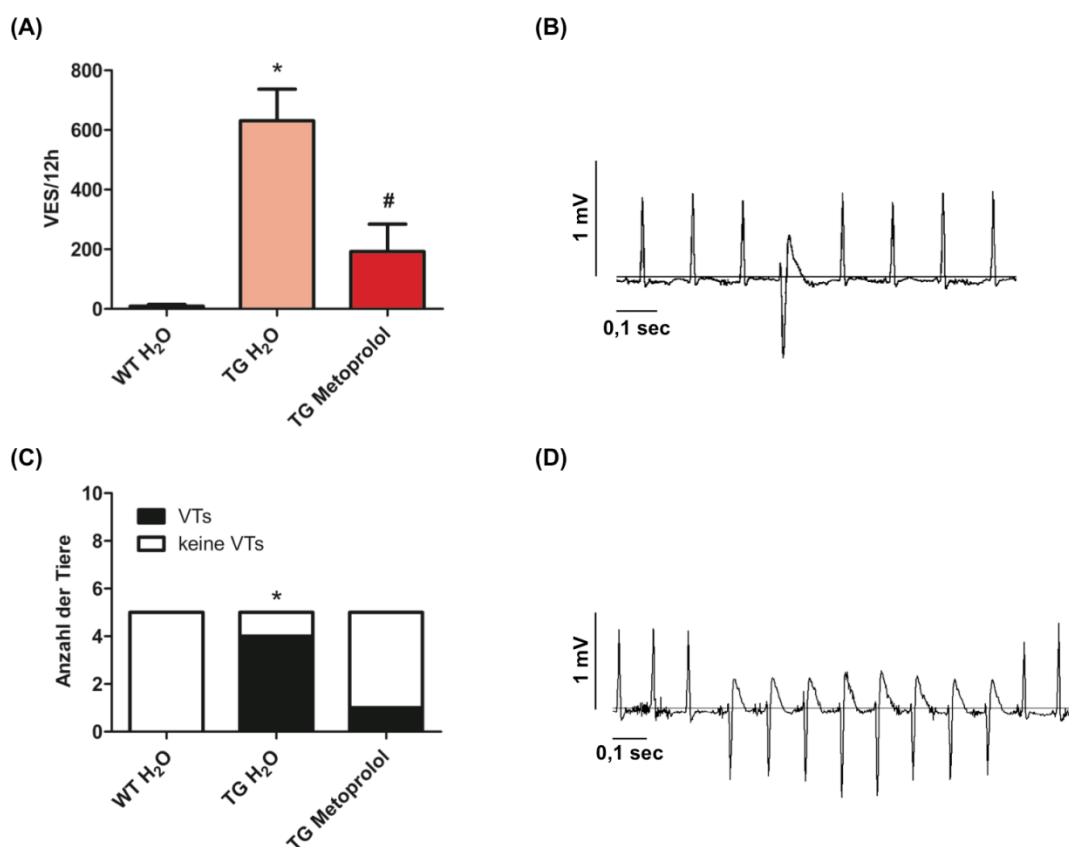


Abbildung 18: Spontane Arrhythmien in CaMKII δ_C -TG mit und ohne Betablockertherapie im Vergleich zum WT. (A) Häufigkeit von VES in WT und TG mit und ohne Metoprolol-Behandlung, (B) repräsentative Aufzeichnung einer VES, (C) Anzahl der Tiere mit VTs in den drei Gruppen, (D) repräsentative Aufzeichnung einer VT. $n=5$. $*p < 0,05$ gegenüber WT, $#p < 0,05$ gegenüber TG H₂O. Statistik: one-way-ANOVA (A) und Chi-Quadrat-Test (C).

3.5 Effekte einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Aktivität und die Phosphorylierung von CaMKII- und PKA-Zielproteinen

Um den Einfluss der Betablockertherapie auf die CaMKII-Aktivität in diesem Modell zu untersuchen, wurden die Herzen der Tiere im Alter von 12-14 Wochen explantiert und das ventrikuläre Gewebe für Proteinanalytik verwendet.

3.5.1 CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung

Zunächst wurde die CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung in ventrikulärem Gewebe im Western Blot analysiert. Dabei zeigten sich eine 15- bis 20-fache CaMKII-Überexpression und eine 2- bis 3-fach erhöhte CaMKII-Autophosphorylierung in den TG im Vergleich zum WT (Abbildung 19). Die Autophosphorylierung wurde dabei durch Metoprolol nicht beeinflusst, was für eine unter Betablockertherapie unveränderte Enzymaktivität spricht.

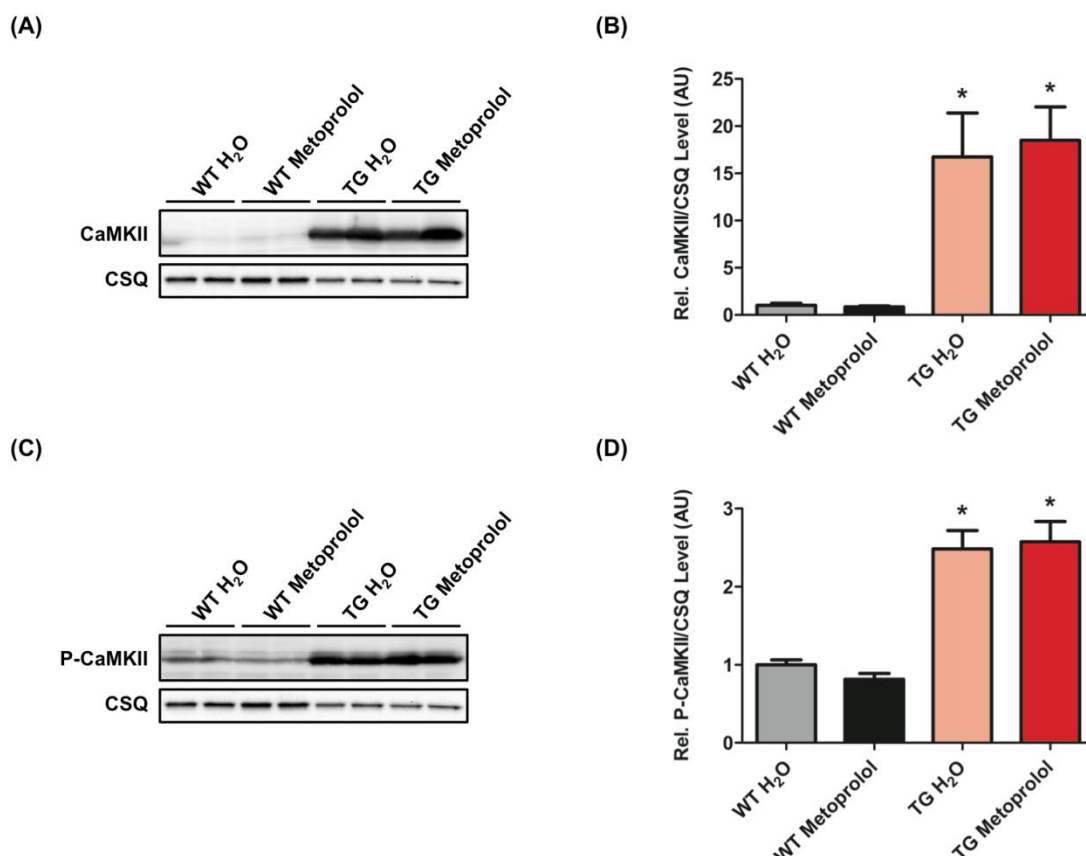


Abbildung 19: CaMKII-Expression und CaMKII-Autophosphorylierung in CaMKII δ _c-TG und WT mit und ohne Betablockertherapie. (A) Repräsentativer Western Blot von CaMKII-total und CSQ, (B) Quantifizierung CaMKII-total normalisiert auf CSQ, (C) Repräsentativer

Western Blot von P-CaMKII und CSQ, (D) Quantifizierung P-CaMKII normalisiert auf CSQ. $n \geq 8$.
* $p < 0,05$ gegenüber WT H₂O. Statistik: one-way-ANOVA.

Die CaMKII-Aktivität im ventrikulären Gewebe wurde daraufhin zusätzlich in einem Aktivitätsassay analysiert.

3.5.2 CaMKII-Aktivitätsassay

Der durchgeführte Pulldownassay basiert auf einer HDAC4-Bindung der aktivierten CaMKII. Nach Inkubation mit HDAC4-gebundenen GST-Beads wurde die gefällte aktive CaMKII im Western Blot detektiert. Dabei ließ sich erneut kein Einfluss der Metoprolol-Behandlung auf die CaMKII-Aktivität feststellen (Abbildung 20).

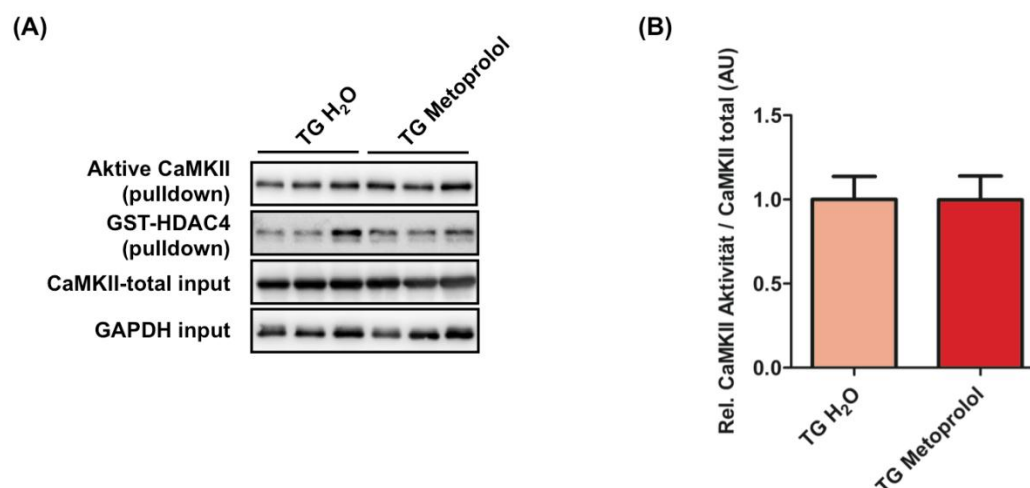


Abbildung 20: CaMKII-Aktivität im Pulldown-Assay in CaMKII δ _C-TG mit und ohne Betablockertherapie. (A) Repräsentativer Assay mit Western Blots von aktiver CaMKII (pulldown), HDAC4 (pulldown), CaMKII-total und GAPDH, (B) Quantifizierung aktive CaMKII normalisiert auf CaMKII-total. Die aktive CaMKII wurde auf GST-HDAC4 normalisiert, CaMKII-total auf GAPDH. $n \geq 12$. Statistik: ungepaarter t-Test.

Ein Effekt der Metoprolol-Behandlung auf die CaMKII-Aktivität konnte also weder hinsichtlich der CaMKII-Autophosphorylierung im Western Blot noch im CaMKII-Aktivitätsassay nachgewiesen werden.

3.5.3 Phosphorylierung der PKA- und CaMKII-Zielproteine

Abschließend wurde die Phosphorylierung der PKA- und CaMKII-Zielproteine PLB und RyR2 im Western Blot untersucht. Die Betablockertherapie führte zu einer signifikanten

Reduktion der PKA-abhängigen Phosphorylierung an PLB-Ser16 in WT ($-74,7 \pm 9,4 \%$ WT Metoprolol gegenüber WT H₂O) und TG ($-60,7 \pm 15,9 \%$ TG Metoprolol gegenüber TG H₂O) (Abbildung 21). Die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an PLB-Thr17 wurde durch Metoprolol dagegen nicht signifikant beeinflusst.

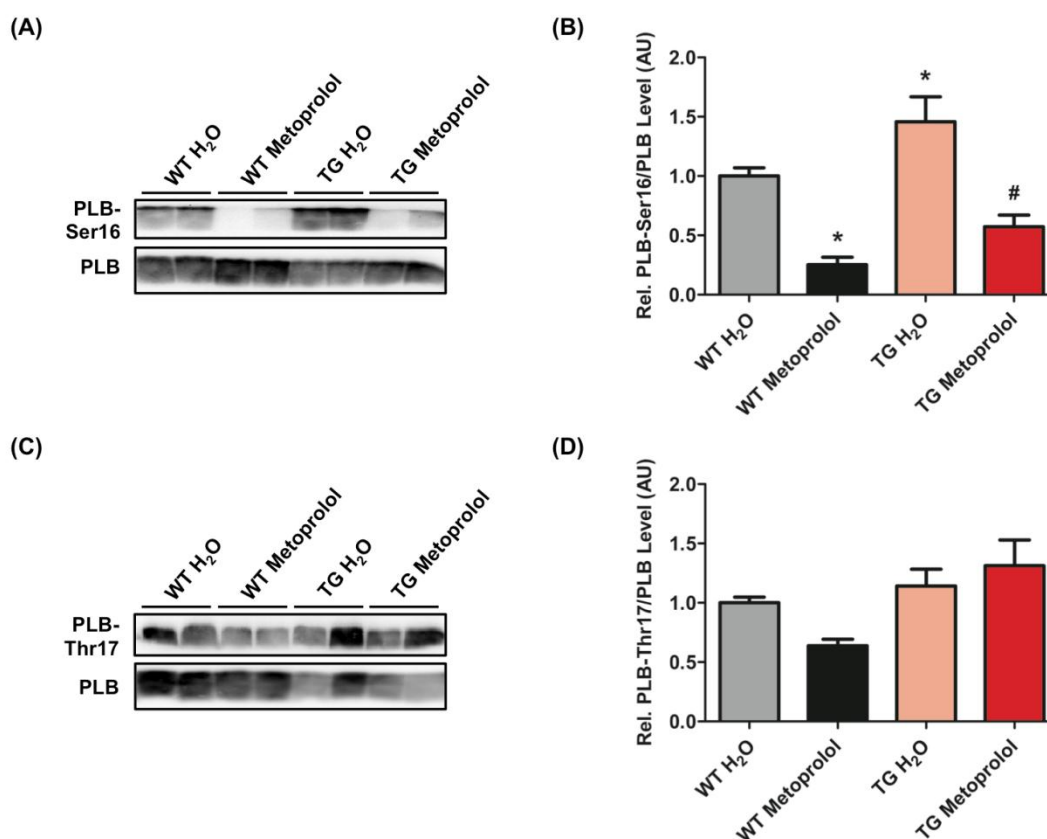


Abbildung 21: PLB-Phosphorylierung an den PKA- und CaMKII-Phosphorylierungsstellen in CaMKII δ c-TG und WT mit und ohne Betablockertherapie. (A) Repräsentative Western Blots von PLB-Ser16 und PLB-total, (B) Quantifizierung PLB-Ser16 normalisiert auf PLB-total, (C) repräsentative Western Blots von PLB-Thr17 und PLB-total, (D) Quantifizierung PLB-Thr17 normalisiert auf PLB-total. $n \geq 9$. * $p < 0,05$ gegenüber WT H₂O, # $p < 0,05$ gegenüber TG H₂O. Statistik: one-way-ANOVA.

Auch am RyR2 ließ sich unter Metoprolol-Behandlung eine verminderte Phosphorylierung an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle RyR2-2808 sowohl in WT ($-35,6 \pm 7,6 \%$ WT Metoprolol gegenüber WT H₂O) als auch TG ($-47,2 \pm 10,7 \%$ TG Metoprolol gegenüber TG H₂O) feststellen (Abbildung 22). Die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an RyR2-2814 wurde dagegen durch die Betablockertherapie wiederum nicht beeinflusst.

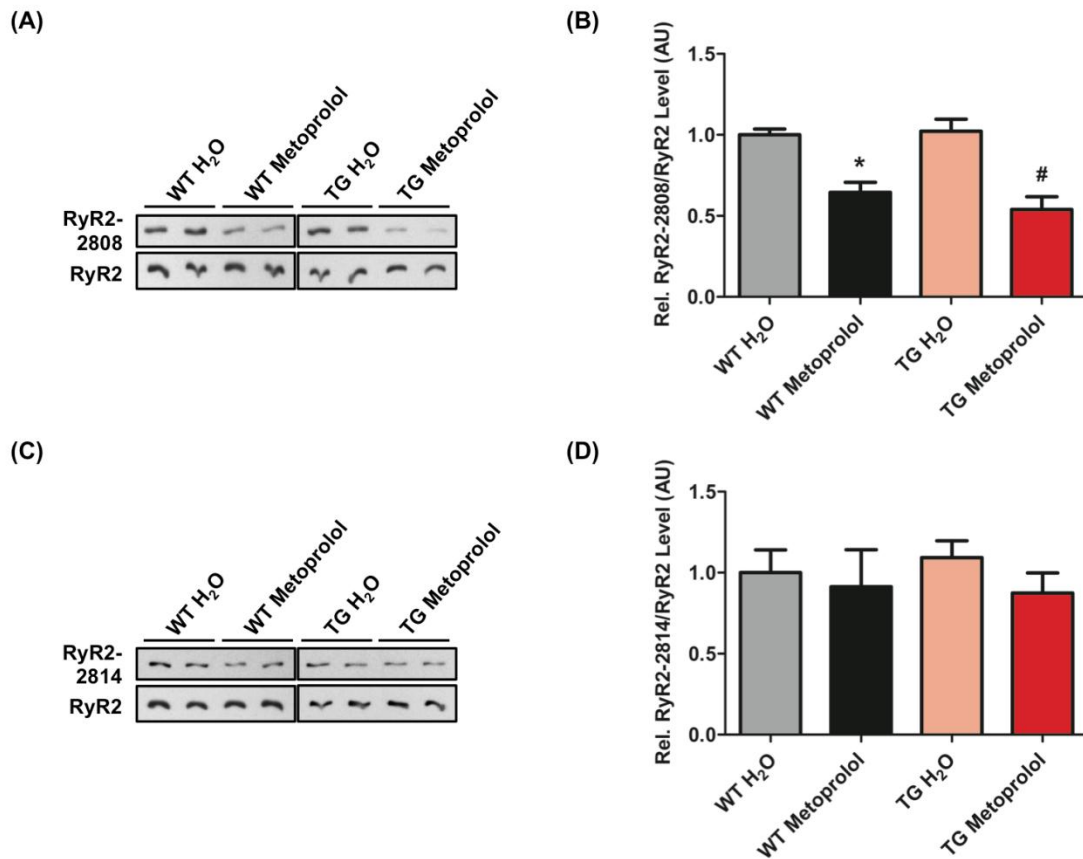


Abbildung 22: RyR2-Phosphorylierung an den PKA- und CaMKII-Phosphorylierungsstellen in CaMKII δ c-TG und WT mit und ohne Betablockertherapie. (A) Repräsentative Western Blots von RyR2-2808 und RyR2-total, (B) Quantifizierung RyR2-2808 normalisiert auf RyR2-total, (C) repräsentative Western Blots von RyR2-2814 und RyR2-total, (D) Quantifizierung RyR2-2814 normalisiert auf RyR2-total. $n \geq 6$. * $p < 0,05$ gegenüber WT H₂O, # $p < 0,05$ gegenüber TG H₂O. Statistik: one-way-ANOVA.

Die erniedrigten PKA-abhängigen PLB und RyR2-Phosphorylierungen spiegeln damit zum einen eine effektive Blockade der β -adrenergen Signalkaskade wider. Zum anderen bestätigen die durch Betablockertherapie unbeeinflussten CaMKII-abhängigen PLB- und RyR2-Phosphorylierungen, dass die CaMKII-Aktivität unter Behandlung mit Metoprolol unverändert erhalten bleibt.

4 Diskussion

4.1 Fragestellung

Betablocker sind eine wichtige Säule in der Therapie der Herzinsuffizienz. Die Rationale hinter ihrem klinischen Einsatz ist eine myokardiale Blockade des in der Herzinsuffizienz überaktiven sympathischen Nervensystems. Die mechanistischen Grundlagen der protektiven Wirkung einer Betablockertherapie sind jedoch in vielen Aspekten unklar. Eine vermehrte Expression der CaMKII ist sowohl in der menschlichen Herzinsuffizienz als auch in experimentellen Herzinsuffizienzmodellen beobachtet worden. Eine kardiale Überexpression der CaMKII im Mausmodell führt zu einer Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase und ist mit der Entwicklung einer schweren dilatativen Kardiomyopathie, kontraktiler Dyfunktion und einer verstärkten Arrhythmie neigung assoziiert. Demgegenüber hat sich eine CaMKII-Inhibition in verschiedenen experimentellen Herzinsuffizienzmodellen als protektiv erwiesen. Es gibt zunehmende Evidenz für einen pathophysiologisch relevanten *cross talk* zwischen β -adrenerger Signalkaskade und Aktivierung der CaMKII. Es ist jedoch bisher nicht untersucht worden, inwieweit sich die protektiven Effekte einer Betablockertherapie in der Herzinsuffizienz durch eine inhibitorische Wirkung auf die myokardiale CaMKII erklären lassen. Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte einer Betablockertherapie auf die Aktivität der CaMKII zu untersuchen. Dazu wurde zum einen die CaMKII-Aktivität in humanen Proben von herzinsuffizienten und primär nicht herzinsuffizienten Patienten mit und ohne Betablockertherapie analysiert. Zum anderen wurde eine Betablockertherapie in einem Mausmodell der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz etabliert und anschließend der Einfluss der β -AR-Blockade auf den kardialen Phänotyp und die CaMKII-Aktivität in diesem Modell untersucht.

4.2 Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung in humanen Proben

In der menschlichen Herzinsuffizienz wurde eine ca. 3-fach höhere myokardiale CaMKII-Aktivität festgestellt (Kirchhefer et al. 1999). Sowohl die Expression als auch die Autophosphorylierung der CaMKII sind in der ischämischen und dilatativen Kardio-

myopythie erhöht (Fischer et al. 2014). Dabei scheint eine CaMKII-induzierte Störung der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase im Sinne eines vergrößerten SR- Ca^{2+} -Lecks eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der menschlichen Herzinsuffizienz zu spielen. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine CaMKII-Inhibition in aus insuffizienten menschlichen Herzen isolierten ventrikulären Trabekeln zu einer verbesserten Kontraktilität führt (Sossalla et al. 2010). Als mechanistische Grundlage konnten eine Verminderung des SR- Ca^{2+} -Lecks in Verbindung mit einer geringeren RyR2-Phosphorylierung und eine Verbesserung der Ca^{2+} -Beladung des SRs durch Hemmung der CaMKII festgestellt werden.

Die Beobachtung, dass eine Betablockertherapie langfristig zu einer myokardialen Kontraktilitätsverbesserung führt, erscheint kontraintuitiv, da durch Blockade β -adrenerger Signalprozesse keine Steigerung der Inotropie zu erwarten ist. Mechanistisch wurde eine Verbesserung der in der Herzinsuffizienz gestörten intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase durch Betablocker als Grundlage einer verbesserten Herzleistung beschrieben (Rehsia und Dhalla 2010). Chronische katecholaminerge Stimulation führt im Mausmodell zu einem vergrößerten CaMKII-induzierten SR- Ca^{2+} -Leck auf der Grundlage einer RyR2-Hyperphosphorylierung an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle (Grimm M et al. 2015). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich der protektive Effekt einer Betablockertherapie hinsichtlich des intrazellulären Ca^{2+} -*handlings* und die damit verbundene Verbesserung der Herzleistung u.a. durch eine inhibitorische Wirkung auf die CaMKII erklären lassen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Betablockertherapie auf die CaMKII-Aktivität in menschlichen Proben von Patienten, die mit Betablockern behandelt wurden, im Vergleich zu Patienten ohne Betablockertherapie untersucht. Dabei zeigte die Analyse ventrikulärer Herzproben von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz, dass eine Betablockertherapie keinen Effekt auf die Expression oder Autophosphorylierung der CaMKII hat (Abbildung 8). Dies bestätigte sich in der Analyse atrialer Herzproben von primär nicht herzinsuffizienten Patienten, die sich einer Herzoperation (Aortenklappenersatz und/oder Bypassoperation und/oder Mitralklappenreparatur) unterzogen (Abbildung 9, 10). Hier ließ sich ebenfalls kein Unterschied in der CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung zwischen Patienten mit und ohne Betablockertherapie detektieren. Da die CaMKII-Autophosphorylierung als *readout* für die Enzymaktivierung dient (Grimm M und Brown 2010), weisen diese Befunde darauf hin, dass eine chronische Betablockertherapie nicht - wie bisherige Publikationen zum *crosstalk* zwischen β -adrenerger Stimulation und CaMKII-

Aktivierung vermuten lassen - mit einer Inhibition der CaMKII assoziiert ist, sondern die CaMKII-Überaktivität unter Betablockertherapie persistiert.

Die Analyse humanen Gewebes unterliegt dabei einigen Einschränkungen hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Proben, was die Aussagekraft insbesondere in Studien mit geringer n-Zahl limitiert. Dabei sind u.a. die unterschiedlichen Komorbiditäten und Begleitmedikationen der Patienten und eine lückenhafte Dokumentation der klinischen Parameter und Medikation zu nennen.

Der überraschende Befund einer persistierenden CaMKII-Aktivität unter Betablockertherapie in herzinsuffizienten und primär nicht herzinsuffizienten Patienten wurde daher in einem etablierten Mausmodell der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz (Maier et al. 2003; Zhang T et al. 2003) weiter evaluiert.

4.3 Etablierung einer effektiven Betablockertherapie im Mausmodell

Eine therapeutische Wirksamkeit von Metoprolol in Mausmodellen wurde für ein sehr großes orales Dosierungsspektrum von 2,5 mg/kg/d (Bauer et al. 2010) bis 350 mg/kg/d (Harding et al. 2001) beschrieben. Darüber hinaus wurde in einer Untersuchung an 23 verschiedenen Mausstämmen gezeigt, dass der genetische Hintergrund der Mäuse einen starken Einfluss auf die Reaktion auf katecholaminerge Stimulation und β -AR-Blockade hat (Berthonneche et al. 2009).

Um eine effektive Betablockade zu erzielen, wurden in dieser Arbeit verschiedene orale Metoprolol-Dosierungen getestet und sowohl *in vivo* als auch molekulare Effekte analysiert. Als *in vivo readout* wurde dazu der Herzfrequenzanstieg nach katecholaminerger Stimulation mit Dobutamin untersucht, als molekulares *readout* diente die Phosphorylierung von PLB an der PKA-Phosphorylierungsstelle Ser16. Eine orale Metoprolol-Therapie in der Dosierung 270 mg/kg/d führte sowohl zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Dobutamin-Dosiswirkungskurve als auch zu einer deutlich verminderten PLB-Ser16-Phosphorylierung, was für geringere Dosierungen nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 11, 12). Die Behandlung mit Metoprolol 270 mg/kg/d über das Trinkwasser führte dabei zu keiner Einschränkung der Trinkmenge im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. In der Beobachtung des Verhaltens, der Ernährung und der körperlichen Erscheinung der Tiere ließen sich keine offensichtlichen toxischen Effekte durch die dauerhafte Betablockertherapie feststellen.

Im Verlauf der anschließend durchgeführten Studie in den CaMKII δ_c -TG hatte die chronische Behandlung mit Metoprolol 270 mg/kg/d signifikante Effekte auf typische klinische Parameter, die durch Betablockertherapie beeinflusst werden. Die Herzfrequenz wurde während des gesamten Behandlungszeitraums sowohl in den TG als auch WT durch Betablockertherapie gesenkt (Abbildung 14). Außerdem konnte eine signifikante Reduktion des Blutdrucks unter der Behandlung mit Metoprolol festgestellt werden (Abbildung 15). Daneben führte die β -AR-Blockade initial (Tag 3) zu negativ inotropen Effekten, wobei sich die kardiale Kontraktilität im Verlauf der Metoprolol-Behandlung wieder den nicht behandelten Kontrolltieren angleich (Abbildung 14).

Darüber hinaus konnte bei den mit Metoprolol behandelten Tieren eine signifikante Reduktion der PKA-abhängigen Phosphorylierungen an PLB und RyR2 als molekularer Hinweis auf eine Blockade der β -adrenergen Signalprozesse festgestellt werden (Abbildung 21, 22).

Damit sprechen sowohl die beobachteten *in vivo* als die auch molekularen Effekte für eine effektive Betablockade in dem angewandten Modell.

4.4 Effekte einer chronischen Betablockade auf die kardiale Dysfunktion in CaMKII δ_c -transgenen Mäusen

Der kardiale Phänotyp des CaMKII δ_c -transgenen Mausmodells wurde durch Zhang et al. ausführlich charakterisiert. Die herzspezifische Überexpression der CaMKII δ_c führte zu einer schweren dilatativen Kardiomyopathie mit massiver kardialer Dysfunktion bereits im Alter von 8 Wochen und war mit einem frühzeitigen Tod assoziiert (Zhang T et al. 2003).

Dieser schwere kardiomyopathische Phänotyp ließ sich auch im Rahmen der für diese Arbeit durchgeführten Versuche beobachten. Die CaMKII δ_c -TG zeigten eine progressive Einschränkung der kardialen Kontraktilitätsparameter, die echokardiographisch bereits im Alter von 4 Wochen zu beobachten war und sich im Verlauf zu einer massiven kontraktile Dysfunktion entwickelte (Abbildung 14). In den im Alter von 12-14 Wochen durchgeführten biometrischen und histologischen Untersuchungen ließ sich eine deutliche kardiale Hypertrophie (Abbildung 16, 17), eine vermehrte Fibrose (Abbildung 17) und eine vermehrte Lungenstauung als Ausdruck der Linksherzinsuffizienz (Abbildung 16) in den TG feststellen. Die Entwicklung dieser schweren Herzinsuffizienz hatte eine deutlich verschlechterte Überlebensrate mit einem medianen Überleben von 13 Wochen zur Folge

(Abbildung 13).

Der protektive Effekt einer Betablockertherapie auf die Mortalität bei Herzinsuffizienzpatienten wurde in mehreren klinischen Studien für Bisoprolol (CIBIS-II 1999), Metoprolol (MERIT-HF 1999) und Carvedilol belegt (Packer et al. 1996; Packer et al. 2001). Hinsichtlich der Herzfunktion konnte unter langfristiger Betablockertherapie ein positiver Einfluss auf *remodeling*-Prozesse im Sinne einer Verbesserung der EF und einer Verminderung linksventrikulärer Dilatation und Hypertrophie unter Bisoprolol (van de Ven et al. 2010) Metoprolol (Groenning et al. 2000; Hall et al. 1995) und Carvedilol (Doughty et al. 1997; Lowes et al. 1999; Yang J et al. 2014) beobachtet werden. Antifibrotische Effekte von Betablockern wurden in verschiedenen Tiermodellen untersucht. Während für Carvedilol antifibrotische Effekte in Myokardinfarkt- (Wei et al. 2000), Nachlast- (Grimm D et al. 2001) und Hypertonie-induziertem (Barone et al. 1998) kardialen *remodeling* nachgewiesen wurden, sind die Daten zu Metoprolol weniger konsistent. Für einige Modelle wurde ein reduzierender Einfluss auf die kardiale Fibroseentwicklung beschrieben. So konnte z.B. eine geringere myokardiale Kollagendisposition unter Metoprolol-Behandlung in spontan hypertensiven Ratten (Chan et al. 2011) und in der durch Nierenarterien-Clipping induzierten renovaskulären Hypertonie (Rizzi et al. 2014) festgestellt werden. In vergleichenden Studien führte eine Metoprolol-Behandlung allerdings im Gegensatz zu Carvedilol zu keiner signifikanten Reduktion der Fibroseentwicklung in der Myokardinfarkt- (Wei et al. 2000) und Nachlast-induzierten (Grimm D et al. 2001) Herzinsuffizienz.

In dem in dieser Arbeit untersuchten Mausmodell führte die Behandlung mit Metoprolol zu einem signifikant verbesserten Überleben in den CaMKII δ_c -TG (Abbildung 13). Dabei konnten typische klinische Betablockereffekte wie eine Reduktion der Herzfrequenz und des Blutdrucks gemessen werden (Abbildung 14, 15). Die Betablockertherapie hatte protektive Effekte auf die kardiale Hypertrophieentwicklung (Abbildung 16, 17) und reduzierte die Lungenstauung in den TG (Abbildung 16). In der histologischen Analyse der kardialen Fibrose ließ sich außerdem nur in den TG ohne Metoprolol-Behandlung eine signifikant vermehrte Kollagenanfärbung im Vergleich zum WT detektieren (Abbildung 17).

Protektive Effekte der Metoprolol-Behandlung hinsichtlich der kontraktile Dysfunktion in den TG ließen sich echokardiographisch jedoch nicht nachweisen (Abbildung 14). Dennoch spricht der Befund einer geringeren Lungenstauung unter Betablockertherapie

für eine weniger eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion im Vergleich zu den unbehandelten TG. Es ist jedoch möglich, dass auf Grund des kardiodepressiven Effekts der milden Isofluran-Narkose während der Echokardiographie geringfügige Verbesserungen der Kontraktilitätsparameter nicht erfassbar waren.

Bisher ist keine Intervention in diesem Modell der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz beschrieben worden, die sich positiv auf den schweren kardiomyopathischen Phänotyp ausgewirkt hat. So führte ein PLB-KO in CaMKII δ_c -TG zwar zu einer Normalisierung der SR-Ca²⁺-Beladung, allerdings konnten dabei eine Beschleunigung der Herzinsuffizienzentwicklung und eine geringere Lebenserwartung in den TG in Assoziation mit einem verstärkten SR-Ca²⁺-Leck beobachtet werden (Zhang T et al. 2010). Auch eine Überexpression eines SR-gekoppelten CaMKII-Inhibitors führte überraschenderweise zu einer Verschlechterung des kardialen Phänotyps in den CaMKII δ_c -TG (Huke et al. 2011). Die SR-spezifische Hemmung der CaMKII hatte zwar eine Verbesserung der Ca²⁺-Homöostase im Sinne einer gesteigerten Ca²⁺-Beladung des SRs und eines verringerten diastolischen Ca²⁺-Lecks zur Folge, die Entwicklung der kontraktilen Dysfunktion, der kardialen Hypertrophie und des *remodelings* waren jedoch beschleunigt. Daneben wurde in unserer Arbeitsgruppe der Einfluss eines I-1 KO auf die Ca²⁺-Homöostase und den kardialen Phänotyp in den CaMKII δ_c -TG untersucht. Ein I-1 KO ist mit einer verminderten CaMKII-abhängigen Phosphorylierung des RyR2 und einem reduzierten SR-Ca²⁺-Leck assoziiert (Brammen 2015; El-Armouche et al. 2008). Die Hypothese, dass sich der kardiomyopathische Phänotyp der CaMKII δ_c -TG durch I-1-Ablation-induzierte protektive Effekte auf das intrazelluläre Ca²⁺-*cycling* abschwächen ließe, konnte allerdings nicht bestätigt werden. Im Gegenteil führte der I-1 KO ähnlich wie der PLB-KO und die SR-spezifische CaMKII-Hemmung zu einer verstärkten kontraktilen Dysfunktion und beschleunigten Hypertrophieentwicklung in den CaMKII δ_c -TG (Brammen 2015). Zusammenfassend lassen diese Befunde vermuten, dass SR-unabhängige maladaptive CaMKII-induzierte Signalprozesse eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des kardiomyopathischen Phänotyps in diesem Modell spielen, welche durch eine SR-spezifische CaMKII-Inhibition und Verbesserung des Ca²⁺-*handlings* möglicherweise nicht beeinflusst werden.

Damit ist eine Betablockertherapie die erste Intervention, die in dem Modell der herzspezifischen CaMKII δ_c Überexpression einen protektiven Effekt auf die Entwicklung der kardialen Dysfunktion und das Überleben in der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz hat.

4.5 Effekte einer chronischen Betablockade auf die Arrhythmieneigung in CaMKII δ_c -transgenen Mäusen

Etwa 40 % der Patienten, die an einer Herzinsuffizienz erkrankt sind, sterben an einem plötzlichen Herztod auf Grund von Arrhythmien (Packer 1985). Pathophysiologisch werden diese Arrhythmien insbesondere durch späte Nachdepolarisationen (DAD) (McMurray et al.) getriggert. Mechanistisch spielen spontane diastolische Ca²⁺-Freisetzungen aus dem SR mit nachfolgender Zelldepolarisation durch einen NCX-abhängigen Na⁺-Einstrom eine entscheidende Rolle für das Auftreten von DAD (Bers 2014). Auch ein vermehrtes Auftreten früher Nachdepolarisationen (EAD), die insbesondere in der Arrhythmogenese beim Long-QT-Syndrom eine Rolle spielen, konnte in der Herzinsuffizienz beobachtet werden (Nuss et al. 1999). Es wird jedoch angenommen, dass diese nur eine untergeordnete Rolle in der Arrhythmieneigung bei Herzinsuffizienzpatienten spielen (Pogwizd und Bers 2004).

Die kardiale Überexpression der CaMKII δ_c im Mausmodell führt zu einem verstärkten diastolischen SR-Ca²⁺-Leck auf der Basis einer CaMKII-abhängigen Hyperphosphorylierung des RyR2 und außerdem zu einer erhöhten Aktivität des NCX (Maier et al. 2003). Übereinstimmend mit dem oben dargestellten pathophysiologischen Modell der Arrhythmieentstehung ließ sich ein vermehrtes Auftreten von DAD in den CaMKII δ_c -TG nach catecholaminerger Stimulation beobachten (Sag et al. 2009). Daneben wurde eine vermehrte Aktivierung von Na⁺-Kanälen und eine QT-Zeit-Verlängerung in den CaMKII δ_c -TG beschrieben (Wagner et al. 2006), was mit dem Auftreten spontaner EAD assoziiert war (Sag et al. 2009). Entsprechend wurde sowohl nach elektrischer Stimulation als auch Isoprenalin-Injektion eine erhöhte Arrhythmieanfälligkeit *in vivo* beobachten (Sag et al. 2009; Wagner et al. 2006).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Langzeit-EKG-Aufnahmen bestätigte sich eine erhöhte Arrhythmieneigung in den CaMKII δ_c -TG, die sich in einem deutlich vermehrten Auftreten auch spontaner ventrikulärer Arrhythmien wie VES und VTs äußerte (Abbildung 18).

Betablocker sind Klasse II Antiarrhythmika und verbessern die Prognose in der Langzeittherapie nach Myokardinfarkt (Gottlieb et al. 1998) und bei chronischer Herzinsuffizienz (CIBIS-II 1999; MERIT-HF 1999; Packer et al. 1996; Packer et al. 2001). Die antiarrhythmische Wirkung von Betablockern beruht u.a. auf der Hemmung verschiedener Ionenströme, die cAMP/PKA-abhängig vermehrt aktiviert werden. Dazu

gehören der *funny current* (I_t), dessen verstärkte Aktivierung in Kardiomyozyten in der Herzinsuffizienz mit einem vermehrten Auftreten von ektopten Erregungsbildungen in Verbindung steht, und Calciumströme, die mit dem Risiko einer Ca^{2+} -Überladung der Zelle und konsekutiver NCX-Aktivierung und Auslösung von DAD assoziiert sind (Szentmiklosi et al. 2015). In diesem Zusammenhang spielt auch die unter Betablockertherapie zu beobachtende funktionelle Normalisierung des in der Herzinsuffizienz dysregulierten und daher für ein vermehrtes diastolisches SR- Ca^{2+} -Leck ursächlichen RyR2 eine wichtige Rolle (Reiken et al. 2003). Daneben werden Betablocker auch als Standardtherapie zur Arrhythmieprävention beim Long-QT-Syndroms eingesetzt (Barsheshet et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass eine Betablockertherapie zu einer signifikanten Reduktion spontaner Arrhythmien in den CaMKII δ_c -TG führte (Abbildung 18). Da die Metoprolol-Behandlung keine direkt echokardiographisch messbare Verbesserung der kontraktile Dysfunktion in den TG zur Folge hatte, lässt sich vermuten, dass dieser Arrhythmieschutz einen entscheidenden Grund für das verbesserte Überleben der TG unter Betablockertherapie darstellte.

4.6 Effekte einer chronischen Betablockade auf die CaMKII-Aktivität in CaMKII δ_c -transgenen Mäusen

Eine Inhibition der CaMKII hat sich in experimentellen Herzinsuffizienzmodellen als protektiv gegenüber katecholaminerger Überstimulation erwiesen. So wurde ein vermindertes kardiales *remodeling* nach chronischer katecholaminerger Stimulation und Myokardinfarkt in einem Modell genetischer CaMKII-Inhibition beobachtet (Zhang R et al. 2005). Auch eine Reduzierung der Apoptose-Induktion unter CaMKII-Inhibition nach Isoprenalin-Applikation und Myokardinfarkt wurde beschrieben (Joiner et al. 2012; Yang Y et al. 2006). Ein genetischer Knockout der CaMKII δ zeigte darüber hinaus protektive Effekte hinsichtlich der Entwicklung kardialer Hypertrophie und Fibrose im TAC-Modell (Ling et al. 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich durch eine Hemmung der CaMKII das Auftreten Katecholamin-induzierter Arrhythmien reduzieren lässt (Sag et al. 2009; Wu et al. 2002).

In Untersuchungen an Mausmodellen mit genetischem KO von β_1 -AR und β_2 -AR ließ sich feststellen, dass nur β_1 -AR KO Mäuse resistent gegenüber einer CaMKII-Aktivierung nach Myokardinfarkt sind (Yoo et al. 2009). Diese Befunde ließen vermuten, dass eine Therapie mit dem β_1 -selektiven Betablocker Metoprolol zu einer Hemmung der CaMKII-Aktivität

bzw. CaMKII-abhängiger Prozesse führt und sich daher protektive Effekte einer Betablockertherapie in der Herzinsuffizienz partiell durch eine CaMKII-Inhibition erklären lassen.

In dem in dieser Arbeit angewandten Mausmodell konnten typische vorteilhafte Effekte einer β -AR-Blockade in der Herzinsuffizienz wie ein verbessertes Überleben, eine geringere kardiale Hypertrophieentwicklung und eine Reduktion ventrikulärer Arrhythmien beobachtet werden. Überraschenderweise führte die Betablockertherapie jedoch nicht zu einer Änderung der CaMKII-Aktivität. Weder bezüglich der CaMKII-Autophosphorylierung noch im CaMKII-Aktivitätsassay ließen sich Unterschiede zwischen den Tieren mit und ohne Metoprolol-Behandlung detektieren (Abbildung 19, 20). Daneben wurden die CaMKII-abhängigen Phosphorylierungen an den SR-Proteinen PLB und RyR2 durch Metoprolol nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 21, 22). Dem gegenüber waren PLB und RyR2 an den PKA-abhängigen Phosphorylierungsstellen signifikant weniger phosphoryliert (Abbildung 21, 22), was eine effektive Betablockade reflektiert. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Beeinflussung PKA-abhängiger und nicht CaMKII-abhängiger Signalwege die Grundlage für den Benefit der Metoprolol-Behandlung in diesem Modell war.

Das Ergebnis einer unveränderten CaMKII-Aktivität unter Betablockertherapie in dem angewandten Mausmodell reflektiert dabei die Beobachtungen aus den menschlichen Herzproben (Abbildung 8, 9, 10). Zusammenfassend konnte also kein Einfluss einer Behandlung mit Betablockern auf die Aktivität der CaMKII nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Überaktivität der CaMKII in der Herzinsuffizienz unter Betablockertherapie persistiert.

4.7 Limitationen

4.7.1 Mausmodell

Transgene Mausmodelle bieten die Möglichkeit, die Rolle bestimmter Gene bzw. Proteine in pathophysiologischen Zusammenhängen unter sehr kontrollierten Bedingungen und mit einer geringen Varianz der Ergebnisse zu untersuchen. Die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen unterliegt dabei einigen Einschränkungen. Im Hinblick auf kardiale Fragestellungen sind z.B. die im Vergleich zum Menschen deutlich erhöhte Herzfrequenz der Maus von 500-700 bpm (Chan et al. 2011), speziesabhängige

Unterschiede im Ca^{2+} -Haushalt und in Ionenströmen und Diskrepanzen in der Expression von Isoformen einiger Proteine zu nennen (Breckenridge 2010). Hinsichtlich des in dieser Arbeit verwendeten Mausmodells ist zu beachten, dass die CaMKII ca. 15 bis 20-fach überexprimiert wird (Abbildung 19). Zwar wird dieses Protein nicht in seiner aktiven Form exprimiert und die CaMKII-Aktivität ist in diesem Modell nur 2-3-fach erhöht (Abbildung 19), jedoch können unspezifische Effekte auf intrazelluläre Signalprozesse durch die vermehrte CaMKII-Expression nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit keine signifikant erhöhte CaMKII-abhängige Phosphorylierung der SR-Proteine PLB und RyR2 in den CaMKII δ_c -TG festgestellt werden (Abbildung 21, 22), obwohl diese als 2-3-fach erhöht beschrieben wurden (Zhang T et al. 2003). Dies weist möglicherweise auf die Wichtigkeit SR-unabhängiger Mechanismen an der Pathogenese der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz in diesem Modell hin.

4.7.2 Analyse der CaMKII-Aktivierung

Die CaMKII kann über verschiedene Mechanismen aktiviert werden. Neben einer Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin und der Autophosphorylierung an Threonin286/7 spielen Glykosylierung, Oxidation und Nitrosylierung eine Rolle (Mollova et al. 2015). In dieser Arbeit wurden neben der Analyse der CaMKII-Autophosphorylierung ein Aktivitätsassay auf der Grundlage einer HDAC4-Bindung der aktivierten CaMKII durchgeführt und außerdem die CaMKII-Zielproteinphosphorylierungen untersucht (Abbildung 19, 20, 21, 22). Alle diese Parameter waren unter Betablockertherapie unverändert, was insgesamt auch ohne genauere Analyse des Glykosylierungs-, Oxidations- und Nitrosylierungszustandes der CaMKII dafür spricht, dass die CaMKII-Aktivität unter Metoprolol-Behandlung unverändert erhalten bleibt.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Bisherige experimentelle Befunde sprechen für einen klinisch relevanten *crosstalk* zwischen β -adrenerger Stimulation und CaMKII-Aktivierung in der Herzinsuffizienz. Es ließ sich daher vermuten, dass die in vielerlei Hinsicht mechanistisch unklaren protektiven Effekte einer Betablockertherapie partiell auf einer Hemmung der myokardialen CaMKII beruhen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich eine chronische Betablockertherapie in Patienten und im Mausmodell überraschenderweise nicht auf die CaMKII-Aktivität auswirkt. Dabei wurden im experimentellen Modell der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz zwar protektive Effekte durch eine Betablockertherapie beobachtet,

jedoch ging dies nicht mit einer Modulation der CaMKII-Aktivität einher. Es ist also anzunehmen, dass eine Inhibition der CaMKII kein entscheidender Teilaspekt der klinischen Wirksamkeit einer β -AR-Blockade in der Herzinsuffizienz ist. Möglich ist allerdings, dass maladaptive Signalprozesse durch eine vermehrte CaMKII-Aktivität initiiert und durch Betablocker weiter *downstream* positiv beeinflusst werden.

Die pathophysiologischen Zusammenhänge hinsichtlich des *crosstalks* zwischen β -AR-Blockade und CaMKII-abhängiger Signalprozesse könnten durch folgende Fragestellungen weiter charakterisiert werden:

Welche anderen Signalwege, die über eine Störung des SR- Ca^{2+} -*cyclings* und proarrhythmische Veränderung der Elektrophysiologie hinaus eine pathophysiologische Rolle bei der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz spielen, werden durch eine β -AR-Blockade beeinflusst? Die Beobachtung, dass durch verschiedene Interventionen zwar eine Verbesserung der Ca^{2+} -Homöostase in den CaMKII δ_c -TG erzielt werden konnte, dies jedoch überraschenderweise jeweils mit einer Verschlechterung des kardiomyopathischen Phänotyps assoziiert war (Huke et al. 2011; Zhang T et al. 2010), deutet auf die Relevanz SR-unabhängiger Mechanismen in der Pathophysiologie der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz hin. Hinsichtlich epigenetischer Regulation wurde beispielsweise die CaMKII-HDAC4-MEF2-Achse als kardiales *remodeling* fördernder CaMKII-abhängiger Signalweg beschrieben (Bucks et al. 2006; Zhang M et al. 2015). Auch inflammatorische und apoptotische Signalwege scheinen durch die CaMKII reguliert zu werden. So wurde z.B. gezeigt, dass eine CaMKII δ -induzierte NF- κ B-Aktivierung in der myokardialen Ischämie inflammatorische Prozesse fördert (Ling et al. 2013) und dass die CaMKII δ_c proapoptotische Prozesse in Assoziation mit vermehrter mitochondrialer Cytochrom c-Freisetzung induziert kann (Zhu W et al. 2007). Diese Signalwege werden möglicherweise durch eine β -AR-Blockade positiv beeinflusst, ohne dass die globale CaMKII-Aktivität moduliert wird.

Wie wirkt sich eine Betablockertherapie auf die CaMKII-Aktivität und CaMKII-abhängige Prozesse in anderen Herzinsuffizienzmodellen wie Myokardinfarkt oder TAC aus? Diese Modelle spiegeln die klinische Pathophysiologie der Herzinsuffizienz durch veränderte Expressions- und Aktivitätsmuster der endogenen regulatorischen Proteine und Effektoren anders wider als ein transgenes Mausmodell und sind dabei möglicherweise weniger artifiziell hinsichtlich der Regulation und Interaktion verschiedener Signalwege. Durch eine Analyse des Effekts einer Betablockertherapie auf die bisher beschriebenen Mediatoren des

crossstalks zwischen β -adrenerger Signalkaskade und CaMKII könnte dabei auch die pathophysiologische Relevanz der postulierten *crossstalk*-Mechanismen (Grimm M und Brown 2010; Grimm M et al. 2011) besser beurteilt werden.

4.9 Klinische Relevanz

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung, die weltweit zu den wichtigsten Morbiditäts- und Mortalitätsursachen zählt. Die prognoseverbessernden medikamentösen Therapieoptionen beruhen im Wesentlichen auf einer Hemmung neurohumoraler Systeme durch Betablocker, ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptorblocker und Aldosteron-Antagonisten. Auch wenn die Fortschritte in der Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz zu einer Verbesserung der Prognose und Lebensqualität geführt haben, versterben nach wie vor ca. 50 % der Patienten innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung (Go et al. 2013). Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines verbesserten pathophysiologischen Verständnisses zur Entwicklung neuer Therapieoptionen, zumal sich vielversprechende Wirkstoffe wie Endothelinrezeptor-Antagonisten (Kalra et al. 2002) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α)-Antagonisten (Mann et al. 2004) in klinischen Studien als nicht erfolgreich erwiesen haben.

Eine Inhibition der CaMKII hat sich in der experimentellen Forschung der letzten Jahre zu einer aussichtsreichen neuen Interventionsmöglichkeit zur Behandlung der Herzinsuffizienz entwickelt. Mehrere CaMKII-Inhibitoren wie KN-93, *Autocamtide-2 related inhibitory peptide* (AIP) und *Autocamtide-3 derived inhibitory peptide* (AC3-I) sind experimentell etabliert und verschiedene Programme zur Entwicklung oral anwendbarer CaMKII-Inhibitoren, die in klinischen Studien einsetzbar sind, wurden gestartet (Pellicena und Schulman 2014). Bisher wurde der CaMKII-Inhibitor SMP-114 in einer klinischen Phase-II Studie zur rheumatoiden Arthritis getestet (ISRCTN-Register für klinische Studien 2015), bei der die CaMKII an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist (Westra et al. 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine Betablockertherapie die in der Herzinsuffizienz erhöhte CaMKII-Aktivität nicht beeinflusst. Dieser Befund unterstützt den potentiellen Nutzen einer direkten CaMKII-Inhibition als eine Betablocker komplementierende zusätzliche therapeutische Option in einer verbesserten medikamentösen Herzinsuffizienzbehandlung.

5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist eine der führenden Mortalitäts- und Morbiditätsursachen weltweit. Dabei ist die Prävalenz steigend und die Prognose trotz Fortschritten im Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankung und Weiterentwicklung der Therapiekonzepte weiterhin schlecht. Betablocker sind eine der Hauptsäulen in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Sie verbessern langfristig die Herzleistung, wirken sich protektiv auf das kardiale *remodeling* aus und schützen vor Arrhythmien. Viele Mechanismen ihres klinischen Nutzens sind allerdings wenig charakterisiert.

Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II wird in der experimentellen und menschlichen Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert, induziert eine Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase und scheint damit eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz zu spielen. Eine kardiale Überexpression der CaMKII ist mit der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie, einer kontraktilen Dysfunktion und einer erhöhten Anfälligkeit für Arrhythmien assoziiert. Es wurden verschiedene Mechanismen eines pathophysiologisch relevanten *crossstalks* zwischen β -adrenerger Stimulation und Aktivierung der CaMKII charakterisiert. Dabei gibt es zunehmende experimentelle Hinweise darauf, dass einige der schädigenden Effekte eines vermehrt aktiven Sympathikus durch die CaMKII vermittelt werden. Bisher ist jedoch unklar, inwieweit sich der protektive Effekt einer Betablockertherapie in der Herzinsuffizienz durch einen hemmenden Einfluss auf die CaMKII erklären lässt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt einer Betablockertherapie auf die Aktivität der CaMKII zu untersuchen. Dazu wurde zunächst die CaMKII-Expression und Autophosphorylierung in myokardialem Gewebe von terminal herzinsuffizienten und primär nicht herzinsuffizienten Patienten mit und ohne Betablocker analysiert. In allen untersuchten Patientenkollektiven ließen sich dabei keine Unterschiede zwischen mit Betablockern behandelten Patienten und Patienten ohne Betablockertherapie feststellen. Anschließend wurde eine orale Therapie mit dem β_1 -selektiven Betablocker Metoprolol in CaMKII δ_c -TG Mäusen, einem Modell der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz, etabliert. Eine effektive Blockade der β -adrenergen Signalkaskade zeigte sich zum einen in verschiedenen klinischen Parametern wie einer Reduktion der Herzfrequenz, des Blutdrucks und negativ inotropen Effekten bei Behandlungsbeginn. Zum anderen ließ sich auf molekularer Ebene bei den mit Metoprolol behandelten Tieren eine signifikante Reduktion der PKA-abhängigen Phosphorylierungen von PLB und RyR2 feststellen. Die

Betablockertherapie führte in den CaMKII δ_c -TG zu einem signifikant verbesserten Überleben, hatte protektive Effekte hinsichtlich der kardialen Hypertrophieentwicklung und verringerte das Auftreten spontaner ventrikulärer Arrhythmien. Allerdings ließ sich trotz der bisher beschriebenen *crossstalk*-Mechanismen zwischen β -adrenerger Stimulation und CaMKII-Aktivierung kein Einfluss der Metoprolol-Behandlung auf die Aktivität der CaMKII detektieren. Die mit Betablocker behandelten Tiere zeigten im Vergleich zu den nicht behandelten weder eine verringerte CaMKII-Autophosphorylierung noch -Aktivität im Pulldownassay. Daneben waren auch die CaMKII-abhängigen Phosphorylierungen an PLB und RyR2 unter Metoprolol-Therapie nicht signifikant verändert. Die unter Betablockertherapie unverändert erhaltene CaMKII-Aktivität im Mausmodell reflektiert damit die Befunde aus den menschlichen Herzproben von Patienten mit und ohne Betablocker.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen zusammenfassend darauf schließen, dass eine Betablockertherapie nicht wie zu erwarten zu einer Modulation der CaMKII-Aktivität führt. Die protektiven Effekte einer Betablockertherapie in der Herzinsuffizienz scheinen sich daher nicht partiell durch eine Inhibition der CaMKII erklären zu lassen. Dieser Befund unterstützt den potentiellen Nutzen einer direkten CaMKII-Inhibition als zusätzlicher therapeutischer Option in einer verbesserten medikamentösen Herzinsuffizienzbehandlung.

6 Literaturverzeichnis

- Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 11. Auflage; Urban und Fischer/Elsevier, München 2013
- Anderson ME, Brown JH, Bers DM (2011): CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 51, 468-473
- Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN (2001): Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res* 89, 997-1004
- Asai K, Yang GP, Geng YJ, Takagi G, Bishop S, Ishikawa Y, Shannon RP, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ (1999): Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salpa) mouse. *J Clin Invest* 104, 551-558
- Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN (2006): CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 116, 1853-1864
- Barone FC, Campbell WG, Jr., Nelson AH, Feuerstein GZ (1998): Carvedilol prevents severe hypertensive cardiomyopathy and remodeling. *J Hypertens* 16, 871-884
- Barsheshet A, Dotsenko O, Goldenberg I (2014): Congenital long QT syndromes: prevalence, pathophysiology and management. *Paediatr Drugs* 16, 447-456
- Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H (1996): Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem* 157, 171-179

-
- Bauer R, Blain A, Grealley E, Bushby K, Lochmuller H, Laval S, Straub V, MacGowan GA (2010): Intolerance to ss-blockade in a mouse model of delta-sarcoglycan-deficient muscular dystrophy cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 12, 1163-1170
- Benedict CR, Shelton B, Johnstone DE, Francis G, Greenberg B, Konstam M, Probstfield JL, Yusuf S (1996): Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation* 94, 690-697
- Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205
- Bers DM (2014): Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu Rev Physiol* 76, 107-127
- Berthonneche C, Peter B, Schupfer F, Hayoz P, Kutalik Z, Abriel H, Pedrazzini T, Beckmann JS, Bergmann S, Maurer F (2009): Cardiovascular response to beta-adrenergic blockade or activation in 23 inbred mouse strains. *PLoS One* 4, e6610
- Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA (1997): Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96, 1495-1500
- Boknik P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Muller T, Schmitz W, Schroder F (2000): Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 222-231
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Brammen C: Kardiale Phänotypisierung einer transgenen Mauslinie mit herzspezifischer Calcium-Calmodulin-Kinase II δ c-Überexpression auf einem Phosphatase-Inhibitor-1-Knockout-Hintergrund. Med. Diss. Göttingen 2015
- Breckenridge R (2010): Heart failure and mouse models. *Dis Model Mech* 3, 138-143

-
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982): Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307, 205-211
- Brodde OE, Bruck H, Leineweber K (2006): Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci* 100, 323-337
- Chan V, Fenning A, Hoey A, Brown L (2011): Chronic beta-adrenoceptor antagonist treatment controls cardiovascular remodeling in heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 58, 424-431
- CIBIS-II (1999): The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 353, 9-13
- Curran J, Tang L, Roof SR, Velmurugan S, Millard A, Shonts S, Wang H, Santiago D, Ahmad U, Perryman M (2014): Nitric oxide-dependent activation of CaMKII increases diastolic sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes in response to adrenergic stimulation. *PLoS One* 9, e87495
- Doughty RN, Whalley GA, Gamble G, MacMahon S, Sharpe N (1997): Left ventricular remodeling with carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 29, 1060-1066
- Du XJ, Autelitano DJ, Dilley RJ, Wang B, Dart AM, Woodcock EA (2000): beta(2)-adrenergic receptor overexpression exacerbates development of heart failure after aortic stenosis. *Circulation* 101, 71-77
- Eichhorn EJ (1992): The paradox of beta-adrenergic blockade for the management of congestive heart failure. *Am J Med* 92, 527-538
- El-Armouche A, Eschenhagen T (2009): Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14, 225-241

-
- El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T (2004): Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 61, 87-93
- El-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, Wittköpper K, Peeck M, Eschenhagen T (2007a): Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail* 9, 1077-1080
- El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L (2007b): Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43, 223-229
- El-Armouche A, Wittköpper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didie M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsold B (2008): Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 80, 396-406
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999): Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7059-7064
- Enns LC, Bible KL, Emond MJ, Ladiges WC (2010): Mice lacking the Cbeta subunit of PKA are resistant to angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and dysfunction. *BMC Res Notes* 3, 307
- Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N (2008): A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462-474
- Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM (2013): Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 502, 372-376

-
- Eschenhagen T, Mende U, Diederich M, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Warnholtz A, Schafer H (1992): Long term beta-adrenoceptor-mediated up-regulation of Gi alpha and G(o) alpha mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. *Mol Pharmacol* 42, 773-783
- Ferrero P, Said M, Sanchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P, Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C (2007): Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 43, 281-291
- Fischer TH, Eiringhaus J, Dybkova N, Forster A, Herting J, Kleinwachter A, Ljubojevic S, Schmitto JD, Streckfuss-Bomeke K, Renner A (2014): Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 16, 1292-1300
- Flather MD, Shibata MC, Coats AJ, Van Veldhuisen DJ, Parkhomenko A, Borbola J, Cohen-Solal A, Dumitrascu D, Ferrari R, Lechat P (2005): Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J* 26, 215-225
- Frishman WH (2007): A Historical Perspective on the Development of β -Adrenergic Blockers. *J Clin Hypertens* 2, 19-27
- Gauthier C, Rozec B, Manoury B, Balligand JL (2011): Beta-3 adrenoceptors as new therapeutic targets for cardiovascular pathologies. *Curr Heart Fail Rep* 8, 184-192
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS (2013): Heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127, e6-e245
- Gottlieb SS, McCarter RJ, Vogel RA (1998): Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *N Engl J Med* 339, 489-497

-
- Grimm D, Huber M, Jabusch HC, Shakibaei M, Fredersdorf S, Paul M, Riegger GA, Kromer EP (2001): Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 33, 487-501
- Grimm M, Brown JH (2010): Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 48, 322-330
- Grimm M, Ling H, Brown JH (2011): Crossing signals: relationships between beta-adrenergic stimulation and CaMKII activation. *Heart Rhythm* 8, 1296-1298
- Grimm M, Ling H, Willeford A, Pereira L, Gray CB, Erickson JR, Sarma S, Respress JL, Wehrens XH, Bers DM (2015): CaMKII δ mediates beta-adrenergic effects on RyR2 phosphorylation and SR Ca²⁺ leak and the pathophysiological response to chronic beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 85, 282-291
- Groenning BA, Nilsson JC, Sondergaard L, Fritz-Hansen T, Larsson HB, Hildebrandt PR (2000): Antiremodeling effects on the left ventricle during beta-blockade with metoprolol in the treatment of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 36, 2072-2080
- Gutierrez DA, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E (2013): NO-dependent CaMKII activation during beta-adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 100, 392-401
- Hall SA, Cigarroa CG, Marcoux L, Risser RC, Grayburn PA, Eichhorn EJ (1995): Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta-adrenergic blockade. *J Am Coll Cardiol* 25, 1154-1161
- Harding VB, Jones LR, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Rockman HA (2001): Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5809-5814
- Heijman J, Dewenter M, El-Armouche A, Dobrev D (2013): Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol* 64, 90-98

-
- Heilbrunn SM, Shah P, Bristow MR, Valantine HA, Ginsburg R, Fowler MB (1989): Increased beta-receptor density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term metoprolol therapy in heart failure from dilated cardiomyopathy. *Circulation* 79, 483-490
- Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993): The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 22, 6A-13A
- Hudmon A, Schulman H (2002): Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 364, 593-611
- Huke S, Desantiago J, Kaetzel MA, Mishra S, Brown JH, Dedman JR, Bers DM (2011): SR-targeted CaMKII inhibition improves SR Ca²⁺ handling, but accelerates cardiac remodeling in mice overexpressing CaMKIIdeltaC. *J Mol Cell Cardiol* 50, 230-238
- Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Asai K, Shannon RP, Kudej RK, Wagner TE, Wight DC, Patrick TA, Ishikawa Y (1997): Cardiomyopathy induced by cardiac Gs alpha overexpression. *Am J Physiol* 272, H585-589
- Jelinek M: Einfluss einer Reduktion der kardialen Schrittmacheraktivität auf das Überleben und die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt. *Med. vet. Diss. Hannover* 2013
- Joiner ML, Koval OM, Li J, He BJ, Allamargot C, Gao Z, Luczak ED, Hall DD, Fink BD, Chen B (2012): CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature* 491, 269-273
- Kalra PR, Moon JC, Coats AJ (2002): Do results of the ENABLE (Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart Failure) study spell the end for non-selective endothelin antagonism in heart failure? *Int J Cardiol* 85, 195-197
- Kawai K, Qin F, Shite J, Mao W, Fukuoka S, Liang CS (2004): Importance of antioxidant and antiapoptotic effects of beta-receptor blockers in heart failure therapy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H1003-1012

-
- Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42, 254-261
- Kuschel M, Karczewski P, Hempel P, Schlegel WP, Krause EG, Bartel S (1999): Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am J Physiol* 276, H1625-1633
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lai NC, Tang T, Gao MH, Saito M, Takahashi T, Roth DM, Hammond HK (2008): Activation of cardiac adenylyl cyclase expression increases function of the failing ischemic heart in mice. *J Am Coll Cardiol* 51, 1490-1497
- Lehnart S, Marks AR (2007): Regulation of ryanodine receptors in the heart. *Circ Res* 101, 746-749
- Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chen J, Bers D (2009): Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest* 119, 1230-1240
- Ling H, Gray CB, Zambon AC, Grimm M, Gu Y, Dalton N, Purcell NH, Peterson K, Brown JH (2013): Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II delta mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor-kappaB. *Circ Res* 112, 935-944
- Lowes BD, Gill EA, Abraham WT, Larrain JR, Robertson AD, Bristow MR, Gilbert EM (1999): Effects of carvedilol on left ventricular mass, chamber geometry, and mitral regurgitation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 83, 1201-1205
- Maier LS (2005): CaMKIIdelta overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling. *Braz J Med Biol Res* 38, 1293-1302

-
- Maier LS, Bers DM (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939
- Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res* 92, 904-911
- Mangmool S, Shukla AK, Rockman HA (2010): beta-Arrestin-dependent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol* 189, 573-587
- Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, Djian J, Drexler H, Feldman A, Kober L (2004): Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation* 109, 1594-1602
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, Marks AR (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-376
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA (2012): ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 14, 803-869
- MERIT-HF (1999): Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 353, 2001-2007
- Mollova MY, Katus HA, Backs J (2015): Regulation of CaMKII signaling in cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 6, 178

-
- Neef S, Maier LS (2007): Remodeling of excitation-contraction coupling in the heart: inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak as a novel therapeutic approach. *Curr Heart Fail Rep* 4, 11-17
- Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Doring V, Kalmar P (1988): Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet* 2, 936-937
- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997): Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29, 265-272
- Nuss HB, Kaab S, Kass DA, Tomaselli GF, Marban E (1999): Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure. *Am J Physiol* 277, H80-91
- Oestreich EA, Malik S, Goonasekera SA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV (2009): Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca^{2+} release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J Biol Chem* 284, 1514-1522
- Okumura S, Takagi G, Kawabe J, Yang G, Lee MC, Hong C, Liu J, Vatner DE, Sadoshima J, Vatner SF (2003): Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9986-9990
- Okumura S, Vatner DE, Kurotani R, Bai Y, Gao S, Yuan Z, Iwatsubo K, Ulucan C, Kawabe J, Ghosh K (2007): Disruption of type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of cyclic adenosine monophosphate signal and increases Akt signal with chronic catecholamine stress. *Circulation* 116, 1776-1783
- Omori K, Kotera J (2007): Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 100, 309-327
- Packer M (1985): Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation* 72, 681-685

-
- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH (1996): The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 334, 1349-1355
- Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB (2001): Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 344, 1651-1658
- Pellicena P, Schulman H (2014): CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front Pharmacol* 5, 21
- Perez-Schindler J, Philp A, Hernandez-Cascales J (2013): Pathophysiological relevance of the cardiac beta2-adrenergic receptor and its potential as a therapeutic target to improve cardiac function. *Eur J Pharmacol* 698, 39-47
- Pogwizd SM, Bers DM (2004): Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 14, 61-66
- Ponikowski P, Anker SD, AlHabib KF, Cowie MR, Force TL, Hu S, Jaarsma T, Krum H, Rastogi V, Rohde LE (2014): Heart failure preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Failure* 1, 4-25
- Prabhu SD, Chandrasekar B, Murray DR, Freeman GL (2000): beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling. *Circulation* 101, 2103-2109
- Rehsia NS, Dhalla NS (2010): Mechanisms of the beneficial effects of beta-adrenoceptor antagonists in congestive heart failure. *Exp Clin Cardiol* 15, e86-95
- Reiken S, Wehrens XH, 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

-
- Rizzi E, Guimaraes DA, Ceron CS, Prado CM, Pinheiro LC, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2014): beta1-Adrenergic blockers exert antioxidant effects, reduce matrix metalloproteinase activity, and improve renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. *Free Radic Biol Med* 73, 308-317
- Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH (2009): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail* 2, 664-675
- Schroder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwinger RH, Weil J, Herzig S (1998): Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 98, 969-976
- Seeland U, Schaffer A, Selejan S, Hohl M, Reil JC, Muller P, Rosenkranz S, Bohm M (2009): Effects of AT1- and beta-adrenergic receptor antagonists on TGF-beta1-induced fibrosis in transgenic mice. *Eur J Clin Invest* 39, 851-859
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME (1991): CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252, 1427-1430
- Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J (2010): Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107, 1150-1161
- Szentmiklosi AJ, Szentandrassy N, Hegyi B, Horvath B, Magyar J, Banyasz T, Nanasi PP (2015): Chemistry, physiology, and pharmacology of beta-adrenergic mechanisms in the heart. Why are beta-blocker antiarrhythmics superior? *Curr Pharm Des* 21, 1030-1041
- Thireau J, Karam S, Fauconnier J, Roberge S, Cassan C, Cazorla O, Aimond F, Lacampagne A, Babuty D, Richard S (2012): Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity. *Cardiovasc Res* 95, 59-68

-
- Thomas JA, Marks BH (1978): Plasma norepinephrine in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 41, 233-243
- Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993): Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87, 454-463
- van de Ven LL, van Veldhuisen DJ, Gouder M, Zilahi Z, Meyer WR, Willenheimer R (2010): The effect of treatment with bisoprolol-first versus enalapril-first on cardiac structure and function in heart failure. *Int J Cardiol* 144, 59-63
- Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH (2006): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3138
- Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW (1988): The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 22, 447-455
- Wei S, Chow LT, Sanderson JE (2000): Effect of carvedilol in comparison with metoprolol on myocardial collagen postinfarction. *J Am Coll Cardiol* 36, 276-281
- Westra J, Brouwer E, Bouwman E, Doornbos-van der Meer B, Posthumus MD, van Leeuwen MA, Limburg PC, Ueda Y, Kallenberg CG (2009): Role for CaMKII inhibition in rheumatoid arthritis: effects on HIF-1-induced VEGF production by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann NY Acad Sci* 1173, 706-711
- Wittköpper K, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A (2011): Phosphatase-1 inhibitor-1 in physiological and pathological beta-adrenoceptor signalling. *Cardiovasc Res* 91, 392-401
- Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ (2002): Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106, 1288-1293

-
- Yang J, Liu Y, Fan X, Li Z, Cheng Y (2014): A pathway and network review on beta-adrenoceptor signaling and beta blockers in cardiac remodeling. *Heart Fail Rev* 19, 799-814
- Yang Y, Zhu WZ, Joiner ML, Zhang R, Oddis CV, Hou Y, Yang J, Price EE, Gleaves L, Eren M (2006): Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H3065-3075
- Yoo B, Lemaire A, Mangmool S, Wolf MJ, Curcio A, Mao L, Rockman HA (2009): Beta1-adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1377-1386
- Zhang M, Hagenmueller M, Riffel JH, Kreusser MM, Bernhold E, Fan J, Katus HA, Backs J, Hardt SE (2015): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II couples Wnt signaling with histone deacetylase 4 and mediates dishevelled-induced cardiomyopathy. *Hypertension* 65, 335-344
- Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE, Jr., Thiel W, Guatimosim S, Song LS (2005): Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 11, 409-417
- Zhang T, Brown JH (2004): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63, 476-486
- Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH (2003): The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912-919
- Zhang T, Guo T, Mishra S, Dalton ND, Kranias EG, Peterson KL, Bers DM, Brown JH (2010): Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKIIdelta(C) transgenic mice. *Circ Res* 106, 354-362

Zhu W, Woo AY, Yang D, Cheng H, Crow MT, Xiao RP (2007): Activation of CaMKII δ is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis. J Biol Chem 282, 10833-10839

Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao RP (2003): Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. J Clin Invest 111, 617-625

6.1 Internetquellen

Arzneimittelreport 2015:

<https://presse.barmer-gek.de/barmer/web/Portale/Presseportal/Subportal/Infothek/Studien-und-Reports/Arzneimittelreport/Arzneimittelreport-2015/Arzneimittelreport-2015.html>; Zugriff am 04.02.2016

ISRCTN-Register für klinische Studien 2015:

<http://www.isrctn.com/ISRCTN32398235>; Zugriff am 04.02.2016

Statistisches Bundesamt 2014:

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Gesundheit.html>;
Zugriff am 04.02.2016

7 Anhang

7.1 Eigene Publikationen

7.1.1 Originalarbeiten

Vettel C, Lindner M, **Dewenter M**, Riedel M, Lämmle S, Mason F, Meinecke S, Brunner F, Geerts A, Hoffmann M, Wunder F, Wieland T, Wagner M, Sossalla S, Mehel H, Karam S, Lechêne P, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R, El-Armouche A: Phosphodiesterase 2 controls heart rate and protects against catecholamine-induced arrhythmias. In Revision bei *Circulation Research*

Godier-Furnémont AF, Tiburcy M, Wagner E, **Dewenter M**, Lämmle S, El-Armouche A, Lehnart SE, Vunjak-Novakovic G, Zimmermann WH (2015): Physiologic force-frequency response in engineered heart muscle by electromechanical stimulation. *Biomaterials* 60, 82-91

Vettel C, Lämmle S, Ewens S, Cervirgen C, Emons J, Ongherth A, **Dewenter M**, Lindner D, Westermann D, Nikolaev VO, Lutz S, Zimmermann WH, El-Armouche A (2014): PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, 1246-1252

Haj Slimane Z, Bedioun I, Lechêne P, Varin A, Lefebvre F, Mateo P, Domergue-Dupont V, **Dewenter M**, Richter W, Conti M, El-Armouche A, Zhang J, Fischmeister R, Vandecasteele G (2014): Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 102, 97-106

Mehel H, Emons J, Vettel C, Wittköpper K, Seppelt D, **Dewenter M**, Lutz S, Sossalla S, Maier LS, Lechêne P, Leroy J, Lefebvre F, Varin A, Eschenhagen T, Nattel S, Dobrev D, Zimmermann WH, Nikolaev VO, Vandecasteele G, Fischmeister R, El-Armouche A (2013): Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts β -adrenergic responses in cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol* 62, 1596-1606

7.1.2 Übersichtsartikel

Dewenter M, El-Armouche A (2015): Cystin zur Raucherentwöhnung. Internistische Praxis 55, 182

Dewenter M, Vettel C, El-Armouche A (2014): The Janus face of BNP therapy in chronic heart failure: beneficial effects unmasked by β blockers? Heart 100, 819-820

Döker S, **Dewenter M**, El-Armouche A (2014): Tofacitinib. Dtsch Med Wochenschr 139, 1003-1008

Heijman J, **Dewenter M**, El-Armouche A, Dobrev D (2013): Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. J Mol Cell Cardiol 64, 90-98

Dewenter M, Vettel C, El-Armouche A (2013): Losmapimod - Ein neuartiger Wirkstoff gegen kardiovaskuläre Erkrankungen? Dtsch Med Wochenschr 138, 39-42

Dewenter M, El-Armouche A (2012): Vareniclin - Erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei der Raucherentwöhnung? Der Kardiologe 6, 240-243

Christalla P, **Dewenter M**, El-Armouche A (2012): Effektivität und Sicherheit von Vareniclin zur Raucherentwöhnung. Dtsch Med Wochenschr 137, 940-944

7.1.3 Kongressbeiträge

Dewenter M, Neef S, Brammen C, Vettel C, Zelarayan LC, Katz S, Lämmle S, Sossalla S, Backs J, Brown JH, Maier LS, El-Armouche A: Chronic β -adrenoceptor blockade in heart failure does not modulate CaMKII activity. DGK Frühjahrstagung 2016, Mannheim

Dewenter M, Neef S, Brammen C, Vettel C, Zelarayan LC, Katz S, Lämmle S, Meyer-Roxlau S, Weber S, Sossalla S, Backs J, Brown JH, Maier LS, El-Armouche A: CaMKII overactivity persists during chronic β -adrenoceptor blockade in experimental and human heart failure. 14th Dutch-German Joint Meeting of the Molecular Cardiology Working Groups 2016, Leiden

Dewenter M, Vettel C, Lindner M, Riedel M, Lämmle S, Mason F, Meinecke S, Wieland T, Vandecasteele G, Geerts A, Wunder F, Sossalla S, Fischmeister R, El-Armouche A: Phosphodiesterase 2 regulates resting heart rate and protects against arrhythmias and β -adrenergic overstimulation. DGK Frühjahrstagung 2015, Mannheim

Saadatmand AR, **Dewenter M**, Meyer-Roxlau S, Vettel C, Lehmann L, Backs J, El-Armouche A: PKA and CaMKII-mediated phosphorylation of Histone H3S28 during pathological β -adrenergic stimulation. DGPT Jahrestagung 2014, Hannover

Dewenter M, Neef S, Brammen C, Brown JH, Maier LS, El-Armouche A: Genetic deletion of phosphatase inhibitor-1 versus betablocker treatment in severe CaMKII δ_C -induced heart failure. ESC Heart Failure Congress 2013, Lissabon

Dewenter M, Neef S, Brammen C, Brown JH, Maier LS, El-Armouche A: Genetic deletion of phosphatase inhibitor-1 versus betablocker treatment in severe CaMKII δ_C -induced heart failure. ESC Heart Failure Association Winter Meeting 2013, Les Diablerets

Brammen C, **Dewenter M**, Neef S, Wittköpper K, Sowa T, Schulte T, Blume R, Zimmermann WH, Maier LS, El-Armouche A: Loss of phosphatase-inhibitor-1 exaggerates heart failure progression in CaMKII δ_C transgenic mice. 10th Dutch-German Joint Meeting of the Molecular Cardiology Working Groups 2012, Kerkrade

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ali El-Armouche für die Vergabe des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein stetiges Interesse an meiner Arbeit und die kompetente fachliche und persönliche Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion. Besonderer Dank gilt außerdem für die Möglichkeit, an nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen und mich neben meiner Doktorarbeit an weiteren Forschungsprojekten seiner Arbeitsgruppe beteiligen zu können.

Ich bedanke mich des Weiteren bei Herrn Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann für die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie Göttingen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Lars Maier und seiner Arbeitsgruppe für die immer hilfsbereite und fachlich kompetente Kooperation im Rahmen dieses Forschungsprojektes. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. Stefan Neef, dessen Mitbetreuung meiner Arbeit wissenschaftlich und persönlich immer sehr motivierend war.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe El-Armouche, in der stets eine sehr freundliche und motivierende Arbeitsatmosphäre herrschte.

Ich bedanke mich bei allen Personen, die mich bei der Durchführung der Versuche unterstützt haben. Insbesondere danke ich Dr. Christiane Vettel, Dr. Simon Lämmle und Thomas Sowa für die Durchführung eines Teils der Western Blots, Dr. Laura Zelarayan für die histologischen Färbungen und Auswertungen, Dr. Sylvia Katz für die Durchführung des CaMKII-Aktivitätsassays und Roland Blume und Marcel Zoremba für die Durchführung der Echokardiographien.

Außerdem danke ich dem technischen Personal des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie Göttingen, der AG Prof. Lars Maier und des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie Dresden für die stets hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.