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

Funktionelle Charakterisierung neu entwickelter SERCA2a-Modulatoren an humanem Myokard und isolierten Herzmuskelzellen der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Linn Karen Löns, geb. Lüllau

aus

Braunschweig

Göttingen 2016

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

Referent: Prof. Dr. med. L. S. Maier

Ko-Referentin: PD Dr. rer. nat. Laura Zelarayan-Behrend

Drittreferent: Prof. Dr. med. Martin Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2018

Inhaltsverzeichnis

A	bbild	dungsverzeichnis	IV
Ta	abel	lenverzeichnis	٧
F	orme	elverzeichnis	VI
A	bkür	zungsverzeichnis	VI
1	E	inleitung	8
	1.1	Hintergrund	8
	1.2	Ultrastruktureller Aufbau der Herzmuskelzelle	9
	1.3	Die elektromechanische Kopplung	11
	1	I.3.1 Die SR Ca ²⁺ -ATPase (SERCA): Funktion, Struktur und Regulation	15
	1.4	Physiologische Regulationsmechanismen der Kontraktionskraft	17
	1	I.4.1 Frank-Starling-Mechanismus	17
	1	I.4.2 Positive Kraft-Frequenz-Beziehung	17
	1	I.4.3 Neurohumorale Aktivierung	18
	1.5	Herzinsuffizienz	18
	1	I.5.1 Definition, Ursachen, Klinik und Therapie	18
	1	I.5.2 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	19
	1	1.5.2.1 Strukturelle und mechanische Veränderungen	19
	1	1.5.2.2 Neurohumorale Veränderungen	20
	1	1.5.2.3 Molekulare und elektrophysiologische Veränderungen	20
	1.6	Bedeutung von Inotropika in der Herzinsuffizienztherapie	21
	1.7	Die SERCA2a-Modulatoren	23
	1	I.7.1 SERCA2a-Stimulation in der Medizin	23
	1	I.7.2 Entwicklung der SERCA2a-Modulatoren	24
	1.8	Zielsetzung und Fragestellungen	25
2	N	laterial und Methoden	26
	2.1	Epifluoreszenzexperimente	26
	5	2.1.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen	26
		2.1.2 Messung von intrazellulären Ca ²⁺ -Transienten und der Myozytenverkürzung	
		2.1.2.1 Grundlagen des Epifluoreszenzverfahrens	
		2.1.2.2 Eigenschaften des Kalzium-sensitiven Farbstoffs Fluo-3 AM	
		-	_

2.1.2.3 Das Epifluoreszenz-Setup	29
2.1.3 Versuchsdurchführung	31
2.1.4 Messprotokoll	33
2.1.5 Datenauswertung	33
2.1.5.1 Fraktionelle Zellverkürzung und Ca ²⁺ - Transienten F/F ₀	
2.1.5.2 Relaxationszeit	
2.1.5.3 Bestimmung des SR Ca ²⁺ -Gehaltes und der fraktionellen	SR Ca ²⁺ -
Freisetzung	35
2.2 Muskelstreifenexperimente	35
2.2.1 Gewinnung der humanen Muskelstreifen	35
2.2.2 Aufbau der Versuchsanlage	36
2.2.2.1 Zirkulation der Lösung	37
2.2.2.2 Kraftabnehmer	37
2.2.2.3 Reinigung der Anlage	38
2.2.2.4 Datenverarbeitung	38
2.2.3 Versuchsdurchführung	39
2.2.3.1 Einspannen der Muskelstreifen	39
2.2.3.2 Ausspülen, Stimulation, Kalziumaufbau und Einschlagen	39
2.2.3.3 Dehnung des Muskelstreifens	40
2.2.4 Messprotokoll	
2.2.4 Messprotokoll 2.3 Statistik	40
2.3 Statistik	40
2.3 Statistik	404041
2.3 Statistik	404041
2.3 Statistik	404145
Statistik 2.4 Lösungen und Chemikalien 3 Ergebnisse	404145
2.3 Statistik	40414545
2.3 Statistik	4041454545
2.3 Statistik 2.4 Lösungen und Chemikalien 3 Ergebnisse 3.1 Screening der SERCA2a-Modulatoren an Einzelzellen 3.1.1 ENF018 3.1.2 ENG020	
2.3 Statistik 2.4 Lösungen und Chemikalien 3 Ergebnisse 3.1 Screening der SERCA2a-Modulatoren an Einzelzellen 3.1.1 ENF018 3.1.2 ENG020 3.1.3 ENH036	
2.3 Statistik 2.4 Lösungen und Chemikalien 3 Ergebnisse 3.1 Screening der SERCA2a-Modulatoren an Einzelzellen 3.1.1 ENF018 3.1.2 ENG020 3.1.3 ENH036 3.1.4 ENL055	
2.3 Statistik 2.4 Lösungen und Chemikalien 3 Ergebnisse 3.1 Screening der SERCA2a-Modulatoren an Einzelzellen 3.1.1 ENF018 3.1.2 ENG020 3.1.3 ENH036 3.1.4 ENL055 3.1.5 ENL056	
2.3 Statistik	
2.3 Statistik 2.4 Lösungen und Chemikalien 3 Ergebnisse 3.1 Screening der SERCA2a-Modulatoren an Einzelzellen 3.1.1 ENF018 3.1.2 ENG020 3.1.3 ENH036 3.1.4 ENL055 3.1.5 ENL056 3.1.6 ENO107 3.1.7 ENO114 3.1.8 ENO166 3.1.9 ENO185	
2.3 Statistik 2.4 Lösungen und Chemikalien 3 Ergebnisse 3.1 Screening der SERCA2a-Modulatoren an Einzelzellen 3.1.1 ENF018 3.1.2 ENG020 3.1.3 ENH036 3.1.4 ENL055 3.1.5 ENL056 3.1.6 ENO107 3.1.7 ENO114 3.1.8 ENO166 3.1.9 ENO185 3.1.10 ENO187	
2.3 Statistik 2.4 Lösungen und Chemikalien 3 Ergebnisse 3.1 Screening der SERCA2a-Modulatoren an Einzelzellen 3.1.1 ENF018 3.1.2 ENG020 3.1.3 ENH036 3.1.4 ENL055 3.1.5 ENL056 3.1.6 ENO107 3.1.7 ENO114 3.1.8 ENO166 3.1.9 ENO185	

	3.1.13 GPZ000876	60
	3.1.14 GPZ001441	61
	3.1.15 GPZ003362	62
	3.1.16 GPZ006800	63
	3.1.17 GPZ007738	64
	3.1.18 Zusammenfassung des Screenings	65
	3.2 Einfluss auf den SR Ca ²⁺ -Gehalt	65
	3.2.1 ENL055	65
	3.2.2 ENO107	66
	3.2.3 ENO114	66
	3.2.4 ENO185	67
	3.2.5 ENO209	67
	3.2.6 GPZ003362	68
	3.3 Einfluss auf humane Muskelzellverbände	68
	3.3.1 ENL055	68
	3.3.2 ENO107	69
	3.3.3 ENO114	70
	3.3.4 ENO185	70
	3.3.5 ENO209	71
	3.3.6 GPZ003362	72
4	Diskussion	73
	4.1 Positiv inotrope SERCA2a-Modulatoren	74
	4.1.1 ENO114	. 74
	4.1.2 GPZ003362	. 77
	4.2 SERCA2a-Modulatoren ohne nachweisbaren Effekt auf die Kontraktilität	77
	4.3 Negativ inotrope SERCA2a-Modulatoren	. 79
	4.4 Klinischer Ausblick	81
5	Zusammenfassung	83
	Literatumverzeichnie	
	Litorotum/orzojobnio	0 1

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle	10
Abb. 1.2 Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung	12
Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Querbrückenzyklus	13
Abb. 1.4 Schematischer Aufbau der SERCA2a	16
Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage	27
Abb. 2.2 A Emissionsspektrum von Fluo-3	29
Abb. 2.2 B Strukturformel unterschiedlicher Fluo-Analoga	29
Abb. 2.3 Schema des Epifluoreszenz-Setups und des Strahlenganges im Mikroskop	30
Abb. 2.4 Schematische Darstellung einer Versuchskammer	31
Abb. 2.5 Originalregistrierung der Zellverkürzung einer Kardiomyozyte bei Stimulation	
mit 1 Hz	32
Abb. 2.6 Exemplarischer Kalziumtransient	35
Abb. 2.7 Aufbau der Versuchsanlage	37
Abb. 3.1 Screeningergebnisse von ENF018 (n=6) vs. Kontrolle (n=6)	46
Abb. 3.2 Exemplarische Originalregistrierung der normalisierten Zellverkürzung einer	
ENG020- Zelle (A) und einer Kontrollzelle (B) unter Stimulation von 2 Hz	47
Abb. 3.3 Screeningergebnisse von ENG020 (n=6) vs. Kontrolle (n=7)	48
Abb. 3.4 Screeningergebnisse von ENH036 (n=7) vs. Kontrolle (n=6)	49
Abb. 3.5 Screeningergebnisse von ENL055 (n=7) vs. Kontrolle (n=6)	50
Abb. 3.6 Screeningergebnisse von ENL056 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)	51
Abb. 3.7 Screeningergebnisse von ENO107 (n=7) vs. Kontrolle (n=8)	52
Abb. 3.8 Exemplarische Originalregistrierung der normalisierten Zellverkürzung einer	
ENO114-Zelle (A) und einer Kontrollzelle (B) unter Stimulation von 2 Hz	53
Abb. 3.9 Exemplarische Originalregistrierung einer kurzzeitigen Arrhythmie unter 10 μΝ	1
des SERCA2a-Modulators ENO114	53
Abb. 3.10 Screeningergebnisse von ENO114 (n=8) vs. Kontrolle (n=8)	54
Abb. 3.11 Screeningergebnisse von ENO166 (n=7) vs. Kontrolle (n=8)	55
Abb. 3.12 Screeningergebnisse von ENO185 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)	56
Abb. 3.13 Screeningergebnisse von ENO187 (n=6) vs. Kontrolle (n=7)	57
Abb. 3.14 Screeningergebnisse von ENO207 (n=7) vs. Kontrolle (n=6)	58
Abb. 3.15 Screeningergebnisse von ENO209 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)	59
Abb. 3.16 Screeningergebnisse von GPZ000876 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)	60
Abb. 3.17 Screeningergebnisse von GPZ001441 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)	61
Abb. 3.18 Screeningergebnisse von GPZ003362 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)	62
Abb. 3.19 Screeningergebnisse von GPZ006800 (n=6) vs. Kontrolle (n=6)	63
Abb. 3.20 Screeningergebnisse von GPZ007738 (n=7) vs. Kontrolle (n=8)	64

ADD. 3.21	Auswirkungen von Enluss auf den SR Ca ⁻ -Genalt von	
	Ratten-Kardiomyozyten	65
Abb. 3.22	Auswirkungen von ENO107 auf den SR Ca ²⁺ -Gehalt von	
	Ratten-Kardiomyozyten	66
Abb. 3.23	Auswirkungen von ENO114 auf den SR Ca ²⁺ -Gehalt von	
	Ratten-Kardiomyozyten	66
Abb. 3.24	Auswirkungen von ENO185 auf den SR Ca ²⁺ -Gehalt von	
	Ratten-Kardiomyozyten	67
Abb. 3.25	Auswirkungen von ENO209 auf den SR Ca ²⁺ -Gehalt von	
	Ratten-Kardiomyozyten	67
Abb. 3.26	Auswirkungen von GPZ003362 auf den SR Ca ²⁺ -Gehalt von	
	Ratten-Kardiomyozyten	68
Abb. 3.27	Konzentrationsabhängige Änderung der relativen Kraft und der Relaxations-	
	zeit im Muskelstreifenexperiment durch ENL055 (n=3) vs. Kontrolle(n=3)	69
Abb. 3.28	Konzentrationsabhängige Änderung der relativen Kraft und der Relaxations-	
	zeit im Muskelstreifenexperiment durch ENO107 (n=6) vs. Kontrolle(n=6)	69
Abb. 3.29	Konzentrationsabhängige Änderung der relativen Kraft und der Relaxations-	
	zeit im Muskelstreifenexperiment durch ENO114 (n=4) vs. Kontrolle(n=4)	70
Abb. 3.30	Konzentrationsabhängige Änderung der relativen Kraft und der Relaxations-	
	zeit im Muskelstreifenexperiment durch ENO185 (n=6) vs. Kontrolle(n=4)	70
Abb. 3.31	Konzentrationsabhängige Änderung der relativen Kraft und der Relaxations-	
	zeit im Muskelstreifenexperiment durch ENO209 (n=4) vs. Kontrolle(n=3)	71
Abb. 3.32	Konzentrationsabhängige Änderung der relativen Kraft und der Relaxations-	
	zeit im Muskelstreifenexperiment durch GPZ003362 (n=8) vs. $Kontrolle(n=8)$	72
Γabelle	enverzeichnis	
Tab. 2.1 l	Lösungen zur Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen	41
Tab. 2.2 H	Herstellung der Fluo 3 AM – Farbstofflösung	41
Tab. 2.3 2	Zusammensetzung der Normaltyrode	42
Tab. 2.4 H	Herstellung der Messtyroden	42
Tab. 2.5 2	Zusammensetzung von Krebs-Henseleit- und Präparierlösung für Muskel-	
5	streifenexperimente	43
Tab. 2.6 H	Herztransplantationspatienten	44
Tab. 2.7 N	Medikation der Herztransplantationspatienten	44

Formelverzeichnis

Formel 2.1 Berechnung der fraktionellen Zellverkürzung	34
Formel 2.2 Berechnung der Amplitude der Ca ²⁺ - Transienten F/F ₀	34
Formel 2.3 Berechnung der Querschnittsfläche eines Muskelstreifens	38
Formel 2.4 Berechnung des Standardfehlers des Mittelwertes (S.E.M.)	40

Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

ACE-Hemmer Hemmer des Angiotensin-konvertierenden Enzyms

ADP Adenosindiphosphat

A/D-Wandler Analog-Digital-Wandler

AM Azetoxymethylester

AP Aktionspotential

ATP Adenosintriphosphat

ATPasen Adenosintriphosphatasen

BDM 2.3-Butandion-Monoxim

Ca²⁺, [Ca²⁺]_i Kalzium, Kalziumkonzentration

CaMKII Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

cAMP zyklisches 3′,5′- Adeninmonophosphat

CICR Ca-induced Ca release (Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung)

DCM dilatative Kardiomyopathie

DMSO Dimethylsulfoxid

EF Ejektionsfraktion

engl. englisch

F_{sys} systolische Kraft

F_{dia} diastolische Spannung

F/F₀ Quotient aus systolischer und diastolischer Fluoreszenz

ICD implantierbarer Kardioverter-Defibrillator

ICM ischämische Kardiomyopathie

K⁺, [K⁺]_i Kalium, Kaliumkonzentration

KHK koronare Herzkrankheit

KH-Lösung Krebs-Henseleit-Lösung

lat. lateinisch

L_{max} maximale Kraftentwicklung

LVAD linksventrikuläres Unterstützungssystem

Na⁺, [Na⁺]_i Natrium, Natriumkonzentration

NCX Natrium/Kalzium-Austauscher

NT Normaltyrode

NT-proBNP N-terminales Pro-B-Typ Natriuretisches Peptid

n. s. nicht signifikant

NYHA New York Heart Association

PKA Proteinkinase A

PKC Proteinkinase C

PLB Phospholamban

RAAS Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RyR Ryanodin-Rezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums

RT₅₀ Zeit bis zur 50%igen Relaxation

RT₉₀ Zeit bis zur 90%igen Relaxation

sATP sarkolemmale ATPase

S.E.M. Standardfehler des Mittelwertes

SERCA2a Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums

SR sarkoplasmatisches Retikulum

 τ_{Ca} monoexponentielle Zeitabfallskonstante des Ca²⁺-Transienten

Tab. Tabelle

TTP Zeit bis zum Kraftmaximum

vs. versus

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die Herzinsuffizienz ist mit einer Prävalenz von etwa 23 Millionen Betroffenen weltweit eine der häufigsten Erkrankungen der Inneren Medizin. Sowohl die derzeitige demografische Entwicklung als auch die erfreuliche Reduktion der Mortalität durch Myokardinfarkte führen dazu, dass diese Prävalenz weiter zunimmt (Bui et al. 2011; Go et al. 2013). Während sie in der Gesamtbevölkerung ungefähr 2% beträgt, liegt die Prävalenz bei der zunehmenden Altersgruppe der über 80-Jährigen mit 10% ausgesprochen hoch (McMurray und Stewart 2000).

Trotz der Etablierung lebensverlängernder Wirkstoffe wie z. B. ACE-Hemmer und β -Blocker sowie nicht-medikamentöser Therapien wie z. B. implantierbarer Kardioverter-Defibrillatoren (ICD) ist die Prognose der Herzinsuffizienz noch immer schlecht: Die 5-Jahres-Überlebensrate bei chronischer Herzinsuffizienz beträgt durchschnittlich nur 45-60% (Levy et al. 2002).

Ein wichtiger Mechanismus in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz liegt in einer gestörten Kalzium-Homöostase der Kardiomyozyten (Gwathmey et al. 1987; Morgan et al.1990; Hasenfuss und Pieske 2002). Maßgeblich beteiligt an der gestörten Kalzium-Homöostase bei Herzinsuffizienz ist eine verminderte Expression der Herz-spezifischen sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase (SERCA2a), die zur reduzierten Ca²⁺-Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) beiträgt (Hasenfuss et al.1994).

Im Rahmen des EUGeneHeart-Projektes wurden neue Wirkstoffe entwickelt, die spezifisch an die SERCA2a binden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einfluss dieser neuen SERCA2a-Modulatoren auf die Aktivität der SERCA2a, den Kalzium-Haushalt sowie die Kontraktilität von Kardiomyozyten zu untersuchen, mit der Absicht, eine neue Therapieoption für die Behandlung der Herzinsuffizienz zu finden. Hierbei wurde sowohl eine Einzelzellstudie mit isolierten Herzmuskelzellen aus Rattenmyokard verwandt als auch eine Versuchsreihe mit Muskelzellverbänden aus menschlichen, terminal insuffizienten Herzen gewählt.

Für ein weiteres Verständnis der möglichen Wirkungsweisen der SERCA2a-Modulatoren soll im Folgenden zunächst ein Überblick über die physiologischen Regulationsmechanismen der Herzmuskelzelle geschaffen werden. Neben einer Beschreibung des ultrastrukturellen Aufbaus des Herzens, der elektromechanischen Kopplung, der für den Kalziumstoffwechsel relevanten Proteine und Signalwege und der pathophysiologischen Vorgänge der Herzinsuffizienz soll abschließend auf die SERCA2a-Modulatoren im Zusammenhang aktueller Forschungsergebnisse eingegangen werden.

1.2 Ultrastruktureller Aufbau der Herzmuskelzelle

Das Herzmuskelgewebe setzt sich aus einkernigen, teilweise auch zweikernigen, großen, parallel verlaufenden Herzmuskelzellen zusammen, die an ihren Enden über Glanzstreifen (lat. Disci intercalares) zahnartig untereinander in Verbindung stehen (Junqueira und Carneiro 2005). Die Glanzstreifen sorgen nicht nur für einen mechanischen Zusammenhalt, sondern auch für eine direkte Übertragung chemischer und elektrischer Reize zwischen den benachbarten Kardiomyozyten. Letzteres erfolgt über sog. *gap junctions*, kanalbildende Proteinkomplexe, die durchlässig für Ionen, Botenstoffe und andere kleine Moleküle (<1000 Dalton) des Zellzytosols sein können und somit die Bezeichnung des Herzmuskelgewebes als funktionelles Synzytium begründen (Loewenstein 1981). Bei einem gestörten Elektrolytmilieu des Zytosols, wie z. B. bei einer Protonen- oder Ca²⁺-Überladung, können sich die *gap junctions* jedoch auch verschließen und somit gesunde Zellen vor dem Zelltod schützen (Vaughan-Jones et al. 2009).

Jeder Kardiomyozyt wird durch eine Lipid/Phospholipid-Doppelmembran, das sog. Sarkolemm, begrenzt, die das Zytosol vom Extrazellulärraum trennt. Sie enthält wichtige funktionelle Proteine wie Ionenkanäle, Ionenpumpen und Rezeptoren, die allesamt von Relevanz für die elektrische und chemische Signalübermittlung und letztlich für die Regulation der elektromechanischen Kopplung sind. Zu den wichtigsten sarkolemmalen Kanälen im ventrikulären Kardiomyozyten zählen der L-Typ-Ca²+-Kanal, der Na+-Kanal und verschiedene K+-Kanäle. Wichtige sarkolemmale Austauscher und Pumpen sind der Na+/Ca²+-Austauscher (NCX), die Na+/K+-ATPase und die sarkolemmale Ca²+-ATPase. Die Funktion der einzelnen Kanäle soll im Abschnitt 1.3 näher erläutert werden.

Das Sarkolemm wirft quer zum Muskelfaserverlauf tiefe Falten in das Zellinnere auf. Diese als T-Tubuli bezeichneten sarkolemmalen Einstülpungen stehen in enger nachbarschaftlicher Beziehung zu den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums und enthalten in ihrer Membran die oben genannten L-Typ-Ca²⁺-Kanäle, die für die elektromechanische Kopplung eine besondere Rolle spielen (Ibrahim et al. 2011).

Eines der wichtigsten Zellkompartimente der Herzmuskelzelle für den kardialen Kalziumstoffwechsel stellt das sarkoplasmatische Retikulum (SR) dar. Da es sich schlauchförmig in Muskelfaserlängsrichtung ausdehnt, wird es auch als longitudinales Tubulus-System (L-Tubulus-System) bezeichnet. Es endet in den terminalen Zisternen, die zusammen mit den T-Tubuli des Sarkolemms durch ihre räumliche Nähe eine sogenannte Diadenstruktur bilden (Bers 2001). Das SR hat die Funktion der kontrollierten Ca²⁺-Speicherung und –Freisetzung inne, die es mithilfe zweier in seiner Membran integrierte Proteine erfüllt: der Herz-spezifischen SR Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) und des Ca²⁺-Freisetzungskanals, auch Ryanodin-Rezeptor (RyR) genannt. Im Lumen des SR befindet

sich neben einer großen Menge an Kalzium u. a. das Protein Calsequestrin, das durch seine hohe Kalziumbindungskapazität das Kalzium puffert (Campbell et al. 1983).

Als weitere Zellorganelle der Herzmuskelzelle sind die Myofibrillen zu nennen. Sie füllen allein etwa 50% des Zellvolumens aus und stellen den kontraktilen Apparat der Herzmuskelzelle dar (Bers 2001). Die etwa 1-2 µm dicken, zylindrisch aufgebauten Myofibrillen lassen sich aufgliedern in dünne Aktinfilamente und in dicke Myosinfilamente. Sie verlaufen parallel zueinander und bewirken durch ein gegenläufiges Ineinandergleiten eine Verkürzung der Zelle (Huxley 1969). Da sich die Myofilamente teilweise überlagern, entsteht die typische, im Mikroskop sichtbare Querstreifung der Herzmuskulatur. Wie aus Abb. 1.1 ersichtlich, lassen sich elektronenmikroskopisch Streifen unterschiedlicher Helligkeit voneinander abgrenzen (A-, H-, M-, I- und Z-Streifen). Die Z-Linien stellen den Ort dar, an dem die dünnen Aktinfilamente zusammen mit stützenden Titinsträngen verankert sind. Als Sarkomer bezeichnet man dabei den Abschnitt zwischen zwei aufeinanderfolgenden Z-Linien, der die kleinste funktionelle Einheit der Myofibrille darstellt (Bers 2001).

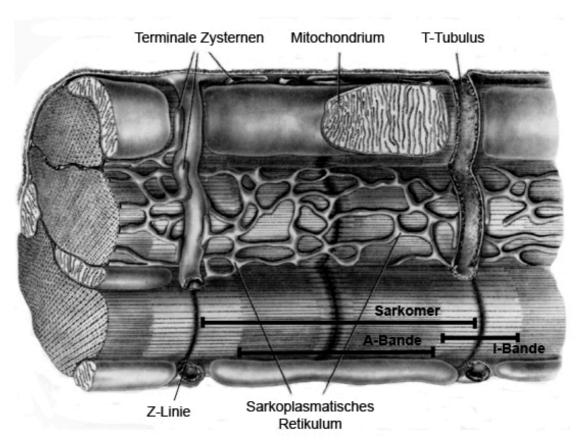


Abb. 1.1 Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle (modifiziert nach Bers 2001, Seite 2, mit freundlicher Genehmigung durch Springer Science and Bus Media BV)

Den Myofibrillen angelagert sind mehrere verschiedene Proteine, wie z. B. der Troponin-Tropomyosin-Komplex, ein spezieller Proteinkomplex, der essentiell für die Regulation der Zellkontraktion ist.

Zwischen den Myofibrillen befinden sich die Mitochondrien, die mit einem Volumenanteil von 35% das zweitgrößte Kompartiment der Kardiomyozyte darstellen. Als Energielieferant versorgen die Mitochondrien die Zelle mit Adenosintriphosphat (ATP), das insbesondere für den energieaufwendigen Gleit-Filament-Mechansimus der Myofibrillen notwendig ist. Außerdem tragen sie mit ihren in der Membran eingelagerten Ca²⁺-Uniportern einen geringen Anteil zur Elimination des Ca²⁺ aus dem Zytosol (etwa 2 %) und damit zur Relaxation der Zelle während der Diastole bei.

Weitere unerlässliche Zellorganellen der Kardiomyozyte sind sowohl der Golgi-Apparat, die Peroxysomen und Lysosomen als auch das Zytoskelett.

1.3 Die elektromechanische Kopplung

Vorraussetzung für die Initiierung der elektromechanischen Kopplung, d. h. der Umwandlung eines fortgeleiteten Aktionspotentials in eine Zellverkürzung, ist ein transienter Anstieg des intrazellulären Kalziums von ca. 100 nM auf über 1 µM (Drop 1985). Anschließend muss für die Relaxation der Zelle das intrazelluäre Kalzium wieder aus dem Zytosol eliminiert werden. Damit in der Zelle insgesamt kein Kalzium verloren geht oder angereichert wird, ist eine streng geregelte Balance zwischen Kalzium-Ein- und -Ausstrom notwendig (Bers 2002).

Die Erregungsbildung des Herzens beginnt in den spezialisierten Kardiomyozyten des Sinusknotens. Dort kommt es zu spontanen und rhythmischen Depolarisationen der Zellmembran und somit zu einem Aktionspotential, das über das Erregungsleitungssystem und schließlich über die oben genannten gap junctions direkt von Zelle zu Zelle weitergeleitet Öffnen wird. Das Aktionspotential wird generiert durch das sarkolemmaler spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle. Durch den Einwärtsstrom von Na⁺-Ionen kommt es zur Depolarisation der sarkolemmalen Membran, d. h. zu einem Anstieg des Membranpotentials von ca. - 80 mV, des Ruhemembranpotentials, auf positive Werte von ca. + 30 mV. Dies resultiert wiederum in einer Aktivierung auswärtsgerichteter K⁺-Kanäle, wodurch ein Auswärtsstrom von K⁺-lonen in den Extrazellulärraum entsteht. Fast gleichzeitig kommt es auch zu einem Ca2+-Einstrom über das Sarkolemm. Es entsteht die sogenannte Plateau-Phase des Aktionspotentials, während der nun die Kontraktion der Zelle initiiert wird (Birkeland et al. 2005). Der zur Plateau-Phase führende Kalziumeinstrom erfolgt über die sarkolemmalen L-Typ-Ca²⁺-Kanäle und zu einem geringen Anteil über den sogenannten reverse mode des Na⁺Ca²⁺-Austauschers (NCX), angeregt durch die Depolarisation und den passager höheren Na⁺-Gehalt der Zelle infolge des Aktionspotentials (Leblanc und Hume 1990). Für die Generierung einer Kontraktion ist jedoch ein sehr viel höherer Kalziumanstieg im Zytosol notwendig. Dieser kommt durch die sogenannte Kalzium-induzierte-Kalzium-Freisetzung, engl. *calcium induced calcium release* (CICR), zustande (Fabiato und Fabiato 1973): Die lokal erhöhte Menge an Ca²⁺-lonen zwischen den L-Typ-Ca²⁺-Känalen in den T-Tubuli und den eng benachbarten Ryanodin-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums führt zur Freisetzung von Kalzium aus dem SR. Das Kalzium stellt hierbei den adäquaten Trigger für den RyR dar sich zu öffnen und eine große Menge des im SR gespeicherten Kalziums freizusetzen.

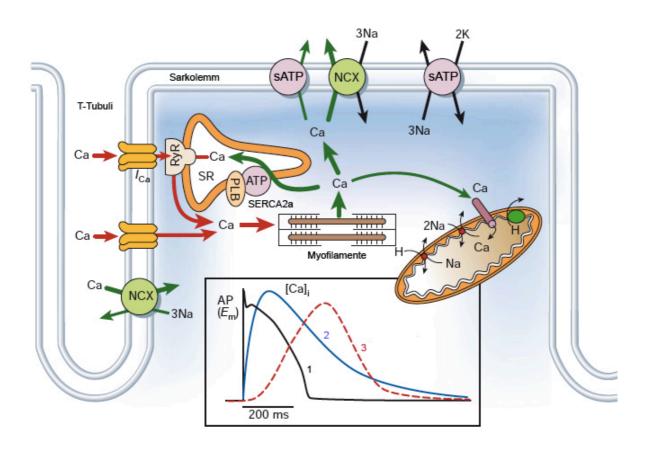


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung

Die roten Pfeile demonstrieren den Kalziumeinstrom während der Systole, die grünen Pfeile den Kalziumausstrom während der Diastole. Das Diagramm unten zeigt die Beziehung zwischen Aktionspotential (1), intrazellulärer Ca²⁺-Konzentration (2) und Myozytenverkürzung (3). (Modifiziert nach Bers 2002, Seite 198, mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd)

Im Weiteren erfolgt dann die Kontraktion der Myozyte über mehrere nacheinander folgende Schritte, die in Abb. 1.3 veranschaulicht werden:

Molekulare Mechanismen der Muskelfunktion Erregung [Ca²⁺]₁₇₈ 1-40 µmol/ Aktin-Myosin [Ca²⁺]_{IZR} < 1µmol/l Ruhestellung neue Kontraktion Bindung Ca²⁺-Rückfuhr ATP-Spaltung Kippen der Myosinköpfe Aufrichten der Myosinköpfe, durch P_i-Abgabe Lösen der Aktin Myosin-Bindung Endstellung der Köpfe durch mit ATP: ADP-Abgabe ohne stabiler Rigorkomplex bleibt bestehen Totenstarre

Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Querbrückenzyklus. Initial wird Kalzium an Troponin C gebunden. Dies bedingt die Freigabe der Bindungsstelle des Aktinstranges für das Myosinköpfchen. Unter Spaltung von ATP kommt es zur Anlagerung des ausgerichteten Hebelarms am Aktinstrang. Nach Abspaltung des Phosphats erfolgt die Rotationsbewegung des Kopfes und somit das gegenläufige Ineinandergleiten der Filamente. (Mit freundlicher Genehmigung durch CC BY-SA 2.5, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=558850)

Für das Zustandekommen einer Kontraktion muss der Kopf des Myosinfilaments an das Aktinfilament binden. In der Ausgangssituation wird diese Bindungsstelle jedoch durch den am Aktinfilament befindlichen Troponin-Tropomyosin-Komplex verdeckt. Durch Bindung von Kalzium an Troponin C dieses Komplexes kommt es zur Konformationsänderung des Tropomyosins, wodurch die Bindungsstelle für das Myosinköpfchen frei wird. Der folgende Prozess geschieht nun unter Energieaufwand, d. h. ATP-abhängig: Das Myosinköpfchen katalysiert als ATPase die Spaltung von einem Molekül ATP in ADP und Phosphat. Hierdurch kommt es zur Ausrichtung eines Hebelarms zwischen Myosinstrang und Myosinkopf und zu einer zunächst schwachen Bindung des Myosinköpfchens an der Aktinbindungsstelle. Anschließend erhöht sich die Bindungsaffinität der beiden Myofilamente. Erst durch die endgültige Abspaltung des Phosphats kommt es im folgenden Schritt zum Abkippen des Hebelarms und somit zu einem Gleiten des Aktinfilaments in Richtung der M-Linie des Sarkomers. Das Sarkomer ist nun um ca. 5-10 nm verkürzt. Im letzten Schritt dissoziiert das noch gebundene ADP-Molekül vom Myosinkopf ab und wird durch ein neues ATP-Molekül ersetzt. Das Myosinköpfchen löst sich vom Aktinstrang, und es kann ein weiterer Durchlauf dieses sog. Querbrückenzyklus erfolgen. Um eine adäguate Kontraktion der Zelle zu bewirken, muss der Querbrückenzyklus mehrere Male und von den in Reihe liegenden Myofilamenten synchron durchlaufen werden (Huxley 1969; Ebashi et al. 1974; Potter und Gergely 1974; Rayment et al. 1993).

Erst wenn die Kalziumkonzentration im Zytosol sinkt, kommt es zur Relaxation der Zelle. Da nun der auswärtsgerichtete K⁺-Ausstrom gegenüber dem Ca²⁺-Einstrom dominiert, kommt es zur Repolarisation der Membran auf ca. – 80 mV. Um ein Abdiffundieren des Kalziums von den Myofilamenten zu gewährleisten, muss die zytosolische Kalziumkonzentration auf den Ausgangswert von ca. 100 nM gesenkt werden. Dies erfolgt über vier verschiedene Mechanismen: Der größte Anteil des während der Systole im Zytosol befindlichen Kalziums wird über die SERCA2a wieder zurück ins SR gepumpt. Ein nicht unerheblicher Anteil wird über den NCX aus der Zelle in den Extrazellulärraum geschleust. Mit einem deutlich geringeren Anteil von 1-2% der zytosolischen Kalziumelimination trägt die sarkolemmale Ca²⁺-ATPase zur Kalziumausschleusung in den Extrazellulärraum bei. Insgesamt entspricht die über den NCX und die Ca²⁺-ATPase beförderte Kalziummenge ungefähr derjenigen, die zu Beginn der Systole über den L-Typ-Ca²⁺-Kanal in die Zelle gelangt ist. Ein weiterer geringer Anteil an Kalzium (ca. 2%) wird ferner über einen mitochondrialen Uniporter ins Lumen der Mitochondrien eliminiert (Bers 2001).

Der Abtransport des Kalziums über die SERCA2a und den NCX variiert innerhalb verschiedener Spezies: Während bei der Maus und der Ratte ca. 92 % des zytosolischen Kalziums über die SERCA2a und nur knapp 7 % über den NCX eliminiert wird, liegt das Verhältnis SERCA2a zu NCX der zytosolischen Kalziumelimination im menschlichen

Myokard bei ca. 70% zu 30 % (Bers 2002; Maier und Bers 2002). Allerdings unterliegen die Verhältnisse einer Frequenzabhängigkeit. Im gesunden menschlichen Myokard führt eine gesteigerte stimulierende Frequenz zu einer Erhöhung der Kalziumelimination über die SERCA2a bei gleichzeitig reduzierter Kalziumelimination über den NCX. Am herzinsuffizienten Myokard dagegen bleibt der Beitrag der SERCA2a zur Kalziumelimination bei gesteigeter Frequenz unverändert (Pieske et al. 1999). Bei der Ratte wiederum fällt die Steigerung der Kalziumelimination über die SERCA2a bei Frequenzerhöhung gering aus (Maier et al. 2000).

1.3.1 Die SR Ca²⁺-ATPase (SERCA): Funktion, Struktur und Regulation

Die Funktion der sarkoendoplasmatischen Ca²⁺-ATPase (SERCA) besteht darin, während der Diastole unter Energieaufwand, d. h. unter Spaltung eines ATP-Moleküls, zwei Ca²⁺-lonen in das sarkoplasmatische Retikulum zu befördern (Tada et al. 1978). Einerseits trägt sie hiermit entscheidend zur diastolischen Kalziumelimination und somit zur Relaxation der Kardiomyozyte bei (Inesi 1985; Schatzmann 1989). Andererseits wird unter normalen Bedingungen über ihre Aktivität indirekt die Kontraktilität reguliert: Je mehr Kalzium während der Relaxation in das SR befördert wird, desto mehr Kalzium kann innerhalb der nächsten Systole freigesetzt werden, desto stärker fällt also die folgende Kontraktion aus. Außerdem bestimmt ihre Aktivität die Relaxationsgeschwindigkeit (Shull et al. 2000).

In Säugetieren existieren mehrere Isoformen der SERCA, die sich in Lokalisation, Aktivität und Regulation voneinander unterscheiden und von insgesamt drei verschiedenen Genen (ATP2A1, ATP2A2 und ATP2A3) kodiert werden. Die Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen während der Transkription dieser Gene. Das ATP2A1-Gen wird in schnell kontrahierenden Skelettmuskelzellen transkribiert. Hier entsteht über alternatives Spleißen einerseits die neonatale SERCA-Isoform SERCA1b und andererseits die adulte Isoform SERCA1a. Das ATP2A2-Gen kodiert für weitere drei bekannte Isoformen: Während die Isoformen SERCA2a und SERCA2c vorwiegend in Herzmuskelzellen und in langsam kontrahierenden Skelettmuskelzellen vorkommen, wird die Isoform SERCA2b in allen Gewebezellen des Körpers, d. h. auch in nicht-muskulären Geweben, auf niedrigem Niveau exprimiert. Die Isoformen des ATP2A3-Gens kommen allgemein verteilt in nicht-muskulären Zellen vor und dominieren in hämatopoetischen Zellen, Thrombozyten, Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen (Periasamy und Kalyanasundaram 2007).

Da die SERCA-Isoform SERCA2a die dominierende Isoform der Herzmuskelzelle ist, wird im Folgenden nur diese genauer beschrieben.

Die SERCA2a ist ein ca. 110 kDa schweres Transmembranprotein, das den größten Anteil des Proteingehaltes des SR ausmacht und, wie bereits beschrieben, vorwiegend in den geraden Regionen der L-Tubuli lokalisiert ist (Tada et al. 1978). Wie in Abb. 1.4 zu sehen,

besteht die SERCA2a aus zehn transmembranären, α-helikalen Domänen (M1 – M10) und zwei zytoplasmatischen Anteilen. Die zytoplasmatischen Anteile wiederum setzen sich zusammen aus einer kleinen Schlaufe, der sog. β-Domäne, und einer großen Schlaufe, bestehend aus einer Phosphorylierungsstelle an Asp351, einer ATP-Bindungsstelle und einer Scharnierregion. Als Vorraussetzung für den Beginn eines Kalziumtransport-Prozesses müssen ein ATP-Molekül an die ATP-Bindungsstelle und zwei Ca²+-lonen an die Transmembrandomäne binden. Anschließend wird unter ATP-Hydrolyse die freiwerdende Phosphatgruppe auf die Aminosäure Asp351 übertragen, was zur Konformationsänderung der SERCA2a führt. Diese bewirkt, dass die Kalziumaffinität der SERCA2a sinkt, so dass das gebundene Kalzium in das Lumen des SR entlassen werden kann. Nach Abspaltung des Phosphats kann ein neuer Zyklus beginnen (MacLennan 1990; Lompré et al. 1994; Wankerl und Schwartz 1995).

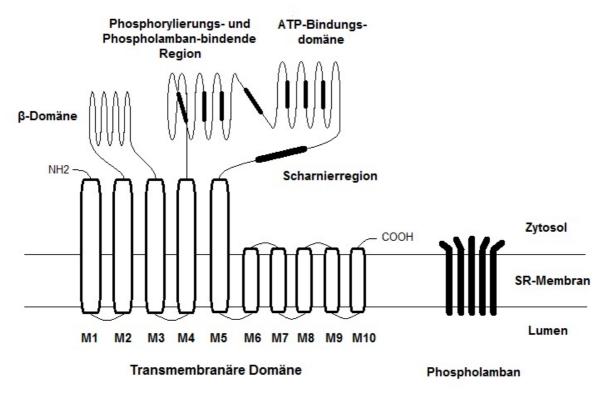


Abb. 1.4 Schematischer Aufbau der SERCA2a (Angelehnt an Lompré et al. 1994, Vol. 26, Seite 1111, Abbildung 1, mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier)

Reguliert wird die SERCA2a-Aktivität durch das Phosphoprotein Phospholamban (PLB). In dephosphorylierter Form inhibiert Phospholamban die Funktion der SERCA2a, indem es die Kalziumaffinität der Ca²⁺-ATPase mindert. Die Bindungsstelle für dephosphoryliertes Phospholamban befindet sich neben der Phosphorylierungsstelle der SERCA2a (James et al. 1989; Toyofuku et al. 1993). Durch Phosphorylierung dissoziiert Phospholamban von der SERCA2a ab, so dass die Kalziumaffinität der Ca²⁺-ATPase und somit die Aufnahme von Kalzium in das SR wieder steigt (Tada und Katz 1982; James et al. 1989; Kim et al. 1990).

An der Phosphorylierung von Phospholamban sind vornehmlich drei verschiedene Proteinkinasen beteiligt: zum einen die Proteinkinase A (PKA), die durch β -adrenerge Stimulation cAMP-abhängig aktiviert wird und Phospholamban an der Aminosäure Serin-16 phosphoryliert, zum anderen die Ca²+-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), die PLB an Threonin-17 phosphoryliert, und schließlich die Ca²+/Phospholipid-abhängige Proteinkinase C (PKC), die an Serin-10 des PLB phosphoryliert (Wegener et al. 1989; Colyer 1998). Die Phosphatbindung wird anschließend wieder durch SR-assoziierte Phosphatasen gespalten (Kranias und DiSalvo 1986).

Ferner wird die Aktivität der SERCA2a durch den physiologischen pH-Wert der Zelle beeinflusst. Bei Azidose wird die Funktion der SERCA2a herabgesetzt (Hulme und Orchard 1998). Dies kommt zum Beispiel im Rahmen eines Myokardinfarktes vor, wobei die reduzierte SR Ca²⁺-Aufnahme letztlich zu einer gestörten Relaxation und verminderten Kontraktilität führt.

1.4 Physiologische Regulationsmechanismen der Kontraktionskraft

In Belastungssituationen kann die Kontraktionskraft des Herzens durch unterschiedliche Anpassungsmechanismen gesteigert werden. Zu diesen gehören der Frank-Starling-Mechanismus, die positive Kraft-Frequenz-Beziehung (Bowditch-Effekt) sowie die Aktivierung neurohumoraler Systeme.

1.4.1 Frank-Starling-Mechanismus

Erhöhte enddiastolische Füllungsdrücke führen zu einer Steigerung der Kontraktionskraft (Frank 1895; Starling 1918). Dieser als Frank-Starling-Mechanismus bezeichnete Effekt beruht nach heutiger Ansicht überwiegend auf einer Erhöhung der Ca²⁺-Sensitivität der Myofilamente bei Dehnung (Allen und Kurihara 1982; Allen und Kentish 1985; Shiels und White 2008). Zum kleineren Teil wird er durch eine verbesserte Überlappung der Myofilamente hervorgerufen (Gordon et al. 1966).

1.4.2 Positive Kraft-Frequenz-Beziehung

Bei dem erstmals 1871 von Bowditch beschriebenen Anpassungsmechanismus wird die erhöhte Kontraktionskraft durch eine Steigerung der Herzfrequenz bewirkt. Der positiv inotrope Effekt beruht auf einem gesteigerten Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum aufgrund schnell aufeinander folgender Depolarisationen. Sowohl eine erhöhte Kalzium-Beladung des SR (Pieske et al. 1999 b), ein vermehrter Kalzium-Einstrom über den L-Typ-Kalzium-Kanal (Piot et al. 1996) als auch eine Erhöhung des intrazellulären Natriums mit konsekutiv erhöhtem Kalzium-Einstrom über den NCX (Cohen et al. 1982; Pieske et al. 2002) sind an der Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt.

1.4.3. Neurohumorale Aktivierung

In Belastungssituationen kommt es zur Ausschüttung diverser neurohumoraler Stoffe, die über verschiedene Mechanismen die Kontraktilität des Herzens beeinflussen können. Zu den wichtigsten zählen Katecholamine, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) sowie Endothelin-1.

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin wirken am Herzen über α - und β_1 -Rezeptoren stark positiv inotrop, wobei der Effekt über die β_1 -Rezeptoren stärker ausgeprägt ist (Brodde 1991). Die Stimulation der β_1 -Rezeptoren löst eine Signalkaskade aus, die zur Bildung von cyclischem 3′,5′- Adeninmonophosphat (cAMP) führt. Das cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die bestimmte Zielproteine im Zytosol phosphoryliert wie z. B. den L-Typ-Ca²+-Kanal, Phospholamban, Troponin I und den RyR. Insgesamt resultieren hieraus zum einen eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und somit ein positiv inotroper Effekt und zum anderen auch eine positiv chronotrope, dromotrope und lusitrope Wirkung (Nawrath 1989; Brodde et al. 1992). Die Stimulation der α -Rezeptoren führt dagegen u. a. zur Aktivierung der Proteinkinase C. Der positiv inotrope Effekt wird hier hauptsächlich durch eine Erhöhung der Ca²+-Sensitivität der Myofilamente hervorgerufen (Endoh 1991). Peripher führt die Stimulation der α -Rezeptoren zu einer Vasokonstriktion (Ahlquist 1976; Kohl et al. 1989).

Bei Blutdruckabfällen und Reduktion des zirkulierenden Blutvolumens kommt es zur Aktivierung des RAAS, das den Kreislauf durch Gefäßkonstriktion und Na⁺- und Wasser-Retention stabil hält. Ferner ist für das körpereigene Polypeptid Angiotensin II auch eine positiv inotrope Wirkung auf den Herzvorhof nachgewiesen (Holubarsch et al. 1993; Möllmann et al. 2007).

Der neurohumorale Stoff Endothelin-1 führt über eine Steigerung der Ca²⁺-Sensitivität der Myofilamente ebenfalls zu einer erhöhten Kontraktionskraft (Pieske et al. 1999 a). Außerdem wirkt er als potenter Vasokonstriktor und erhöht somit den peripheren Widerstand.

1.5 Herzinsuffizienz

1.5.1 Definition, Ursachen, Klinik und Therapie

Bei der Herzinsuffizienz handelt es sich definitionsgemäß um die Unfähigkeit des Herzens, die peripheren Organe trotz ausreichender linksventrikulärer Füllung mit genügend Sauerstoff zu versorgen (McMurray 1996).

Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind vielfältig. Man unterscheidet zwischen der systolischen Herzinsuffizienz mit eingeschränkter Pumpfunktion und der diastolischen Herzinsuffizienz mit gestörter Relaxation des Herzens bei erhaltener Pumpfunktion. Die häufigste Ursache der systolischen Herzinsuffizienz ist die Koronare Herzkrankheit (KHK), die entweder akut im Rahmen eines Myokardinfarktes oder chronisch über einen langen

Zeitraum zum Untergang des Herzmuskels und damit zur Einschränkung der Auswurfleistung führt. Neben der KHK sind die arterielle Hypertonie, die dilatative Kardiomyopathie (DCM), Herzvitien sowie die Myokarditis als weitere Ursachen der systolischen Herzinsuffizienz zu nennen (McMurray und Stewart 2000). Der diastolischen Herzinsuffizienz liegt häufig eine Herzhypertrophie zugrunde, die beispielsweise durch einen arteriellen Hypertonus bedingt sein kann. Häufig sind die ursächlichen Mechanismen der diastolischen Herzinsuffizienz jedoch unbekannt.

Klinisch können sich die systolische und die diastolische Herzinsuffizienz sehr ähneln. Unterschieden werden Symptome des Vorwärtsversagens wie z. B. Zyanose, Leistungsminderung und Synkopen von Symptomen des Rückwärtsversagens wie z. B. Dyspnoe bei Lungenödem, periphere Ödeme und Aszites.

Die Therapie der Herzinsuffizienz erfolgt abgestuft nach der Schweregrad-Klassifikation der New York Heart Association (NYHA-Klassen I-IV) mit ACE-Hemmern, β-Blockern, Diuretika, Aldosteronantagonisten und Digitalis. Bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz wird zudem nichtmedikamentös mittels implantierbarer Kardioverter-Defibrillatoren und/oder kardialer Resynchronisationstherapie behandelt (Weinbrenner et al. 2012).

1.5.2 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Allen Entitäten, die zur Entstehung der Herzinsuffizienz führen, ist der Verlust funktionellen Herzmuskels gemeinsam, der über einen begrenzten Zeitraum durch eine Hypertrophie der verbliebenen Herzmuskelanteile sowie sympathoadrenerge und neurohumorale Mechanismen kompensiert wird (siehe Abschnitt 1.4). Im Verlauf werden diese Kompensationsmechanismen jedoch ineffektiv, zum größten Teil schädigen sie sogar im Sinne eines circulus vitiosus die Funktion des Herzens und führen zur weiteren klinischen Manifestation der Herzinsuffizienz.

1.5.2.1 Strukturelle und mechanische Veränderungen

Als Antwort auf eine dauerhafte Belastung entsteht eine Hypertrophie des Herzens, die bei Druckbelastung konzentrisch und bei Volumenbelastung exzentrisch angeordnet ist (Grossman et al. 1975). Durch Zunahme der Zellgröße und gesteigerter Synthese von kontraktilen Proteinen wird die Auswurfleistung des Herzens zunächst aufrechterhalten (Ferrans et al. 1976; Takahashi et al. 1980; Olivetti 1994). Ab einem kritischen Herzgewicht von ca. 500 g kommt es jedoch zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffzufuhr und - Bedarf des Herzens. Es folgen subendokardiale Ischämien, die einen weiteren Verlust an Herzmuskelanteilen und somit eine zunehmende myokardiale Kraftminderung bewirken. Zusätzlich wird aufgrund einer gesteigerten Kollagensynthese die ventrikuläre Dehnbarkeit eingeschränkt, woraus eine diastolische Dysfunktion resultiert.

Des Weiteren werden bei Herzinssuffizienz Veränderungen der intrinsischen Kraftregulation gefunden: Sowohl in tierexperimentellen Herzinsuffizienzmodellen als auch in Versuchen mit humanen insuffizienten Kardiomyozyten wurde ein abgeschwächter oder fehlender Frank-Starling-Mechanismus beschrieben (Komamura et al. 1993; Schwinger et al. 1994). Im Gegensatz hierzu war dieser in vergleichbaren Versuchen anderer Arbeitsgruppen jedoch weiterhin vorhanden (Holubarsch et al. 1996; Vahl et al. 1997). Ferner ist auch der Bowditch-Effekt bei Herzinsuffizienz verändert: Unter Frequenzzunahme kommt es hier im Gegensatz zum gesunden Myokard zu einer Verminderung der Kontraktilität, d. h. einer negativen Kraft-Frequenz-Beziehung (Ezzaher et al. 1992; Mulieri et al 1992).

1.5.2.2 Neurohumorale Veränderungen

Erhöhte Katecholamin-Spiegel führen langfristig zu einer Herunterregulation und Desensibilisierung der β_1 -Rezeptoren (Bristow et al. 1982; Brodde 1991). Die positiv inotrope Wirkung der Katecholamine als wichtiger Anpassungsmechanismus ist folglich bei Herzinsuffizienz vermindert. Durch die chronische Stimulation der verbliebenen β_1 -Rezeptoren wird über eine Hypertrophie der Herzmuskulatur eine weitere Progredienz der Herzinsuffizienz bewirkt. Ferner wurde nachgewiesen, dass die Dauerstimulation der β_1 -Rezeptoren zu einer Induktion von Apoptosevorgängen und somit zum Entstehen von Myokardnekrosen führt (Communal 1999).

Auch eine Dauerstimulation des RAAS führt durch die vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin II und die Wasser-retendierende Wirkung von Aldosteron zu einer weiteren Arbeitsbelastung des Herzens (Chatterjee 2005). Für Angiotensin II ist zudem ebenfalls eine proapoptotische Wirkung nachgewiesen (Packer 1992).

1.5.2.3 Molekulare und elektrophysiologische Veränderungen

Obwohl ätiologisch verschiedene Erkrankungen zu einer Herzinsuffizienz führen können, lassen sich auf molekularer Ebene am terminal insuffizienten Herzen stets gleiche Veränderungen finden. Zu diesen molekularen Veränderungen gehört vor allem eine gestörte Kalziumhomöostase, die die Hauptursache für die beeinträchtigte Kontraktion und Relaxation des Herzens darstellt (Gwathmey et al. 1987, Morgan et al. 1990, Hasenfuß et al. 1992).

So lässt sich bei Herzinsuffizienz eine verminderte Kalziumtransienten-Amplitude, eine Verlangsamung des Abfalls der Kalziumtransienten und ein erhöhter diastolischer Kalziumgehalt nachweisen (Beuckelmann und Erdmann 1992, Pieske et al. 1995).

Außerdem ist bei Herzinsuffizienz ein verminderter SR Ca²⁺-Gehalt zu verzeichnen (Lindner et al. 1998; Hobai und O'Rourke 2001; Baartscheer et al. 2003). Ursache hierfür ist hauptsächlich ein veränderter Expressionsgrad der SERCA2a und des NCX. Es ist vielfach

gezeigt worden, dass die SERCA2a bei Herzinsuffizienz vermindert exprimiert wird, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Mercadier et al. 1990; Hasenfuss et al. 1994; Studer et al. 1994; Meyer et al. 1995). Konsekutiv wird angenommen, dass die hierdurch bedingte reduzierte SR Ca²⁺-Aufnahme einerseits zur diastolischen Dysfunktion mit enddiastolisch erhöhten Kalziumkonzentrationen und verlangsamtem Ca²⁺-Transienten-Abfall führt (Beuckelmann et al. 1995; Stüdeli et al 2006). Im Weiteren wird durch die verringerte Verfügbarkeit des systolisch freisetzbaren Kalziums eine verminderte Kontraktilität hervorgerufen.

Neben einer reduzierten SERCA2a-Expression können auch eine verminderte Phosphorylierung von Phospholamban (Schmidt et al. 1999; Schwinger et al. 1999; Dash 2001; Sande et al. 2002) sowie ein vermindertes SERCA2a/Phosphlamban-Verhältnis (Koss et al. 1997) zu der reduzierten Aktivität der SERCA2a beitragen.

Ferner konnte belegt werden, dass der NCX bei Herzinsuffizienz verstärkt exprimiert wird (Studer et al. 1994, Flesch et al. 1996, Bers et al. 2002) oder zumindest ein erhöhtes NCX/SERCA2a-Verhältnis vorliegt (Hasenfuss et al. 1999). Da folglich während der Diastole vermehrt Kalzium über den NCX verloren geht, trägt die NCX-Überexpression zum verminderten SR Ca²⁺-Gehalt bei.

Eine womöglich zusätzliche Ursache für den verminderten SR Ca²⁺-Gehalt bei Herzinsuffizienz ist ein erhöhtes sog. diastolisches SR Ca²⁺-Leck über den RyR (Shannon et al. 2003), das vermutlich als Resultat einer gesteigerten Hyperphosphorylierung auftritt. Diese entsteht einerseits durch die bei Herzinsuffizienz gesteigerte β-adrenerge Stimulation und andererseits durch eine erhöhte Expression und Aktivität der Ca²⁺-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), eines Enzyms, das neben anderen Zielproteinen auch den RyR phosphoryliert und somit dessen Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht (Maier et al. 2003; Ai et al. 2005; Curran et a. 2007; Sossalla et al. 2010).

Weitere pathophysiologische Mechanismen der Herzinsuffizienz sind eine verminderte ATPase-Aktivität der Myofibrillen (Alpert und Gordon 1962), die eine Störung des Querbrückenzyklus zur Folge hat, sowie eine verlängerte Aktionspotentialdauer, die auf eine Herunterregulation der Kalium-Ströme zurückzuführen zu sein scheint (Beuckelmann et al. 1993; Li et al. 2002).

1.6 Bedeutung von Inotropika in der Herzinsuffizienztherapie

Die systolische Herzinsuffizienz ist gekennzeichnet durch eine reduzierte Kontraktionskraft des Myokards. Seit Jahrzehnten wird daher intensiv an der Entwicklung und Etablierung postitiv inotroper Medikamente geforscht, die nicht nur kurzfristig die Kontraktionskraft des Herzens verbessern, sondern auch zur Langzeittherapie der chronischen Herzinsuffizienz eingesetzt werden können. Die einzigen positiv inotropen Generika, die derzeit von der

Deutschen Gesellschaft für Kardiologie Langzeittherapie zur der chronischen Herzinsuffizienz empfohlen werden, sind Herzglykoside (Hoppe et al. 2005). Herzglykoside wie Digoxin und Digitoxin entfalten ihre Wirkung über eine Hemmung der membranständigen Na⁺/K⁺-ATPase. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Na⁺-Konzentration. Durch den fallenden Na⁺-Gradienten kommt es zu einer Hemmung des NCX, so dass weniger Kalzium in den Extrazellulärraum eliminiert wird. Letztlich resultiert aus der so erhöhten intrazellulären Ca2+-Konzentration eine Steigerung der Kontraktionskraft (Hauptman und Kelly 1999). Nachteile der Digitalis-Therapie sind jedoch eine enge therapeutische Breite und eine proarrhythmogene Wirkung (Fisch und Knoebel 1985), weshalb Digitalis-Präparate nur eingeschränkt angewendet werden können. Zudem wird die Prognose der Herzinsuffizienz durch Herzglykoside nicht verbessert (Ahmed et al. 2006).

Andere Inotropika wie z. B. Katecholamine werden vor allem zur vorübergehenden Therapie der akuten Herzinssuffizienz herangezogen. Kurzfristig verbessern diese via cAMP-Erhöhung sowohl die hämodynamische Situation als auch die Symptome der Patienten. Aufgrund diverser nachteiliger Effekte können sie jedoch nicht zur Langzeittherapie der chronischen Herzinssuffizienz eingesetzt werden. Zu diesen zählen u. a. eine negative Energiebilanz, d. h. ein hoher ATP- bzw. Sauerstoffverbrauch (Bendersky et al. 1981; Nikolaidis et al.2004), der die Kardiomyozyten auf Dauer schwächt und sogar schädigt, ein auf lange Sicht entstehender Wirkverlust der Katecholamine aufgrund einer Herunterregulation der adrenergen Rezeptoren (Chang et al. 1982; Colucci et al. 1987; Soltysinska et al. 2011) sowie eine zusätzliche chronotrope Wirkung (Burger et al. 2002), die die Herzarbeit und somit den Energieverbrauch weiter erhöht.

Zu den neuen Inotropika, die in den letzten Jahren etabliert wurden, zählen Phosphodiesterasehemmer und Ca²⁺-Sensitizer. Phosphodiesterasehemmer wie Milrinon, Amrinon und Enoximon führen wie Katecholamine zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels. Als Vorteil gegenüber den Katecholaminen bewirken sie jedoch keine Herunterregulation der adrenergen Rezeptoren, so dass langfristig kein Wirkverlust entsteht (Mager et al. 1991). Aufgrund beträchtlicher Nebenwirkungen wie z. B. Arrhythmien (Cuffe et al. 2002) werden Phosphodiesterasehemmer jedoch nur bei therapieresistenter schwerer Herzinsuffizienz eingesetzt.

Ca²⁺-Sensitizer wie Levosimendan sind Inotropika, die die Ca²⁺-Sensitivität der Myofilamente erhöhen (Haikala et al. 1995) und somit vorübergehend, d. h. erfahrungsgemäß für ca. zwei bis drei Wochen nach einmaliger Infusion, die Kontraktilität des Herzens verbessern (Nieminen et al. 2014). Nachteilig ist jedoch, dass Ca²⁺-Sensitzer nur intravenös appliziert werden können. Zudem können sie extreme Blutdrucksenkungen verursachen (Slawsky et al. 2000; Moiseyev et al. 2002), so dass sie nur auf Intensivstationen Anwendung finden.

1.7 Die SERCA2a-Modulatoren

1.7.1 SERCA2a-Stimulation in der Medizin

Aufgrund der verminderten SERCA2a-Expression bei Herzinsuffizienz erscheint eine Stimulation der SERCA2a als neuer therapeutischer Ansatz vielversprechend. Tatsächlich ist es in Tiermodellen gelungen, mittels Gen-therapeutischer Überexpression der SERCA2a eine Erhöhung der Kontraktilität und der Ca²⁺-Transienten sowie eine Steigerung der Relaxationsgeschwindigkeit und der Ca²⁺-Extrusion zu erzielen (Hajjar et al. 1997; Baker et al. 1998; Meyer und Dillmann 1998; Yao et al. 1998; Müller et al. 2003; Maier et al. 2005). Des Weiteren konnte auch in Herzinsuffizienzmodellen durch eine adenoviral vermittelte SERCA2a-Überexpression eine Verbesserung der diastolischen und systolischen Funktionsparameter erreicht werden (Miyamoto et al. 2000; Müller et al. 2003; Byrne et al. 2008; Mi et al. 2009; Mariani et al. 2011; Xin et al. 2011). Ferner zeigten del Monte et al. 2004 und Prunier et al. 2008, dass eine Überexpression der SERCA2a in einem Ischämie-/Reperfusionsmodell der Ratte bzw. von Schweinen zu einem verminderten Auftreten von Arrhythmien führt. Derartige Ergebnisse konnten auch Lyon et al. 2011 und Cutler et al. 2012 an Herzinsuffizienzmodellen bestätigen. Neben einer verbesserten linksventrikulären Funktion konnten Fu et al. 2012 in einem Herzinsuffizienz-Modell mit Hunden auch reduzierte inflammatorische und Stress- assoziierte Proteine im Serum nachweisen.

Die adenoviral vermittelte SERCA2a-Überexpression wurde darüber hinaus auch in präklinischen Untersuchungen mit großen Säugetieren getestet, die hier ebenfalls zu einer Verbesserung der kontraktilen Funktion führte (Fu et al.2008; Kawase et al. 2008).

Momentan sind bereits klinische Untersuchungen dabei, die Sicherheit und positiven Effekte des SERCA2a-Gentransfers am Menschen zu prüfen. In der CUPID-Studie der Arbeitsgruppe Jessup et al. 2011 wurden 39 Patienten nach einem Zeitraum von 6 und 12 Monaten nach einer Adenovirus Typ 1 – vermittelten SERCA2a-Überexpression untersucht. Die Applikation des viralen Vektors erfolgte intrakoronar. Es zeigte sich eine Verbesserung oder zumindest Stabilisierung der Symptome gemäß NYHA-Klassifikation, der Leistung in einem 6-minütigen Geh-Test, des Biomarkers NT-pro-BNP und der linksventrikulären Funktion. Nach drei Jahren konnte bei der gleichen Patientengruppe eine Reduktion des Wiederauftretens kardiovaskulärer Ereignisse verzeichnet werden (Zsebo et al. 2014). Jedoch scheinen sich präexistente Antikörper gegen den Adenovirus Typ 1 limitierend auf die Gentherapie auszuwirken (Greenberg et al. 2016).

1.7.2 Entwicklung der SERCA2a-Modulatoren

Da neben einer Gen-vermittelten Steigerung der SERCA2a-Aktivität auch eine medikamentöse Beeinflussung der SERCA2a sinnvoll erscheint, wurde im Rahmen des EUGeneHeart-Projektes nach Stoffen gesucht, die sich durch eine strukturbedingte Affinität zur SERCA2a auszeichnen. Die Entwicklung dieser neuen SERCA2a-Modulatoren erfolgte durch die Pharmaunternehmen GreenPharma (Orléans, Frankreich) und Endotherm (Saarbrücken, Deutschland).

Vorraussetzung hierfür war zunächst die Ermittlung der exakten dreidimensionalen Molekülstruktur der SERCA2a. Diese erfolgte computergestützt, d. h. *in silico*, durch eine sog. Kristallstrukturanalyse. Prinzip dieses Verfahrens ist, mithilfe geeigneter Strahlung wie z. B. Röntgenstrahlung ein für die Kristallstruktur des Zielproteins charakteristisches Beugungsmuster zu bestimmen, aus dem sich die Elektronendichte und somit die Lage der Atome des Proteins ablesen lässt.

Im nächsten Schritt wurden die Datenbänke der Pharmaunternehmen virtuell nach Molekülen durchsucht, deren Struktur zu derjenigen der SERCA2a passen. Mithilfe einer erneuten Strukturanalyse der SERCA2a zusammen mit dem gebundenen Wirkstoff ließ sich anschließend ermitteln, wie die Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen aussieht. Auf diese Weise konnten insgesamt 17 Stoffe gefunden werden, die anschließend synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit bezüglich ihrer Eigenschaften *in vitro* untersucht wurden.

1.8 Zielsetzung und Fragestellungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einfluss der insgesamt 17 verschiedenen SERCA2a-Modulatoren auf die Kontraktilität und den Ca2+-Haushalt von Herzmuskelzellen zu untersuchen. Zunächst wurden die Stoffe mittels Epifluoreszenzverfahren an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte charakterisiert. Diejenigen SERCA2a-Modulatoren, die in dieser Versuchsreihe als direktes Maß für eine Steigerung der SERCA2a-Funktion eine Beschleunigung der Relaxation und Kalziumelimination oder eine Tendenz zur positiven Inotropie als indirektes Maß zeigten, wurden weitergehend mittels Messung des SR Ca²⁺-Gehaltes und Muskelstreifenexperimenten am humanen, insuffizienten Myokard untersucht.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Fragestellungen:

I. Charakterisierung mittels Epifluoreszenzverfahren an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte

- 1. Führen die SERCA2a-Modulatoren zu Veränderungen der Kontraktilität?
- 2. Haben die SERCA2a-Modulatoren Auswirkungen auf die Ca²⁺-Transienten-Amplitude?
- 3. Führen die SERCA2a-Modulatoren zu Änderungen im Relaxationsverhalten der Zellen?
- 4. Haben die SERCA2a-Modulatoren Auswirkungen auf die Ca²⁺-Abfallgeschwindigkeit?
- 5. Führen die SERCA2a-Modulatoren zu einem veränderten SR Ca²⁺-Gehalt?

II. Charakterisierung mittels Muskelstreifenexperiment am humanen, insuffizienten Myokard

- 1. Haben die SERCA2a-Modulatoren Einfluss auf die Kontraktilität?
- 2. Führen die SERCA2a-Modulatoren zu Änderungen im Relaxationsverhalten der Muskelstreifen?

2 Material und Methoden

2.1 Epifluoreszenzexperimente

2.1.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Für die Epifluoreszenzexperimente wurden ventrikuläre Kardiomyozyten aus sechs Monate alten männlichen Wistar-Ratten verwendet. Als Voraussetzung lag eine Genehmigung der niedersächsischen Tierschutzbehörde vor (AZ T14.06). Die im Folgenden beschriebene Methode zur Myozytenisolation kommt bereits seit mehreren Jahren erfolgreich zur Anwendung (Maier et al. 2003; Kohlhaas 2006; Rokita 2008).

Zur Explantation der Herzen wurde die zu untersuchende Ratte zunächst in einer luftdichten Kammer mit einer ihrem Gewicht entsprechenden Menge des Inhalationsnarkotikums Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden) anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Im nächsten Schritt wurde die Bauchdecke mit einer Präparierschere eröffnet, das Zwerchfell durchtrennt und das Herz vom Perikard befreit. Um eine Thrombusbildung im Herzen zu vermeiden, wurden anschließend 0,5 ml (2500 I.E.) Heparin-Natrium (Ratiopharm, Ulm) in das linke Herzohr injiziert. Unter Belassen eines möglichst großen Aortenstumpfes wurden nun die Gefäße des Herzens durchtrennt und das Herz in einer Petrischale mit Ca²⁺-haltiger Isolationstyrode (0,75 mM CaCl₂, Temperatur: 0°C, siehe Tabelle 2.1) vorsichtig ausgedrückt, um restliches Blut zu entfernen. Anschließend wurde unter einem binokularen Mikroskop die Aorta ascendens über eine Injektionskanüle gestülpt und mithilfe einer kleinen Gefäßklemme und eines Fadens an dieser fixiert. Danach erfolgte das Anschließen des kanülierten Herzens an eine Langendorff-Perfusionsapparatur (Langendorff 1895), die in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt ist.

Das an das Langendorff-Setup angeschlossene Herz wurde nun zunächst hinsichtlich seiner Vitalität geprüft: Durch etwa 5-10minütige Perfusion mit Ca²⁺-haltiger Isolationstyrode (1,25 mM CaCl₂, Temperatur: 37°C, Begasung mit 100% Sauerstoff) bei einem Fluss von 8 ml/h wurde das Herz zum Schlagen angeregt. Anschließend wurde auf Ca²⁺-freie Isolationstyrode gewechselt, bis nach etwa 20 Minuten die Muskelkontraktionen aussetzten. Dieser Wechsel diente einerseits zur Reduktion des Energieverbrauchs der Herzmuskelzellen, andererseits zur Auflösung Ca²⁺-abhängiger interzellulärer Verbindungen, die z. B. durch Cadherine oder Integrine vermittelt werden. Im nächsten Schritt wurde das nicht mehr kontrahierende Herz mit Enzymlösung (siehe Tabelle 2.1) perfundiert, bis sich das Herzgerüst auflöste. Als Zeichen für einen hinreichenden Verdau galten ein Farbwechsel des Herzens von vorher rot zu muskatbraun und eine abnehmende Festigkeit des Myokards. Anschließend wurde das Herz vom Langendorff-Setup entfernt und in eine Petrischale mit erwärmter Enzymlösung (Temperatur: 37°C) überführt. Hier wurden die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel mit einer Schere vorsichtig in kleine Teile geschnitten. Nach kurzem Schwenken im Wasserbad wurde

die so entstandene Zellsuspension zum Entfernen von Fettzellen und Zellverbänden durch eine Nylon-Gaze (Porengröße 200 µm) gefiltert und die Herzmuskelzellen in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nun erfolgte ein langsamer Kalzium-Aufbau, um die Zellen wieder an Kalzium zu gewöhnen: Nach erster Sedimentation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in Isolationstyrode mit 0,125 mM Kalzium resuspendiert, um sie anschließend wieder sedimentieren zu lassen. Diese Schritte wurden insgesamt drei Mal mit jeweils steigender Kalzium-Konzentration wiederholt (0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM). Nach der letzten Sedimentation wurden die Zellen in ca. 15 ml eines modifizierten M199-Nährmediums (siehe Tabelle 2.1) gegeben und waren nach Zählung in einer Neubauer Zählkammer messbereit.

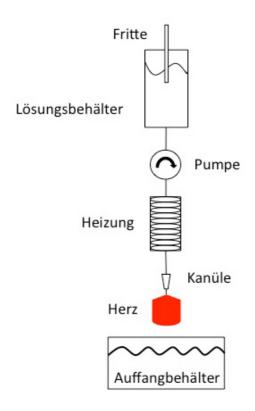


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage.

Das kanülierte Herz wird mit der in dem temperierten Lösungsbehälter und unter Begasung stehender Enzymlösung perfundiert und das Zellmaterial in einem zweiten Behälter aufgefangen. Der Fluss wird über eine Pumpe reguliert.

2.1.2 Messung von intrazellulären Ca²⁺-Transienten und der Myozytenverkürzung

Eine der verwendeten Messmethoden dieser Arbeit stellte die Epifluoreszenz-Mikroskopie dar, mithilfe derer die simultane Messung von fraktioneller Verkürzung der Sarkomerlänge der Kardiomyozyten einerseits und von intrazellulären Kalziumkonzentrationsveränderungen als Funktion der Zeit, dem sog. intrazellulären Ca²⁺-Transienten, andererseits ermöglicht wurde. Im Folgenden soll dieses Verfahren näher beschrieben werden.

2.1.2.1 Grundlagen des Epifluoreszenzverfahrens

Die Epifluoreszenz-Mikroskopie ist eine Form der Auflicht-Mikroskopie, bei der das zu untersuchende Objekt mit fluoreszierenden Farbstoffen, sogenannten Fluorochromen, beladen wird. Werden diese Farbstoffe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt (sog. Anregungslicht), so emittieren sie Licht geringerer Energie, d. h. einer größeren Wellenlänge. Diesem Verhalten liegt die strukturelle Eigenschaft vieler Fluoreszenzfarbstoffe zugrunde, aromatische Ringstrukturen mit delokalisierten Elektronen zu besitzen, die leicht mit der Umgebung wechselwirken können. Durch Absorption von Energie in Form von Photonen gelangen die Elektronen auf ein höheres Energieniveau, fallen jedoch gleich wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Die aufgenommene Energie wird hierbei wieder freigesetzt in Form von Fluoreszenzlicht (Emissionslicht). Allerdings wird nicht die gesamte aufgenommene Energie in Lichtenergie umgewandelt, so dass das emittierte Licht etwas energieärmer, d. h. langwelliger ist. Die Differenz der beiden Wellenlängen zwischen ein- und ausgehenden Photonen wird als Stokes'sche Verschiebung bezeichnet (Lakowicz 1983; Grynkiewicz et al. 1985).

2.1.2.2 Eigenschaften des Kalzium-sensitiven Farbstoffs Fluo-3 AM

In dieser Arbeit wurde der Kalzium-sensitive Farbstoff Fluo-3 AM verwendet (Firma MoBiTec, Göttingen, Deutschland) (Minta et al. 1989). Wie auch andere Kalzium-sensitive Farbstoffe (z. B. Fura-2 und Indo-1) leitet sich Fluo-3 AM von Kalzium-Chelatoren ab. Durch Bindung von Ca²⁺-Ionen und anschließender Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge kommt es zu einer Fluoreszenz, dessen Intensität um das Hundertfache gesteigert ist und eng mit der Kalziumkonzentration der Zelle korreliert. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, um Kalziumkonzentrationsverschiebungen in Herzmuskelzellen während eines Kontraktionszyklus sichtbar zu machen.

Da Fluo-3 an sich ein hydrophiler Farbstoff ist und somit die Membran der Kardiomyozyten nicht überwinden könnte, wird er in seiner Herstellung an einen Azetoxymethylester (AM) gekoppelt. In dieser lipophilen Form kann er die Zellmembran passieren. Zytosolische Esterasen spalten den Azetoxymethylester ab, so dass der nun wieder hydrophile Farbstoff die Zelle nicht verlassen kann.

Bei den Fluoreszenzfarbstoffen unterscheidet man ratiometrische von nicht-ratiometrischen Farbstoffen. Fluo-3 AM gehört zu den nicht-ratiometrischen Farbstoffen. Als solcher besitzt er feste Absorptions- und Emissionsmaxima, die sich nicht in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration verändern. Im Gegensatz zu ratiometrischen Farbstoffen wie z. B. Indo-1 AM oder Fura-2 AM lässt er also keine quantitativen Aussagen über Kalziumkonzentrationen zu. Als Vorteil bietet Fluo-3 aber ein sehr gutes Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrundrauschen und ermöglicht somit saubere Messsignale. Das

Absorptionsmaximum von Fluo-3 AM liegt bei 488 nm, das mithilfe eines geeigneten Anregungsfilters aus dem Licht einer Xenonlampe erzeugt werden kann. Sein Emissionsmaximum liegt im Wellenlängenbereich von 525 nm (siehe Abb. 2.2).

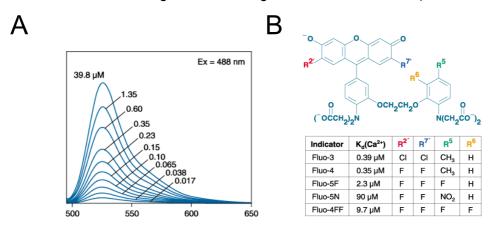


Abb. 2.2 A: Emissionspektrum von Fluo-3

X-Achse: Emissionswellenlänge in nm. Y-Achse: Intensität der Emission. Die Zahlen im Diagrammen entsprechen der freien Ca²⁺-Konzentration.

B: Strukturformel unterschiedlicher Fluo-Analoga.

(Modifiziert nach "The Molecular Probes Handbook" 2010, Abschnitt 19.3; mit freundlicher Genehmigung durch Thermo Fisher Scientific Inc.)

2.1.2.3 Das Epifluoreszenz-Setup

Das in dieser Arbeit verwendete Epifluoreszenz-Setup der Firma IonOptix (IonOptix, Milton, USA) ermöglichte die zeitgleiche Aufzeichnung und Darstellung der Längenänderung der Sarkomere einerseits und der Änderung der Kalziumkonzentration während der Myozytenverkürzungen andererseits. Im Folgenden soll die Erzeugung und Verarbeitung beider Messsignale näher beschrieben werden. Abbildung 2.3 bietet einen schematischen Überblick über das Epifluoreszenz-Setup und den Strahlengang durch das Mikroskop.

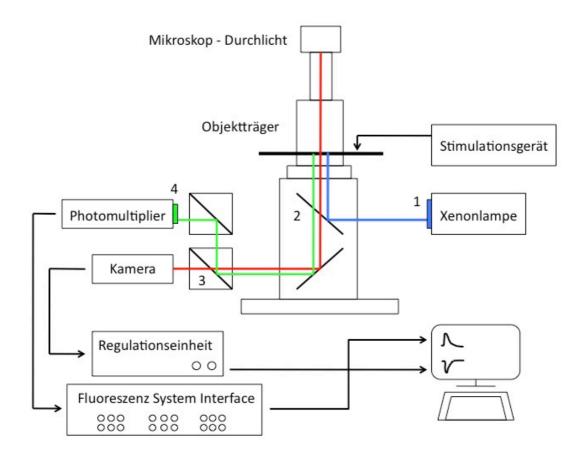


Abb. 2.3 Schema des Epifluoreszenz-Setups und des Strahlenganges im Mikroskop

Die schwarzen Pfeile deuten die Vernetzung der Geräte untereinander an. Die blaue Linie stellt das Anregungslicht und die grüne Linie das Emissionslicht dar. Die rote Linie repräsentiert das Durchlicht, welches von der Kamera aufgenommen wird.

- 1. Filter (D480 ± 15 nm); 2. Dichroitischer Spiegel (D505 DCLP); 3. Dichroitischer Spiegel (685 DCLP);
- 4. Filter (535 \pm 20 nm).

1. Messung der Ca²⁺-Transienten während der Myozytenverkürzung:

Zur maximalen Anregung des Farbstoffes Fluo-3 AM (488nm) wurde mithilfe eines Anregungsfilters (D480 ± 15 nm) aus dem Weißlicht einer Xenonlampe (Xenon Short Arc Lamp Typ UXL-75XE, Ushio Inc., Japan) ein Anregungslicht mit adäquater Wellenlänge erzeugt. Über einen dichroitischen Spiegel (505 DCLP) wurde das Anregungslicht auf das Myozytenpräparat abgelenkt, während das langwelligere emittierte Licht des Farbstoffs (~535 ± 20 nm) zusammen mit dem Durchlicht des Mikroskops (Nikon Eclipse TE 2000-U, Firma Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande) diesen Spiegel passieren konnte und über einen Seitenausgang des Mikroskops auf einen weiteren dichroitischen Spiegel (685 DCLP) weitergeleitet wurde. Dieser diente zur Trennung des Durchlichtes, das zur Bestimmung der Myozytenverkürzung in eine Kamera geleitet wurde, vom Emissionslicht des Farbstoffs, das auf einen Photomultiplier (electron tubes limited, USA) gelenkt wurde.

Entsprechend dem Emissionmaximum des Fluo-3 von 525 nm war dem Photomultiplier noch ein Filter (D 535 ± 20 nm) vorgeschaltet, um Streulicht heraus zu filtern.

Hersteller aller erwähnten Filter ist die Firma Chroma Technology Corp, Bellows Falls, USA. Das optische Ca²⁺-Fluoreszenz-Signal wurde nun im Photomultiplier in ein elektrisches transformiert, vom Fluoreszenz System Interface (Ion Optix, Milton, USA) in für den Computer lesbare Daten umgeschrieben und schließlich durch eine Software (IonWizard Version 5.0, Firma IonOptix, Milton, USA) auf dem Computerbildschirm dargestellt.

2. Messung der fraktionellen Myozytenverkürzung:

Im Sinne eines Durchlichtmikroskops wurde der Kardiomyozyt mit rotem Licht einer Wellenlänge von >650 nm durchleuchtet, welches anschließend einer Myozytenkamera (MyoCamTM, Firma IonOptix, Milton, USA) zugeleitet wurde. Durch diese wurden die Sarkomerlängen des Kardiomyozyten visualisiert und vermessen und durch das IonWizard Programm am Computer graphisch dargestellt. Mittels der Software IonWizard Analyze wurden die gemittelten Sarkomerlängen bezüglich ihrer fraktionellen Zellverkürzung sowie ihrer Relaxationskinetik ausgewertet.

2.1.3 Versuchsdurchführung

Zunächst wurden die Versuchskammern – Spezialanfertigungen aus einem Kunststoffrahmen mit dünnem Glasboden (siehe Abb. 2.4) – gründlich gereinigt, mit 2 µl des Adhäsionsproteins Laminin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zum Fixieren der Zellen beschichtet und bei Raumluft fünf Minuten getrocknet.

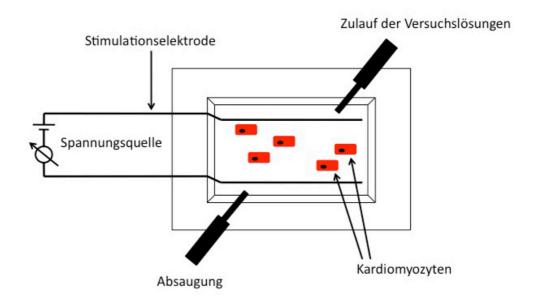


Abb. 2.4 Schematische Darstellung einer Versuchkammer

Nun wurden 200 µl der isolierten Herzmuskelzellen auf eine Versuchskammer ausplattiert. Nach ca. zehnminütiger Sedimentationszeit wurden der nicht fixierte Zellüberstand abpipettiert und anschließend die fixierten Zellen mit 200 µl des Fluo-3 AM - Farbstoffs (siehe Tabelle 2.2) lichtgeschützt im Inkubationsschrank (37°C bei 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit) für 15 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Versuchskammer in die Halterung des Mikroskops gelegt, der Zulauf der Versuchslösungen und die Absaugung an den vorgesehenen Öffnungen angebracht und die Stimulationselektroden am Versuchskammerrahmen befestigt. Über einen Temperaturfühler einer externen Heizung am Zulauf wurde eine Versuchskammertemperatur von $35 \pm 2^{\circ}$ C eingestellt.

Nach dem Einsetzen der Versuchskammer in das Mikroskop konnte mit der Stimulation (Myopacer, Firma IonOptix, Milton, USA) begonnen werden. Die Spannung betrug hierbei ca. 20 – 25 mV, was einem Wert von etwa 25% über der Reizschwelle entsprach. Da die Herzmuskelzellen von Ratten auf eine Stimulationsfrequenz von 1 Hz mit starken Schwankungen in der Myozytenverkürzung reagierten (siehe Abb. 2.5), wurde mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert, bei der diese Schwankungen nicht auftraten. Nur bei den Messungen der koffeininduzierten Ca²⁺-Transienten (siehe unten) wurde zur besseren Handhabung eine Stimulationsfrequenz von 1 Hz gewählt.

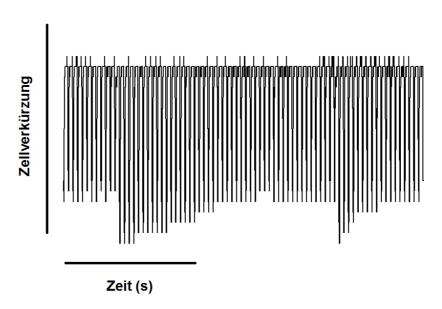


Abb. 2.5 Originalregistrierung der Zellverkürzung einer Kardiomyozyte bei Stimulation mit 1 Hz Es zeigen sich starke Schwankungen in der Myozytenverkürzung.

Zur Elimination überschüssigen Farbstoffs und störenden Zelldetritus wurden die Zellen zunächst fünf Minuten lang mit Normaltyrode (siehe Tabelle 2.3) bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 40 ml/h gespült. Währenddessen wurde eine geeignete Zelle aus der Versuchskammer ausgewählt und in dem Messfenster in Position gebracht. Als Auswahlkriterien galten eine gut sichtbare Querstreifung, eine fraktionelle Zellverkürzung von

mindestens 1,5 % und das Fehlen von Hinweisen auf beginnenden Zelltod, wie z. B. intrazellulären Verklumpungen.

2.1.4 Messprotokoll

Nachdem ein sogenanntes *steady state* der Zellverkürzung während des Spülens mit der Normaltyrode erreicht wurde, d. h. nachdem sich die Amplitude der Zellverkürzung nicht mehr änderte, wurde kurzzeitig der Fluoreszenzfilter zur Messung der Ca²⁺-Transienten eingedreht, um das Anregungslicht auf die Zellen zu lenken. Die Messung der Ca²⁺-Transienten erstreckte sich nicht über den gesamten Zeitraum einer Messung, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern. Anschließend sollte das Verhalten der Zelle auf den zu untersuchenden Stoff bei steigender Konzentration (0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M) beobachtet werden (siehe Tabelle 2.4). Hierzu wurden die Zellen im ersten Schritt mit 0,1 μ M- Stofflösung bis zum Erreichen des *steady states*, mindestens aber für 5 Minuten, superfundiert und abschließend wieder die Fluoreszenz kurzzeitig gemessen.

Mit den 1 μ M- und 10 μ M- Stofftyroden wurde ebenso verfahren. Da alle in dieser Arbeit zu untersuchenden Stoffe in DMSO gelöst waren, wurde der Normaltyrodenlösung der Kontrollzellen entsprechend 0,1 μ M, 1 μ M bzw. 10 μ M DMSO hinzugefügt.

Stoffe, die in dieser Versuchsreihe Hinweise auf eine Beschleunigung der Relaxation oder einen positiv inotropen Effekt ergaben, wurden in folgenden Experimenten näher untersucht. In diesen Experimenten wurde bei den oben als interessant herausgefilterten Stoffen zur Bestimmung des Kalziumgehaltes des sarkoplasmatischen Retikulums Messungen der koffeininduzierten Ca²⁺-Transienten durchgeführt. Zur Messung des SR Ca²⁺-Gehaltes mittels koffeininduzierter Ca²⁺-Transienten wurde nach Erreichen des *steady states* bei 1 Hz die elektrische Stimulation unterbrochen und eine Sekunde nach dem letzten Stimulationsimpuls mithilfe einer kleinen Injektionsnadel ein Tropfen koffeinhaltiger Tyrode (10 mM, siehe Tabelle 2.4) direkt auf die Zelle gegeben. Koffein bewirkt eine Öffnung der Ca²⁺-Freisetzungskanäle des SR (RyR) und damit eine Entleerung des gesamten Kalziums ins Zytosol. Somit stellt die Amplitude des Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten einen geeigneten Indikator für den SR Ca²⁺-Gehalt dar (BERS 2001).

2.1.5 Datenauswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten wurde mithilfe einer speziellen Software (Ion Wizard Analyze Version 5.0, Firma IonOptix, Milton, USA) ermöglicht. Die hiermit erstellten Rohdaten wurden in das Programm Microsoft Excel (Microsoft Office Version 2003, Microsoft Corporation, Redmond, USA) eingefügt und weiter ausgewertet. Aus den ausgewerteten Daten wurden anschließend Abbildungen mithilfe des Programms SigmaPlot Version 8.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) angefertigt.

2.1.5.1 Fraktionelle Zellverkürzung und Ca²⁺- Transienten F/F₀

Die fraktionelle Zellverkürzung errechnete sich als Verkürzung der Zelle in Prozent der Ausgangszelllänge:

Fraktionelle Zellverkürzung in % der Ruhezelllänge =

<u>Diastolische Sarkomerlänge – Systolische Sarkomerlänge x100</u>

Diastolische Sarkomerlänge

Formel 2.1 Berechnung der fraktionellen Zellverkürzung

Da es sich bei dem Farbstoff Fluo-3 AM um einen nicht-ratiometrischen Farbstoff handelte und somit die Fluoreszenzintensität von der Farbstoff- und Kalziumkonzentration abhing, konnte die absolute Kalziumkonzentration nur indirekt berechnet werden. Die Amplitude der Ca^{2^+} -Transienten F/F $_0$ ergab sich aus dem Quotienten der maximalen Fluoreszenzintensität während der Systole (F_{Peak}) und der Fluoreszenz der relaxierten Zelle während der Diastole ($F_{Baseline}$). Von beiden Werten musste jeweils noch die Hintergrundfluoreszenz, die in unmittelbarer Umgebung der Zelle gemessen worden war, abgezogen werden. Somit ergab sich folgende Formel für F/F $_0$:

$$F/F_0 = \frac{F_{Baseline} - F_{Hintergrund}}{F_{Peak} - F_{Hintergrund}}$$

Formel 2.2 Berechnung der Amplitude der Ca²⁺- Transienten F/F₀

2.1.5.2 Relaxationszeit

Die Relaxationszeit kann als Maß für die Funktion der SERCA2a herangezogen werden, da diese bei der Ratte für die Ausschleusung von etwa 90% des Kalziums aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum verantwortlich ist. Der NCX befördert die restlichen 10% des Kalziums aus der Zelle. In dieser Arbeit wurde diejenige Relaxationszeit bestimmt, die der Kardiomyozyt benötigt, um nach Kontraktion auf 50% der Ausgangszelllänge (RZ $_{50}$) zu relaxieren. Zur Beurteilung der Geschwindigkeit der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme wurde der Abfallsexponent τ herangezogen. τ entspricht dem Krümmungsgrad der in Abb. 2.6 dargestellten Exponentialfunktion und gibt somit die Geschwindigkeit der Ca $^{2+}$ -Transienten-Abnahme an. Ein großer Wert für τ ergibt einen flachen Abfall der Exponentialfunktion, d. h. er beschreibt in diesem Fall eine langsame zytosolische Kalziumelimination bzw. eine geringe SERCA2a-Aktivität. Andersherum beschreibt ein kleiner τ -Wert einen schnellen Abfall der Exponentialfunktion bzw. eine schnelle zytosolische Kalziumelimination und hohe SERCA2a-Aktivität.

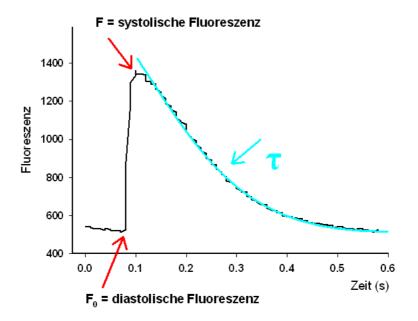


Abb. 2.6 Exemplarischer Kalziumtransient

Der Abfallsexponent τ entspricht dem Krümmungsgrad der türkis dargestellten Exponentialfunktion und beschreibt somit die Geschwindigkeit der Ca²⁺-Transienten -Abnahme

2.1.5.3 Bestimmung des SR Ca²⁺-Gehaltes und der fraktionellen SR Ca²⁺-Freisetzung

Wie oben beschrieben, wird der SR Ca²⁺-Gehalt mithilfe der Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten bestimmt. Die Transienten nach der Koffein-Applikation werden direkt mit denen in der Grundstimulation ins Verhältnis gesetzt.

2.2 Muskelstreifenexperimente

2.2.1 Gewinnung der humanen Muskelstreifen

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Muskelstreifenexperimente ausschließlich humane Muskelstreifen aus explantierten, terminal insuffizienten Herzen verwendet. Die Herzen stammten von Transplantationspatienten der Klinik für Thorax- und Kardiovaskularchirurgie des Herz- und Diabeteszentrums in Bad Oeynhausen (siehe Tab. 2.6 und Tab. 2.7). Alle in dieser Arbeit durchgeführten Muskelstreifenexperimente wurden von der lokalen Ethikkommission (Ifd. Antragsnummer 31/9/00) genehmigt.

Zur Präparation wurde das Herz in eine 2,3-Butandion-Monoxim (BDM)-haltige Lösung (siehe Präparierlösung, Tabelle 2.5) überführt (Mulieri et al. 1989). Indem es die Bindungsstelle für Kalzium am Troponin C und die Kalziumkanäle blockiert, unterbindet BDM die elektromechanische Kopplung und trägt somit zur Reduktion des Energieverbrauchs bei. Um den pH-Wert der BDM-Lösung zu regulieren und um das Herz mit ausreichend Sauerstoff zu

versorgen, wurde die Lösung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Carbogen bildet mit Hydrogencarbonat ein offenes Puffersystem.

Im folgenden Schritt wurden mithilfe einer kleinen Pinzette, einer Federschere und einem Binokular Trabekel aus dem rechten Ventrikel freipräpariert. Hierbei war darauf zu achten, dass die Trabekel möglichst schonend ohne Berührung und Dehnung behandelt wurden, um eine Schädigung der Muskelfasern zu verhindern. Außerdem sollten die Streifen möglichst eine rosige Farbe aufweisen und zur besseren Vergleichbarkeit folgende Dimensionen erfüllen, die mittels einer in das Mikroskop intregrierten Skala abgelesen werden konnten: Breite und Tiefe 0,25-1,3 mm; Länge 1,5-4 mm.

Zunächst wurden die Trabekel an beiden Seiten großzügig aus der Wand herausgeschnitten. Anschließend wurde das eine Ende des Trabekels zu einem kleinen rechteckigen Block geschnitten. Dieser sollte später zur Aufhängung in der Drahtöse dienen. Am anderen Ende wurde eine kleine Verlängerung in Form eines Stecknadelkopfes stehen gelassen, die zum Aufspießen auf den Haken genutzt wurde. Auf diese Weise wurde eine direkte Schädigung des Trabekels verhindert.

2.2.2 Aufbau der Versuchsanlage

Die Versuchsanlage der Muskelstreifenexperimente ermöglichte eine direkte Messung systolischer und diastolischer Kraft von Muskelzellverbänden und die Beobachtung von Auswirkungen verschiedener Versuchslösungen. Einen Überblick über den Aufbau der Versuchsanlage bietet Abbildung 2.7.

Die Anlage für isolierte Muskelstreifen, die einen geschlossenen Flüssigkeitskreislauf darstellte, bestand aus einem Organbad mit elektrischem Stimulator, einer Pumpe, einem Lösungsbehälter und einem System zur Temperaturregulation.

Das Organbad, eine aus Kunststoff hergestellte längliche Wanne, war über einen Zu- und einen Ablauf an den Flüssigkeitskreislauf angeschlossen. Zur Aufhängung des Muskelstreifens wurde auf der einen Seite ein gebogener Haken aus einem Insekten-Pin, der an einer Mikrometerschraube befestigt war, und auf der anderen Seite eine aus Platindraht gebogene Öse, die an einem Kraftabnehmer (Typ KG3, Firma Scientific Instruments, Heidelberg) fixiert war, genutzt. Beide Aufhängungseinrichtungen ragten so weit in das Becken des Organbades hinein, dass der Muskelstreifen vollständig von Flüssigkeit umgeben war.

Die Stimulation der Muskelstreifen erfolgte über zwei längs der Wanne eingelassene Platindrähte, die mit einem Stimulator (Scientific Instruments, Heidelberg) verbunden waren. Dieser generierte einen bipolaren elektrischen Rechteckimpuls, der in Frequenz, Spannung und Dauer variiert werden konnte.

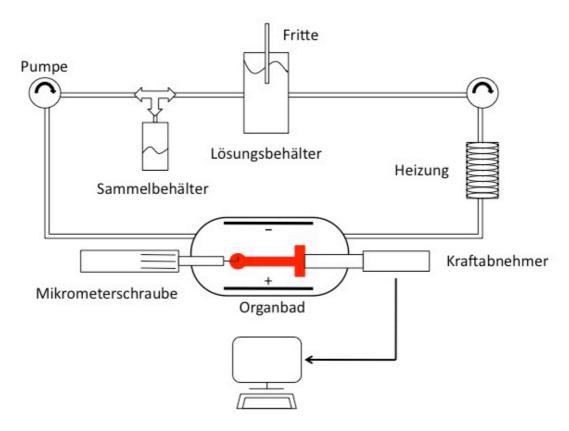


Abb 2.7 Aufbau der Versuchsanlage

2.2.2.1 Zirkulation der Lösung

Lösungsbehälter, Organbad und Verbindungsschläuche bildeten gemeinsam einen geschlossenen Kreislauf. Über zwei zwischengeschaltete Pumpen (Reglo, Firma Ismatec, Wertheim-Mondfeld), eine vor und eine hinter dem Organbad, wurde ein kontinuierlicher Fluss gewährleistet, wobei die Pumpkapazitäten manuell so eingestellt wurden, dass der Abfluss vom Organbad stets schneller war (8-11 ml/min) als der Zufluss (4-6 ml/min).

Als Lösungsbehälter diente ein etwa 150 ml fassender, doppelwandiger Behälter aus Glas, in dem sich eine Fritte (Porosität I, Firma Schott) zur Carbogen-Begasung der Versuchslösung befand. Über eine Heizung wurde eine konstante, physiologische Temperatur von 37°C im Organbecken erzeugt. Sowohl die Doppelwand des Lösungsgefäßes als auch ein die Schläuche umgebender Mantel wurden mit dem Heizungswasser perfundiert, so dass die Wärme auf die Lösung übertragen werden konnte.

2.2.2.2 Kraftabnehmer

Über den Kraftabnehmer erfolgte die Übertragung der Muskelspannung, indem er die durch Muskelkontraktionen ausgelösten Auslenkungen in elektrische Spannungssignale transformierte. Über einen Brückenverstärker (Scientific Instruments, Heidelberg) wurden diese Spannungssignale amplifiziert und über einen analog/digitalen Wandler (Typ: PCI

3 Ergebnisse

1200, Firma National Instruments, Austin/USA) an den Computer weitergeleitet. Für eine getrennte Zuordnung und Aufzeichnung einzelner Muskelkontraktionen gab der Stimulator außerdem fünf Millisekunden vor jeder Muskelstimulation einen Triggerimpuls über den A/D-Wandler an den Computer ab.

2.2.2.3 Reinigung der Anlage

Die Versuchsanlage wurde jeweils vor und nach jedem Versuch mit mindestens 100 ml Aqua dest. und alle zwei bis drei Tage mit 30%iger Essigsäure gespült.

2.2.2.4 Datenverarbeitung

Mithilfe der drei Programme "Collect", "Chart" und "Analyse" der Software LabView (Firma National Instruments, Austin/USA) wurde die Erstellung, Speicherung und Bearbeitung der Daten ermöglicht. Alle drei Programme wurden von P. Janssen entwickelt.

Das Programm "Collect" diente zur Aufzeichnung und Beobachtung der Messwerte, wobei es ab dem Triggersignal des Stimulators für eine einzelne Kontraktion ("Twitch") jeweils 900 Datenpunkte pro Sekunde aufzeichnete.

Die Speicherung der Daten erfolgte einerseits in eine Chart-Datei und andererseits in eine Average-Datei. Die Chart-Datei enthielt den gesamten Versuchsablauf, d. h. eine kontinuierliche Kurve zwischen registrierten Minimalwerten (diastolischen Werten, Ruhespannung) und Maximalwerten (systolischen Werten) der entwickelten Kraft. Um eine genaue Analyse der Messwerte vornehmen zu können, wurden außerdem zu bestimmten Zeitpunkten des Messprotokolls Average-Dateien angelegt, in die jeweils fünf Kontraktionen gemittelt abgespeichert wurden. Zur späteren Identifikation bei der Auswertung wurden diese während der Messung mit verschiedenen Kommentaren versehen.

Bei der Speicherung der Average-Dateien wurden folgende Parameter automatisch erfasst: systolische Kraft (F_{sys} in mN/mm³), diastolische Spannung (F_{dia}), Zeit bis zum Kraftmaximum (TTP), maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, normalisiert auf die systolische Kraft, und die Zeit bis zur 50%igen (RT_{50}) und 90%igen Relaxation (RT_{90}).

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Experimente wurden die systolische und die diastolische Kraft auf die Querschnittsfläche des Muskelstreifens normiert, die gemäß folgender Formel berechnet wurde:

 $Q=D_1/2 \times D_2/2 \times \pi$

Formel 2.3 Berechnung der Querschnittsfläche eines Muskelstreifens

D₁ und D₂: Durchmesser des Muskels

Die beiden Analyseprogramme "Chart" und "Analyse" dienten zur weiteren Bearbeitung der erhobenen Daten, so dass diese schließlich in einem entsprechenden Dateiformat in eine Tabellenkalkulation von Microsoft Excel überführt werden konnten.

2.2.3 Versuchsdurchführung

2.2.3.1 Einspannen der Muskelstreifen

Vor dem Einspannen des präparierten Muskelstreifens musste die Versuchsanlage zunächst mit 100 ml destilliertem Wasser gespült werden. Anschließend wurden 150 ml einer sogenannten Krebs-Henseleit-Lösung (KH-Lösung, siehe Tabelle 2.5) - einer Lösung, die in ihrer Elektrolytzusammensetzung annähernd der des Blutes entsprach - in den beheizten Lösungsbehälter gefüllt und zur pH-Regulation mit Carbogen begast. Danach wurde kurzzeitig die Umwälzpumpe eingeschaltet, bis sich das Organbad mit der KH-Lösung füllte. Anschließend wurde diese wieder entfernt und der Muskelstreifen mithilfe einer Plastikpipette mit wenigen Millilitern BDM-Lösung in das Becken befördert. Das Einspannen des Streifens erfolgte unter mikroskopischer Sicht mittels zweier Splitterpinzetten. Zunächst wurde das Kopf-Ende vorsichtig durch die Drahtöse gezogen, so dass der rechteckige Block in der Öse zum Liegen kam. Danach konnte das andere Ende auf den Haken aufgespießt werden. Hierbei war darauf zu achten, dass der Muskelstreifen schlaff und mit seiner Längsachse möglichst gerade, d. h. in Verlängerung des Kraftaufnehmers, in dem Bad eingehängt wurde.

2.2.3.2 Ausspülen, Stimulation, Kalziumaufbau und Einschlagen

Nach dem Einspannen wurde durch Öffnen des Kreislaufsystems die im Organbad befindliche BDM-Lösung mit 50 ml KH-Lösung ausgepült, im Sammelbehälter aufgefangen und verworfen. Währenddessen wurde das Programm LabView geöffnet und die Dimensionen des Muskelstreifens (Länge, Breite und Tiefe) eingegeben. Das Programm errechnete hieraus automatisch die auf den Muskelquerschnitt bezogenen Kräfte.

Nach Anschalten der biphasischen Stimulation (5 Volt) erfolgte der Kalziumaufbau. Über einen Zeitraum von 12 Minuten wurde die Ausgangskonzentration von 0,25 mM der KH-Lösung alle 2 Minuten um 0,25 mM auf eine Endkonzentration von 2,0 mM gesteigert. Die langsame Steigerung des Kalziumgehaltes diente der Verhinderung einer Kontraktur des Muskelstreifens. Um sich von eventuellen Schädigungen während der Präparation regenerieren zu können, wurde der Muskelstreifen anschließend für etwa 30 Minuten im nicht gedehnten Zustand stimuliert.

2.2.3.3 Dehnung des Muskelstreifens

Nach dem dreißigminütigen Einschlagen erfolgte die Dehnung des Muskelstreifens mithilfe der Mikrometerschraube. Durch die Dehnung gewann der Streifen gemäß des Frank-Starling-Mechanismus schrittweise an Kraft. Der Muskelstreifen wurde so lange gedehnt, bis diejenige Länge mit der maximalen Kraftentwicklung (L_{max}) erreicht wurde. Da sich durch die Dehnung die Dimensionen des Muskelstreifens änderten, wurden diese erneut ausgemessen und im Programm eingegeben. Nach Erreichen einer konstanten Kraft, d. h. nach Erreichen des *steady states*, erfolgte die erste Speicherung der Werte in eine Average-Datei.

2.2.4 Messprotokoll

Nach Erreichen des *steady states* sollte der Effekt des zu untersuchenden SERCA2a-Modulators auf die Kontraktilität bei steigender Konzentration (0,1 μM, 1 μM und 10 μM) beobachtet werden (siehe Tabelle 2.5). Hierzu wurden jeweils entsprechende Mengen des gelösten Stoffes in den Lösungsbehälter pipettiert und jeweils bis zum erneuten *steady state*, mindestens aber für den Zeitraum von 15 Minuten, gewartet. Abschließend erfolgte nach jedem der drei Schritte eine Speicherung der Werte in die Average-Datei.

2.3 Statistik

In den erstellten Abbildungen des Ergebnisteils werden die Mittelwerte der erhobenen Daten dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.), der folgendermaßen berechnet wird:

$$S.E.M = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Formel 2.4 Berechnung des Standardfehlers des Mittelwertes (S.E.M.)

n: Anzahl; σ: Standardabweichung; σ²: Varianz

Mithilfe des Statistikprogramms SigmaStat 2.03 (Access Softec Inc., San Rafael, USA) wurden zur Prüfung auf Signifikanz der Daten Student's T-tests, je nach Bedarf gepaart oder ungepaart, und für wiederholte Messungen zur Analyse von Longitudinaldaten mehrerer Gruppen Zwei-Wege-Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p<0,05 festgelegt.

2.4 Lösungen und Chemikalien

Zu 2.1.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Tab. 2.1 Lösungen zur Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Isolationstyrode	NaCl (Merck,Darmstadt,Deutschland) KCl (Merck) MgSO ₄ · 7 H ₂ O (Merck) Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (Merck) HEPES (Sigma-Aldrich,St.Louis,USA) Glukose (Merck)	137 mM 5,4 mM 1,2 mM 1,2 mM 20 mM 15 mM	gelöst in ddH ₂ O ; pH bei RT mit NaOH auf 7,55 titrieren
Ca ²⁺ -freie Isolationstyrode	100-fach Penicillin/ Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	8,3 ml/l	gelöst in 1 Liter Isolationstyrode
Enzymlösung	Kollagenase II (Biochrom AG) Protease XIV (Sigma-Aldrich) CaCl ₂ (Sigma-Aldrich)	230 U/ml 0,5 U/ml 0,1 mM	gelöst in 1 Liter Isolationstyrode
Modifiziertes M199- Nährmedium	M199 Medium (Sigma-Aldrich) Taurin (Sigma-Aldrich) D,L- Carnitin (Sigma-Aldrich) Kreatin (Sigma-Aldrich) 100-fach Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG) 100-fach L-Glutamin (Biochrom AG)	500 ml 312,5 mg 500 mg 327,5 mg 5,0 ml	steril filtriert und bei 4°C gelagert

Zu 2.1.3 Versuchsdurchführung

Tab 2.2 Herstellung der Fluo 3 AM – Farbstofflösung

Lösung	Substanz	Menge	
Pluronic- Lösung	Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich)	20 % w/v	gelöst in DMSO
Fluo 3 AM – Vorratslösung (1 mM)	Fluo 3 AM (MoBiTec, Göttingen) DMSO (Sigma-Aldrich)	1 mg 885µl	Lagerung bei -20°C
Fluo 3 AM – Farbstofflösung (10 µM)	Fluo 3 AM – Vorratslösung Pluronic- Lösung Normaltyrode mit 2 mM Ca ²⁺	50 μl 5 μl 5 ml	Lichtgeschützte Lagerung bei -20°C

Tab 2.3 Zusammensetzung der Normaltyrode

Lösung	Substanz	Menge	
Normaltyrode	NaCl (Merck) KCl (Merck) MgCl ₂ (Merck) HEPES (Sigma-Aldrich) Glukose (Merck) CaCl ₂ (Sigma-Aldrich)	140 mM 4 mM 1 mM 5 mM 10 mM 2 mM	gelöst in ddH ₂ O; pH bei 37°C mit NaOH auf 7,4 titrieren

Zu 2.1.4 Messprotokoll

Tab 2.4 Herstellung der Messtyroden

Lösung	Substanz	Menge	
Stoff-Vorratslösung I	SERCA2a-Modulator	0,1 M	gelöst in DMSO
Stoff-Vorratslösung II (aufgrund von Nichtlöslichkeit der Stoffe GPZ000876 und GPZ001441 in DMSO)	Stofflösung I der SERCA2a- Modulatoren GPZ000876 bzw. GPZ001441	0,01 M	gelöst in ddH₂O
Stoff-Tyrode	Stoffvorratslösung I bzw. II	0,1 μM bzw. 1 μM bzw. 10 μM	gelöst in Normaltyrode
Kontrolltyrode	DMSO (Sigma-Aldrich)	0,1 μM bzw. 1 μM bzw. 10 μM	gelöst in Normaltyrode
Koffeinhaltige Tyrode	Koffein (Sigma-Aldrich)	10 mM	gelöst in Normaltyrode

Zu 2.2 Muskelstreifenexperimente

Tab. 2.5 Zusammensetzung von Krebs-Henseleit- und Präparierlösung für Muskelstreifenexperimente

Lösung	Substanz	Menge	
Krebs-Henseleit- Lösung	NaCl (Merck) KCl (Merck) MgCl ₂ · 6 H ₂ O (Merck) Na ₂ SO ₄ (Merck) NaH ₂ PO ₄ · 1 H ₂ O (Merck) Glukose (Merck)	116,1 mM 5,0 mM 1,2 mM 1,2 mM 2,0 mM	gelöst in ddH₂O
Präparierlösung	NaHCO ₃ (Merck) CaCl ₂ (Sigma-Aldrich) BDM (C ₄ H ₇ NO ₂)	20 mM 0,25 mM 20 mM	gelöst in Krebs- Henseleit-Lösung
Stoff-Vorratslösung I bzw. II (siehe Tabelle 2.4)		0,1 μM bzw. 1 μM bzw. 10 μM	gelöst in Krebs- Henseleit-Lösung

Tab. 2.6 Herztransplantationspatienten (DCM = Dilatative Kardiomyopathie; ICM = Ischämische Kardiomyopathie; LVAD = Linksventrikuläres Unterstützungssystem; EF = Ejektionsfraktion)

Patient	Geschlecht	Alter	Ätiologie	LVAD	EF (%)
1	m	53	ICM	+	14
2	m	69	ICM	-	35
3	m	63	ICM	+	20
4	w	50	ICM	-	25
5	m	51	DCM	+	20
6	w	35	Pulmonalatresie	-	27
7	m	58	DCM	+	10
8	m	69	DCM	+	13
9	w	57	DCM	+	29
10	m	66	DCM	+	10
11	m	47	ICM	+	22
12	m	56	ICM	+	15
13	m	47	ICM	-	15
14	m	42	DCM	-	18
15	m	56	DCM	+	20
16	m	60	ICM	-	31

Tab. 2.7 Medikation der Herztransplantationspatienten

Patient	Katechol -amine	Digitalis	β- Blocker	ACE- Inhibitor	Diuretika	Nitrate	Antiar- rythmika
1	-	-	+	+	+	-	-
2	-	-	+	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	-	-	+	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	-	+
6	+	+	+	-	+	-	+
7	-	-	+	+	+	-	+
8	-	-	+	-	+	-	-
9	-	-	-	-	+	-	-
10	-	-	+	+	+	-	-
11	-	-	+	+	+	-	+
12	-	-	+	+	+	-	+
13	+	-	+	-	+	-	-
14	-	+	+	+	+	+	+
15	-	-	+	+	+	-	-
16	-	-	+	+	+	-	+

3 Ergebnisse

3.1 Screening der SERCA2a-Modulatoren an Einzelzellen

Für das Screening am Epifluoreszenz-Mikroskop wurden folgende Konzentrationen der in Tyrode gelösten SERCA2a-Modulatoren untersucht: 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M. Die Relaxationszeit der Zelle (RT₅₀) bzw. die Geschwindigkeit der Kalziumelimination aus dem Zytosol (τ _{Ca}) wurde als Maß für die SERCA2a-Aktivität herangezogen.

3.1.1 ENF018

Die konzentrationsabhängige Untersuchung des SERCA2a-Modulators ENF018 ergab, dass bei der fraktionellen Zellverkürzung im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen vorliegen. Sowohl bei ENF018 als auch bei der Kontrolle nimmt die Kontraktilität der Zellen, normalisiert auf die durchschnittliche Kontraktilität unter Ausgangsbedingungen mit Normaltyrode (NT), über den Zeitraum des Versuches kontinuierlich ab. Tendenziell ist bei 1 μ M eine verringerte Zellverkürzung gegenüber der Kontrolle zu beobachten.

Die Amplituden der Ca^{2+} -Transienten nehmen mit steigender Konzentration zunehmend und im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ab. Bei 10 μ M des SERCA2a-Modulators ENF018 beträgt die Ca^{2+} -Amplitude F/F₀ in Prozent des Ausgangswertes bei Normaltyrode 56,4% \pm 6,3% während sie bei der Kontrolle 82,2% \pm 6,4% beträgt. Damit ist die Ca^{2+} -Amplitude bei 10 μ M im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (p=0,02).

Die statistische Untersuchung des Relaxationsverhaltens von ENF018 ergibt im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede. In beiden Gruppen bleibt die RT $_{50}$ bei allen Konzentrationen in etwa konstant. Sehr ähnlich verhält sich der Abfall der Ca $^{2+}$ -Transienten. Auch hier sind kaum Unterschiede zwischen den Abfallsexponenten τ von ENF018 und der Kontrolle feststellbar (Abb. 3.1).

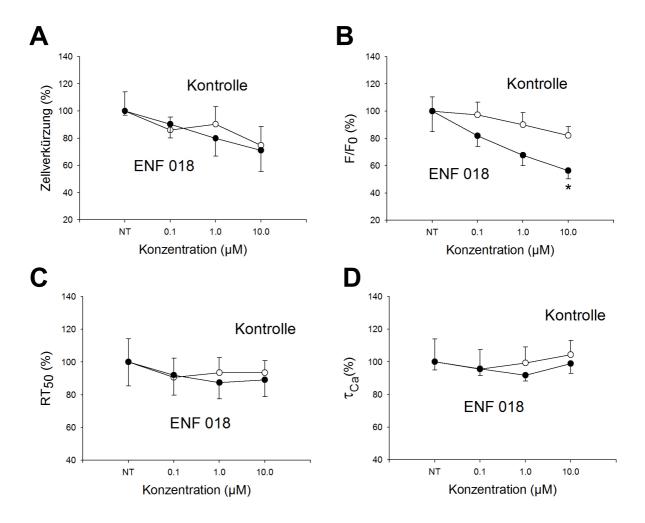


Abb. 3.1 Screeningergebnisse von ENF018 (n=6) vs. Kontrolle (n=6)

^{*} Signifikanz mit p=0,02 zwischen ENF018 und Kontrolle

3.1.2 ENG020

Wie Abb. 3.2 zeigt, ist bereits in den Originalregistrierungen bei steigender Konzentration des SERCA2a-Modulators ENG020 eine zunehmend beeinträchtigte Kontraktilität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

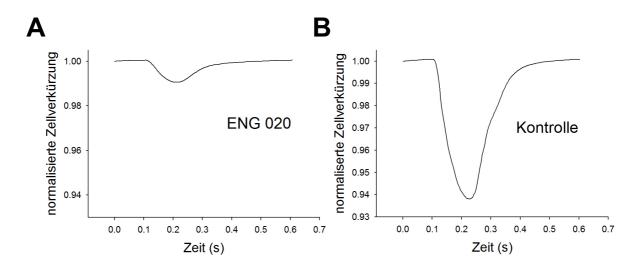


Abb. 3.2 Exemplarische Originalregistrierung der normalsierten Zellverkürzung einer ENG020- Zelle (**A**) und einer Kontroll-Zelle (**B**) unter Stimulation von 2 Hz

Während die Zellverkürzung bei den Konzentrationen 0,1 μ M und 1 μ M im Vergleich zur Kontrollgruppe nur leicht abnimmt (p=n.s.), ist sie bei der höchsten Konzentration von 10 μ M im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert (p=0,02).

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Amplituden F/F_0 der Ca^{2+} -Transienten: Der konzentrationsabhängige Vergleich der Ca^{2+} -Amplituden zeigt signifikant reduzierte Amplituden bei höchster und mittlerer Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (10 μ M: p=0,001; 1 μ M: p=0,02).

In dem Relaxationsverhalten der Zellen sind beim Vergleich der RT₅₀ keine signifikanten Unterschiede zwischen der ENG020– und der Kontrollgruppe feststellbar. Tendenziell ist eine geringe Beschleunigung der Relaxation bei 1 μ M ENG 020 im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (p=n.s.). Auch in der Betrachtung der Abfallsexponenten τ der Ca²⁺- Amplituden ergeben sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. In der Tendenz ist die Kalziumelimination aus dem Zytosol bei mittlerer und höchster Konzentration im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt (Abb. 3.3).

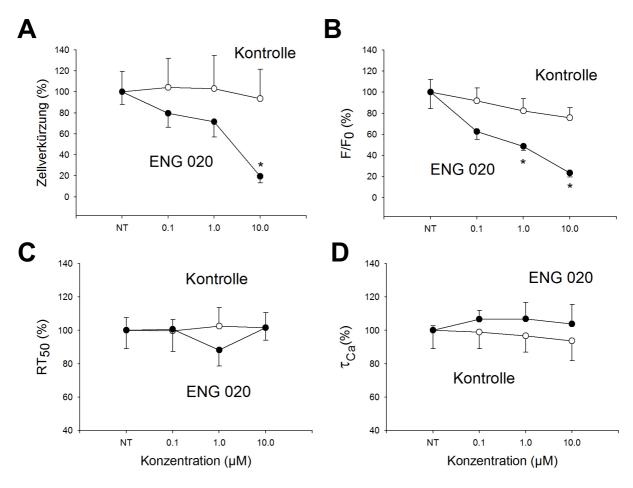


Abb. 3.3 Screeningergebnisse von ENG020 (n=6) vs. Kontrolle (n=7)

A: Relative Zellverkürzung in Prozent der durchschnittlichen Zellverkürzung unter NT; **B**: Relative Ca²⁺-Transienten in Prozent des durchschnittlichen Ca²⁺-Transienten unter NT; **C**: Relative Relaxationszeit in Prozent der durchschnittlichen Relaxationszeit unter NT; **D**: Relativer Abfallsexponent in Prozent des durchschnittlichen Abfallsexponenten unter NT;

3.1.3 ENH036

Während die fraktionelle Zellverkürzung bei niedrigster Konzentration des SERCA2a-Modulators ENH036 (0,1 μ M) noch nahezu unbeeinflusst bleibt, sinkt sie bei höchster Konzentration (10 μ M) auf 0,5% \pm 0,3% des Ausgangswertes bei Normaltyrode ab. Dieser eindeutig negativ inotrope Effekt bei 10 μ M ist bereits in den Originalregistrierungen zu sehen, in denen die Zellverkürzung bei den meisten Zellen auf nahezu Null sinkt. Somit zeigt der statistische Vergleich von ENH036 und Kontrolle eine signifikant reduzierte Kontraktilität (p=0,001) bei 10 μ M (Abb. 3.4 A).

Der negativ inotrope Effekt spiegelt sich auch in den Ca^{2+} -Transienten wider, mit im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzierter Amplitude bei 10 μ M (p=0,001).

Auch bei der Betrachtung der Relaxationszeit ergibt sich ein entsprechendes Bild: Bei 10 μ M ENH036 ist die RT₅₀ im Vergleich zur Kontrolle signifikant verlängert (p=0,001). In den

^{*} Signifikanz mit p≤0,02 zwischen ENG 020 und Kontrolle

meisten Fällen war diese sogar durch die enorm kleine Zellverkürzung bei 10 μ M nicht mehr messbar. Die Abfallsexponenten τ der Ca²+-Amplituden unterscheiden sich bei allen Konzentrationen kaum von der der Kontrollgruppe (p=n.s.). Tendenziell ist auch hier die zytosolische Kalziumelimination bei 10 μ M im Vergleich zur Kontrolle leicht verlangsamt. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse also eher für eine verminderte SERCA2a-Aktivität durch ENH036 bei 10 μ M (Abb.3.4)

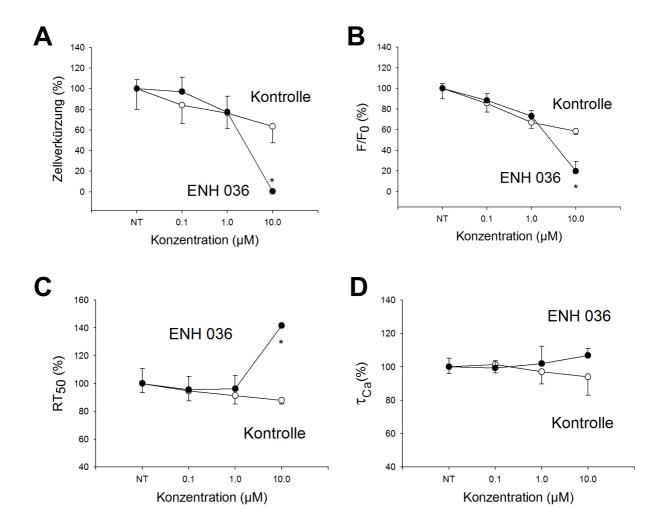


Abb. 3.4 Screeningergebnisse von ENH036 (n=7) vs. Kontrolle (n=6)

A: Relative Zellverkürzung in Prozent der durchschnittlichen Zellverkürzung unter NT; **B**: Relative Ca^{2+} -Transienten in Prozent des durchschnittlichen Ca^{2+} -Transienten unter NT; **C**: Relative Relaxationszeit in Prozent der durchschnittlichen Relaxationszeit unter NT; bei 10 μM ENH036 minimiert sich die Anzahl der berechenbaren Relaxationszeiten auf n=2, da der Großteil der Zellen bei 10 μM nicht mehr kontrahiert; **D**: Relativer Abfallsexponent in Prozent des durchschnittlichen Abfallsexponenten unter NT; bei 10 μM ENH036 minimiert sich die Anzahl der berechenbaren Abfallsexponenten auf n=3;

^{*} Signifikanz mit p=0,001 zwischen ENH036 und Kontrolle

3.1.4 ENL055

Bei 0,1 µM des SERCA2a-Modulators ENL055 ist im Vergleich zum Ausgangswert und zur Kontrolle eine tendenzielle Zunahme der fraktionellen Zellverkürzung zu sehen, die im Vergleich zur Kontrolle aber nicht signifikant ist. Bei den darauf folgenden Konzentrationen nimmt die Kontraktilität bei ENL055 wie bei der Kontrolle kontinuierlich ab.

Die Amplitude der Ca²⁺-Transienten wird von dem SERCA2a-Modulator ENL055 kaum bis gar nicht beeinflusst. Wie in Abb. 3.7 B dargestellt, reduziert sich die Amplitude der ENL055-Gruppe bei steigender Konzentration in einem etwa gleichen Umfang wie die der Kontrollgruppe.

In dem Relaxationsverhalten der Zellen sind beim Vergleich der RT₅₀ keine signifikanten Unterschiede zwischen der ENL055– und der Kontrollgruppe feststellbar. Bei der statistischen Untersuchung der Geschwindigkeit der zytosolischen Ca²⁺-Elimination ergeben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.5).

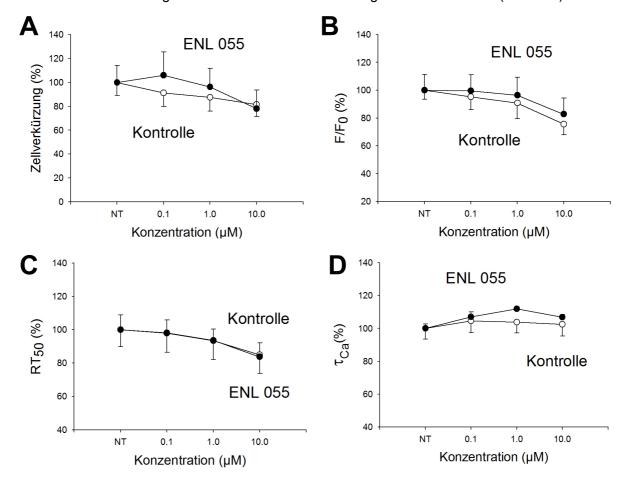


Abb. 3.5 Screeningergebnisse von ENL055 (n=7) vs. Kontrolle (n=8)

3.1.5 ENL056

Wie in Abb. 3.6 A dargestellt, nimmt die Kontraktilität durch den SERCA2a-Modulator ENL056 mit steigender Konzentration zunehmend und im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ab, im Vergleich zur Kontrolle aber in nicht signifikantem Umfang. Bei den Ca^{2+} -Amplituden F/F_0 und bei der Relaxationszeit RT_{50} sind keinerlei Unterschiede zwischen ENL056 und der Kontrollgruppe erkennbar. Der Abfallsexponent τ nimmt mit steigender Konzentration des Stoffes ENL056 immer mehr zu, d.h. die Kalziumelimination aus dem Zytosol wird mit steigender Konzentration verlangsamt, im Vergleich zur Kontrolle bei allen Konzentrationen jedoch nicht signifikant (bei 10 μ M p=0,07).

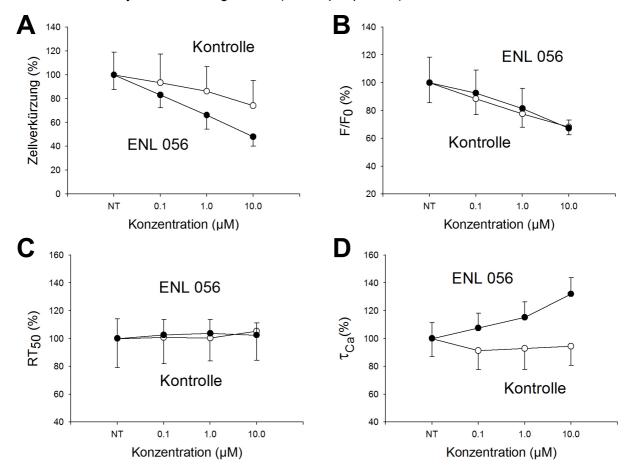


Abb. 3.6 Screeningergebnisse von ENL056 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)

3.1.6 ENO107

Die Kontraktilität der Zellen nimmt mit steigender Konzentration des SERCA2a-Modulators ENO107 zu. Allerdings weist diesbezüglich der statistische Vergleich zwischen ENO107 und der Ausgangssituation mit Normaltyrode sowie der Vergleich mit der Kontrolle mittels 2-Wege-ANOVA aufgrund der hohen Variabilität, die sich in den Standardfehlern darstellt, keine signifikanten Unterschiede auf. Die Betrachtung der Ca²+-Amplituden F/F₀ ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen ENO107 und der Kontrollgruppe. Allenfalls ist eine tendenzielle Reduktion der Amplituden bei 0,1 μM und 1 μM ENO107 im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Die statistische Untersuchung des Relaxationsverhaltens von ENO107 ergibt im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede. In der ENO107-Gruppe bleibt die RT₅₀ bei allen Konzentrationen in etwa konstant, bei 0,1 μM ist sie im Vergleich zur Kontrolle tendenziell leicht beschleunigt, bei 10 μM hingegen verlangsamt. Der Abfall der Ca²+-Transienten ist bei höchster ENO107-Konzentration (10 μM) gegenüber der Kontrolle ebenfalls leicht verlangsamt, jedoch in nicht signifikantem Ausmaß (Abb.3.7).

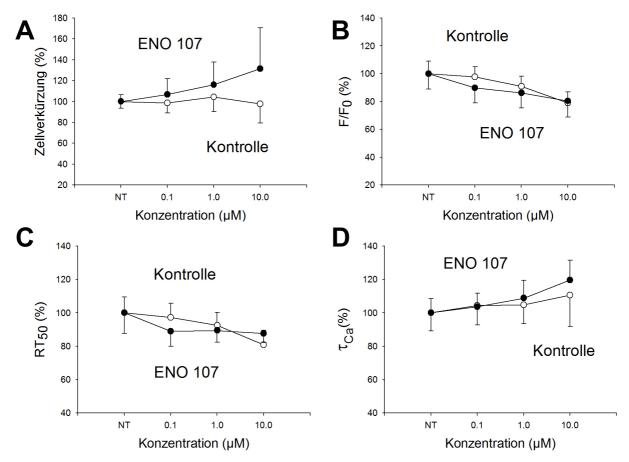


Abb. 3.7 Screeningergebnisse von ENO107 (n=7) vs. Kontrolle (n=8)

3.1.7 ENO114

Während bei niedrigster und mittlerer Konzentration (0,1 μ M bzw. 1 μ M) des SERCA2a-Modulators ENO114 noch keine eindeutigen Veränderungen der fraktionellen Zellverkürzung zu sehen sind, nimmt diese bei der 10 μ M-Lösung im Vergleich zur Kontrolle signifikant zu (p=0,01). Dieser positiv inotrope Effekt bei 10 μ M ist bereits optisch in den Originalregistrierungen festzustellen. In der unten stehenden Abbildung 3.8 sind zwei exemplarische Originalaufzeichnungen der Zellverkürzung bei 10 μ M dargestellt. Bei 10 μ M des SERCA2a-Modulators ENO114 beträgt die fraktionelle Zellverkürzung in Prozent des Ausgangswertes bei Normaltyrode 149,8% \pm 14,4%, während sie bei der Kontrolle 87,4% \pm 13,8% beträgt.

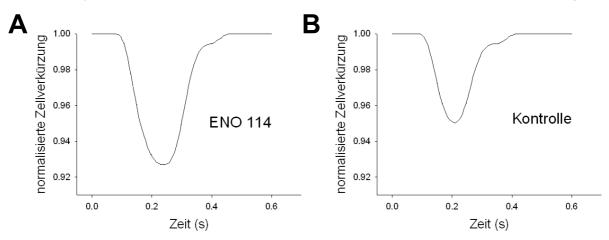


Abb. 3.8 Examplarische Originalregistrierung der normalsierten Zellverkürzung einer ENO114 - Zelle (**A**) und einer Kontroll-Zelle (**B**) unter Stimulation von 2 Hz

Bemerkenswerter Weise wurden 3 der 8 gemessenen Zellen unter höchster ENO114 - Konzentration von 10 µM kurzzeitig arrhythmisch, wie Abb. 3.9 exemplarisch zeigt.

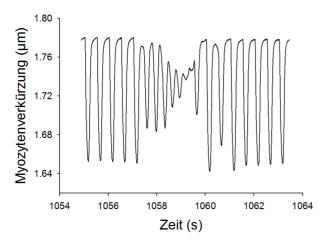


Abb. 3.9 Exemplarische Originalregistrierung einer kurzzeitigen Arrhythmie unter 10 μM des SERCA2a-Modulators ENO114. Dargestellt ist die Myozytenverkürzung im Verlauf der Zeit.

Die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten wird von dem SERCA2a-Modulator ENO114 nicht signifikant beeinflusst, tendenziell ist der Ca^{2+} -Transienten bei 10 μ M etwas größer als bei der Kontrolle.

Die Relaxationszeit RT $_{50}$ bleibt bei allen Konzentrationen von ENO114 konstant, im Vergleich zur Kontrolle ist allenfalls eine leichte Verlangsamung mit zunehmender Konzentration zu sehen. Auch bezüglich der Geschwindigkeit der zytosolischen Kalziumelimination τ gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Stoff und Kontrolle. Tendenziell ist der Abfallsexponent τ bei 1 μ M und 10 μ M ENO114 etwas größer als bei der Kontrolle, d. h. die zytosolische Kalziumelimination leicht verlangsamt (Abb. 3.10).

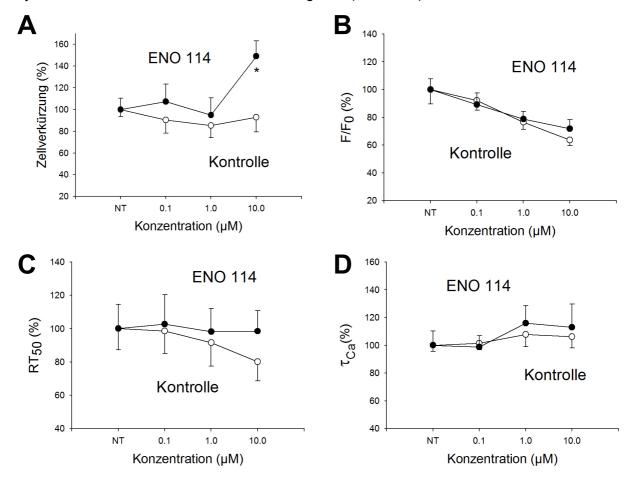


Abb. 3.10 Screeningergebnisse von ENO114 (n=8) vs. Kontrolle (n=8)

^{*} Signifikanz mit p=0,01 zwischen ENO114 und Kontrolle

3.1.8 ENO166

Wie aus Abb. 3.11 A ersichtlich, zeigt der SERCA2a-Modulator ENO166 weder einen Effekt auf die Kontraktilität noch auf die Ca²⁺-Transienten der Zellen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe liegen bezüglich dieser Messgrößen keine signifikanten Veränderungen vor.

Die statistische Untersuchung des Relaxationsverhaltens von ENO166 ergibt im Vergleich zur Kontrolle weder tendenzielle noch signifikante Unterschiede. Der Abfall der Ca $^{2+}$ -Amplituden ist bei höchster ENO166-Konzentration (10 μ M) tendenziell langsamer als der der Kontrolle, mit p=0,16 allerdings nicht signifikant.

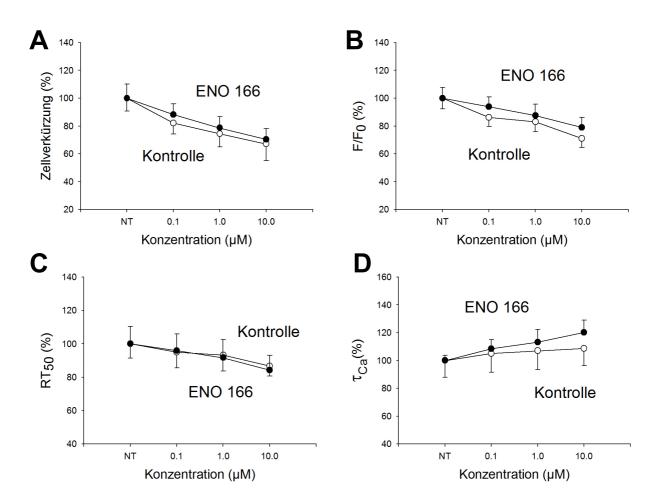


Abb. 3.11 Screeningergebnisse von ENO166 (n=7) vs. Kontrolle (n=8)

3.1.9 ENO 185

Bei 0,1 μ M und 1 μ M des SERCA2a-Modulators ENO185 ist im Vergleich zum Ausgangswert und zur Kontrolle eine tendenzielle Zunahme der fraktionellen Zellverkürzung zu sehen, die im Vergleich zur Kontrolle aber jeweils nicht signifikant ist. Bei der Betrachtung der Ca²⁺- Amplituden F/F₀ fällt auf, dass diese bei 1 μ M und 10 μ M ENO185-Lösung im Vergleich zur Kontrolle zunehmen, jedoch nicht signifikant (bei 10 μ M p=0,07).

In der Tendenz ist die Relaxationszeit RT₅₀ bei 1 μ M und 10 μ M gegenüber der Kontrolle etwas verlängert. Ebenso ist die zytosolische Ca²⁺-Elimination bei 10 μ M im Vergleich zur Kontrolle tendenziell verlangsamt (p=n.s.), erkennbar am vergrößerten Abfallsexponenten τ (Abb. 3.12).

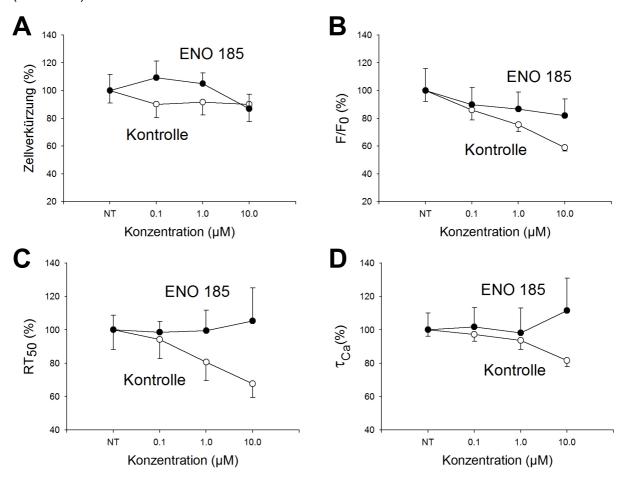


Abb. 3.12 Screeningergebnisse von ENO185 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)

3.1.10 ENO187

Der SERCA2a-Modulator ENO187 zeigt weder einen Effekt auf die Kontraktilität noch auf die Ca²⁺-Transienten der Zellen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe liegen bezüglich dieser Messgrößen keine signifikanten Veränderungen vor.

Auch die statistische Untersuchung des Relaxationsverhaltens und des Abfalls der Ca²⁺-Amplituden ergeben im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede. Allenfalls ist bei beiden Messgrößen eine minimale Verlangsamung erkennbar.

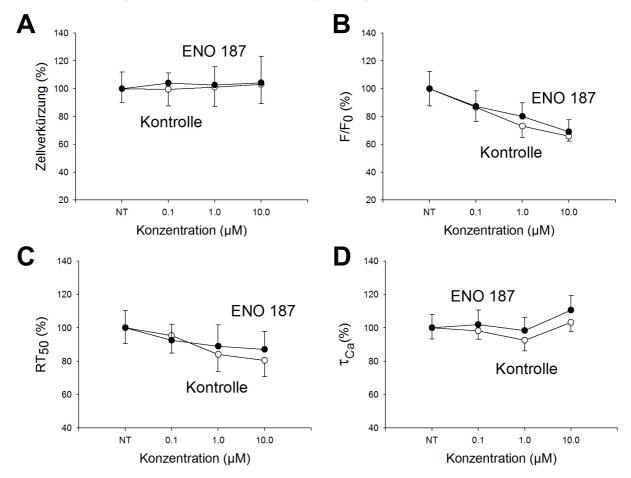


Abb. 3.13 Screeningergebnisse von ENO187 (n=6) vs. Kontrolle (n=7)

3.1.11 ENO207

Die konzentrationsabhängige Untersuchung des SERCA2a-Modulators ENO207 ergab, dass bei der fraktionellen Zellverkürzung und bei den Ca²⁺-Transienten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen vorliegen. Sowohl bei ENO207 als auch bei der Kontrolle nehmen beide Messgrößen über den Zeitraum des Versuches kontinuierlich und in etwa gleichem Umfang ab.

Auch bezüglich der Relaxationszeit RT_{50} und des Ca^{2+} -Abfall-Exponenten τ sind keine Veränderungen nachweisbar.

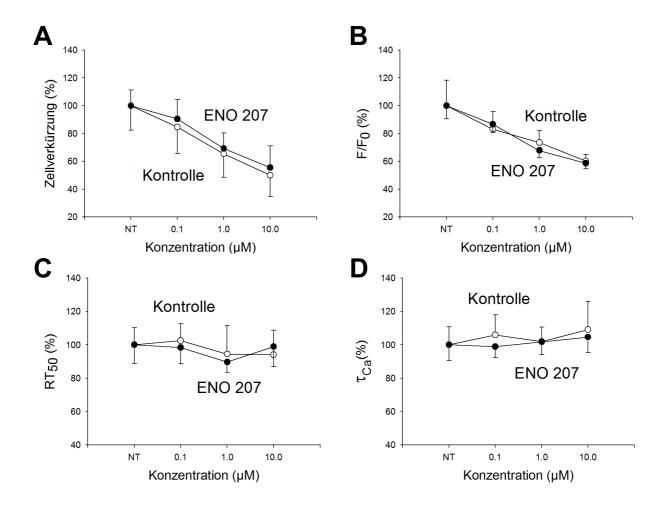


Abb. 3.14 Screeningergebnisse von ENO207 (n=7) vs. Kontrolle (n=6)

3.1.12 ENO209

Wie aus Abb. 3.15 ersichtlich, bewirkt der SERCA2a-Modulator ENO209 hinsichtlich der Kontraktilität und der Ca²⁺-Amplituden der Zellen keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Kontrolle.

Auch die Relaxationszeit der Zellen bleibt von ENO209 unbeeinflusst, ohne signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Der Abfallsexponent τ der Ca²⁺- Amplituden ist bei mittlerer und höchster ENO209-Konzentration (1 μ M und 10 μ M) tendenziell größer als die der Kontrolle, d. h. die Kalziumelimination unter ENO209 etwas langsamer, statistisch jedoch in nicht signifikantem Umfang.

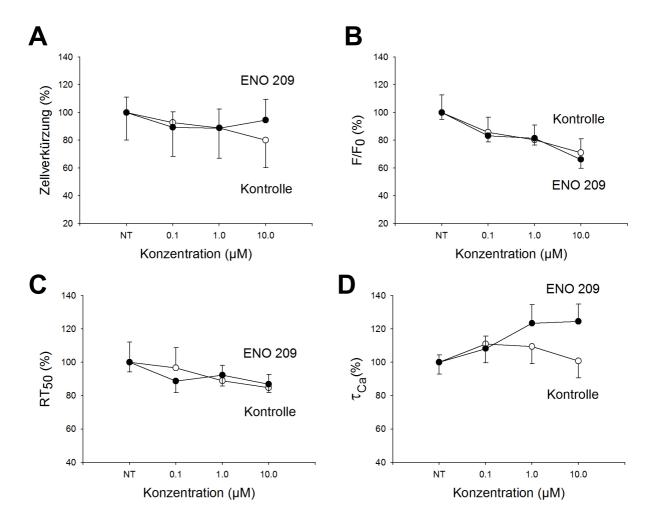


Abb. 3.15 Screeningergebnisse von ENO209 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)

3.1.13 GPZ000876

Der SERCA2a-Modulator GPZ000876 bewirkt hinsichtlich der Kontraktilität der Zellen keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Kontrolle.

Auch bei der Untersuchung der Ca^{2+} -Amplituden, der Relaxationszeit RT_{50} und der zytosolischen Kalziumelimination ergeben sich, wie in Abb. 3.16 dargestellt, keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

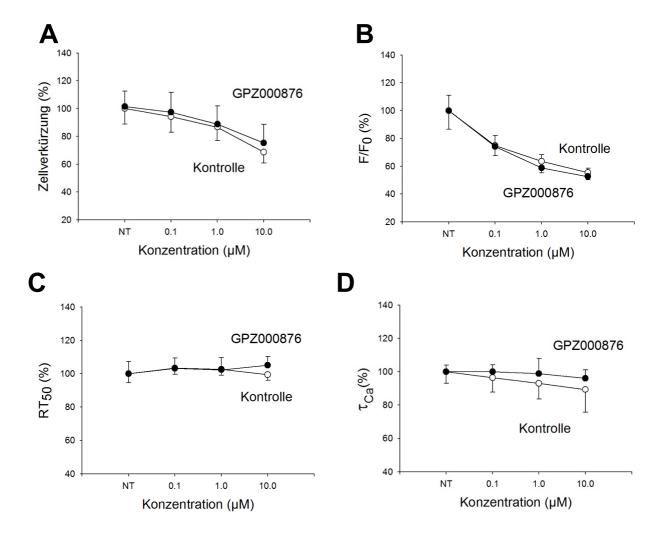


Abb. 3.16 Screeningergebnisse von GPZ000876 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)

3.1.14 GPZ001441

Wie aus Abb. 3.17 ersichtlich, zeigt der SERCA2a-Modulator GPZ001441 weder einen Effekt auf die Kontraktilität noch auf die Ca²⁺-Transienten der Zellen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe liegen bezüglich dieser Messgrößen keine signifikanten Veränderungen vor. In gleicher Weise verhalten sich die Relaxationszeit und der Abfall der Ca²⁺- Amplituden: Beide Messgrößen bleiben von GPZ001441 unbeeinflusst, ohne signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Tendenziell ist die Relaxation bei 10 μM gegenüber der Kontrolle etwas verlangsamt.

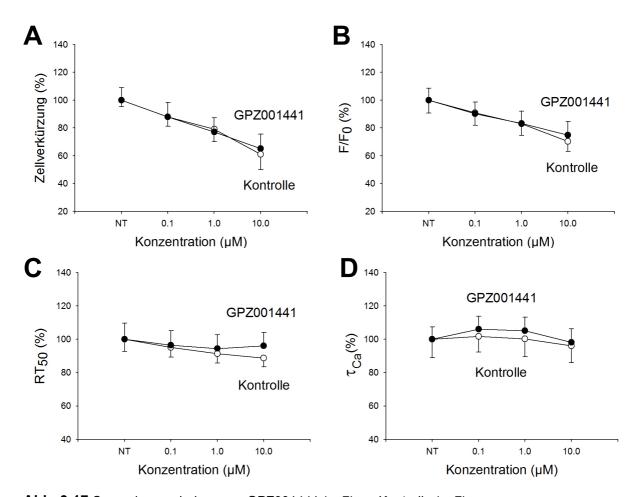


Abb. 3.17 Screeningergebnisse von GPZ001441 (n=7) vs. Kontrolle (n=7)

3.1.15 GPZ003362

Im Vergleich zur Kontrolle zeigt der SERCA2a-Modulator GPZ003362 bei allen Konzentrationen eine tendenzielle Zunahme der Kontraktilität, aufgrund der hohen Standardfehler ist diese bei allen Konzentrationen jedoch nicht signifikant.

Die Amplitude der Ca²⁺-Transienten wird von dem SERCA2a-Modulator GPZ003362 in keiner Weise beeinflusst. Wie in Abb. 3.18 B dargestellt, reduziert sich die Amplitude der GPZ003362-Gruppe bei steigender Konzentration in gleichem Umfang wie die der Kontrollgruppe.

Auch in der Relaxationszeit RT_{50} und der Geschwindigkeit der zytosolischen Kalziumelimination zeigen sich keine signifikanten Veränderungen zwischen GPZ003362 und Kontrolle. In der Tendenz ist die Kalziumelimination bei allen Konzentrationen des Stoffes GPZ003362 im Vergleich zur Kontrolle minimal beschleunigt.

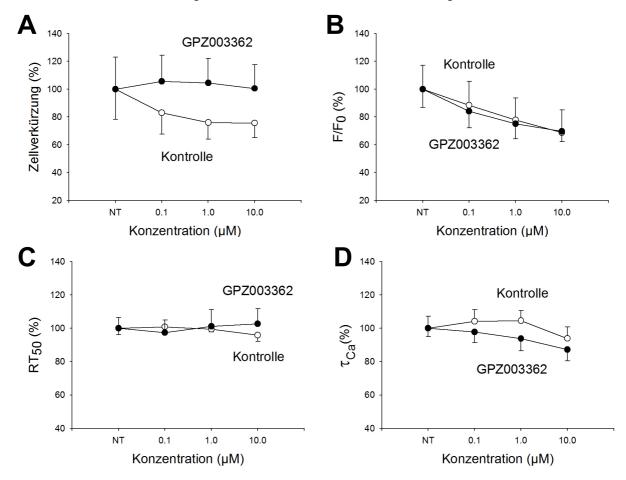


Abb. 3.18 Screeningergebnisse von GPZ003362 (n=7) vs. Kontrolle (n=6)

3.1.16 GPZ006800

Wie in Abb. 3.19 A dargestellt, nimmt die Kontraktilität durch den SERCA2a-Modulator GPZ006800 mit steigender Konzentration zunehmend und im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ab, jedoch in nicht signifikantem Umfang.

Die Amplituden der Ca²⁺-Transienten dagegen nehmen im Verlauf des Versuches weniger ab als die der Kontrollgruppe. Im statistischen Vergleich weisen beide Gruppen bezüglich dieser Messgröße jedoch keine signifikanten Unterschiede auf.

Beim Vergleich der RT_{50} sind zwischen SERCA2a-Modulator und Kontrolle keine tendenziellen und signifikanten Unterschiede feststellbar.

Der Abfallsexponent τ der Ca²⁺- Amplituden ist bei allen Konzentrationen von GPZ006800 größer als der der Kontrolle, d. h. die Kalziumelimination tendenziell verlangsamt, statistisch jedoch ohne Signifikanz.

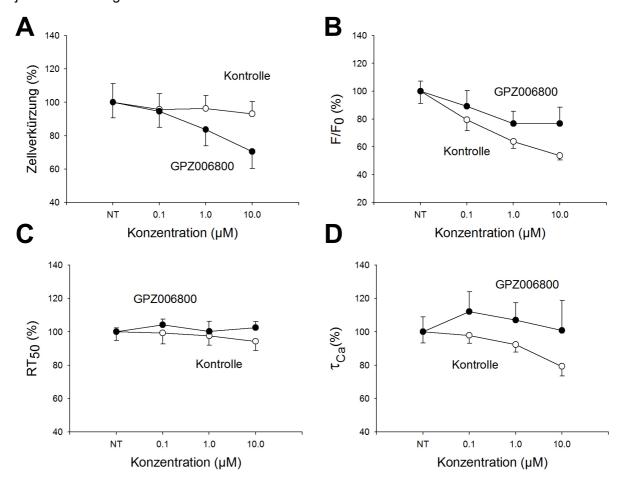


Abb. 3.19 Screeningergebnisse von GPZ006800 (n=6) vs. Kontrolle (n=6)

3.1.17 GPZ007738

Die konzentrationsabhängige Untersuchung des SERCA2a-Modulators GPZ007738 ergab, dass er weder einen Effekt auf die Kontraktilität noch auf die Ca²⁺-Transienten der Zellen zeigt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe liegen bezüglich dieser Messgrößen keine signifikanten Veränderungen vor.

Auch die statistische Untersuchung des Relaxationsverhaltens und des Abfalls der Ca²⁺-Amplituden ergeben im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede. Beide Messgrößen weisen eher auf eine tendenziell geringere SERCA2a-Aktivität unter GPZ007738 hin als unter Kontrolle, wie Abb. 3.20 zeigt, wie oben beschrieben jedoch ohne Effekt auf Kontraktilität und Ca²⁺-Transienten.

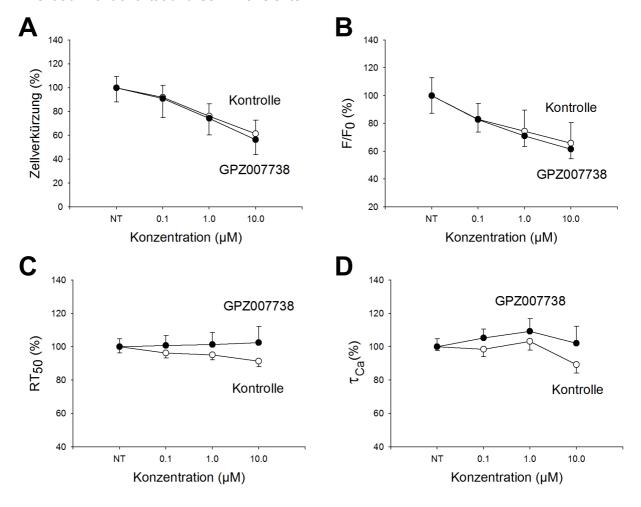


Abb. 3.20 Screeningergebnisse von GPZ007738 (n=7) vs. Kontrolle (n=8)

3.1.18 Zusammenfassung des Screenings

Aufgrund der Zielsetzung dieser Arbeit, einen womöglich geeigneten Stoff zur Behandlung der Herzinsuffizienz zu finden, wurden diejenigen SERCA2a-Modulatoren, die eine Tendenz zur positiven Inotropie zeigten, hinsichtlich ihrer Auswirkung auf den SR-Kalziumgehalt und auf Muskelzellverbände näher untersucht. Zu den tendenziell positiv inotropen SERCA2a-Modulatoren zählen ENL055, ENO107, ENO114, ENO185, ENO209 und GPZ003362.

3.2 Einfluss auf den SR Ca²⁺-Gehalt

Zur direkten Messung des SR Ca²⁺-Gehaltes mittels lokaler Koffein-Applikation wurde diejenige Konzentration des SERCA2a-Modulators gewählt, bei der die positive Inotropie in den Versuchen zuvor am deutlichsten ausgeprägt war.

3.2.1 ENL055

Wie aus Abb. 3.21 ersichtlich, fällt die koffeininduzierte Ca²⁺-Amplitude bei ENL055 etwas kleiner aus als bei der Kontrolle, im statistischen Vergleich jedoch nicht signifikant.

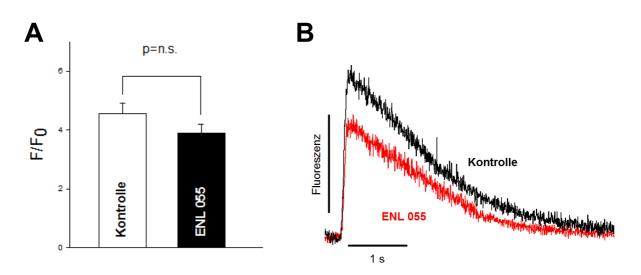


Abb 3.21 Auswirkungen von ENL055 auf den SR Ca²⁺-Gehalt von Ratten-Kardiomyozyten **A:** Mittelwerte der koffeininduzierten Ca²⁺-Transienten-Amplitude F/F₀ von Kontrolle (n=16) und

ENL055 (n=11); **B:** Repräsentative Originalregistrierung der Ca²⁺-Transienten nach Koffein-Applikation; Signifikanzen: keine

3.2.2 ENO107

Die Amplitude der Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten ist bei ENO107 größer als bei der Kontrolle, jedoch nicht signifikant, wie der Abb. 3.22 zu entnehmen ist.

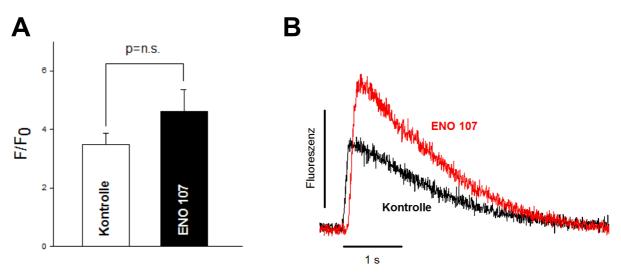


Abb 3.22 Auswirkungen von ENO107 auf den SR Ca²⁺-Gehalt von Ratten-Kardiomyozyten **A:** Mittelwerte der koffeininduzierten Ca²⁺-Transienten-Amplitude F/F₀ von Kontrolle (n=11) und

ENO107 (n=13); **B:** Repräsentative Originalregistrierung der Ca²⁺-Transienten nach Koffein-Applikation; Signifikanzen: keine

3.2.3 ENO114

Die Amplitude der Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten nimmt durch ENO114 tendenziell zu, im Vergleich zur Kontrolle jedoch ohne signifikantes Niveau.

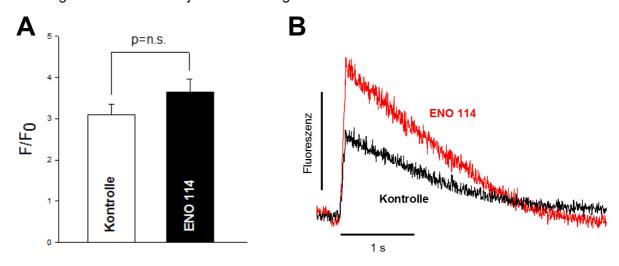


Abb 3.23 Auswirkungen von ENO114 auf den SR Ca²⁺-Gehalt von Ratten-Kardiomyozyten **A:** Mittelwerte der koffeininduzierten Ca²⁺-Transienten-Amplitude F/F₀ von Kontrolle (n=14) und

ENO114 (n=15); **B:** Repräsentative Originalregistrierung der Ca²⁺-Transienten nach Koffein-Applikation; Signifikanzen: keine

3.2.4 ENO185

Die Koffein-induzierten Ca²⁺-Amplituden fallen bei ENO185 und der Kontrolle etwa gleich groß aus, wie aus Abb. 3.24 ersichtlich.

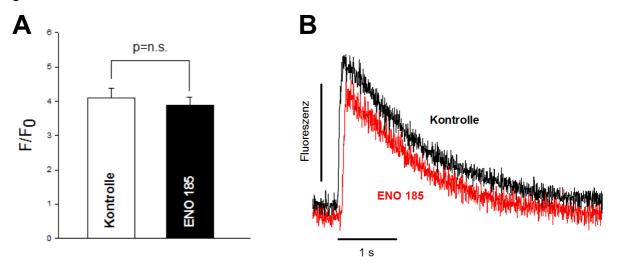


Abb 3.24 Auswirkungen von ENO185 auf den SR Ca²⁺-Gehalt von Ratten-Kardiomyozyten **A:** Mittelwerte der koffeininduzierten Ca²⁺-Transienten-Amplitude F/F₀ von Kontrolle (n=12) und

ENO185 (n=12); **B:** Repräsentative Originalregistrierung der Ca²⁺-Transienten nach Koffein-Applikation; Signifikanzen: keine

3.2.5 ENO209

Die Koffein- induzierten Ca²⁺-Amplituden beider Gruppen unterscheiden sich kaum. Tendenziell ist die Amplitude durch ENO209 gegenüber der Kontrolle minimal vergrößert.

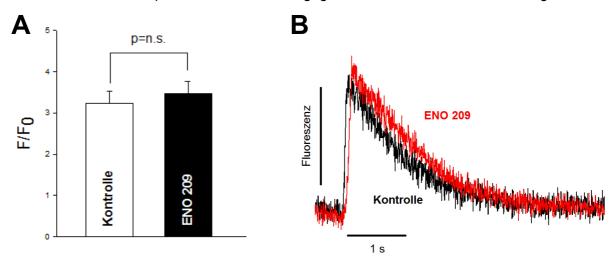


Abb 3.25 Auswirkungen von ENO209 auf den SR Ca²⁺-Gehalt von Ratten-Kardiomyozyten **A:** Mittelwerte der koffeininduzierten Ca²⁺-Transienten-Amplitude F/F₀ von Kontrolle (n=14) und

ENO209 (n=10); **B:** Repräsentative Originalregistrierung der Ca²⁺-Transienten nach Koffein-Applikation; Signifikanzen: keine

3.2.6 GPZ003362

Die Koffein-induzierte Ca²⁺-Amplitude ist unter GPZ003362 tendenziell etwas größer als die der Kontrolle, jedoch nicht signifikant, wie aus Abb. 3.26 ersichtlich.

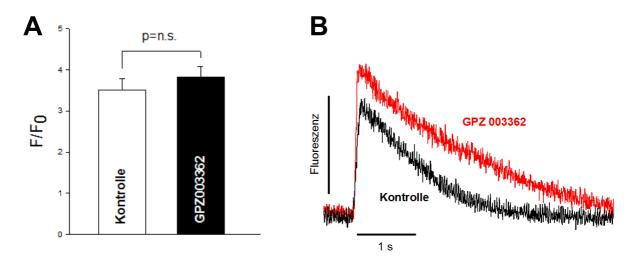


Abb 3.26 Auswirkungen von GPZ003362 auf den SR Ca²⁺-Gehalt von Ratten-Kardiomyozyten **A:** Mittelwerte der koffeininduzierten Ca²⁺-Transienten-Amplitude F/F₀ von Kontrolle (n=10) und GPZ003362 (n=11); **B:** Repräsentative Originalregistrierung der Ca²⁺-Transienten nach Koffein-Applikation; Signifikanzen: keine

3.3 Einfluss auf humane Muskelzellverbände

Um die SERCA2a-Modulatoren auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf menschliches Herzmuskelgewebe einerseits und auf Zellverbände andererseits zu untersuchen, wurden mit ihnen Muskelstreifenexperimente durchgeführt, und zwar in den gleichen Konzentrationen wie auch schon bei den Epifluoreszenz-Messungen: 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M. Zur Charakterisierung der Effekte wurden die entwickelte Kraft und die Zeit vom Kraftmaximum bis zu 50% der Relaxation (RT₅₀) herangezogen.

3.3.1 ENL055

Wie aus Abb. 3.27 ersichtlich, nimmt die entwickelte Kraft in Prozent der Ausgangskraft bei ENL055 im Verlauf zunehmend ab. Bei 10 μ M ist sie im Vergleich zu Kontrolle signifikant reduziert (p=0,03). Auch die Relaxation ist bei 10 μ M im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt, mit p=0,06 jedoch nicht auf Signifikanzniveau.

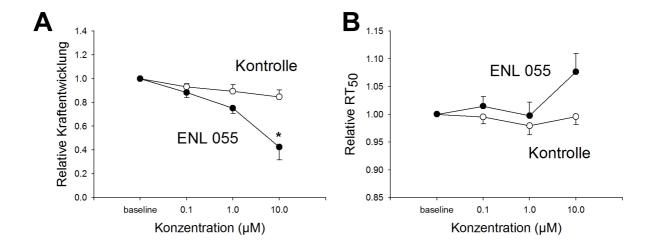


Abb. 3.27 Konzentrationsabhängige Änderung der relativen entwickelten Kraft und der Relaxationszeit im Muskelstreifenexperiment durch ENL055 (n=3) vs. Kontrolle (n=3)

A: Relative Kraft im Verhältnis zur Ausgangskraft; **B**: Relative Relaxationszeit im Verhältnis zum Ausgangswert; * Signifikanz mit p=0,03 zwischen ENL055 und Kontrolle

3.3.2 ENO107

Die entwickelte Kraft von ENO107 im Muskelstreifenexperiment zeigt im Vergleich zur Kontrolle keinen Unterschied. Auch bezüglich der Relaxationszeiten lassen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

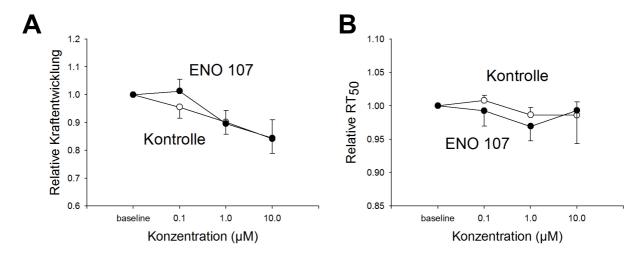


Abb. 3.28 Konzentrationsabhängige Änderung der relativen entwickelten Kraft und der Relaxationszeit im Muskelstreifenexperiment durch ENO107 (n=6) vs. Kontrolle (n=6)

A: Relative Kraft im Verhältnis zur Ausgangskraft; **B**: Relative Relaxationszeit im Verhältnis zum Ausgangswert; Signifikanzen: keine

3.3.3 ENO114

Wie aus Abb. 3.29 ersichtlich, nimmt die entwickelte Kraft in Prozent der Ausgangskraft bei ENO114 im Verlauf zunehmend und im Vergleich zur Kontrolle stärker ab. Der statistische Vergleich von Kontrolle und ENO114 ergibt diesbezüglich jedoch keine Signifikanz.

Die Relaxationszeit unter ENO114 ist bei 0,1 μ M und 1 μ M im Vergleich zur Kontrolle deutlich verkürzt, bei 0,1 μ M mit einer Signifikanz von p=0,01. Bei höchster Konzentration dagegen gleichen sich die Relaxationszeiten wieder an.

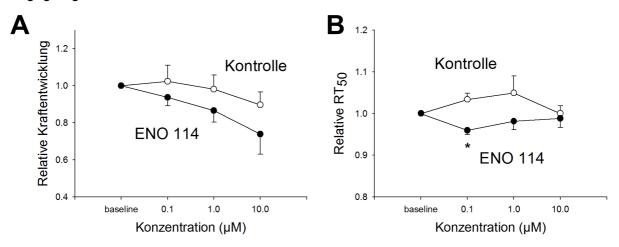


Abb. 3.29 Konzentrationsabhängige Änderung der relativen entwickelten Kraft und der Relaxationszeit im Muskelstreifenexperiment durch ENO114 (n=4) vs. Kontrolle (n=4)

A: Relative Kraft im Verhältnis zur Ausgangskraft; **B**: Relative Relaxationszeit im Verhältnis zum Ausgangswert; Signifikanzen: keine

3.3.4 ENO185

Sowohl der Vergleich der Kraft als auch der Relaxationszeit zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen ENO185 und der Kontrolle.

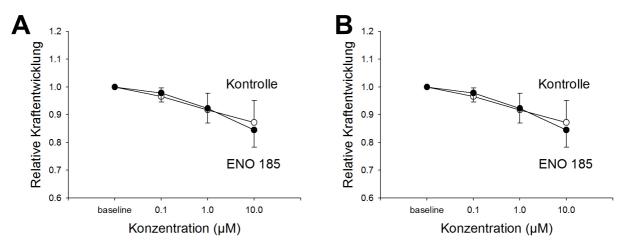


Abb. 3.30 Konzentrationsabhängige Änderung der relativen entwickelten Kraft und der Relaxationszeit im Muskelstreifenexperiment durch ENO185 (n=6) vs. Kontrolle (n=4)

A: Relative Kraft im Verhältnis zur Ausgangskraft; **B**: Relative Relaxationszeit im Verhältnis zum Ausgangswert; Signifikanzen: keine

3.3.5 ENO209

Die entwickelte Kraft von ENO209 im Muskelstreifenexperiment zeigt im Vergleich zur Kontrolle keinen Unterschied. Tendenziell ist sie bei höchster Konzentration von 10 μ M minimal kleiner als die der Kontrolle. Auch die Relaxationszeit zeigt im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede, tendenziell ist sie bei 0,1 μ M und 10 μ M leicht verkürzt.

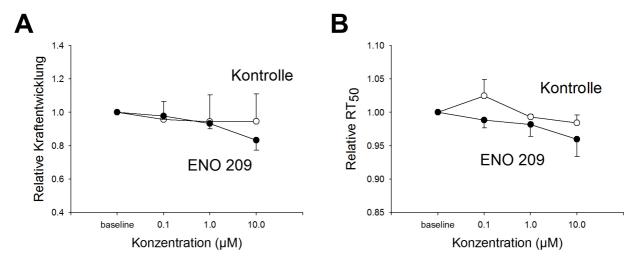


Abb. 3.31 Konzentrationsabhängige Änderung der relativen entwickelten Kraft und der Relaxationszeit im Muskelstreifenexperiment durch ENO209 (n=4) vs. Kontrolle (n=3)

A: Relative Kraft im Verhältnis zur Ausgangskraft; **B**: Relative Relaxationszeit im Verhältnis zum Ausgangswert; Signifikanzen: keine

3.3.6 GPZ003362

In den Muskelstreifenexperimenten mit dem SERCA2a-Modulator GPZ003362 zeigte sich bei niedrigster Konzentration von 0,1 μ M eine signifikante Zunahme der entwickelten Kraft mit p=0,05, wie Abb. 3.32 zeigt. Während die Kraft in Prozent zur Ausgangskraft bei 0,1 μ M unter GPZ003362 auf 101,1 % ± 5,4 % minimal ansteigt, fällt diese unter Kontrolllösung auf 93,2 ± 8,5 % ab. Die Relaxation ist tendenziell bei allen Konzentrationen des SERCA2a-Modulators leicht verlängert, im statistischen Vergleich zur Kontrolle jedoch nicht signifikant.

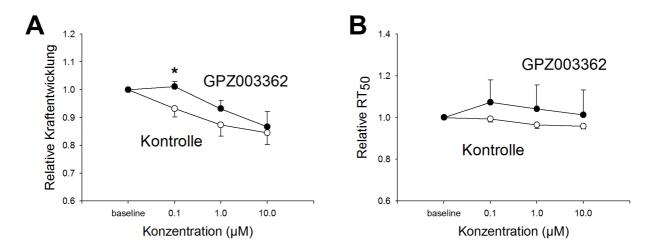


Abb. 3.32 Konzentrationsabhängige Änderung der relativen entwickelten Kraft und der Relaxationszeit im Muskelstreifenexperiment durch GPZ003362 (n=8) vs. Kontrolle (n=8)
A: Relative Kraft im Verhältnis zur Ausgangskraft; B: Relative Relaxationszeit im Verhältnis zum Ausgangswert; * Signifikanz mit p=0,05 zwischen GPZ003362 und Kontrolle

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Auswahl von potentiellen SERCA2a-Modulatoren auf die Aktivität der Myokard-spezifischen sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf einer qualitativen Untersuchung der Relaxation und der Ca²⁺-Extrusion aus dem Zytosol als direkte Parameter der SERCA2a-Funktion. Als indirekte Funktionsparameter der SERCA2a wurden die Zellkontraktilität, die Ca²⁺-Transienten-Amplitude und der SR Ca²⁺-Gehalt gemessen.

Eine Steigerung der SERCA2a-Aktivität würde erwartungsgemäß zu einer beschleunigten Ca²⁺-Extrusion aus dem Zytosol und konsekutiv zu verkürzten Relaxationszeiten führen. Folglich könnte es sekundär zu einer stärkeren Ca²⁺-Beladung des SR und damit zu einer erhöhten SR Ca²⁺-Ausschüttung pro Exzitationszyklus mit daraus resultierender Steigerung von Ca²⁺-Transienten und Kontraktilität kommen. Derartige Veränderungen durch eine erhöhte SERCA2a-Aktivität konnten bereits durch mehrere Studien mittels Gentherapeutischer Überexpression der SERCA2a belegt werden. Ein adenoviraler Gentransfer der SERCA2a führte in Tiermodellen sowohl zu einer erhöhten Kontraktilität und verkürzten Relaxationszeit als auch zu einer erhöhten Kalziumamplitude und einem beschleunigten Kalziumabfall (Hajjar et al. 1997; Baker et al. 1998; Meyer und Dillmann 1998; Yao et al. 1998; Müller et al. 2003; Maier et al. 2005). Entsprechend konnten auch in Herzinsuffizienz-Modellen verbesserte Pumpfunktionen und erhöhte Relaxationsgeschwindigkeiten bestätigt werden, sowohl in Tiermodellen (Miyamoto et al. 2000; Müller et al. 2003; Byrne et al. 2008; Fu et al. 2008; Kawase et al. 2008; Mi et al. 2009; Mariani et al. 2011; Xin et al. 2011) als auch in Versuchen mit isolierten Myozyten aus humanen, terminal insuffizienten Herzen (Del Monte et al. 1999). Neben diesen Studien zu gesteigerter Kontraktilität durch Gentransfer wurde in den letzten Jahren auch ein neuer positiv inotroper Wirkstoff namens Istaroxime (PST2744) entwickelt, der einerseits seine Wirkung ähnlich den Digitalis-Präparaten über eine Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase entfaltet, aber zusätzlich auch die SERCA2a stimulieren soll (Micheletti et al. 2002; De Munari et al. 2003; Rocchetti et al. 2005; Mattera et al. 2007; Sabbah et al. 2007). In allen genannten Studien konnte erwartungsgemäß neben einer Verbesserung der systolischen Funktion und teilweise der diastolischen Funktion auch eine Beschleunigung der Relaxationszeit und/oder des Kalziumabfalls gezeigt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SERCA2a-Modulatoren wiesen bezüglich der genannten Parameter deutliche Unterschiede auf. Aufgrund des übergeordneten Ziels dieser Arbeit, eine neue Therapieoption für die Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz, d. h. ein neues potentielles Inotropikum, zu finden, werden die SERCA2a-Modulatoren im Folgenden nach ihrem Einfluss auf die Kontraktilität gruppiert diskutiert.

4.1 Positiv inotrope SERCA2a-Modulatoren

4.1.1 ENO114

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ENO114 im fluoreszenzoptischen Versuch mit Kardiomyozyten aus Rattenherzen eine signifikant erhöhte Kontraktilität bei höchster untersuchter Konzentration von 10 μ M bewirkt. Interessanterweise kam es bei 3 der 8 gemessenen Zellen unter höchster Konzentration kurzzeitig zu Arrhythmien. Sowohl eine Beschleunigung der Ca²+-Extrusion (gemessen als Abfallsexponent τ) als auch der Relaxationszeit konnten in der ersten Versuchsreihe mit Rattenherzzellen jedoch nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich lediglich ein im Trend erhöhter Koffein-induzierter Ca²+-Transient als Ausdruck für einen erhöhten Kalziumgehalt des SR.

Ein erhöhter SR Ca²⁺-Gehalt kann in diesem Fall die Ursache für die beschriebenen Arrhythmien der Ratten-Kardiomyozyten sein. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass eine Ca²⁺-Überladung des SR ab einer bestimmten Schwelle zu diastolischen Kalziumentladungen führen kann – messbar als sog. Kalzium-Sparks, die eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der Ryanodinrezeptoren widerspiegeln. Kalziumentladungen sind dabei wahrscheinlich die wichtigste Grundlage für die Entstehung arrhythmogener später Nachdepolarisationen. Infolge kurzzeitiger Erhöhuna Kalziumgehaltes im Zytosol kommt es zu einem vorübergehenden Kalzium-abhängigen Einstrom von Na⁺-Ionen über den NCX (I_{NCX}) in die Zelle, der folglich zur spontanen Membrandepolarisation führen kann (Satoh et al. 1997; Schlotthauer und Bers 2000; Pogwizd et al. 2001). Insofern können die spontan aufgetretenen Arrhythmien als ein Hinweis für eine Ca²⁺-Überladung des SR angesehen werden und somit indirekt darauf hinweisen, dass ENO114 die SERCA2a-Funktion tatsächlich stimuliert und konsekutiv zu einer erhöhten SR Ca²⁺-Beladung führt. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Studie, in der eine Gen-therapeutische Überexpression der SERCA2a am Modell der Ratte ebenfalls zu vermehrten Arrhythmien führte (Chen et al. 2004). Dem gegenüber stehen jedoch neueste widersprüchliche Ergebnisse, die eine Reduktion ventrikulärer Arrhythmien durch SERCA2a-Überexpression beschreiben (Lyon et al. 2011; Cutler et al. 2012). Allerdings scheinen letztere Ergebnisse aufgrund der Durchführung an Herzinsuffizienzmodellen – und nicht wie in dieser Arbeit an gesunden Rattenzellen – nur eingeschränkt vergleichbar.

Passend zum leicht erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalt im Einzelzellexperiment wird am Muskelstreifen aus herzinsuffizienten humanen Herzen die Relaxationszeit bei minimaler Konzentration von 0,1 μ M signifikant verkürzt, was ebenfalls auf eine Steigerung der SERCA2a-Aktivität hinweisen könnte.

Im deutlichen Kontrast der positiv inotropen Wirkung im Einzelzellexperiment steht jedoch das Ergebnis einer unveränderten bzw. in der Tendenz verminderten Kraft mit steigender Konzentration im Muskelstreifenexperiment.

Die divergierenden Ergebnisse einer erhöhten Kontraktilität der Rattenzellen einerseits und der unveränderten bzw. verminderten Kraft der humanen insuffizienten Muskelstreifen andererseits können vielfältiger Natur sein, lassen sich aber möglicherweise am ehesten aufgrund der Unterschiede zwischen gesunden versus insuffizienten Kardiomyozyten erklären:

Mehrere Studien konnten in den vergangenen Jahren zeigen, dass bei Herzinsuffizienz ein erhöhtes RyR-abhängiges diastolisches SR Ca²⁺-Leck vorliegt, das neben einer veränderten SERCA2a- und NCX-Aktivität zu einer Reduktion des SR Ca²⁺-Gehaltes und somit zur kontraktilen Dysfunktion bei Herzinsuffizienz beiträgt (Shannon et al. 2003; Belevych et al. 2007). Es wird angenommen, dass solch ein erhöhtes diastolisches SR Ca²⁺-Leck durch eine vermehrte Phosphorylierung des RyR bedingt ist. Dieses entsteht infolge der bei Herzinsuffizienz gesteigerten β-adrenergen Stimulation (Marx et al. 2000) und erhöhten Expression und Aktivität der Ca²⁺-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), eines Enzyms, das neben anderen Zielproteinen auch den RyR im herzinsuffizienten Myokard hyperphosphoryliert (Maier et al. 2003; Ai et al. 2005; Curran et al. 2007; Sossalla et al. 2010). Auch für die in dieser Arbeit verwendeten terminal insuffizienten Muskelstreifen kann eine Hyperphosphorylierung des RyR und somit ein erhöhtes diastolisches SR Ca²⁺-Leck angenommen werden. Möglicherweise hat damit eine verstärkte Ca²⁺-Aufnahme ins SR im humanen terminal insuffizienten Myokard keinen wesentlichen Einfluss auf den SR Ca²⁺-Gehalt, da das Ca²⁺ im Sinne eines Kurzschlusses das SR in der Diastole über die undichten RyR wieder verlassen kann.

Zur Erläuterung der unveränderten bzw. tendenziell verminderten Kontraktilität am insuffizienten Myokard sind weiterhin die Unterschiede in der SERCA2a- und NCX-Expression zu verdeutlichen: Während in Rattenzellen in der Diastole das im Zytosol befindliche Kalzium zu über 90% über die SERCA2a sequestriert wird (Hove-Madsen und Bers 1993), tragen in terminal insuffizienten menschlichen Herzzellen SERCA2a und NCX fast gleichermaßen zur diastolischen Kalziumelimination bei (Studer et al. 1994, Flesch et al. 1996, Bers et al. 2002). Zum einen ist dieser Unterschied Spezies-bedingt, da am gesunden humanen Herzen während der Diastole etwa 70% des intrazellulären Kalziums in das SR befördert werden (Maier und Bers 2002). Zum anderen wird als zusätzlicher Faktor bei Herzinsuffizienz die SERCA2a deutlich schwächer (Mercadier et al. 1990; Hasenfuss et al. 1994; Studer et al. 1994; Meyer et al. 1995) und der NCX stärker exprimiert (Studer et al. 1994, Flesch et al. 1996, Bers et al. 2002) als im gesunden Herzen.

Tatsächlich konnten Mackiewicz und Lewartowski 2008 an Herzmuskelzellen von Meerschweinchen zeigen, dass der Effekt eines SR Ca²⁺-Lecks auf die Myozyten-Kontraktilität von der NCX-Aktivität abhängig ist. Bei erhöhter NCX-Aktivität wird das aus dem SR "leckende" Kalzium vermehrt aus der Zelle transportiert. Dieser Netto-Verlust an

Kalzium führt folglich zu einer verminderten Kontraktilität, da weniger Kalzium für die nächste Kontraktion zur Verfügung steht.

Zusammengefasst könnte der Effekt einer unveränderten bis verminderten Kontraktilität am humanen insuffizienten Myokard trotz potentiell erhöhter SERCA2a-Aktivität durch ENO114 auf ein erhöhtes SR Ca²⁺-Leck bei ebenfalls erhöhter NCX-Funktion zurückzuführen sein. Andersherum entsteht die positive Inotropie im Einzellzellexperiment mit gesunden Kardiomyozyten der Ratte vermutlich durch eine gesteigerte SERCA2a-Funktion ohne gleichzeitigen Netto-Ca²⁺-Verlust.

Im Widerspruch zu dieser Theorie scheinen jedoch neueste Ergebnisse mittels Gentherapeutischer SERCA2a-Überexpression zu stehen: Sowohl Lyon et al. 2011 als auch Cutler et al. 2012 konnten zeigen, dass eine Überexpression der SERCA2a am Herzinsuffizienzmodell zu einem verminderten SR Ca²+-Leck führt. Möglicherweise ist die Ursache dieser gegenteiligen Ergebnisse bzw. Hypothesen in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen und den Spezies-Unterschieden zu finden: Während in den beiden genannten Studien sowohl In vivo-Daten als auch Ex vivo-Einzelzell-Daten an einem Herzinsuffizienzmodell der Ratte bzw. des Meerschweinchens verwendet wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit Ex vivo-Ergebnisse anhand insuffizienter Muskelzellverbände von humanen Herzen erhoben. Zudem birgt die Verwendung einer Substanz-bedingten SERCA2a-Stimulation versus einer SERCA2a-Aktivitätssteigerung mittels Überexpression weitere Möglichkeiten unterschiedlicher Wirkungen bzw. Ergebnisse in sich.

Ferner kommt eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in dieser Arbeit, d. h. positive Inotropie im Ratten-Modell und unveränderte Kontraktilität im humanem Herzinsuffizienzmodell, in Frage: Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte durch die unterschiedlichen Versuchsmethoden - Einzelzellen versus Zellverbände - bedingt sein. Verlängerte Diffusionsstrecken sowie fibrosierte Areale im Muskelzellverband sind Beispiele für eine mögliche Ursache von veränderten Effekten der SERCA2a-Modulatoren am insuffizienten Myokard.

Aufgrund des nicht eindeutigen Einflusses von ENO114 auf den Kalzium-Haushalt muss außerdem eingeräumt werden, dass mögliche Off-Target-Effekte entweder zusätzlich oder unabhängig von der SERCA2a-Modulation zu der erhöhten Kontraktilität im Einzelzellexperiment der Ratte führen. Als möglicher Off-Target-Effekt von ENO114 ist eine Erhöhung der Kalziumsensitivität der Myofilamente denkbar. Auf diese Weise ließe sich die gesteigerte Kontraktilität ohne gleichzeitige Erhöhung der Ca²⁺-Transienten erklären, wie es vergleichsweise für die Ca²⁺-Sensitizer EMD 57033 und CGP 48506 sowie den Myosin-Aktivator Omecamtiv Mecarbil beschrieben worden ist (Herzig et al. 1996; Brixius et al. 2002; Endoh 2008; Teerlink 2009). Allerdings wäre dann im Muskelstreifenexperiment unter solch einem Wirkmechanismus ebenfalls eine positive Inotropie zu erwarten.

Insgesamt bleibt die Wirkungsweise von ENO114 zunächst noch spekulativ. Tatsache bleibt jedoch, dass ENO114 im fluoreszenzoptischen Versuch mit Rattenzellen eine signifikant erhöhte Kontraktilität bewirkt und somit ein interessanter Wirkstoff für kommende Untersuchungen bleibt.

4.1.2 GPZ003362

Die vorliegenden Daten zeigen, dass der SERCA2a-Modulator GPZ003362 sowohl im Einzelzell- als auch im Muskelstreifenexperiment einen positiv inotropen Effekt aufweist. Dieser kann durch eine Steigerung der SERCA2a-Funktion bedingt sein, da GPZ003362 sowohl jeweils in der Tendenz zu einer Beschleunigung des zytosolischen Kalziumabfalls als auch zu einer Steigerung des Koffein-induzierte Ca²⁺-Transienten als Hinweis für einen erhöhten SR Ca²⁺-Gehalt führt. Paradoxerweise kann ein Einfluss auf die Ca²⁺-Transienten-Amplitude und die Relaxationszeiten in beiden Versuchsreihen nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis unveränderter Kalziumtransienten trotz erhöhter SERCA2a-Aktivität ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Reilly et al. 2001 an einem Ratten-Modell, die zeigten, dass eine Überexpression der SERCA2a zwar zu einer Beschleunigung des Kalziumabfalls, nicht aber zu erhöhten Kalziumtransienten führen. Dem gegenüber stehen allerdings mehrheitlich Studien mit erhöhten Kalziumtransienten durch Gen-therapeutische SERCA2a-Überexpression (Hajjar et al. 1997; Baker et al. 1998; Yao et al. 1998; Müller et al. 2003). Aufgrund des nicht eindeutigen Einflusses von GPZ003362 auf den Ca²⁺-Haushalt sind auch bei diesem SERCA2a-Modulator Off-Target-Effekte nicht auszuschließen. Ähnlich wie bei dem SERCA2a-Modulator ENO114 wäre eine erhöhte Kalziumsensitivierung der Myofilamente durch GPZ003362 denkbar, die unabhängig vom Ca²⁺-Haushalt zu einer erhöhten Kontraktilität sowohl im Einzelzellexperiment der Ratte als auch Muskelstreifenexperiment führen könnte.

Ob GPZ003362 über eine Steigerung der SERCA2a-Funktion oder über mögliche Off-Target-Effekte zu der positiven Inotropie führt, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

4.2 SERCA2a-Modulatoren ohne nachweisbaren Effekt auf die Kontraktilität

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die SERCA2a-Modulatoren ENF018, ENO166, ENO187, ENO207, GPZ000876, GPZ001441 und GPZ007738 im fluoreszenzoptischen Versuch mit Kardiomyozyten aus Rattenherzen weder einen Einfluss auf die Kontraktilität noch einen wesentlichen Effekt auf die SERCA2a-Aktivität aufweisen.

Als Ursache dieser Ergebnisse kommen zum einen Stoff-bedingte Eigenschaften und zum anderen methodische Bedingungen in Betracht. Eine methodisch bedingte Ursache kann beispielsweise die äußere Zellmembran der Kardiomyozyten sein, da sie die Passage bzw. Diffusion der SERCA2a-Modulatoren zum SR verhindern könnte. Dieses potentielle Hindernis könnte experimentell durch eine Erweiterung der in dieser Arbeit verwandten Methode umgangen werden, indem eine Porenbildung in der äußeren Zellmembran geschaffen würde, wie z. B. durch den Gebrauch von β-escin. β-escin permeabilisiert selektiv die äußere Zellmembran, indem es mit Cholesterinmolekülen Komplexe bildet. So kommt es in der äußeren Zellmembran, die einen zehn Mal höheren Gehalt an Cholesterinmolekülen aufweist als die Membran des SR, zu einer selektiven Porenbildung (Thelestam und Möllby, 1979). Allerdings wäre eine solche Anwendung am Menschen nicht möglich und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht angewendet.

Ferner ist eine potentiell nicht hinreichende Löslichkeit der Stoffe in Normaltyrode als mögliche methodisch-bedingte Ursache der genannten Ergebnisse in Erwägung zu ziehen. Zwar wurde beim Arbeiten mit den Stoffen auf eine makroskopische Löslichkeit geachtet, diese wurde aber nicht im Speziellen getestet. Die Bestimmung der Löslichkeit hätte mithilfe von Leitfähigkeitsmessungen durch ein Konduktometer erfolgen können.

Eine weitere Ursache könnte in der Wahl der Versuchskonzentrationen von $0,1~\mu\text{M},~1~\mu\text{M}$ und $10~\mu\text{M}$ bestehen. Bei der Planung der Experimente wurde ein für die Testung von Medikamenten gängiges Konzentrationsfenster gewählt, dennoch ist nicht auszuschließen, dass ein optimaler Konzentrationsbereich verfehlt wurde.

Ein Beispiel für eine Stoff-bedingte Ursache könnte sein, dass die genannten SERCA2a-Modulatoren zwar aufgrund der mutmaßlichen strukturbedingten Affinität an die SERCA2a binden, jedoch keine Änderung ihrer Aktivität bewirken. Eine Änderung der SERCA2a-Aktivität wäre beispielsweise potentiell bei einer Wechselwirkung des SERCA2a-Modulators nahe der Bindungsstelle des Phospholambans denkbar, da auf diese Weise die Interaktion zwischen SERCA2a und Phospholamban gestört würde. Zuletzt kommt auch die strukturbedingte Unfähigkeit der SERCA2a-Modulatoren, tatsächlich an die SERCA2a zu binden, als Ursache der Ergebnisse in Betracht.

Die SERCA2a-Modulatoren ENO107, ENO185 und ENO209 weisen in Zusammenschau der Ergebnisse ebenfalls keinen wesentlichen Effekt auf die Kontraktilität und SERCA2a-Aktivität auf. Da bei den genannten Stoffen im fluoreszenzoptischen Versuch mit Kardiomyozyten aus Rattenherzen zwar eine tendenzielle Zunahme der Kontraktilität dokumentiert werden konnte, bot dies Anlass, die genannten Modulatoren im Hinblick auf SR Ca²⁺-Gehalt und Auswirkung auf humane Muskelstreifen näher zu untersuchen. In Zusammenschau mit diesen Ergebnissen, die weder einen Einfluss auf die Kontraktilität der Muskelstreifen noch

einen wesentlichen Effekt auf den SR Ca²⁺-Gehalt zeigen, ist jedoch am ehesten ebenfalls von einem nicht vorhandenen Effekt auf die SERCA2a-Aktivität auszugehen. Eine spekulative Ursache der erhöhten Kontraktilität im Einzelzellexperiment könnte ein Wirkmechanismus sein, der eine positive Inotropie unabhängig vom Ca²⁺-Haushalt verursacht. Hierzu würde z. B. eine erhöhte Sensitivität der Myofilamente für Kalzium zählen. In diesem Fall müsste die unbeeinflusste Kontraktilität im Muskelstreifenexperiment damit begründet werden, dass die SERCA2a-Modulatoren ENO107, ENO185 und ENO209 beispielsweise aufgrund längerer Diffusionsstrecken ihre Wirkung am insuffizienten Muskelzellverband nicht entfalten können. Da die Ergebnisse bezüglich der Kontraktilität im Einzelzellexperiment nicht signifikant sind und die Streubreiten insbesondere bei den SERCA2a-Modulatoren ENO185 und ENO107 sehr groß ausfallen, sind methodischexperimentelle Ursachen für die vermeintlich positive Inotropie iedoch wahrscheinlichsten.

Separat zu diskutieren sind außerdem die Ergebnisse des SERCA2a-Modulatoren ENF018: Dieser zeigt im Einzelzellexperiment mit Rattenzellen einen signifikant reduzierten Ca^{2+} -Transienten bei höchster untersuchter Konzentration von 10 μ M. Verminderte Ca^{2+} -Transienten würden erwartungsgemäß – sei es beispielsweise durch eine Hemmung der SERCA2a-Aktivität oder durch einen anderen Wirkmechanismus – mit einer verminderten Kontraktilität einhergehen. Paradoxer Weise bleiben jedoch sowohl die Kontraktilität als auch die Relaxationszeit und der Kalziumabfallsexponent τ durch ENF018 unbeeinflusst.

Eine Interpretation der Ergebnisse ist allein basierend auf den hier durchgeführten funktionellen Untersuchungen nicht möglich. Aufgrund der Vielfältigkeit und Widersprüchlichkeit der Messergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass Off-Target-Effekte - entweder separat oder zusätzlich zur SERCA2a-Modulation - vorliegen, die mittels der durchgeführten funktionellen Experimente nicht getestet wurden.

4.3 Negativ inotrope SERCA2a-Modulatoren

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die SERCA2a-Modulatoren ENG020, ENH036, ENL055, ENL056 und GPZ006800 die Kontraktilität von Kardiomyozyten dosisabhängig reduzieren.

Da sich die SERCA2a-Modulatoren durch eine strukturbedingte Affinität zur SERCA2a auszeichnen, ist am ehesten von einer Inihibition der SERCA2a als Ursache der Reduktion der myokardialen Kontraktilität auszugehen. Erwartungsgemäß würde eine Hemmung der SERCA2a-Aktivität sowohl zu einer verlangsamten Relaxationszeit und Ca²⁺-Elimination führen als auch zu einer verminderten Kontraktilität und einem verminderten Ca²⁺-Transienten. Derartige Parameter-Veränderungen durch eine Hemmung der SERCA2a-

Aktivität konnten mehrere Arbeitsgruppen belegen, die in Versuchen an isolierten Herzmuskelzellen der Ratte Thapsigargin – einen bekannten Inhibitor der SERCA2a – verwendeten (Davia et al. 1997; Li et al. 2005; Bode et al. 2011).

Während der SERCA2a-Modulator ENH036 vergleichbare Effekte wie Thapsigargin aufweist und somit von einer Hemmung der SERCA2a-Aktivität durch ENH036 ausgegangen werden kann, weisen die übrigen oben genannten SERCA2a-Modulatoren uneinheitliche Effekte bezüglich der genannten Parameter auf: Die Ergebnisse zeigen sowohl verminderte (ENG020), unveränderte (ENL056, ENL055) als auch tendenziell erhöhte (GPZ006800) Ca²⁺-Transienten trotz des gemeinsamen negativ inotropen Effektes. Allen Stoffen gemeinsam ist dagegen eine Verlangsamung der Kalziumelimination, die am ehesten auf eine Hemmung der SERCA2a hinweisen kann.

Aufgrund der uneinheitlichen und nicht signifikanten Ergebnisse kommen weitere Wirkmechanismen als Ursache der negativen Inotropie in Frage:

Reduzierte Kontraktilität bei unveränderten Ca²⁺-Transienten und Relaxationsparametern wie im Falle des SERCA2a-Modulators ENL056 könnte beispielsweise durch eine Hemmung der Aktin-Myosin-Interaktion hervorgerufen sein - ähnlich dem Wirkstoff Blebbistatin (Fedorov et al. 2007) - wobei diese detaillierte Untersuchung über den Gegenstand der vorliegenden Arbeit hinausgeht und deshalb nicht durchgeführt wurde.

Negative Inotropie einhergehend mit erhöhten Ca²⁺-Transienten wie bei dem SERCA2a-Modulator GPZ006800 erscheint paradox und möglicherweise nur durch eine Kombination unterschiedlicher Effekte erklärbar. Spekulativ wäre beispielsweise eine Kombination aus SERCA2a-Stimulation und Hemmung der Aktin-Myosin-Interaktion denkbar, wobei letzterer Effekt in Bezug auf die Kontraktilität überwiegen müsste. Aufgrund der insignifikanten Ergebnisse von GPZ003362 sind methodisch-experimentelle Ursachen für die vermeintlich erhöhten Kalziumtransienten jedoch am wahrscheinlichsten.

Eine weitere zu diskutierende Konstellation ergibt sich bei dem SERCA2a-Modulator ENL055: Während sich im Einzelexperiment mit Rattenzellen eine unveränderte bis tendenziell erhöhte Kontraktilität bei unveränderten Ca²⁺-Transienten zeigt, führt ENL055 am terminal insuffizienten humanen Herzen zu einer signifikant reduzierten Kraft bei verlangsamter Relaxation. Die Ursache für diese Diskrepanz zwischen deutlich negativer Inotropie im Muskelstreifenexperiment einerseits und dem nicht nachweisbaren Effekt auf Kontraktilität bzw. der tendenziellen Zunahme der Kontraktilität im Einzelzellexperiment andererseits ist möglicherweise der Umstand, dass die verwendeten humanen Herzen im Muskelstreifenexperiment bereits terminal insuffizient waren. Denkbar wäre, dass die gesunden Rattenzellen mit putativ normaler SERCA2a-Funktion den durch ENL055 hervorgerufenen und im humanen insuffizienten Myokard demaskierten SERCA2a-inhibierenden Effekt kompensieren können. Untersuchungen an einem genetisch

modifiziertem Mausmodell, bei dem das SERCA2a-kodierende Gen Atp2a2 exzidiert wurde und somit ein funktioneller SERCA2a-Knockout vorlag, konnten interessanterweise zeigen, dass ein kompletter Verlust der SERCA2a-Aktivität lediglich zu einer moderaten kardialen Dysfunktion ohne Zeichen einer Herzinsuffizienz führte. Die Ergebnisse zeigten, dass zum einen ein erhöhter Kalziumeinstrom über die L-Typ Ca²⁺-Kanäle und ein verminderter Ca²⁺-Ausstrom über den NCX und zum anderen eine erhöhte myofilamentäre Ansprechbarkeit auf Kalzium die Herzfunktion anfänglich erhalten kann (Andersson et al. 2009). Zu ähnlichen Ergebnissen waren vorher auch Brittsan et al. 2003 und Zaoh et al. 2006 gekommen, in deren Studien die SERCA2a-Aktivität mittels Gen-therapeutisch erzeugter, dauerhaft inhibierenden Formen von Phospholamban reduziert wurde. Durch ähnliche Mechanismen auch die unveränderte bzw. sogar leicht gesteigerte Kontraktilität Einzelexperiment mit den gesunden Rattenzellen erklärt werden. Eventuell wird der SERCA2a-inhibierende Effekt durch ENL055 in gesunden Rattenzellen durch erhöhte Ansprechbarkeit der Myofilamente auf Kalzium und durch einen erhöhten SR-unabhängigen Kalziumfluss kompensiert, wohingegen dieser Kompensationsmechanismus in den terminal insuffizienten Muskelstreifen womöglich nicht mehr funktioniert. Insgesamt wurden diese Effekte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht detailliert untersucht und bleiben deshalb spekulativ. Diese Theorie einschränkend muss außerdem erwähnt werden, dass derartige Kompensationsmechanismen wahrscheinlich erst nach einem gewissen Zeitraum eintreten. In den genannten Studien fanden die Experimente erst nach Ablauf mehrerer Wochen nach den jeweiligen Gen-Veränderungen statt.

Weiterhin könnte die Diskrepanz der Ergebnisse jedoch auch durch die unterschiedlichen Versuchsmethoden - mit Einzelzellen einerseits und Zellverbänden andererseits - bedingt sein. Beispielsweise können eine verlängerte Diffusionsstrecke sowie fibrosierte Areale im Muskelzellverband zu veränderten Effekten der SERCA2a-Modulatoren führen.

4.4 Klinischer Ausblick

Aufgrund der ungünstigen Effekte bisheriger Inotropika (siehe Kapitel 1.6) herrscht seit langem das Bestreben, Stoffgruppen zu finden, die vor allem langfristig die Kontraktionskraft des Herzens verbessern und dabei keine negativen Langzeiteffekte aufweisen.

Eine Steigerung der SERCA2a-Aktivität bietet diverse Vorteile gegenüber anderen Inotropika: Zum einen wird nicht nur die systolische, sondern auch die diastolische Funktion des Herzens verbessert. Außerdem wird die Energiebilanz positiv beeinflusst, so dass der Sauerstoffverbrauch des Herzens sinkt (del Monte et al. 2001; Sakata et al. 2007). Ferner führt eine Erhöhung der SERCA2a-Aktivität zu einer Verkürzung des Aktionpotentials, die eine Kalziumüberladung der Kardiomyozyten und somit Arrhythmien möglicherweise verhindern kann (Terracciano et al. 2002). Neben einer verbesserten linksventrikulären

Funktion konnten Fu et al. 2012 in einem Herzinsuffizienz-Modell mit Hunden auch reduzierte inflammatorische und Stress-assoziierte Proteine im Serum nachweisen.

Der bisherige Versuch, die SERCA2a-Aktivität mittels Gentransfer zu steigern, hat jedoch den Nachteil, dass es aufgrund des adenoviralen Gentransfers zu immunologischen Nebenwirkungen am Menschen kommen kann (Yang et al. 1994; Di Paolo et al. 2009).

Neuere Verfahren mittels humanem Parvovirus weisen zwar eine geringere immunologische Antwort auf, haben jedoch den Nachteil, dass die Geneinschleusung derzeit noch invasiv erfolgen muss (Jessup et al. 2011).

Aufgrund der theoretisch positiven Beeinflussung der Herzinsuffizienz durch eine Steigerung der SERCA2a-Aktivität wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nach neuen Wirkstoffen gesucht, die diese speziell stimulieren. Mit dem SERCA2a-Modulator GPZ003362 konnte tatsächlich ein neuer Stoff gefunden werden, der sowohl an isolierten Kardiomyozyten der Ratte als auch am humanen, insuffizienten Myokard positiv inotrop wirkt. Ferner ist auch der SERCA2a-Modulator ENO114 aufgrund seines eindeutig positiv inotropen Effektes an Rattenzellen ein weiterhin interessanter Wirkstoff. Bislang bleibt jedoch noch spekulativ, ob diese potentiellen neuen Inotropika ihre Wirkung tatsächlich über eine Steigerung der SERCA2a-Aktivität entfalten. Weitere Studien mit diesen möglicherweise bedeutungsvollen Wirkstoffen erscheinen daher sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Die verminderte Expression der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) ist ein bedeutender Mechanismus in der Pathogenese der Herzinsuffizienz. In den vergangenen Jahren rückte daher die Stimulation der SERCA2a als neuer therapeutischer Ansatz immer mehr in den Vordergrund.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von siebzehn neu entwickelten SERCA2a-Modulatoren auf die Kontraktilität und den Ca²⁺-Haushalt von isolierten Kardiomyozyten der Ratte im Einzellzellexperiment untersucht. Zur Einschätzung der SERCA2a-Aktivität wurden mittels Epifluoreszenzverfahren die Ca²⁺-Transientenamplitude, die Relaxationszeit, die Geschwindigkeit der Kalziumelimination aus dem Zytosol und die Koffein-induzierte Ca²⁺-Transientenamplitude als Maß für den SR- Ca²⁺-Gehalt gemessen.

Insgesamt ließen sich die Wirkstoffe bezüglich ihrer inotropen Eigenschaften in drei Gruppen einteilen: Es konnte gezeigt werden, dass fünf der insgesamt siebzehn SERCA2a-Modulatoren die Kontraktilität im Einzelzellexperiment dosisabhängig reduzieren. Der Einfluss auf den Ca²⁺-Haushalt war bei diesen Wirkstoffen uneinheitlich. Weitere zehn Wirkstoffe wiesen keinen wesentlichen Effekt auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten auf. Letztendlich konnten zwei SERCA2a-Modulatoren identifiziert werden, die die Kontraktilität von isolierten Kardiomyozyten der Patte dosisabhängig erhöhen. Als Hinweis auf eine

von isolierten Kardiomyozyten der Ratte dosisabhängig erhöhen. Als Hinweis auf eine gesteigerte SERCA2a-Aktivität zeigte der SERCA2a-Modulator GPZ003362 sowohl eine Beschleunigung des intrazellulären Kalziumabfalls als auch eine Erhöhung des SR Ca²+-Gehaltes. Ein Einfluss auf die Ca²+-Transienten und auf die Relaxationszeiten waren jedoch nicht nachweisbar. Zur weiteren Klärung der klinischen Relevanz wurden die potentiellen Inotropika auch hinsichtlich ihres Effekts auf die Kontraktionskraft von humanen terminal insuffizienten ventrikulären Muskelstreifen untersucht. GPZ003362 wies hier ebenfalls einen positiv inotropen Effekt auf. Aufgrund der uneinheitlichen Einflüsse auf den Ca²+-Haushalt bleibt allerdings unklar, ob der SERCA2a-Modulator GPZ003362 seine Wirkung tatsächlich über eine Steigerung der SERCA2a-Aktivität entfaltet oder ob ein anderer Wirkmechanismus vorliegt. Der SERCA2a-Modulator ENO114 wies im Einzelzellexperiment ebenfalls einen positiv inotropen Effekt auf. Im Muskelstreifenexperiment mit terminal insuffizientem Myokard konnte eine dosisabhängige Beschleunigung der Relaxation gezeigt werden, die auf eine gesteigerte SERCA2a-Aktivität hinweisen könnte. Ein wesentlicher Effekt auf die Kontraktiltät der Muskelstreifen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Angesichts der weiterhin schlechten Prognose und der limitierten Therapiemöglichkeiten der Herzinsuffizienz könnten die SERCA2a-Modulatoren GPZ003362 und ENO114 eine neue Therapieoption darstellen. Weiterführende Arbeiten sind notwendig, um den Wirkmechanismus dieser Stoffe aufzuklären und ihre Relevanz für die Therapie der Herzinsuffizienz einzuschätzen.

6 Literaturverzeichnis

Ahlquist RP (1976): Present state of alpha- and beta-adrenergic drugs I. The adrenergic receptor. Am Heart J 92, 661-664

Ahmed A, Rich MW, Fleg JL, Zile MR, Young JB, Kitzman DW, Love TE, Aronow WS, Adams KF Jr, Gheorghiade M (2006): Effects of digoxin on morbidity and mortality in diastolic heart failure: the ancillary digitalis investigation group trial. Circulation <u>114</u>, 397-403

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. Circ Res 97, 1314-1322

Allen DG, Kurihara S (1982): The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. J Physiol <u>327</u>, 79-94

Allen DG, Kentish JC (1985): The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. J Mol Cell Cardiol <u>17</u>, 821-840

Alpert NR, Gordon MS (1962): Myofibrillar adenosine triphosphatase activity in congestive heart failure. Am J Physiol <u>202</u>, 940-946

Andersson KB, Birkeland JA, Finsen AV, Louch WE, Sjaastad I, Wang Y, Chen J, Molkentin JD, Chien KR, Sejersted OM (2009): Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the Serca2 gene. J Mol Cell Cardiol <u>47</u>, 180-187

Baartscheer A, Schumacher CA, Belterman CN, Coronel R, Fiolet JW (2003): SR calcium handling and calcium after-transients in a rabbit model of heart failure. Cardiovasc Res <u>58</u>, 99-108

Baker DL, Hashimoto K, Grupp IL, Ji Y, Reed T, Loukianov E, Grupp G, Bhagwhat A, Hoit B, Walsh R (1998): Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. Circ Res <u>83</u>, 1205-1214

Belevych A, Kubalova Z, Terentyev D, Hamlin RL, Carnes CA, Györke S (2007): Enhanced ryanodine receptor-mediated calcium leak determines reduced sarcoplasmic reticulum calcium content in chronic canine heart failure. Biophys J 93, 4083-4092

Bendersky R, Chatterjee K, Parmley WW, Brundage BH, Ports TA (1981): Dobutamine in chronic ischemic heart failure: alterations in left ventricular function and coronary hemodynamics. Am J Cardiol 48, 554-558

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

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

Bers DM, Pogwizd SM, Schlotthauer K (2002): Upregulated Na/Ca exchange is involved in both contractile dysfunction and arrhythmogenesis in heart failure. Basic Res Cardiol <u>97</u>, 36-42

Beuckelmann DJ, Erdmann E (1992): Ca²⁺-currents and intracellular [Ca²⁺]i-transients in single ventricular myocytes isolated from terminally failing human myocardium. Basic Res Cardiol 87, 235-243

Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1993): Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. Circ Res <u>73</u>, 379-385

Beuckelmann DJ, Näbauer M, Krüger C, Erdmann E (1995): Altered diastolic [Ca²⁺]i handling in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. Am Heart J <u>129</u>, 684-689

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

Bode EF, Briston SJ, Overend CL, O'Neill SC, Trafford AW, Eisner DA (2011): Changes of SERCA activity have only modest effects on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in rat ventricular myocytes. J Physiol 589, 4723-4729

Bowditch H (1871): Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. Arb Physiol Inst Lpz 6, 139-176

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

Brittsan AG, Ginsburg KS, Chu G, Yatani A, Wolska BM, Schmidt AG, Asahi M, MacLennan DH, Bers DM, Kranias EG (2003): Chronic SR Ca²⁺-ATPase inhibition causes adaptive changes in cellular Ca²⁺ transport. Circ Res 92, 769-776

Brixius K, Reicke S, Reuter H, Schwinger RH (2002): Effects of the Ca²⁺ sensitizers EMD 57033 and CGP 48506 on myocardial contractility and Ca²⁺ transients in human ventricular and atrial myocardium. Z Kardiol 91, 312-318

Brodde OE (1991): Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure Pharmacol Rev. 43, 203-242

Brodde OE, Broede A, Daul A, Kunde K, Michel MC (1992): Receptor systems in the non-failing human heart. Basic Res Cardiol <u>87</u>, 1-14

Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC (2011): Epidemiology and risk profile of heart failure. Nat. Rev. Cardiol 8, 30–41

Burger AJ, Horton DP, LeJemtel T, Ghali JK, Torre G, Dennish G, Koren M, Dinerman J, Silver M, Cheng ML (2002): Effect of nesiritide (B-type natriuretic peptide) and dobutamine on ventricular arrhythmias in the treatment of patients with acutely decompensated congestive heart failure: the PRECEDENT study. Am Heart J 144, 1102-1108

Byrne MJ, Power JM, Preovolos A, Mariani JA, Hajjar RJ, Kaye DM (2008): Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. Gene Ther 5, 1550-1557

Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO, Mintzer MC (1983): Purification and characterization of calsequestrin from canine cardiac sarcoplasmic reticulum and identification of the 53,000 dalton glycoprotein. J Biol Chem 258, 1197-204.

Chang HY, Klein RM, Kunos G (1982): Selective desensitization of cardiac beta adrenoceptors by prolonged in vivo infusion of catecholamines in rats. J Pharmacol Exp Ther 221, 784-789

Chatterjee K (2005): Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. Am J Cardiol 95, 8-13

Chen Y, Escoubet B, Prunier F, Amour J, Simonides WS, Vivien B, Lenoir C, Heimburger M, Choqueux C, Gellen B (2004): Constitutive cardiac overexpression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase delays myocardial failure after myocardial infarction in rats at a cost of increased acute arrhythmias. Circulation <u>109</u>, 1898-1903 Cohen CJ, Fozzard HA, Sheu SS (1982): Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle. Circ Res <u>50</u>, 651-662

Colucci WS, Leatherman GF, Ludmer PL, Gauthier DF (1987): Beta-adrenergic inotropic responsiveness of patients with heart failure: studies with intracoronary dobutamine infusion. Circ Res 61, 82-86

Colyer J (1998): Phosphorylation states of phospholamban. Ann N Y Acad Sci 853, 79-91

Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS (1999): Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxinsensitive G protein. Circulation 100, 2210-2212

Cuffe MS, Califf RM, Adams KF Jr, Benza R, Bourge R, Colucci WS, Massie BM, O'Connor CM, Pina I, Quigg R (2002): Short-term intravenous milrinone for acute exacerbation of chronic heart failure: a randomized controlled trial. JAMA 287, 1541-1547

Curran J, Hinton MJ, Ríos E, Bers DM, Shannon TR (2007): Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. Circ Res <u>100</u>, 391-398

Cutler MJ, Wan X, Plummer BN, Liu H, Deschenes I, Laurita KR, Hajjar RJ, Rosenbaum DS (2012): Targeted sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2a gene delivery to restore electrical stability in the failing heart. Circulation <u>126</u>, 2095-2104

Dash R, Frank KF, Carr AN, Moravec CS, Kranias EG (2001): Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-handling in failing human myocardium. J Mol Cell Cardiol <u>33</u>, 1345-1353

Davia K, Davies CH, Harding SE (1997): Effects of inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium uptake on contraction in myocytes isolated from failing human ventricle. Cardiovasc Res <u>33</u>, 88-97

De Munari S, Cerri A, Gobbini M, Almirante N, Banfi L, Carzana G, Ferrari P, Marazzi G, Micheletti R, Schiavone A (2003): Structure-based design and synthesis of novel potent Na⁺,K⁺ -ATPase inhibitors derived from a 5alpha,14alpha-androstane scaffold as positive inotropic compounds. J Med Chem <u>46</u>, 3644-3654

del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ (1999): Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. Circulation 100, 2308-2311

del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ (2001): Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in a rat model of heart failure. Circulation 104, 1424-1429

del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, Tsuji T, Doye AA, Gwathmey JK, Hajjar RJ (2004): Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 5622-5627

Di Paolo NC, Miao EA, Iwakura Y, Murali-Krishna K, Aderem A, Flavell RA, Papayannopoulou T, Shayakhmetov DM (2009): Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo. Immunity 31, 110-121

Drop LJ (1985): Ionized calcium, the heart, and hemodynamic function. Anesth Analg $\underline{64}$, 432-51

Ebashi S, Masaki T, Tsukui R (1974): Cardiac contractile proteins. Adv Cardiol 12, 59-69

Endoh M (1991): Physiological and pathophysiological modulation of calcium signaling in myocardial cells. Jpn Circ J <u>55</u>, 1108-1117

Endoh M (2008): Cardiac Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ sensitizers. Circ J 72, 1915-1925

Ezzaher A, el Houda Bouanani N, Crozatier B (1992): Force-frequency relations and response to ryanodine in failing rabbit hearts. Am J Physiol 263, 1710-1715

Fabiato A, Fabiato F (1973): Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardioactive drugs. Eur J Cardiol <u>1</u>, 143-155

Fedorov VV, Lozinsky IT, Sosunov EA, Anyukhovsky EP, Rosen MR, Balke CW, Efimov IR (2007): Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. Heart Rhythm 4, 619-626

Ferrans VJ, Maron BJ, Jones M, Thiedemann KU (1976): Ultrastructural aspects of contractile proteins in cardiac hypertrophy and failure. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab 12, 129-140

Fisch C, Knoebel SB (1985): Digitalis cardiotoxicity. J Am Coll Cardiol 5, 91-98

Flesch M, Schwinger RH, Schiffer F, Frank K, Südkamp M, Kuhn-Regnier F, Arnold G, Böhm M (1996): Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na⁺- Ca²⁺ exchanger in failing human myocardium. Circulation <u>94</u>, 992-1002

Frank O (1895): Zur Dynamik des Herzmuskels. Z Biol 32, 370–477

Fu ZQ, Li XY, Liu XH, Sun S, Liu T, Mi YF, Zhou SA, Ye WH, Wang QS (2008): Overexpression of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase induced hemodynamic and proteomic changes in a dog model of heart failure. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi 36, 260-265

Fu ZQ, Li XY, Lu XC, Mi YF, Liu T, Ye WH (2012): Ameliorated stress related proteins are associated with improved cardiac function by sarcoplasmic reticulum calcium ATPase gene transfer in heart failure. J Geriatr Cardiol <u>9</u>, 269-277

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS (2013): Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics -2013 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation <u>127</u>, 143-152

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

Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Pogoda JM, Provost R, Guerrero J, Hajjar RJ, Zsebo KM (2016): Prevalence of AAV1 neutralizing antibodies and consequences for a clinical trial of gene transfer for advanced heart failure. Gene Ther <u>23</u>, 313-319

Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975): Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. J Clin Invest <u>56</u>, 56-64

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem <u>260</u>, 3440-3450

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

Haikala H, Kaivola J, Nissinen E, Wall P, Levijoki J, Lindén IB (1995): Cardiac troponin C as a target protein for a novel calcium sensitizing drug, levosimendan. J Mol Cell Cardiol <u>27</u>, 1859-1866

Hajjar RJ, Kang JX, Gwathmey JK, Rosenzweig A (1997): Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. Circulation 95, 423-429

Hasenfuss G, Pieske B (2002): Calcium cycling in congestive heart failure. J Mol Cell Cardiol 34, 951-969

Hasenfuss G, Mulieri LA, Holubarsch C, Pieske B, Just H, Alpert NR (1992): Energetics of calcium cycling in nonfailing and failing human myocardium. Basic Res Cardiol 87, 81-92

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994): Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. Circ Res <u>75</u>, 434-442

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999): Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. Circulation 99, 641-648

Hauptman PJ, Kelly RA (1999): Digitalis. Circulation 99, 1265-1270

Herzig JW, Chiesi M, Depersin H, Grüninger S, Hasenfuss G, Kubalek R, Leutert T, Pieske B, Pioch K, Wenk P (1996): Ca²⁺ sensitization in idiopathic dilated human myocardium. Differential in vitro effects of (+)-(5-methyl-6-phenyl)-1,3,5,6-tetrahydro-3,6-methano-1,5-benzodiazocine-2,4-dione, a novel purely Ca²⁺ sensitizing agent, and (+)-5-(1-(3,4-dimethoxybenzoyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)-6-methyl-3, 6-dihydro-2H-1,3,4-thiadiazin-2-one on skinned fibres and isolated ventricular strips. Arzneimittelforschung 46, 586-593

Hobai IA, O'Rourke B (2001): Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. Circulation 103, 1577-1584

Holubarsch C, Hasenfuss G, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Pieske B, Ruf T, Fasol R, Just H (1993): Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium. An in vitro study under physiological experimental conditions. Circulation <u>88</u>, 1228-1237

Holubarsch C, Ruf T, Goldstein DJ, Ashton RC, Nickl W, Pieske B, Pioch K, Lüdemann J, Wiesner S, Hasenfuss G (1996): Existence of the Frank-Starling mechanism in the failing human heart. Investigations on the organ, tissue, and sarcomere levels. Circulation <u>94</u>, 683-689

Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E (2005): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Z Kardiol 94, 488-509

Hove-Madsen L, Bers DM (1993): Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes. Circ Res 73, 820-828

Hulme JT, Orchard CH (1998): Effect of acidosis on Ca²⁺ uptake and release by sarcoplasmic reticulum of intact rat ventricular myocytes. Am J Physiol <u>275</u>, 977-987

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

Ibrahim M, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM (2011): The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. Proc Biol Sci 278, 2714-2723

Inesi G (1985): Mechanism of calcium transport. Annu Rev Physiol 47, 573-601

James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E (1989): Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. Nature <u>342</u>, 90-92

Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Dittrich H, Hajjar RJ (2011): Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. Circulation <u>124</u>, 304-313

Johnson I, Spence MTZ: Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 11. Auflage; Life Technologies Corporation, Carlsbad 2010

Junqueira LC, Carneiro J: Histologie. 6. Auflage; Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg 2005

Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, Hadri L, Yoneyama R, Hoshino K, Takewa Y (2008): Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. J Am Coll Cardiol <u>51</u>, 1112-1119

Kim HW, Steenaart NA, Ferguson DG, Kranias EG (1990): Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles. J Biol Chem <u>265</u>, 1702-1709

Kohl C, Schmitz W, Scholz H, Scholz J, Tóth M, Döring V, Kalmár P (1989): Evidence for alpha 1-adrenoceptor-mediated increase of inositol trisphosphate in the human heart. J Cardiovasc Pharmacol 13, 324-327

Kohlhaas M: Die Bedeutung der subzellulären CaMKIIδ-Überexpression auf den intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsel in Herzmuskelzellen. Biol. Diss. Göttingen 2006

Komamura K, Shannon RP, Ihara T, Shen YT, Mirsky I, Bishop SP, Vatner SF (1993): Exhaustion of Frank-Starling mechanism in conscious dogs with heart failure. Am J Physiol 265, 1119-1131

Koss KL, Grupp IL, Kranias EG (1997): The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. Basic Res Cardiol 92, 17-24

Kranias EG, Di Salvo J (1986): A phospholamban protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem <u>261</u>, 10029-10032

Lakowicz JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3. Auflage; Springer Verlag, New York 2006

Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. Pflügers Arch 61, 291-332

Leblanc N, Hume JR (1990): Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. Science <u>248</u>, 372-376

Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS (2002): Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. N Engl J Med 347, 1397-1402

Li GR, Lau CP, Ducharme A, Tardif JC, Nattel S (2002): Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283, 1031-1041

Li SY, Golden KL, Jiang Y, Wang GJ, Privratsky JR, Zhang X, Eason AR, Culver B, Ren J (2005): Inhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase differentially regulates contractile function in cardiac myocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of Ca²⁺ regulatory proteins. Cell Biochem Biophys <u>42</u>, 1-12

Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ (1998): Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. J Mol Cell Cardiol 30, 743-749

Loewenstein WR (1981): Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. Physiol Rev <u>61</u>, 829-913

Lompré AM, Anger M, Levitsky D (1994): Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. J Mol Cell Cardiol <u>26</u>, 1109-1121

Lyon AR, Bannister ML, Collins T, Pearce E, Sepehripour AH, Dubb SS, Garcia E, O'Gara P, Liang L, Kohlbrenner E (2011): SERCA2a gene transfer decreases sarcoplasmic reticulum calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure. Circ Arrhythm Electrophysiol 4, 362-372

Mackiewicz U, Lewartowski B (2008): The effect of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak on contractile activity of guinea pig heart myocytes depends in activity of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and Na⁺/ Ca²⁺ exchanger. J Physiol Pharmacol 59, 287-300

MacLennan DH (1990): Molecular tools to elucidate problems in excitation-contraction coupling. Biophys J <u>58</u>, 1355-1365

Mager G, Klocke RK, Kux A, Höpp HW, Hilger HH (1991): Phosphodiesterase III inhibition or adrenoreceptor stimulation: milrinone as an alternative to dobutamine in the treatment of severe heart failure. Am Heart J 121, 1974-1983

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, Bers DM, Pieske B (2000): Differences in Ca²⁺-handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-content in isolated rat and rabbit myocardium. J Mol Cell Cardiol <u>32</u>, 2249-2258

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKIIdeltaC overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. Circ Res <u>92</u>, 904-911

Maier LS, Wahl-Schott C, Horn W, Weichert S, Pagel C, Wagner S, Dybkova N, Müller OJ, Näbauer M, Franz WM (2005): Increased SR Ca²⁺ cycling contributes to improved contractile performance in SERCA2a-overexpressing transgenic rats. Cardiovasc Res <u>67</u>, 636-646

Mariani JA, Smolic A, Preovolos A, Byrne MJ, Power JM, Kaye DM (2011): Augmentation of left ventricular mechanics by recirculation-mediated AAV2/1-SERCA2a gene delivery in experimental heart failure. Eur J Heart Fail 13, 247-253

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit 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

Mattera GG, Lo Giudice P, Loi FM, Vanoli E, Gagnol JP, Borsini F, Carminati P (2007): Istaroxime: a new luso-inotropic agent for heart failure. Am J Cardiol <u>99</u>, 33-40

McMurray J (1996): Concise Guide to the Management of Heart Failure – World health Organization/Council on Geriatric Cardiology Task Force on Heart Failure Education. Am J Geriatr Cardiol 5, 13-30

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

Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990): Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. J Clin Invest 85, 305-309

Meyer M, Dillmann WH (1998): Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase overexpression by adenovirus mediated gene transfer and in transgenic mice. Cardiovasc Res <u>37</u>, 360-366

Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. Circulation <u>92</u>, 778-784

Mi YF, Li XY, Tang LJ, Lu XC, Fu ZQ, Ye WH (2009): Improvement in cardiac function after sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene transfer in a beagle heart failure model. Chin Med J (Engl) 122, 1423-1428

Micheletti R, Mattera GG, Rocchetti M, Schiavone A, Loi MF, Zaza A, Gagnol RJ, De Munari S, Melloni P, Carminati P (2002): Pharmacological profile of the novel inotropic agent (E,Z)-3-((2-aminoethoxy)imino)androstane-6,17-dione hydrochloride (PST2744). J Pharmacol Exp Ther 303, 592-600

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

Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, Guerrero JL, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ (2000): Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A <u>97</u>, 793-798

Moiseyev VS, Põder P, Andrejevs N, Ruda MY, Golikov AP, Lazebnik LB, Kobalava ZD, Lehtonen LA, Laine T, Nieminen MS (2002): Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN). Eur Heart J 23, 1422-1432

Möllmann H, Schmidt-Schweda S, Nef H, Möllmann S, Burstin JV, Klose S, Elsässer A, Holubarsch CJ (2007): Contractile effects of angiotensin and endothelin in failing and non-failing human hearts. Int J Cardiol 114, 34-40

Morgan JP, Erny RE, Allen PD, Grossman W, Gwathmey JK (1990): Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. Circulation <u>81</u>, 21-32

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

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

Müller OJ, Lange M, Rattunde H, Lorenzen HP, Müller M, Frey N, Bittner C, Simonides W, Katus HA, Franz WM (2003): Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. Cardiovasc Res <u>59</u>, 380-389

Nawrath H (1989): Adrenoceptor-mediated changes of excitation and contraction in isolated heart muscle preparations. J Cardiovasc Pharmacol 14, 1-10

Nieminen MS, Altenberger J, Ben-Gal T, Böhmer A, Comin-Colet J, Dickstein K, Edes I, Fedele F, Fonseca C, García-González MJ (2014): Repetitive use of levosimendan for treatment of chronic advanced heart failure: clinical evidence, practical considerations, and perspectives: an expert panel consensus. Int J Cardiol <u>174</u>, 360-367

Nikolaidis LA, Trumble D, Hentosz T, Doverspike A, Huerbin R, Mathier MA, Shen YT, Shannon RP (2004): Catecholamines restore myocardial contractility in dilated cardiomyopathy at the expense of increased coronary blood flow and myocardial oxygen consumption (MvO2 cost of catecholamines in heart failure). Eur J Heart Fail 6, 409-419

Olivetti G, Melissari M, Balbi T, Quaini F, Cigola E, Sonnenblick EH, Anversa P (1994): Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodelling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure. Cardiovasc Res <u>28</u>, 1199-1208

Packer M (1992): The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. J Am Coll Cardiol 20, 248-254

Periasamy M, Kalyanasundaram A (2007): SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. Muscle Nerve <u>35</u>, 430-442

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

Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G (1999 a): Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. Circulation <u>99</u>, 1802-1809

Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G (1999 b): Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. Circ Res <u>85</u>, 38-46

Pieske B, Maier LS, Piacentino V 3rd, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S (2002): Rate dependence of [Na⁺]i and contractility in nonfailing and failing human myocardium. Circulation 106, 447-453

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

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM (2001): Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. Circ Res 88, 1159-1167

Potter JD, Gergely J (1974): Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. Biochemistry <u>13</u>, 2697-2703

Prunier F, Kawase Y, Gianni D, Scapin C, Danik SB, Ellinor PT, Hajjar RJ, Del Monte F (2008): Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion. Circulation 118, 614-624

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

Reilly AM, Petrou S, Panchal RG, Williams DA (2001): Restoration of calcium handling properties of adult cardiac myocytes from hypertrophied hearts. Cell Calcium <u>30</u>, 59-66

Rocchetti M, Besana A, Mostacciuolo G, Micheletti R, Ferrari P, Sarkozi S, Szegedi C, Jona I, Zaza A (2005): Modulation of sarcoplasmic reticulum function by Na⁺/K⁺ pump inhibitors with different toxicity: digoxin and PST2744 [(E,Z)-3-((2-aminoethoxy)imino)androstane-6,17-dione hydrochloride]. J Pharmacol Exp Ther 313, 207-215

Rokita AG: Der Einfluss der konditionalen Überexpression der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) im Herzen auf die Kontraktilität und den Kalzium-Stoffwechsel von ventrikulären Herzmuskelzellen. Med. Diss. Göttingen 2008

Sabbah HN, Imai M, Cowart D, Amato A, Carminati P, Gheorghiade M (2007): Hemodynamic properties of a new-generation positive luso-inotropic agent for the acute treatment of advanced heart failure. Am J Cardiol 99, 41-46

Sakata S, Lebeche D, Sakata N, Sakata Y, Chemaly ER, Liang LF, Tsuji T, Takewa Y, del Monte F, Peluso R (2007): Restoration of mechanical and energetic function in failing aortic-banded rat hearts by gene transfer of calcium cycling proteins. J Mol Cell Cardiol <u>42</u>, 852-861

Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bøkenes J, Tønnessen T, Holt E, Lunde PK, Christensen G (2002): Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. Cardiovasc Res <u>53</u>, 382-391

Satoh H, Blatter LA, Bers DM (1997): Effects of [Ca²⁺]i, SR Ca²⁺ load, and rest on Ca²⁺ spark frequency in ventricular myocytes. Am J Physiol 272, 657-668

Schatzmann HJ (1989): The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum. Annu Rev Physiol <u>51</u>, 473-485

Schlotthauer K, Bers DM (2000): Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. Circ Res <u>87</u>, 774-780

Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK (1999): Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca²⁺-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. Am J Physiol <u>277</u>, 474-480

Schwinger RH, Böhm M, Koch A, Schmidt U, Morano I, Eissner HJ, Uberfuhr P, Reichart B, Erdmann E (1994): The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. Circ Res 74, 959-969

Schwinger RH, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999): Reduced Ca²⁺-sensitivity of SERCA2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. J Mol Cell Cardiol 31, 479-491

Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM (2003): Elevated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. Circ Res 93, 592-594

Shiels HA, White E (2008): The Frank-Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. J Exp Biol <u>211</u>, 2005-2013

Shull GE (2000): Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases. Eur J Biochem <u>267</u>, 5284-5290

Slawsky MT, Colucci WS, Gottlieb SS, Greenberg BH, Haeusslein E, Hare J, Hutchins S, Leier CV, LeJemtel TH, Loh E (2000): Acute hemodynamic and clinical effects of levosimendan in patients with severe heart failure. Study Investigators. Circulation 102, 2222-2227

Soltysinska E, Thiele S, Olesen SP, Osadchii OE (2011): Chronic sympathetic activation promotes downregulation of β -adrenoceptor-mediated effects in the guinea pig heart independently of structural remodeling and systolic dysfunction. Pflugers Arch <u>462</u>, 529-543

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 <u>107</u>, 1150-1161

Starling EH: The linacre Lecture on the Law of the Heart. Longmans, Green and Co., London 1918

Stüdeli R, Jung S, Mohacsi P, Perruchoud S, Castiglioni P, Wenaweser P, Heimbeck G, Feller M, Hullin R (2006): Diastolic dysfunction in human cardiac allografts is related with reduced SERCA2a gene expression. Am J Transplant 6,775-782

Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac Na⁺- Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. Circ Res <u>75</u>, 443-453

Tada M, Katz AM (1982): Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. Annu Rev Physiol <u>44</u>, 401-423

Tada M, Yamamoto T, Tonomura Y (1978): Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. Physiol Rev 58, 1-79

Takahashi M, Sasayama S, Kawai C, Kotoura H (1980): Contractile performance of the hypertrophied ventricle in patients with systemic hypertension. Circulation <u>62</u>, 116-126

Teerlink JR (2009): A novel approach to improve cardiac performance: cardiac myosin activators. Heart Fail Rev <u>14</u>, 289-298

Terracciano CM, Hajjar RJ, Harding SE (2002): Overexpression of SERCA2a accelerates repolarisation in rabbit ventricular myocytes. Cell Calcium <u>31</u>, 299-305

Thelestam M, Möllby R (1979): Classification of microbial, plant and animal cytolysins based on their membrane-damaging effects of human fibroblasts. Biochim Biophys Acta <u>557</u>, 156-169

Toyofuku T, Kurzydlowski K, Tada M, MacLennan DH (1993): Identification of regions in the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmatic reticulum that affect functional association with phospholamban. J Biol Chem 268, 2809-2815

Vahl CF, Timek T, Bonz A, Kochsiek N, Fuchs H, Schäffer L, Rosenberg M, Dillmann R, Hagl S (1997): Myocardial length-force relationship in end stage dilated cardiomyopathy and normal human myocardium: analysis of intact and skinned left ventricular trabeculae obtained during 11 heart transplantations. Basic Res Cardiol 92, 261-270

Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P (2009): Intracellular pH regulation in heart. J Mol Cell Cardiol <u>46</u>, 318-331

Wankerl M, Schwartz K (1995): Calcium transport proteins in the nonfailing and failing heart: gene expression and function. J Mol Med (Berl) 73, 487-496

Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR (1989): Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. J Biol Chem <u>264</u>, 11468-11474

Weinbrenner S, Langer T, Scherer M, Störk S, Ertl G, Muth Ch, Hoppe UC, Kopp I, Ollenschläger G (2012): The German National Disease Management Guideline "Chronic Heart Failure. Dtsch Med Wochenschr 137, 219-227

Xin W, Lu XC, Li XY, Niu K, Cai JM (2011): Effects of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene transfer in a minipig model of chronic ischemic heart failure. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi 39, 336-342

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, Wilson JM (1994): Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A <u>91</u>, 4407-4411

Yao A, Su Z, Dillmann WH, Barry WH (1998): Sarcoplasmic reticulum function in murine ventricular myocytes overexpressing SR Ca²⁺-ATPase. J Mol Cell Cardiol <u>30</u>, 2711-2718

Zhao W, Yuan Q, Qian J, Waggoner JR, Pathak A, Chu G, Mitton B, Sun X, Jin J, Braz JC (2006): The presence of Lys27 instead of Asn27 in human phospholamban promotes sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase superinhibition and cardiac remodeling. Circulation 113, 995-1004

Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, Wagner K, Greenberg B, Jessup M, Hajjar RJ. (2014): Long-Term Effects of AAV1/SERCA2a Gene Transfer in Patients With Severe Heart Failure: Analysis of Recurrent Cardiovascular Events and Mortality. Circ Res <u>114</u>, 101-108

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Lars Maier für das Überlassen dieses spannenden Dissertationsthemas und das Nahebringen des wissenschaftlichen Arbeitens in einer mehr als freundlichen Arbeitsatmosphäre bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Adam Rokita, der mich nicht nur in die Methodik der Epifluoreszenzmikroskopie einarbeitete und mir Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse gab, sondern mir zu jedem Zeitpunkt mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne seine hervorragende Betreuung und zugleich motivierende Unterstützung wäre die vorliegende Dissertation nicht durchführbar gewesen. Ich danke außerdem Dr. Karl Toischer für die Einarbeitung in die Muskelstreifenexperimente und für die Unterstützung bei der Interpretation der Ergebnisse.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe unter Prof. Dr. Lars Maier für ihre ständige Ansprechbarkeit bei Fragen und Problemen, das stets freundliche Arbeitsklima und die technische Unterstützung danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Gudrun Müller bedanken, die mir die isolierten Kardiomyozyten zur Verfügung stellte.