

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

Die Bedeutung der Proteinkinase A und der Ca²⁺/Calmodulin abhängigen Proteinkinase II für das Sarkoplasmatische Retikulum Kalziumleck in der humanen Hypertrophie und Herzinsuffizienz

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von:

Jonas Herting

aus
Göttingen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Brück

Referent: Prof. Dr. med. Samuel Tobias Sossalla

Ko-Referentin: Prof. Dr. med. Dörthe Katschinski

Datum der mündlichen Prüfung: 22. September 2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Bedeutung der Proteinkinase A und der Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Proteinkinase II für das Sarkoplasmatische Retikulum Kalziumleck in der humanen Hypertrophie und Herzinsuffizienz" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden publiziert:

Fischer TH*, **Herting J***, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, Ellenberger D, Forster A, Schmitto JD, Gummert J, et al. (2013): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human cardiac pathology. *Circulation* 128, 970-981

* Die Autoren haben gleichermaßen zur Erstellung der Publikation beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Herzinsuffizienz und nachlastinduzierte kardiale Hypertrophie	7
1.2 Physiologie des myokardialen Kalziumstoffwechsels	9
1.2.1 Kardiomyozytärer Kalziumstoffwechsel und elektromechanische Kopplung	9
1.2.2 Veränderungen der elektromechanischen Kopplung in der Herzinsuffizienz.....	12
1.2.3 Regulation des Ryanodin-Rezeptors Typ 2.....	14
1.2.4 Proteinkinase A.....	16
1.2.5 Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II	16
1.3 Fragestellung.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Humanes Myokardgewebe	19
2.1.1 Terminale Herzinsuffizienz.....	19
2.1.2 Nachlastinduzierte kardiale Hypertrophie.....	20
2.1.3 Gesundes Kontrollmyokard.....	21
2.2 Western Blots	22
2.2.1 Probenaufbereitung.....	22
2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und elektrophoretischer Transfer	23
2.2.3 Immundetektion und Datenanalyse.....	26
2.3 Fluoreszenzmikroskopische Kalziumbildgebung.....	28
2.3.1 Isolation von humanen Kardiomyozyten	28
2.3.2 Messlösungen und pharmakologische Inhibitoren	30
2.3.3 Fluoreszenzfarbstoffe	31
2.3.4 Epifluoreszenzmikroskopie	33
2.3.5 Konfokale Laserscanmikroskopie.....	36
2.4 Statistik	39

3	Ergebnisse	40
3.1	Patientendaten.....	40
3.2	Kalziumstoffwechsel in der kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz	41
3.2.1	Schlüsselproteine des Kalziumstoffwechsels	41
3.2.2	Kalziumhomöostase in der kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz	43
3.2.3	SR Kalziumleck in der kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz	44
3.3	PKA- und CaMKII-Inhibition in der kardialen Hypertrophie	46
3.4	PKA- und CaMKII-Inhibition in der terminalen Herzinsuffizienz.....	50
4	Diskussion.....	53
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	53
4.2	Kalziumstoffwechsel in der kompensierten kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz.....	54
4.3	PKA- und CaMKII abhängige Regulation des SR Kalziumlecks in der kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz.....	56
4.4	Limitationen der Arbeit	60
4.5	Ausblick und klinische Perspektive.....	62
5	Zusammenfassung.....	64
6	Literaturverzeichnis	65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aktionspotential im Arbeitsmyokard mit vereinfachter Darstellung der relevanten Ionenströme....	9
Abb. 2: Die elektromechanische Kopplung im gesunden Myokard.....	10
Abb. 3: Veränderungen der elektromechanischen Kopplung in der humanen Herzinsuffizienz.....	13
Abb. 4: Regulation des Ryanodin-Rezeptors Typ II	15
Abb. 5: Isolierte linksventrikuläre Kardiomyozyte aus einem explantierten terminal insuffizienten humanen Herz.....	30
Abb. 6: Schematischer Versuchsaufbau der Epifluoreszenzmikroskopie.....	34
Abb. 7: Prinzip der konfokalen Laserscanmikroskopie.....	37
Abb. 8: Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus des RyR2 in der nachlastinduzierten kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz.....	42
Abb. 9: Proteinexpression und PKA-vermittelte Phosphorylierung von Troponin I in gesundem Kontrollmyokard und terminaler Herzinsuffizienz.....	43
Abb. 10: Funktionelle Parameter des Kalziumstoffwechsels in der kompensierten kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz	44
Abb. 11: Diastolisches SR Kalziumleck in der kompensierten kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz	45
Abb. 12: Einfluss der PKA- und CaMKII-Inhibition auf die systolische und koffeininduzierte Kalziumfreisetzung in der kardialen Hypertrophie.....	47
Abb. 13: Einfluss der CaMKII-Inhibition auf das diastolische SR Kalziumleck in der kompensierten kardialen Hypertrophie	48
Abb. 14: Einfluss der PKA-Inhibition auf das diastolische SR Kalziumleck in der kompensierten kardialen Hypertrophie.....	49
Abb. 15: Einfluss der CaMKII-Inhibition auf das diastolische SR Kalziumleck in der terminalen Herzinsuffizienz	50
Abb. 16: Einfluss der PKA-Inhibition auf die systolische und koffeininduzierte Kalziumfreisetzung in der terminalen Herzinsuffizienz	51
Abb. 17: Einfluss der PKA-Inhibition auf das diastolische SR Kalziumleck in der terminalen Herzinsuffizienz	52

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der kardioplegen Transportlösung mit BDM.....	20
Tab. 2: Zusammensetzung des Homogenisierungspuffers.....	22
Tab. 3: Zusammensetzung des Lämmli-Puffers	23
Tab. 4: Zusammensetzung des Laufpuffers mit 0,1% SDS.....	24
Tab. 5: Zusammensetzung des Transferpuffers.....	25
Tab. 6: Zusammensetzung des Waschpuffers mit 0,1% Tween 20.....	25
Tab. 7: Übersicht der verwendeten Primärantikörper	26
Tab. 8: Übersicht der verwendeten peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper	27
Tab. 9: Zusammensetzung des modifizierten King's B Medium.....	29
Tab. 10: Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung.....	31
Tab. 11: Klinische Daten der untersuchten Patientengruppen	40

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (<i>angiotensin converting enzyme</i>)
AIP	CaMKII-Inhibitor (<i>autocamtide-2-related inhibitory peptide</i>)
ATP/ATPase	Adenosintriphosphat / Adenosintriphosphatase
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BDM	2,3-Butandion-Monoxim
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Calsequ.	Calsequestrin
Ca ²⁺ /CaM-Komplex	Ca ²⁺ /Calmodulin-Komplex
CaMKII/CaMKIV	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II/IV
DCM	dilatative Kardiomyopathie (<i>dilated cardiomyopathy</i>)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
F/F ₀	Quotient aus maximaler Fluoreszenz und der diastolischen Grundfluoreszenz
F ₃₄₀ /F ₃₈₀	Quotient der Fluoreszenzsignale bei Exzitation mit 340/380 nm (Fura-2 Ratio)
FKBP12.6	FK-506 Bindungsprotein 12.6 / Calstabin
Fluo-3 AM	nicht-ratiometrischer Ca ²⁺ -Fluoreszenzfarbstoff (als Pentaacetoxy-methylester)
Fura-2 AM	ratiometrischer Ca ²⁺ -Fluoreszenzfarbstoff (als Pentaacetoxy-methylester)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H89	PKA-Inhibitor, N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-Isochinolinsulfonamid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
HF	terminale Herzinsuffizienz (<i>heart failure</i>)
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (<i>heart failure with mid-range ejection fraction</i>)

HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (<i>heart failure with preserved ejection fraction</i>)
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (<i>heart failure with reduced ejection fraction</i>)
Hy	kompensierte nachlastinduzierte kardiale Hypertrophie
ICM	ischämische Kardiomyopathie (<i>ischemic cardiomyopathy</i>)
JMEM	kalziumfreies Nährmedium (<i>Joklik modified minimum essential medium</i>)
Kon	Kontrollgruppe ohne pharmakologische Intervention
L-Typ	spannungsabhängiger L-Typ Ca ²⁺ -Kanal (Dihydropyridin-Rezeptor)
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
NCX	Natrium-/Kalziumaustauscher
NF	Myokardproben aus gesunden Donorherzen (<i>non-failing</i>)
PBS	Phosphatpufferlösung (<i>phosphat buffer saline</i>)
PP1/PP2A	Proteinphosphatase 1/2A
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
RT50	Eliminationszeit bis 50% der Transientenhöhe (<i>relaxation time 50%</i>)
<i>rycals</i>	RyR2 Stabilisatoren (<i>ryanodine receptor calcium release channel stabilizers</i>)
RyR2	Ryanodin-Rezeptor Typ 2
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat(<i>sodium dodecyl sulfate</i>)-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERCA2a	sarkoplasmatisches/endoplasmatisches Retikulum Kalzium ATPase 2a
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	transverse Konstriktion der Aorta thoracalis (<i>transverse aortic constriction</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Puffersubstanz)
TnI	Troponin I
T-Tubulus	transversaler Tubulus

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz und nachlastinduzierte kardiale Hypertrophie

Die aktuellen Leitlinien der europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) definieren die Herzinsuffizienz als ein klinisches Syndrom, welches mit typischen Symptomen (z. B. Dyspnoe, Knöchelödeme und verminderte Leistungsfähigkeit) und klinischen Befunden (z. B. erhöhter zentraler Venendruck, pulmonale Rasselgeräusche, verbreiteter und lateralisierter Herzspitzenstoß) einhergeht. Zu Grunde liegt eine Abnormität der kardialen Struktur oder Funktion, die zu einem verminderten Herzzeitvolumen und/oder erhöhten intrakardialen Drücken in Ruhe oder unter Belastung führt. Auf Grundlage der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) erfolgt eine Einteilung in die Herzinsuffizienz mit reduzierter (HFrEF, LVEF <40%), mäßiggradig eingeschränkter (HFmrEF, LVEF 40–49%) oder erhaltener LVEF (HFpEF, LVEF ≥50%). Der Grad der linksventrikulären Funktionseinschränkung muss dabei nicht zwangsläufig mit der klinischen Symptomatik des Patienten korrelieren, welche zumeist anhand der Kriterien der New York Heart Association auf Grundlage der körperlichen Belastungstoleranz in 4 Schweregrade (NYHA-Klassifikation I–IV) unterteilt wird (Ponikowski et al. 2016).

Eine einheitliche Klassifizierung und Terminologie der multiplen klinischen Entitäten der Herzinsuffizienz ist durch die vielfältigen und sich häufig überschneidenden ätiologischen Faktoren, die teils anatomische (z. B. dilatativ/hypertroph), teils funktionelle (z. B. restriktiv) Charakterisierung der kardialen Pathologie sowie die noch unvollständig erforschten genetischen Ursachen erschwert. Eine häufige Unterteilung erfolgt anhand der Genese in eine ischämische (auf dem Boden einer koronaren Herzerkrankung, häufig nach stattgehabtem Myokardinfarkt, entstandene) und nicht-ischämische (z. B. durch arteriellen Hypertonus, Herzklappenerkrankungen, Myokarditis, Toxizität oder genetische Erkrankungen verursachte) Kardiomyopathie. Insbesondere bei den Patienten mit HFrEF stellt in den Industrienationen eine ischämische Kardiomyopathie (ICM) die häufigste Form der Herzinsuffizienz dar. Die teils synonyme Verwendung des Begriffs dilatative Kardiomyopathie (DCM) für alle nicht-ischämischen Formen der Herzinsuffizienz sollte dabei vermieden werden, da beispielweise eine durch Volumen- oder Drucküberladung verursachte Herzinsuffizienz bei arteriellem Hypertonus oder Herzklappenerkrankungen nicht die etablierte Definition der DCM erfüllt (Yancy et al. 2013).

In der westlichen Welt hat die Herzinsuffizienz eine erhebliche klinische und nicht zuletzt auch sozioökonomische Relevanz. Es sind 1–2% der erwachsenen Bevölkerung betroffen, mit einem altersabhängigem Anstieg der Prävalenz bis auf über 10% in der Altersgruppe über 70 Jahre (Mosterd und Hoes 2007). Dabei ist die Prognose nach wie vor schlecht: Eine Auswertung von >55 Mio. stationären Herzinsuffizienzfällen aus den Jahren 1998 bis 2008 in den USA und Puerto Rico konnte zeigen, dass die Zahl der Hospitalisierungen auf Grund von Herzinsuffizienz im Untersuchungszeitraum zwar um 29,5% abnahm, die risikoadjustierte 1-Jahres-Mortalität jedoch lediglich von 31,7% auf 29,6% gesenkt werden

konnte (Chen et al. 2011). Somit ist die Entwicklung neuer medikamentöser und nicht-medikamentöser Therapieverfahren weiterhin von großer Bedeutung.

Eine mögliche Vorstufe in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz stellt die linksventrikuläre Hypertrophie durch eine erhöhte Nachlast dar, wie sie bei arterieller Hypertonie, insbesondere aber bei einer höhergradigen Aortenklappenstenose auftritt, der häufigsten primären Herzklappenerkrankung in der westlichen Welt (Baumgartner et al. 2017). Durch die erhöhte Nachlast steigt der systolische Druckgradient, den der linke Ventrikel zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Schlagvolumens aufbringen muss, deutlich an. Die hierdurch erhöhte Wandspannung führt zu einer konzentrische Hypertrophie des linksventrikulären Myokards, welche zunächst zu einer Kompensation der systolischen Wandspannung und auch des Schlagvolumens beitragen kann (Grossman et al. 1975). Auf längere Sicht kommt es jedoch bei vielen Patienten zu einer Maladaptation auf Grund der erhöhten diastolischen Wandspannung mit verminderter Perfusion sowie auch einem pathologischen Umbau des Myokardgewebes (kardiales Remodeling) mit vermehrter Fibrose und Apoptose von Kardiomyozyten sowie zahlreichen pathologischen Veränderungen des kardiomyozytären Metabolismus, nicht zuletzt des Kalziumstoffwechsels und der zellulären Elektrophysiologie (Nakamura und Sadoshima 2018). Die hieraus resultierende, teils rapide Verschlechterung der kardialen Funktion ist insbesondere bei Patienten mit Aortenklappenstenose mit einer schlechten Prognose assoziiert. Das Risiko der Transition in eine Herzinsuffizienz korreliert dabei mit dem Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie (Kupari et al. 2005). Zusätzlich gehen bereits die linksventrikuläre Hypertrophie, insbesondere aber die HFrEF mit einem erhöhten Risiko für atriale und ventrikuläre Herzrhythmusstörungen und damit auch dem plötzlichen Herztod einher. Dieser tritt besonders häufig bei Patienten mit ICM und hochgradig reduzierter LVEF auf (Hindricks et al. 2021; Priori et al. 2015).

1.2 Physiologie des myokardialen Kalziumstoffwechsels

1.2.1 Kardiomyozytärer Kalziumstoffwechsel und elektromechanische Kopplung

Voraussetzung für eine regelrechte kardiale Funktion ist die zeitlich und geometrisch genauestens koordinierte Kontraktion und Relaxation des atrialen und ventrikulären Myokards. Die diesem Ablauf zu Grunde liegende elektrische Aktivierung der Kardiomyozyten nimmt unter physiologischen Bedingungen ihren Ausgang in den Schrittmacherzellen des Sinusknotens und wird als Aktionspotential über die spezialisierten Herzmuskelzellen des Reizleitungssystems an das Arbeitsmyokard weitergeleitet. Durch die zahlreichen interzellulären Verbindungen mittels *gap junctions* bilden die einzelnen Kardiomyozyten dabei ein geometrisch gerichtetes elektrisches Netzwerk oder auch funktionelles Synzytium (Schmidt 2001). Abb. 1 stellt die vier Phasen des Aktionspotentials im Arbeitsmyokard und eine vereinfachte Darstellung der zu Grunde liegenden Ionenströme dar.

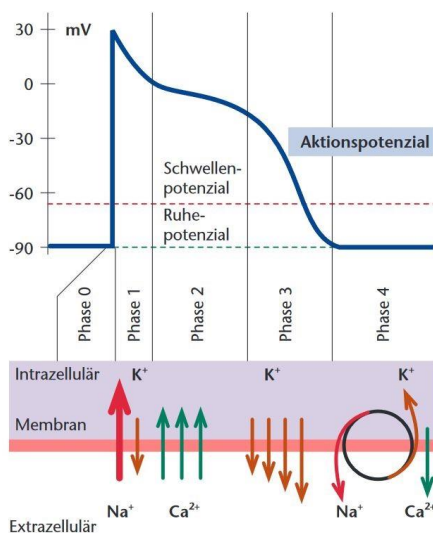


Abb. 1: Aktionspotential im Arbeitsmyokard mit vereinfachter Darstellung der relevanten Ionenströme (modifiziert nach Marx N et al. 2017, mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier).

Phase 0: Initiale Depolarisation durch Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle.

Phase 1: Partielle Repolarisation durch transienten Kaliumausstrom.

Phase 2: Plateauphase mit Kalziueinstrom via spannungsabhängiger L-Typ Kalziumkanäle.

Phase 3: Repolarisation durch überwiegenden Ausstrom von Kalium.

Phase 4: Ruhemembranpotential / Diastole. Elektrogener Transport von Natrium nach extrazellulär im Austausch gegen Kalium mittels der Na⁺/K⁺-ATPase sowie Kalziumelimination mittels des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers und der Ca²⁺-ATPase.

Die elektromechanische Kopplung beschreibt hierbei die Umsetzung der elektrischen Aktivierung in eine mechanische Kontraktion der Kardiomyozyten und damit letztlich des gesamten Herzmuskels. Als zentraler sekundärer Botenstoff wirken dabei Kalziumionen (Ca²⁺), im Folgenden der einfacheren Lesbarkeit halber zumeist als „Kalzium“ bezeichnet, welche entscheidend die besondere Form des kardialen Aktionspotentials prägen und als direkter Aktivator des kontraktile Apparats wirken (Bers 2002, 2008). Der im folgenden Absatz beschriebene Ablauf der elektromechanischen Kopplung im gesunden Myokard ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

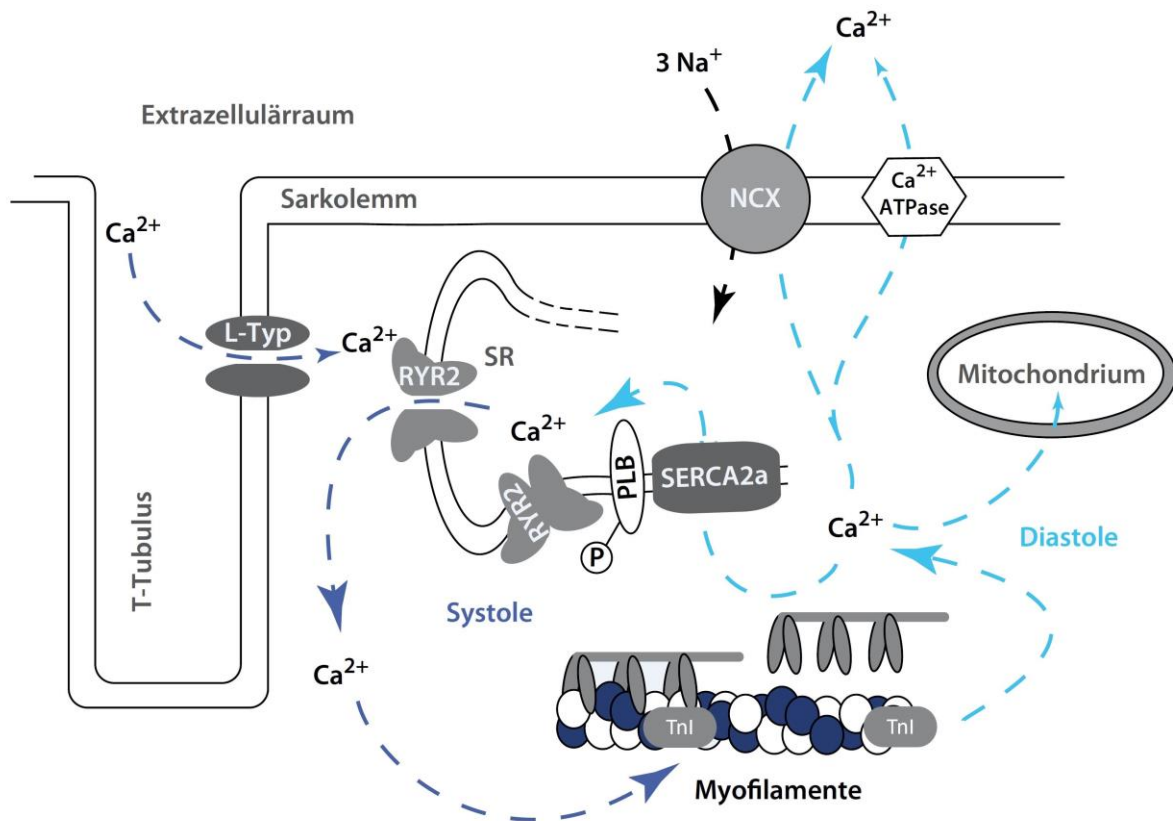


Abb. 2: Die elektromechanische Kopplung im gesunden Myokard (modifiziert nach Fischer et al. 2011, mit freundlicher Genehmigung des Springer Medizin Verlags). Erläuterung im Text, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

In der Systole kommt es mit der Ausbreitung des Aktionspotentials entlang der Zellmembran der Kardiomyozyte, dem Sarkolemm, zur Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle mit einer raschen Depolarisierung des Ruhemembranpotentials von -90 auf +30 mV (Schmidt 2001). Das Sarkolemm der Kardiomyozyte weist dabei mit dem Extrazellulärraum verbundene Einstülpungen auf, die als transversale Tubuli (T-Tubuli) bezeichnet werden und eine unmittelbare räumliche Beziehung des Sarkolemm mit dem intrazellulären Kalziumspeicher, dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), herstellen, welche auch als Diade bezeichnet wird. Hier führt die Depolarisation des Sarkolemm in Phase 2 des Aktionspotentials zur Öffnung spannungsgesteuerter L-Typ Kalziumkanäle (Dihydropyridinrezeptoren) mit Einstrom von Kalzium in die Zelle entlang seines elektrochemischen Gradienten. Dieser zunächst nur lokal begrenzte und relativ geringe Kalziumeinstrom führt zur Aktivierung kalziumsensitiver Kalziumkanäle, den Ryanodin-Rezeptoren Typ 2 (RyR2) in der Membran des SR und hierüber zu einer in der Summe deutlich größeren Kalziumfreisetzung in das Zytosol mit Anstieg der freien Kalziumkonzentration von ca. 100 nmol/L auf ca. 1 μ mol/L (Bers 2002). Dieser positive Verstärkungsmechanismus wird als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung bezeichnet (Fabiato 1983) und durch die direkte Assoziation von

ca. 15–20 L-Typ Kalziumkanälen mit Clustern von etwa 100–200 RyR2 in sogenannten *couplons* oder *calcium-release-units* ermöglicht (Bers 2008; Franzini-Armstrong et al. 1999). Dieser Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration führt über Bindung von Kalzium an Troponin C zur Aktivierung des Querbrückenzyklus an den Myofilamenten und damit zur mechanischen Kontraktion der Zelle. Die Kalziumsensitivität der Myofilamente kann dabei durch Azidose oder erhöhte Konzentrationen von Phosphat- und Magnesiumionen (eine Konstellation, welche beispielsweise in der myokardialen Ischämie auftritt) vermindert oder aber durch Koffein sowie einige weitere positiv inotrope Substanzen verstärkt werden (Bers 2002).

In der Diastole führt der Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration zur Abdissoziation des Kalziums von Troponin C, wodurch der Querbrückenzyklus unterbunden wird und die Kardiomyozyte relaxiert. Die hierzu erforderliche Elimination des Kalziums aus dem Zytosol erfolgt dabei über vier wesentliche Transportwege, deren relative Gewichtung speziesabhängig ist (Bers 2002). In humanen Kardiomyozyten werden in Abhängigkeit von der Herzfrequenz ca. 74% des in der Systole freigesetzten Kalziums mittels der kardialen Isoform der sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase 2a (SERCA2a) unter Verbrauch eines Moleküls ATP pro zwei Kalziumionen zurück in das SR gepumpt (Bers 2014; Pieske et al. 1999). Die Aktivität der SERCA2a wird dabei durch das Protein Phospholamban (PLB) reguliert. In seinem unphosphoryliertem Zustand inhibiert PLB die SERCA2a und hemmt damit die Kalziumwiederaufnahme in das SR. Durch eine Phosphorylierung von PLB an Position Ser16 durch die Proteinkinase A (PKA) oder an Position Thr17 durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) kommt es über eine Konformationsänderung der zytosolischen Domäne von PLB zur Disinhibition der SERCA2a und damit zu einer gesteigerten Kalziumwiederaufnahme in das SR (Davis et al. 1990; Mattiazzi et al. 2005). Weitere ca. 24% der Kalziumelimination erfolgen mittels sekundär aktivem Transport nach extrazellulär über den Natrium-/Kalziumaustauscher (NCX). Dieses sarkolemmale Transportprotein befördert unter physiologischen Bedingungen im sogenannten Vorwärtsmodus ein Kalziumion im Austausch gegen drei Natriumionen aus der Zelle. Die übrigen ca. 2% der Kalziumelimination erfolgen zu etwa gleichen Anteilen mittels primär aktivem Transport über die sarkolemmale Kalzium-ATPase nach extrazellulär oder über Aufnahme des Kalziums in die Mitochondrien über mitochondriale Kalzium-Uniporter (Bers 2014). Dieser sich zyklisch wiederholende Ablauf aus dem raschen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration in der Systole und der anschließenden langsameren diastolischen Kalziumelimination wird auch als Kalziumtransient bezeichnet.

1.2.2 Veränderungen der elektromechanischen Kopplung in der Herzinsuffizienz.

Die Herzinsuffizienz geht mit einer tiefgreifenden Dysregulation der kardiomyozytären Kalziumhomöostase und Elektrophysiologie einher. Tierexperimentelle Untersuchungen, aber auch funktionelle Messungen an isolierten humanen Kardiomyozyten und ventrikulären Muskeltrabekeln demonstrieren eine Beeinträchtigung der Kontraktilität durch eine verminderte Kalziumbelastung des SR mit reduzierter systolischer Kalziumfreisetzung, eine Störung der Relaxation durch eine verzögerte Kalziumelimination mit Anstieg des zytosolischen Kalziumspiegel in der Diastole sowie auch eine Zunahme zellulärer Arrhythmien (Bers und Despa 2006; Beuckelmann et al. 1992; Gwathmey et al. 1987; Hasenfuss und Pieske 2002; Pieske et al. 1999). Auch die für eine physiologische Myokardfunktion charakteristische positive Kraft-Frequenz-Beziehung kehrt sich in der Herzinsuffizienz um (Mulieri et al. 1992; Pieske et al. 1995). Ursächlich hierfür sind Änderungen der Expression und/oder Aktivität mehrerer der in Kapitel 1.2.1 beschriebenen Schlüsselproteine des kardiomyozytären Kalziumstoffwechsels und des kontraktile Apparats. Abb. 3 stellt die wesentlichen Veränderungen schematisch dar.

Eine besondere Rolle spielt dabei die Entwicklung eines vermehrten diastolischen Kalziumlecks aus dem SR durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 (Bers 2014; Dibb und Eisner 2010; Fischer et al. 2013a; Neef und Maier 2007). Durch den kalziumsensitiven Öffnungsmechanismus des Rezeptors, die geclusterte Anordnung innerhalb eines *couplons* und das geringe Volumen des diadischen Spalts kann dabei die Öffnung eines einzelnen RyR2 über den lokalen Anstieg der Kalziumkonzentration die Öffnung von 6–20 benachbarten Rezeptoren induzieren. Diese mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektierbaren spontanen Kalziumfreisetzungseignisse aus dem SR werden als Kalziumsparks (*calcium sparks*) bezeichnet und sind auch in gesunden Kardiomyozyten als stochastisches Ereignis detektierbar. Die Frequenz der Kalziumsparks korreliert dabei mit der Offenwahrscheinlichkeit der einzelnen RyR2, welche maßgeblich durch den Phosphorylierungsstatus des Rezeptors bestimmt wird. In der Herzinsuffizienz bewirkt eine Hyperphosphorylierung des RyR2 (siehe Kapitel 1.2.3) sowie die erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration in der Diastole (siehe unten) eine deutliche Zunahme der Kalziumsparkfrequenz. Dies kann unter Umständen dazu führen, dass das durch einen RyR2-Cluster freigesetzte Kalzium zur RyR2-Aktivierung in benachbarten *couplons* ausreicht. Hieraus resultiert zunächst die Bildung von sogenannten *macrosparks*, welche sich bei entsprechender räumlicher und zeitlicher Überlagerung zu sich entlang der gesamten SR Membran ausbreitenden *calcium waves* summieren und hierüber arrhythmische Kontraktionen der Zelle auslösen können (Bers 2014; Cheng et al. 1996). Dabei ist anzumerken, dass das SR Kalziumleck nicht allein aus der Summe der Kalziumsparks resultiert, sondern sich ein gewisser diastolischer Kalziumausstrom aus dem SR auch Spark- und zu geringem Anteil sogar RyR2-unabhängig als sogenannter *quarky calcium release* manifestiert (Bers 2014; Lipp und Niggli 1998).

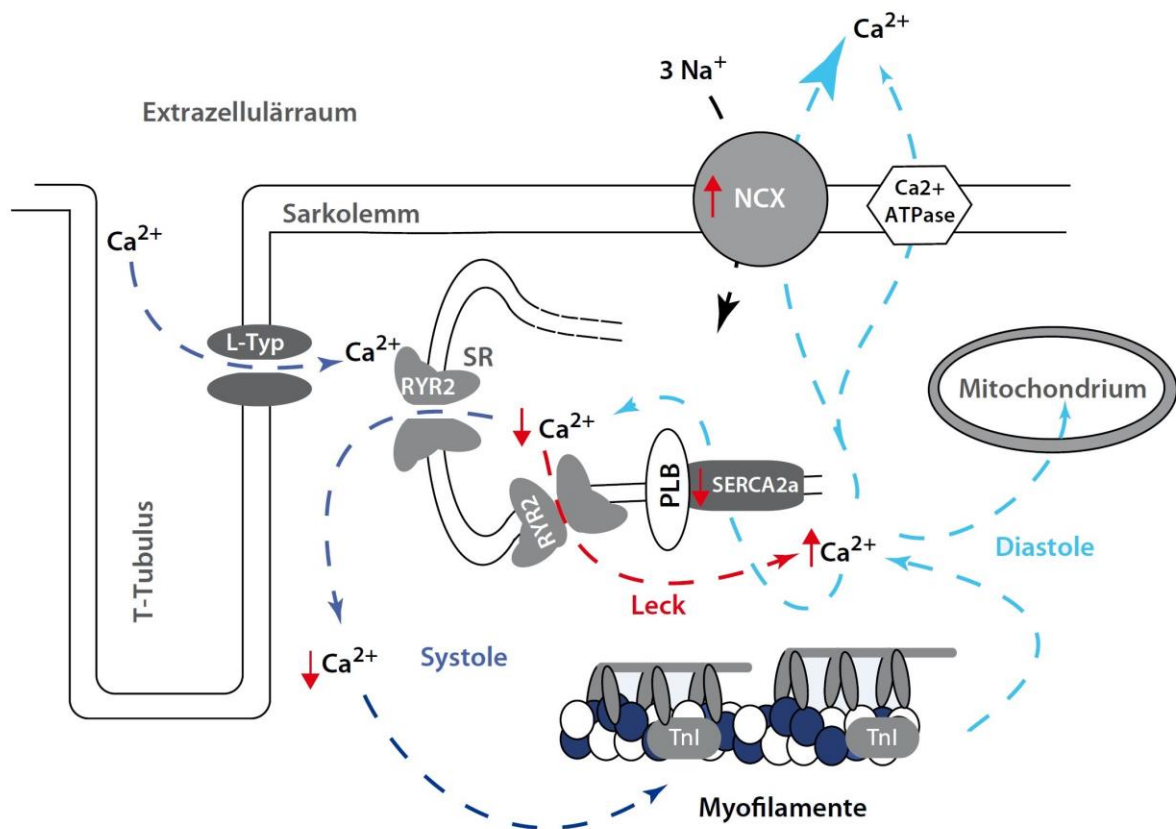


Abb. 3: Veränderungen der elektromechanischen Kopplung in der humanen Herzinsuffizienz mit Entwicklung eines vermehrten diastolischen Kalziumlecks aus dem SR (modifiziert nach Fischer et al. 2011, mit freundlicher Genehmigung des Springer Medizin Verlags). Erläuterung im Text, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

Das vermehrte diastolische SR Kalziumleck in der Herzinsuffizienz hat mehrere bedeutsame pathophysiologische Konsequenzen: Einerseits bedingt der kontinuierliche Kalziumverlust eine verminderte Triebkraft und somit auch geringere Amplitude der Kalziumfreisetzung aus dem SR in der Systole und führt hierüber zu einer Beeinträchtigung der systolischen Kraftentwicklung des Herzens. Gleichzeitig beeinträchtigt der resultierende Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration in der Diastole auch die Abdissoziation des Kalziums von den Myofilamenten und damit die Relaxation der Kardiomyozyte und letztlich die diastolische Funktion des Herzens (Bers 2014; Fischer et al. 2013a). Verstärkt wird diese Kaskade zusätzlich durch eine verminderte Wiederaufnahme des Kalziums in das SR auf Grund einer reduzierten SERCA2a-Expression sowie auch -Aktivität in der Herzinsuffizienz (Hasenfuss 1998; Pieske et al. 1999), letztere insbesondere hervorgerufen durch eine verminderte Phosphorylierung von PLB (Kranias und Hajjar 2012; Schwinger et al. 1999). Stattdessen bewirkt eine gesteigerte Expression und Aktivität des NCX (Reinecke et al. 1996; Schillinger et al. 2003; Studer et al.

1994) eine vermehrte extrazelluläre Elimination des Kalziums und hierüber letztlich eine Depletion des gesamtzellulären Kalziumgehalts der Kardiomyozyte in der Herzinsuffizienz (Fischer et al. 2011).

Die oben beschriebene zytosolische Kalziumüberladung in der Diastole und Zunahme der NCX-abhängigen Kalziumelimination hat auch direkte Auswirkungen auf die kardiomyozytäre Elektrophysiologie: Insbesondere das ausgeprägte SR Kalziumleck im Rahmen von *calcium waves* führt durch die vermehrte transsarkolemmale Elimination des Kalziums mittels des NCX zu einem substantiellen und auf Grund des Transportverhältnisses von drei Na⁺-Ionen zu einem Ca²⁺-Ion elektrogenen Natriumeinstrom in die Zelle. Die hieraus resultierende Depolarisation des Membranpotentials kann bei Überschreiten des Schwellenpotentials zur Induktion getriggert Arrhythmien führen. Hierbei kommt es auf Grund der im Bereich des Ruhemembranpotentials größten NCX-Aktivität zumeist zu in der Diastole auftretenden späten Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarizations*), aber auch das Auftreten von frühen Nachdepolarisationen (*early afterdepolarizations*) in Phase 2 und 3 des Aktionspotentials wird begünstigt (Bers 2014; Xie und Weiss 2009).

Ein weiterer unerwünschter Nebeneffekt des erhöhten SR Kalziumlecks ist ein vermehrter ATP-Verbrauch – bei in der Herzinsuffizienz ohnehin verminderten Energiereserven der Kardiomyozyte. Sowohl die Kalziumwiederaufnahme in das SR mittels SERCA2a als auch die transsarkolemmale Kalziumelimination via Kalzium-ATPase und NCX sind direkt oder indirekt (über die Na⁺/K⁺-ATPase) auf die Hydrolyse von ATP angewiesen. Zusätzlich bewirkt die vermehrte Kalziumaufnahme in die Mitochondrien eine Reduktion des elektrochemischen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran und beeinträchtigt damit die ATP-Synthese (Bers 2014).

1.2.3 Regulation des Ryanodin-Rezeptors Typ 2

Im gesunden Herzen bildet der RyR2 große makromolekulare Komplexe (siehe Abb. 4 A), welche aus den vier Monomeren des eigentlichen Kanalproteins, den regulatorischen Proteinen FK-506 Bindungsprotein 12.6 (FKBP12.6, auch als Calstabin bezeichnet) und Calmodulin sowie den Proteinkinasen PKA und CaMKII sowie den hierzu antagonistisch wirkenden Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1/PP2A) bestehen (Bers 2004; Kushnir und Marks 2010). Die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals wird dabei durch einen Anstieg der diastolischen Kalziumkonzentration im Zytosol, eine vermehrte SR Kalziumbeladung sowie auch eine erhöhte zytosolische ATP-Konzentration gesteigert, während erhöhte zytosolische Magnesiumspiegel oder eine intrazelluläre Azidose diese senken (Xu L und Meissner 1998; Xu L et al. 1996). Auch die Bindung von sowohl FKBP12.6 als auch Calmodulin inhibiert die Aktivität des RyR2. Dabei reduziert Calmodulin in physiologischen Konzentrationen die Kalziumsparkfrequenz um ca. 70% (Wu und Bers 2007), während der inhibitorische Effekt durch FKBP12.6 deutlich weniger ausgeprägt ist und auf Grund der vergleichsweise geringen Menge an FKBP12.6 in ventrikulären Kardiomyozyten

physiologischerweise lediglich 10–20% der RyR2-Komplexe überhaupt FKBP12.6 gebunden haben können (Bers 2014; Guo et al. 2010). In der Herzinsuffizienz (siehe Abb. 4 B) kommt es, am ehesten durch PKA-abhängige Phosphorylierung, zur Abdissoziation von FKBP12.6 aus dem Rezeptorkomplex (Marx SO et al. 2000; Yano et al. 2000). Während die hierdurch zu erwartende Zunahme des diastolischen Kalziumlecks aus oben genannten Gründen eher gering ist, konnte eine gezielte Überexpression von FKBP12.6 in der Herzinsuffizienz das SR Kalziumleck signifikant reduzieren und die SR Kalziumbeladung steigern (Loughrey et al. 2004).

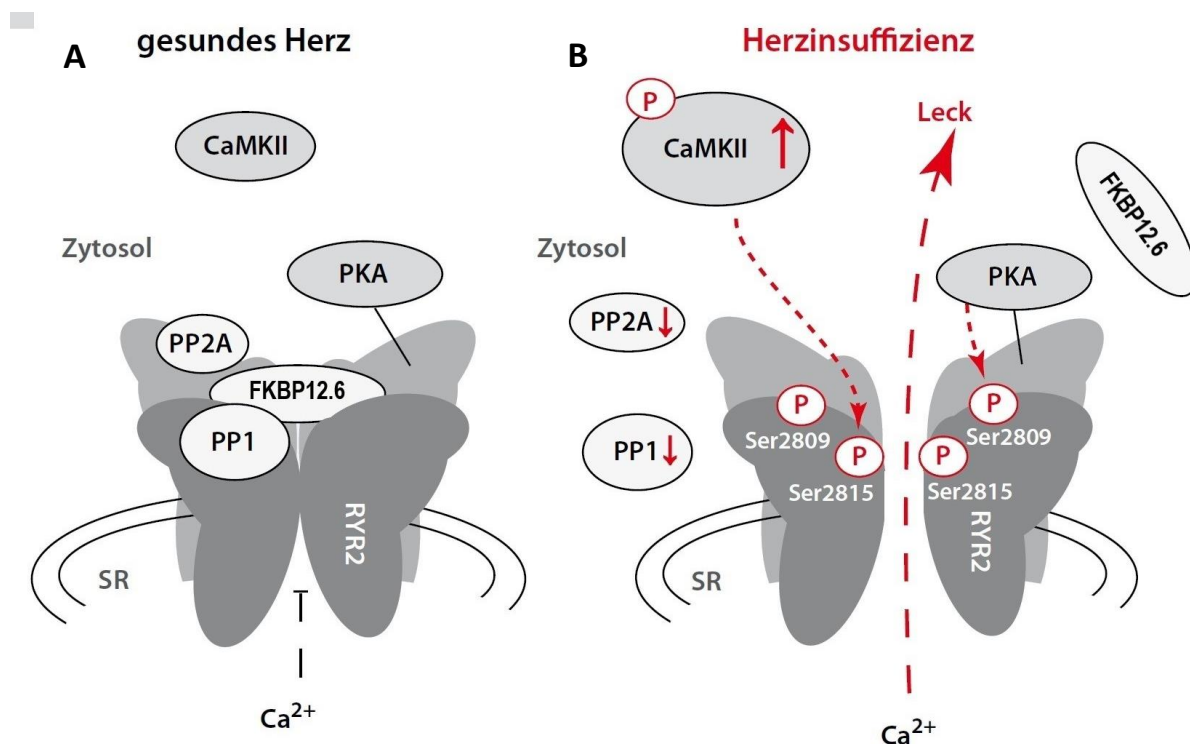


Abb. 4: Regulation des Ryanodin-Rezeptors Typ II (modifiziert nach Fischer et al. 2011, mit freundlicher Genehmigung des Springer Medizin Verlags). **A)** Stabiler diastolischer Rezeptorschluss im gesunden Myokard. **B)** Hyperphosphorylierung des Rezeptors mit Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit in der Herzinsuffizienz. Weitere Erläuterungen im Text, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

Des Weiteren kann die Aktivität des Rezeptors durch posttranslationale Modifikationen des RyR2-Tetramers selbst gesteigert werden: In der Entwicklung des vermehrten SR Kalziumlecks in der Herzinsuffizienz spielt hier insbesondere eine Hyperphosphorylierung des RyR2 eine entscheidende Rolle, aber auch Redox-Modifikationen wie eine Proteinoxidation durch reaktive Sauerstoffspezies oder Nitrosylierung durch Stickstoffmonoxid können zur erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 beitragen (Bers 2014; Fischer et al. 2013a; Zima und Blatter 2006). Ursächlich für die RyR2-Hyperphosphorylierung in der Herzinsuffizienz ist eine Dysbalance durch vermehrte Aktivität der oben

erwähnten Proteinkinasen PKA (Marx SO et al. 2000; Wehrens et al. 2006) und CaMKII (Kohlhaas et al. 2006; Maier et al. 2003; Wehrens et al. 2004) bei gleichzeitiger Abnahme der lokalen Phosphatasenaktivität durch verminderte Bindung der PP1 und PP2a an den RyR2-Komplex (Marx SO et al. 2000). Als PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle des RyR2 konnten hierbei im humanen Myokard Ser2809 (im Nagetier Ser2808) und als Phosphorylierungsstelle der CaMKII Ser2815 (human) bzw. Ser2814 (Nagetier) identifiziert werden (Huke und Bers 2008; Wehrens et al. 2006). Welche der beiden Proteinkinasen in der Entwicklung der RyR2-Dysfunktion in der humanen Herzinsuffizienz die führende Rolle spielt wird aber zum Teil kontrovers diskutiert (siehe Kapitel 4.3).

1.2.4 Proteinkinase A

Die PKA ist eine durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktivierte Serin/Threonin-Proteinkinase. Sie liegt im inaktiven Zustand als Tetramer aus jeweils zwei regulatorischen und katalytischen Untereinheiten vor. Durch Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten kommt es zur Freisetzung der katalytischen Untereinheiten, welche im Folgenden über die Phosphorylierung multipler Zielproteine in die Regulation von Stoffwechselwegen eingreifen können (Hanks et al. 1988; Taylor et al. 2013).

In Kardiomyozyten stellt die PKA das Schlüsselenzym der β -adrenergen Signalkaskade bei sympathischer Aktivierung des Herzens dar. Hier bewirkt die Stimulation von β -Adrenozeptoren über eine G_s -Protein-vermittelte Aktivierung der Adenylcyclase einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die hieraus resultierende Aktivierung der PKA hat unter physiologischen Bedingungen eine positive Inotropie mit gesteigerter systolischer Kalziumfreisetzung durch Phosphorylierung des L-Typ Kalziumkanals und des RyR2 sowie eine gesteigerte SR Kalziumbelastungen durch Phosphorylierung von PLB mit hieraus resultierender Disinhibition der SERCA2a (siehe Kapitel 1.2.1) zur Folge. Die gesteigerter SERCA2a-Aktivität sorgt dabei zusammen mit der PKA-abhängigen Phosphorylierung von Troponin I an Ser23/24 für eine verbesserte Relaxation (positive Lusitropie) des Myokards (Bers 2002; Li L et al. 2000). Diese positiven Effekte auf die kardiale Kontraktilität gehen in der Entwicklung der Herzinsuffizienz durch eine Desensibilisierung der β -adrenergen Reaktion jedoch zunehmend verloren (Choi und Rockman 1999; El-Armouche und Eschenhagen 2009).

1.2.5 Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

Die zweite wesentlich zur Regulation der elektromechanischen Kopplung beitragende Serin/Threonin-Proteinkinase ist die durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration aktivierte CaMKII, genauer deren in Kardiomyozyten prädominant exprimierte δ -Isoform. Bei einem Anstieg der zytosolischen

Kalziumkonzentration kommt es zu einer vermehrten Bildung von Ca^{2+} /Calmodulin (Ca^{2+} /CaM)-Komplexen durch Bindung von bis zu vier Kalziumionen an das regulatorische Protein Calmodulin. Das CaMKII-Holoenzym bildet dabei ein Homo- oder Heteromultimer aus 6–12 ringförmig angeordneten CaMKII-Monomeren. Die einzelnen Monomere weisen jeweils eine aminoterminal katalytische Domäne, eine zentrale regulatorische Domäne mit einer die Bindungsregion für den Ca^{2+} /CaM-Komplex überlappenden autoinhibitorischen Region sowie die für die Oligomerisation des Holoenzym verantwortliche carboxyterminale Domäne auf. Durch Bindung des Ca^{2+} /CaM-Komplexes kommt es zur Verdrängung der autoinhibitorischen Domäne mit Aktivierung der katalytischen Aktivität der CaMKII (Braun und Schulman 1995; Hook und Means 2001; Maier und Bers 2007). Dabei kann die enzymatische Aktivität durch eine Auto-Phosphorylierung der autoinhibitorischen Domäne auch nach Abdissoziation des Ca^{2+} /CaM-Komplexes erhalten bleiben (Braun und Schulman 1995; Zhang T und Brown 2004), so dass die CaMKII auch nach Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration in der Diastole 20–80% ihrer Aktivität aufrechterhalten kann (Lai et al. 1986; Lou et al. 1986; Schworer et al. 1986).

Die Modulation der elektromechanischen Kopplung erfolgt dabei über die Phosphorylierung von mehreren Schlüsselproteinen des myokardialen Kalziumstoffwechsels. Hierzu zählen insbesondere PLB (Davis et al. 1983), die SERCA2a (Xu A et al. 1993) sowie auch L-Typ Kalziumkanäle (Blaich et al. 2010; Lee et al. 2006) und der RyR2 (Hain et al. 1995; Witcher et al. 1991). Des Weiteren wurde eine CaMKII-abhängige Regulation von sarkolemmalen Natrium- und Kaliumkanälen und somit ein direkter Effekt auf die zelluläre Elektrophysiologie nachgewiesen (Wagner et al. 2009; Wagner et al. 2006). Durch die kalziumabhängige Aktivierung vermittelt die CaMKII hierüber unter physiologischen Bedingungen eine gewisse Feedback-Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration und ist besonders in die frequenzabhängige Adaptation der systolischen Kalziumfreisetzung über L-Typ Kalziumkanäle und den RyR2 sowie durch Phosphorylierung von PLB auch in die beschleunigte diastolische Kalziumelimination und Relaxation der Kardiomyozyte bei ansteigender Herzfrequenz involviert (Maier und Bers 2007). Hierdurch spielt die CaMKII eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der physiologischen positiven Kraft-Frequenz-Beziehung des Herzmuskels (Kushnir et al. 2010).

In der Herzinsuffizienz kommt es zu einer signifikanten Zunahme der CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung (Hoch et al. 1999; Kirchhefer et al. 1999). Während dies initial einen kompensatorischen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der myokardialen Kontraktilität darstellen kann, weisen inzwischen zahlreiche tierexperimentelle Daten und auch Versuche an humanem Myokard eine entscheidende Beteiligung der erhöhten CaMKII-Aktivität an der Entwicklung der kontraktilen Dysfunktion und vermehrten Arrhythmie neigung in der Herzinsuffizienz nach (Fischer et al. 2013b), hierauf wird ausführlicher in Kapitel 4.3 der Diskussion eingegangen.

1.3 Fragestellung

Die Entwicklung eines erhöhten diastolischen SR Kalziumlecks durch eine vermehrte RyR2-Phosphorylierung stellt einen wichtigen molekularen Mechanismus in der Pathogenese der Herzinsuffizienz dar. Als potentielle Verursacher der RyR2-Hyperphosphorylierung kommen insbesondere zwei zelluläre Proteinkinasen in Frage – die PKA sowie die CaMKII (Bers 2014; Fischer et al. 2013a).

Um die Rolle dieser Kinasen in der Dysregulation der elektromechanischen Kopplung in der humanen Herzinsuffizienz näher zu beleuchten und somit auch mögliche therapeutische Strategien aufzuzeigen, soll mit der vorliegenden Arbeit der Kalziumstoffwechsel in der kompensierten nachlastinduzierten kardialen Hypertrophie sowie der terminalen Herzinsuffizienz mit Hilfe der Kalziumfluoreszenzmikroskopie und molekularbiologischer Methoden erfasst werden sowie der Einfluss der PKA und CaMKII auf die intrazelluläre Kalziumhomöostase und das SR Kalziumleck in diesen klinisch relevanten Pathologien dargestellt werden. Konkret sollen durch Experimente an humanem linksventrikulären Myokardgewebe folgende Zielsetzungen verfolgt werden:

- I. Bestimmung der Proteinexpression und des Phosphorylierungsstatus wichtiger Schlüsselproteine des Kalziumstoffwechsels in linksventrikulären Myokardproben von Patienten mit nachlastinduzierter kardialer Hypertrophie und terminaler Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Donorherzen.
- II. Vergleichende Untersuchung des Kalziumstoffwechsels und des SR Kalziumlecks in isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit kardialer Hypertrophie und terminaler Herzinsuffizienz.
- III. Vergleich der Effekte einer spezifischen Inhibition der PKA und der CaMKII auf den Kalziumstoffwechsel und das diastolische SR Kalziumleck in der kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz.

2 Material und Methoden

2.1 Humanes Myokardgewebe

Alle Untersuchungen an humanem Myokardgewebe erfolgten im Einklang mit der Deklaration von Helsinki des Weltärztebunds (World Medical Association 2013) und nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen (Ethikanträge 31/9/00 und 21/10/00). Alle eingeschlossenen Patienten wurden über die wissenschaftliche Verwendung des im Rahmen der durchgeführten herzchirurgischen Eingriffe anfallenden Myokardgewebes und der anonymisierten Erhebung klinischer Daten aufgeklärt und erteilten ihr schriftliches Einverständnis.

2.1.1 Terminale Herzinsuffizienz

Das untersuchte linksventrikuläre Myokard entstammt den explantierten Herzen von 32 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (New York Heart Association Klassifikation Grad IV, mittlere LVEF $19,1 \pm 1,1\%$), die sich am Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen in Bad Oeynhausen einer orthotopen Herztransplantation unterzogen. Die explantierten Herzen wurden noch während der Transplantation im Operationssaal entgegengenommen und umgehend in vorgekühlte (4°C) kardioplege Lösung (Custodiol®, Dr. Franz Köhler Chemie, Bensheim, Deutschland) verbracht. Für Western Blot Analysen erfolgte zuvor die Entnahme von intramuralen Myokardanteilen des linken Ventrikels, welche, portioniert in Eppendorf-Cups, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C bis zur Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen (siehe Kapitel 2.2) aufbewahrt wurden.

Das übrige, zur Isolation von Kardiomyozyten bestimmte Herzgewebe wurde für den Transport in eine gekühlte (4°C) kardioprotektive Transportlösung (siehe Tab. 1) überführt. Zur Einstellung eines physiologischen pH-Wertes von 7,4 und Sättigung der Lösung mit Sauerstoff erfolgte eine Begasung mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2). Um eine weitere Kontraktion des Myokards und den damit einhergehenden ATP-Verbrauch zu verhindern enthielt die kardioprotektive Lösung 2,3-Butandion-Monoxim (BDM), welches den Querbrückenzyklus über Bindung an Troponin C unterbindet und Kalziumkanäle blockiert (Mulieri et al. 1989).

Zur Untersuchung einer möglichen iatrogenen Beeinflussung der PKA-Aktivität durch die präoperative Einnahme einer β -Blockermedikation wurden für die molekularbiologischen Experimente zusätzlich gefrorene Myokardproben von Patienten identifiziert, die auf Grund von bestehenden Kontraindikationen oder der hämodynamischen Verträglichkeit zum Zeitpunkt der Transplantation keinen β -Blocker in der dokumentierten Vormedikation aufwiesen.

Tab. 1: Zusammensetzung der kardioplegen Transportlösung mit BDM

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	116,10
Kaliumchlorid (KCl)	74,56	5,00
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	137,99	2,00
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	203,30	1,20
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	142,04	1,20
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	84,01	20,00
D-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180,16	10,00
2,3-Butandion-Monoxim (C ₄ H ₇ NO ₂)	101,10	10,00
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	110,98	0,25

Lösung der Substanzen in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) und Einstellung des pH auf 7,4 mittels Carbogen-Begasung.

2.1.2 Nachlastinduzierte kardiale Hypertrophie

Es wurden Myokardproben von 25 Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose (mittlere Aortenklappenöffnungsfläche 0.69 ± 0.04 cm²) untersucht, die sich in der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen einem operativen Aortenklappenersatz unterzogen. Um eine möglichst isolierte Betrachtung der nachlastinduzierten Hypertrophie zu gewährleisten, wurden lediglich Patienten mit echokardiografisch erhaltener LVEF (>50%) und maximal leichtgradiger Aortenklappen- oder Mitralklappeninsuffizienz eingeschlossen.

Im Rahmen des Eingriffs erfolgte eine transaortale subvalvuläre Myektomie aus dem Bereich des hypertrophierten linksventrikulären Septums, in Anlehnung an das von Morrow et al. (1975) beschriebene operative Vorgehen bei hypertroph-obstruktiver Kardiomyopathie. Von den auf diese Weise gewonnenen Myokardproben wurden erneut Anteile unmittelbar nach der Entnahme für molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C verwahrt. Das übrige Myokardgewebe wurde sofort in gekühlte (4°C) kardioplege Lösung (Custodiol®) gegeben und zügig der Zellisolation (siehe Kapitel 2.3.1) zugeführt.

2.1.3 Gesundes Kontrollmyokard

Als vergleichende Kontrollgruppe zu den untersuchten kardialen Pathologien standen gefrorene linksventrikuläre Myokardproben von fünf gesunden Donorherzen zur Verfügung, die aus logistischen oder operationstechnischen Gründen nicht erfolgreich transplantiert werden konnten. Diese Proben wurden bei -80°C gelagert und für molekularbiologische Untersuchungen eingesetzt. Da die Nichtverwertung eines Spenderorgans im Zuge der mittlerweile weit vorangeschrittenen Optimierung und Vernetzung der europäischen Transplantationszentren eine seltene Ausnahme darstellt, standen im Rahmen der Kooperation mit dem Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen während des Untersuchungszeitraums keine frischen Donorherzen zur Verfügung, die die Isolation von vitalen Kardiomyozyten und damit die Durchführung von funktionellen Messungen des Kalziumstoffwechsels erlaubt hätten.

2.2 Western Blots

Zur Quantifizierung der Proteinexpression und Bestimmung des Phosphorylierungsstatus des RyR2 und des kardialen TnI in den untersuchten Patientengruppen erfolgten Western Blot Analysen aus tiefgefrorenen humanen linksventrikulären Myokardproben (siehe Kapitel 2.1).

2.2.1 Probenaufbereitung

Jeweils ca. 1–2 mm³ große Stücke der tiefgefrorenen Myokardproben wurden zunächst in einem 1,5 mL Eppendorf-Cup mit 200–300 µL Homogenisierungspuffer (siehe Tab. 2) mittels eines Micra D-1, DS-5/K1 Dispergierwerkzeugs (ART Prozess- & Labortechnik GmbH, Mühlheim, Deutschland) auf Eis homogenisiert und anschließend für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Hierbei erfolgte alle 5 Minuten eine Durchmischung mittels Vortexmischer zur Optimierung der Proteinfreisetzung.

Tab. 2: Zusammensetzung des Homogenisierungspuffers

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
TRIS-Hydrochlorid pH 7,4 (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ · HCl)	157,60	20
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	200
Natriumfluorid (NaF)	41,99	20
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	183,91	1
Dithiothreitol (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	154,25	1

Lösung der Substanzen in ddH₂O mit 1% Triton X-100 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland).

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Homogenate für 10 Minuten bei 3000 g und 4°C zur Abzentrifugation der Nuklei und des übrigen Zelldetritus. Der resultierende Überstand wurde jeweils in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Cup überführt und auf Eis aufbewahrt, während zu den verbliebenen Pellets erneut 200 µL Homogenisierungspuffer hinzugegeben wurden. Es erfolgte dann eine erneute Homogenisierung dieser Ansätze mittels eines Handhomogenisators (Dstroy-SR-15, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) und anschließend eine erneute Inkubation auf Eis für 30 Minuten sowie Zentrifugation wie oben beschrieben. Die Überstände der beiden Zentrifugationsschritte wurden jeweils zu einer gemeinsamen Proteinsuspension pro Myokardprobe vereint.

Die Kalibrierung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mittels eines Bicinchoninsäure (BCA)-Assays (Pierce Biotechnology, Rockford IL, USA). Hierzu wurden je 5 µL der Proteinsuspensionen mit 95 µL Phosphatpufferlösung (PBS; Life Technologies, Carlsbad CA, USA) verdünnt und hiervon jeweils 25 µL in drei Näpfchen (*well*) einer 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Als Negativprobe diente eine Verdünnung von 5 µL Homogenisierungspuffer mit 95 µL PBS. Es erfolgte dann die Zugabe von jeweils 200 µL der im BCA Assay enthaltenen Farbstofflösung zu den Proben und die Inkubation auf einem Thermomixer für 30 Minuten bei 37°C. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte dann eine photometrische Extinktionsmessung bei 562 nm gemäß den Vorgaben des verwendeten Assays. Die jeweils drei pro Probe erhaltenen Proteinkonzentrationen wurden dabei gemittelt, bei Abweichungen der Messwerte >10% erfolgte eine Wiederholung des Assays. Die Proteinkonzentration der für die weitere Diagnostik verwendeten Proteinsuspensionen wurde dann mittels Verdünnung mit PBS auf etwa 1 µg/µL eingestellt.

Zur Denaturierung der Proteine erfolgte die Zugabe von Lämmli-Puffer (siehe Tab. 3) zu den Homogenaten in einem Verhältnis von 1:4 und eine Inkubation für 30 Minuten bei 37°C (Expression und Phosphorylierung des RyR2) bzw. 5 Minuten bei 95°C (Expression und Phosphorylierung von TnI).

Tab. 3: Zusammensetzung des Lämmli-Puffers

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
TRIS-Hydrochlorid pH 7,4 (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ · HCl)	157,60	250
Natriumlaurylsulfat (SDS) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	288,37	347
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	92,09	6840

Lösung der Substanzen in ddH₂O und Einstellung des pH auf 6,8 bei Raumtemperatur mit Salzsäure (HCl), anschließend Zugabe von 250 µg/mL Bromphenolblau und 10% β-Mercaptoethanol.

2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und elektrophoretischer Transfer

Die Auftrennung der untersuchten Zielproteine erfolgte mittels SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei führt die in Kapitel 2.2.1 beschriebene Denaturierung und Behandlung mit Natriumlaurylsulfat (SDS) zu einer vollständigen Entfaltung und gleichmäßig negativen Ladung der in den Probensuspensionen enthaltenen Proteine, welche im Folgenden beim Durchwandern eines Polyacrylamidgels in einem elektrischen Feld entsprechend Ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden können. Die vertikale Proteinelektrophorese erfolgte in einer Mini-PROTEAN® III™ Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Zur Anwendung kamen für die Untersuchung der Expression und des Phosphorylierungsstatus des RyR2 ein 4–15% Gradienten-

Polyacrylamidgel, für die übrigen Proteine ein 10%iges Polyacrylamidgel (Mini-PROTEAN® TGX™, 15-well, Bio-Rad Laboratories GmbH). Nach Auffüllen der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (siehe Tab. 4) erfolgte die Beladung der Probenaschen mit jeweils 15 µL der denaturierten Probensuspensionen. Als Molekulargewichtsstandard diente ein Dual-Color-Proteinmarker (PEQGOLD Protein-Marker V, PEQ-LAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Deutschland). Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA und einer Spannung von 100 V und wurde beendet, wenn die durch Bromphenolblau markierte Lauffront kurz davor war, das Ende des Polyacrylamidgels zu erreichen (ca. 90–120 Minuten). Währenddessen wurde die Elektrophoresekammer zur Kühlung in einer eisgefüllten Styroporbox platziert.

Tab. 4: Zusammensetzung des Laufpuffers mit 0,1% SDS

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
TRIS-Hydrochlorid ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$)	157,60	19,16
Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	92,09	156,40
Natriumlaurylsulfat (SDS) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)	288,37	3,47

Lösung der Substanzen in ddH₂O und Einstellung des pH auf 8,3 bei Raumtemperatur mit Salzsäure (HCl).

Zur immunologischen Visualisierung und Analyse der aufgetrennten Proteinbanden ist ein Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman® Protran®, 0,45 µm Porengröße, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) erforderlich. Hierzu wurden kurz vor Ende der SDS-PAGE zwei Schwämme (Bio-Rad Laboratories GmbH), vier Filterpapierstücke und die Nitrozellulosetransfermembran in einem vorbereiteten Gefäß mit Transferpuffer (siehe Tab. 5) getränkt. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel aus der Elektrophoresekammer entnommen und ebenfalls in Transferpuffer getaucht. Der elektrophoretische Transfer erfolgte dann in einer Mini-Trans-Blot-Zelle® (Bio-Rad Laboratories GmbH). Diese wurde wie von Towbin et al. (1979) beschrieben von der Anodenseite ausgehend mit einem Schwamm, zwei Lagen Filterpapier, der Nitrozellulosemembran, dem Polyacrylamidgel sowie erneut zwei Lagen Filterpapier und einem Schwamm bestückt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Es erfolgte dann die Anlage eines zum Polyacrylamidgel vertikalen elektrischen Felds mit einer Stromstärke von 400 mA und einer Potentialdifferenz von 200 V über eine Dauer von zwei Stunden. Hierbei erfolgte ebenfalls eine Kühlung der Transferkammer in einer eisgefüllten Box.

Tab. 5: Zusammensetzung des Transferpuffers

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
TRIS-Hydrochlorid ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$)	157,60	25,00
Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	92,09	156,40
Natriumlaurylsulfat (SDS) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)	288,40	0,35
Methanol (CH_4O)	32,04	986,00

Lösung der Substanzen in ddH₂O und Einstellung des pH auf 8,3 bei Raumtemperatur mit Salzsäure (HCl).

Die visuelle Erfolgskontrolle des Proteintransfers und Markierung der späteren Schnittlinien zur Selektion der jeweiligen Zielproteine anhand des mitgelaufenen Proteinmarkers erfolgte im Anschluss durch eine reversible Anfärbung der Proteinbanden mittels 1-minütiger Inkubation der Nitrozellulosemembran in Ponceau-S Lösung (Sigma Aldrich) bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplatte, welche anschließend durch mehrmaliges 1–2 minütiges Inkubieren in Waschpuffer (siehe Tab. 6) wieder ausgewaschen wurde.

Tab. 6: Zusammensetzung des Waschpuffers mit 0,1% Tween 20

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
TRIS-Hydrochlorid ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$)	157,60	15,36
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	50,00
Polysorbat 20 (Tween 20) ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	1227,72	0,90

Lösung der Substanzen in ddH₂O und Einstellung des pH auf 7,5 bei Raumtemperatur mit Salzsäure (HCl).

2.2.3 Immundetektion und Datenanalyse

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte zunächst eine 60-minütige Inkubation der Nitrozellulosemembranen bei Raumtemperatur unter konstanter Agitation in Waschpuffer (siehe Tab. 6), welcher zuvor mit 5% Trockenmilchpulver (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt wurde. Im Anschluss wurden die Membranen entlang der markierten Schnittlinien geteilt (siehe Kapitel 2.2.2) und es folgte die Inkubation mit dem jeweiligem Primärantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplatte. Die verwendeten Primärantikörper und die jeweiligen Antikörpertiter sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller (Art.-Nr.)	Titer
Anti-RyR2	Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA (HPA020028)	1 : 10 000
Anti-Phospho-RyR2 Ser2808/2809	Kaninchen	Badrilla, Leeds, England (A010-30)	1 : 5 000
Anti-Phospho-RyR2 Ser2814/2815	Kaninchen	Badrilla, Leeds, England (A010-31)	1 : 5 000
Anti-Troponin I	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA (4002S)	1 : 1 000
Anti-Phospho-Troponin I Ser23/24	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA (4004S)	1 : 1 000
Anti-GAPDH	Maus	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland (BT 46-995-55)	1 : 20 000
Anti-Calsequestrin	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA (PA1-913)	1 : 2 500

Lösung gemäß der angegebenen Titer in Waschpuffer (siehe Tab. 6) mit 0,5% Trockenmilchpulver (Carl Roth GmbH + Co. KG).

Anschließend wurden die Membranen erneut dreimal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen, um nicht- oder unspezifisch gebundene Primärantikörper zu entfernen. Dann wurde der jeweilige, in Abhängigkeit von der antikörperproduzierenden Spezies des Primärantikörpers ausgewählte, peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper (siehe Tab. 8) auf die Membranen gegeben. Nach Inkubation für

2 Stunden bei Raumtemperatur auf der Schwenkplatte erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit Waschpuffer zum Auswaschen von nicht gebundenen Antikörpern.

Tab. 8: Übersicht der verwendeten peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller (Art.-Nr.)	Titer
Anti-Kaninchen-IgG	Esel	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, England (NA 934)	1 : 10 000
Anti-Maus-IgG	Schaf	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, England (NA 931)	1 : 20 000

Lösung gemäß der angegebenen Titer in Waschpuffer (siehe Tab. 6) mit 0,5% Trockenmilchpulver (Carl Roth GmbH + Co. KG).

Die Peroxidaseaktivität der Sekundärantikörper ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung der an die jeweiligen Zielproteine gebundenen Primärantikörper mittels einer Chemolumineszenzreaktion. Hierzu wurde eine luminol- und peroxidhaltige Lösung (Immobilon™ Western, Merck Millipore, Billerica MA, USA) auf die Membranen gegeben und diese für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Belichtung eines Röntgenfilms (Fuji medical X-ray film, Fujifilm, Tokio, Japan) durch Platzierung der jeweiligen Membran und des Röntgenfilms in einer Fotokassette. Die Belichtungszeiten wurden dabei schrittweise an die Intensität der jeweiligen Proteinbanden angepasst.

Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mit dem Imaging Densitometer MultiImage™ Light Cabinet und der Software AlphaEaseFC™ Version 4.0 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro CA, USA). Dabei wurde die Expression der Zielproteine auf die Expression des nicht-regulierten Haushaltsproteins Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in der jeweiligen Myokardprobe bzw. für Troponin I (auf Grund des ähnlichen Molekulargewichts zu GAPDH) auf die Expression von Calsequestrin normalisiert. Zusätzlich erfolgte für die untersuchten Phosphoproteine (RyR2-Ser2809 bzw. -Ser2815 und TnI-Ser23/24) eine Normalisierung auf die Gesamtexpression des jeweiligen Ausgangsproteins in den untersuchten Myokardproben.

2.3 Fluoreszenzmikroskopische Kalziumbildgebung

Für die vergleichende funktionelle Untersuchung der Kalziumhomöostase in der kompensierten, nachlastinduzierten kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz sowie Darstellung der Effekte einer spezifischen Inhibition der PKA und CaMKII in diesen Pathologien wurden epifluoreszenz- und konfokalmikroskopische Untersuchungen an vitalen, frisch isolierten humanen linksventrikulären Kardiomyozyten durchgeführt.

2.3.1 Isolation von humanen Kardiomyozyten

Das linksventrikuläre Myokard wurde unter dem Binokular mit Hilfe eines Skalpells und einer mikrochirurgischen Schere unter Vermeidung signifikanter Zug- oder Scherkräfte in gekühlter kardiopleger Lösung (Custodiol®) in Quader mit einer Kantenlänge von etwa 1–3 mm zerteilt. Dabei wurden makroskopisch identifizierbare vernarbte Myokardareale sowie fibrotische bzw. fettgewebige Anteile des Endo- und Epikards entfernt. Nach dreimaligem Waschen in kalziumfreier Nährlösung für Suspensionskulturen (JMEM, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur erfolgte die Überführung in eine Spinner-Flasche mit 20 mL auf 37°C vorgewärmter JMEM-Lösung, welche außerdem die Enzyme Kollagenase Typ 1 (185 U/mg, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood NJ, USA) in einer Konzentration von 1 mg/mL sowie 13% Trypsin (Life Technologies) enthielt. Der pH der jeweiligen JMEM-Lösung wurde zuvor mittels Titration mit Natronlauge auf 7,4 bei Raumtemperatur bzw. 37°C eingestellt. Unter vorsichtigem Rühren der Lösung mittels eines Magnetrührers auf niedrigster Stufe erfolgte unter Lichtschutz zunächst eine Inkubation bei 37°C für 45 Minuten. Da im Rahmen dieses ersten enzymatischen Verdauungsschritts mit einer vermehrten Freisetzung von Fibrinolyt, extrazellulären Bestandteilen sowie im Rahmen der Präparation beschädigten Kardiomyozyten zu rechnen war, wurde der Überstand dieses initialen Ansatzes verworfen.

Es folgten dann die eigentliche Zellisolationsphase mit erneuter Zugabe von 10 mL JMEM-Lösung, welche nun lediglich 10 mg Kollagenase Typ 1 (und kein Trypsin) enthielt, zu dem vorverdauten Myokardgewebe und eine erneute Inkubation unter Lichtschutz und vorsichtigem Rühren für 15 Minuten. Um möglichst viele Kardiomyozyten aus dem Gewebeverband herauszulösen, erfolgte mit Abschluss der Inkubationszeit eine vorsichtige Durchmischung des Ansatzes mit Hilfe einer Pasteurpipette. Diese Suspension wurde anschließend abgenommen und zur Separation der Zellen in einem konischen 15 mL Zentrifugenröhrchen bei 600 U/min für 3 Minuten zentrifugiert, während durch Zugabe von frischer JMEM-Lösung mit Kollagenase Typ 1 zu dem verbliebenen Myokardgewebe ein erneuter Isolationsvorgang gestartet wurde. Dieses Isolationsprotokoll wurde in Abhängigkeit von der Zellausbeute 4- bis 5-mal wiederholt. Dabei erfolgte zur Optimierung des Isolationsergebnisses, sofern erforderlich, eine empirische Anpassung der Inkubationszeit (10–20 Min) und der Kollagenase Typ 1 Konzentration

(0,5–2,0 mg/mL) für die einzelnen Isolationsschritte auf Grundlage der im Rahmen der Präparation eingeschätzten Fibrosierung des Myokardgewebes sowie der Quantität und strukturellen Integrität der gewonnenen Kardiomyozyten, welche regelmäßig mittels stichprobenartiger Begutachtung der Zellsuspensionen unter dem Lichtmikroskop geprüft wurde.

Das bei der Zentrifugation nach Abnahme des Überstands gewonnene Zellpellet wurde jeweils in Abhängigkeit von der Pelletgröße in ca. 3–10 ml modifiziertem King's B Medium (siehe Tab. 9) vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette resuspendiert. Das Medium enthielt zusätzlich zum Stoppen etwaiger persistierender Trypsin- und Kollagenaseaktivität einen Volumenanteil von 10% bovinem Kalbsserum (HyClone®, GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, England).

Tab. 9: Zusammensetzung des modifizierten King's B Medium

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
Taurin (C ₂ H ₇ NO ₃ S)	125,14	10,00
Glutaminsäure (C ₅ H ₉ NO ₄)	147,13	70,00
Kaliumchlorid (KCl)	74,56	25,00
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	136,09	10,00
D-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180,16	22,00
Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure (EGTA, C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀)	380,35	20,00

Lösung der Substanzen in ddH₂O und Einstellung des pH auf 7,4 mittels Kaliumhydroxid (KOH) bei Raumtemperatur. Anschließend Zugabe von bovinem Kalbsserum (HyClone®, GE Healthcare Life Sciences) in einem Volumenanteil von 10%.

Es erfolgte dann eine erneute lichtmikroskopische Kontrolle der Zellqualität und -konzentration. Lediglich Zellsuspensionen, die eine ausreichende Anzahl an länglichen, nicht-granulierten Kardiomyozyten mit erhaltener Querstreifung enthielten, wurden für die weiteren funktionellen Experimente ausgewählt und gepoolt. Eine beispielhaft ausgewählte isolierte linksventrikuläre Kardiomyozyte aus einem terminal insuffizienten humanen Herz ist in Abb. 5 dargestellt. Zur Durchführung der konfokal- und epifluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden jeweils 400 µL der Zellsuspension in spezielle Messkammern für Fluoreszenzmikroskopie (IonOptix Corp., Milton, MA, USA) ausplattiert und für 45 Minuten inkubiert. Um eine ausreichende Adhärenz der Kardiomyozyten auf dem Glasobjektträger am Boden der Messkammer unter den Messungen mit kontinuierlicher Superfusion zu gewährleisten, erfolgte zuvor eine Beschichtung des Objektträgers mit je 4 µL Laminin (Sigma-Aldrich) und es wurde jegliche Manipulation an den Messkammern während der Inkubationszeit vermieden.

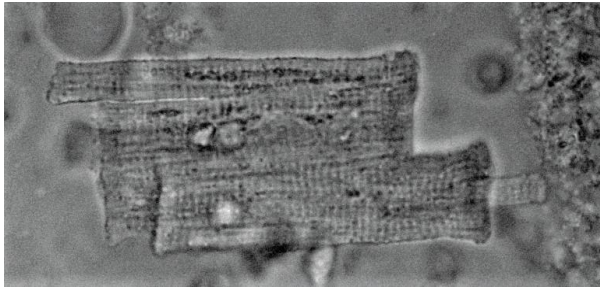


Abb. 5: Isolierte linksventrikuläre Kardiomyozyte aus einem explantierten terminal insuffizienten humanen Herz (Axio Vert.A1 Inversmikroskop, 40x-Objektiv, Carl Zeiss AG; Jena, Deutschland). Foto: Jörg Eiringhaus (mit freundlicher Genehmigung).

2.3.2 Messlösungen und pharmakologische Inhibitoren

Um ein physiologisches Milieu während der fluoreszenzmikroskopischen Messungen an isolierten humanen Kardiomyozyten zu gewährleisten kam eine modifizierte Tyrode-Lösung zur Anwendung, deren Zusammensetzung in Tab. 10 dargestellt ist. In den Interventionsgruppen enthielt die Tyrode-Lösung zusätzlich die jeweiligen Proteinkinaseinhibitoren (siehe unten), so dass sich insgesamt drei Versuchsgruppen ergaben, welche im Folgenden als Kon (Kontrolle ohne pharmakologische Intervention), H89 (PKA-Inhibition) und AIP (CaMKII-Inhibition) bezeichnet werden. Zur Stimulation der elektromechanischen Kopplung und Berücksichtigung der vermehrten catecholaminergen Aktivierung in der humanen Herzerkrankung erfolgte unmittelbar vor den Messungen außerdem die Zugabe des Noradrenalinderivats Isoproterenol in einer sehr geringen Konzentration von 10 nmol/L. Für die Epifluoreszenzexperimente wurde ein zusätzlicher Ansatz der Tyrode-Lösung mit Zugabe von 10 mmol/L Koffein vorbereitet.

Die Inhibition der PKA erfolgte mittels des Isochinolinsulfonamids H89. Dieser von Chijiwa et al. (1990) erstmalig synthetisierte Wirkstoff hemmt die PKA über kompetitive Bindung an die ATP-Bindungsstelle der katalytischen Untereinheit. Wenngleich dosisabhängig auch unspezifische Effekte auf andere Proteinkinasen und Kaliumkanäle diskutiert werden (Lochner und Moolman 2006; Murray 2008), ist eine PKA-Inhibition mit H89 in humanen isolierten Kardiomyozyten und unterschiedlichen Tiermodellen gut etabliert (unter anderem: Ai et al. 2005; Efentakis et al. 2020; Parks und Howlett 2012; Voigt et al. 2012). Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurde auf Grundlage dieser Vorarbeiten eine Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ ausgewählt. Hierzu erfolgte zunächst die Lösung von H89 Dihydrochlorid-Hydrat (Sigma-Aldrich) in ddH₂O mit einer Konzentration von 5 mmol/L. Diese Stock-Lösung wurde aliquotiert und bis unmittelbar vor Beginn der Experimente bei -20°C aufbewahrt. Es erfolgte dann eine Verdünnung der Stock-Lösung in der Tyrode-Lösung und den Fluoreszenzfarbstofflösungen auf die Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$.

Zur Inhibition der CaMKII wurde das synthetische Peptid AIP (*autocamtide-2-related inhibitory peptide*) eingesetzt. Dieser substratbasierte Inhibitor bewirkt in der gewählten Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ eine spezifische und potente nichtkompetitive Hemmung der CaMKII ohne relevante Beeinflussung anderer zellulärer Proteinkinasen (Ishida et al. 1995; Pellicena und Schulman 2014) und wurde ebenfalls bereits

vielfach in Experimenten an isolierten murinen und humanen Kardiomyozyten angewendet (unter anderem: DeSantiago et al. 2002; Sossalla et al. 2010; Toischer et al. 2013; Wagner et al. 2006). Zur Verbesserung der Zellpermeabilität wurde AIP in seiner myristoylierten Form (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale NY, USA) angewendet. Dabei erfolgte erneut zunächst der Ansatz einer bei -20°C gelagerten Stock-Lösung in ddH₂O mit einer Konzentration von 1 mmol/L, welche dann in der Tyrode-Lösung bzw. den Fluoreszenzfarbstofflösungen auf die Endkonzentration von 1 µmol/L verdünnt wurde.

Tab. 10: Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	136,00
Kaliumchlorid (KCl)	74,56	4,00
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	119,98	0,33
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	4,00
Magnesiumchlorid (Mg Cl ₂)	95,21	1,60
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	110,98	2,00
D-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180,16	10,00
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	238,31	10,00

Lösung der Substanzen in ddH₂O und Einstellung des pH auf 7,4 mittels Natronlauge (NaOH) bei Raumtemperatur. Unmittelbar vor den Experimenten erfolgte die Zugabe von Isoproterenol (10 nmol/L) sowie in den Interventionsgruppen die Zugabe des jeweiligen pharmakologischen Inhibitors H89 (5 µmol/L) bzw. AIP (1 µmol/L).

2.3.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Für die epifluoreszenzmikroskopischen Messungen kam der ratiometrische Kalziumfluoreszenzfarbstoff Fura-2 zur Anwendung. Durch eine Chelatkomplexbildung von Fura-2 mit freien Kalziumionen kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffmoleküls von 380 nm zu 340 nm, wobei das Emissionsmaximum von 510 nm nicht beeinflusst wird (Grynkiewicz et al. 1985). Durch Bindung von Kalzium nimmt die Fluoreszenzantwort bei Exzitation mit 340 nm um das 3-fache zu, während gleichzeitig das Signal bei Exzitation mit 380 nm auf ein Zehntel des Ursprungswertes abfällt (Cobbold und Rink 1987). Dies ermöglicht die Bildung eines Quotienten aus den Fluoreszenzsignalen beider Wellenlängen, der sogenannten Fura-2 Ratio. Da sich etwaige Abweichungen der Fura-2 Konzentration durch Unterschiede in der initialen Farbstoffbeladung der Zelle oder Farbstoffverluste (z. B. durch Ausbleichen) gleichartig auf die Fluoreszenzantworten beider Wellenlängen auswirken, erweisen sich

ratiometrische Fluoreszenzfarbstoffe als sehr robust gegenüber diesen Störeinflüssen (Barreto-Chang und Dolmetsch 2009). Auf eine quantitative Kalibrierung der Fura-2 Ratio auf definierte Kalziumkonzentrationen in permeabilisierten Kardiomyozyten wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, so dass die angegebenen Fura-2 Ratios stets als semiquantitative Größe in Bezug auf die Vergleichsgruppe des jeweiligen Experiments zu interpretieren sind. Fura-2 zeichnet sich durch eine hohe Kalziumsensitivität und einen großen Dynamikumfang der Fluoreszenzratio aus, die zeitliche Auflösung von Änderungen der Kalziumkonzentration ist jedoch durch die Bindungs- und Dissoziationskinetik des Farbstoffs sowie insbesondere die erforderlichen alternierenden Exzitationswellenlängen (siehe auch Kapitel 2.3.4 und Abb. 6) auf etwa 5 ms limitiert (Cobbold und Rink 1987).

Um die deutliche schnellere Kinetik der SR Kalziumsparks in der konfokalen Mikroskopie zu erfassen erfolgte dort die Verwendung des nicht-ratiometrischen Kalziumfluoreszenzfarbstoffs Fluo-3. Auch dieser Farbstoff bildet mit freien Kalziumionen einen Chelatkomplex, wodurch sich die Fluoreszenzintensität des Farbstoffmoleküls um das 40-fache erhöht, ohne Auswirkung auf das Absorptions- (488 nm) oder Emissionsmaximum (505 nm) (Minta et al. 1989). Hieraus resultiert ein günstiges Verhältnis von Signalfluoreszenz zu Hintergrundrauschen und eine hohe zeitliche Auflösung. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals ist jedoch stets auch von der aktuellen zytoplasmatischen Farbstoffkonzentration abhängig. Diesem Umstand wurde durch eine sorgfältige Befolgung des in allen Versuchsgruppen identischen Protokolls zur Farbstoffbeladung und eine ausreichend große Anzahl untersuchter Zellen Rechnung getragen.

Die eingesetzten Farbstoffe Fura-2 AM und Fluo-3 AM liegen im Ausgangszustand als Pentaacetoxymethylester vor (gekennzeichnet durch den Namenszusatz „AM“). Die hieraus resultierenden lipophilen Eigenschaften des Gesamtmoleküls verbessern die Membranpermeabilität und ermöglichen die Aufnahme der Farbstoffe in die Zelle. Dort erfolgt durch intrazelluläre Esterasen eine hydrolytische Abspaltung der Acetoxymethylgruppe. Hierdurch kommt es zur Aktivierung und Anreicherung der Farbstoffe im Zytosol, da die nun lipophoben Moleküle nicht mehr über die Zellmembran diffundieren können, während gleichzeitig ein nach intrazellulär gerichteter Konzentrationsgradient für die Acetoxymethylester-gebundene Form aufrechterhalten wird.

Für die vorliegende Arbeit wurden Fura-2 AM und Fluo-3 AM von der Firma Molecular Probes (Eugene OR, USA) bezogen. Es erfolgte jeweils zunächst der Ansatz einer bei -20°C gelagerten Stock-Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit einer Konzentration von 1 mmol/L. Für die Farbstoffbeladung der Kardiomyozyten erfolgte dann eine Verdünnung dieser Stock-Lösungen in Tyrode-Lösung (siehe Tab. 10) im Verhältnis 1:100 auf eine resultierende Farbstoffkonzentration von 10 µmol/L. Als Lösungsvermittler kam dabei 1 µL des nichtionischen Tensids Pluronic™ F-127 (20% in DMSO, Life Technologies) pro mL Tyrode-Lösung zum Einsatz. In den Interventionsgruppen erfolgte außerdem die Zugabe von H89 (5 µmol/L) bzw. AIP (1 µmol/L) zur Tyrode-Lösung, um eine Präinkubation der Zellen mit dem

jeweiligen Proteinkinaseinhibitor während der Farbstoffbeladung zu ermöglichen. Zur Vermeidung eines vorzeitigen Ausbleichens der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgten alle Verarbeitungsschritte in der Dunkelkammer sowie auch die Lagerung unter striktem Lichtschutz.

2.3.4 Epifluoreszenzmikroskopie

Nach Isolation und Ausplattieren der ventrikulären Kardiomyozyten in Laminin-beschichteten Messkammern für Fluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 2.3.1) wurde der Überstand der Messkammern in der Dunkelkammer vorsichtig abgesaugt und durch 200 μL Tyrode-Lösung mit 10 $\mu\text{mol/L}$ Fura-2 AM ersetzt. In den Interventionsgruppen enthielt die Tyrode-Lösung zusätzlich 5 $\mu\text{mol/L}$ H89 bzw. 1 $\mu\text{mol/L}$ AIP (siehe Kapitel 2.3.3). Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur zur Farbstoffbeladung der Kardiomyozyten und Präinkubation mit dem jeweiligen Proteinkinaseinhibitor in den Interventionsgruppen. Anschließend wurde auch die Farbstofflösung abgesaugt und 200 μL Tyrode-Lösung der jeweiligen Versuchsgruppe (Kon, H89, AIP) auf die Messkammern gegeben.

Abb. 6 stellt schematisch den Aufbau und die Funktionsweise der an ein Nikon Eclipse TE2000-U Inversmikroskop mit einem 40x-Öl-Immersionsobjektiv (Nikon, Tokyo, Japan) angeschlossenen Epifluoreszenzmessanlage (IonOptix Corp., Milton MA, USA) dar. Zunächst wurde die Messkammer auf dem Objektisch montiert, ein spezieller Einsatz erlaubte dabei einerseits die Befestigung einer Platinelektrode in der Messkammer zur kontinuierlichen elektrischen Feldstimulation der Kardiomyozyten, zusätzlich wurden über magnetische Halterungen zwei Kanülen in diagonal gegenüberliegenden Ecken der Messkammer platziert. Über eine der Kanülen erfolgte mittels eines modifizierten Infusionssystems mit Infusionsregler (Dahlhausen, Köln, Deutschland) eine kontinuierliche Superfusion der Messkammer mit ca. 20 ml/h Tyrode-Lösung der jeweiligen Versuchsgruppe, während eine an die zweite Kanüle angeschlossene Peristaltikpumpe überschüssige Lösung von der Oberfläche der Messkammer absaugte. Die Superfusion diente der Aufrechterhaltung konstanter extrazellulärer Ionen- und Wirkstoffkonzentrationen während der Experimente sowie auch einer konstanten Messung bei Raumtemperatur.

Vor Beginn der eigentlichen Messungen erfolgte zunächst eine fünfminütige Superfusion mit Tyrode-Lösung um eine vollständige Hydrolyse der Esterverbindungen des intrazellulär aufgenommenen Fura-2 AM (siehe Kapitel 2.3.3) und gleichzeitig das Auswaschen von überschüssigem extrazellulärem Farbstoff zu ermöglichen. Zusätzlich erlaubte dieses Zeitfenster das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes des zellulären Kalziumstoffwechsels unter der eingeleiteten kontinuierlichen Feldstimulation mit 0,5 Hz bei 20 V. Es folgte dann eine visuelle Auswahl der untersuchten Kardiomyozyten über das Lichtmikroskop. Voraussetzung für die Selektion einer Zelle war einerseits eine intakte Morphologie, insbesondere aber eine erkennbare und gleichmäßige Kontraktion unter der elektrischen Feldstimulation. Nach Ausrichtung und Fokussierung der Kardiomyozyte über die im Epifluoreszenzsystem integrierte Kamera wurden die

umgebenden Bereiche über einstellbare Blenden weitestgehend ausgeblendet, um Störeinflüsse durch Zelldetritus oder benachbarte Kardiomyozyten zu minimieren.

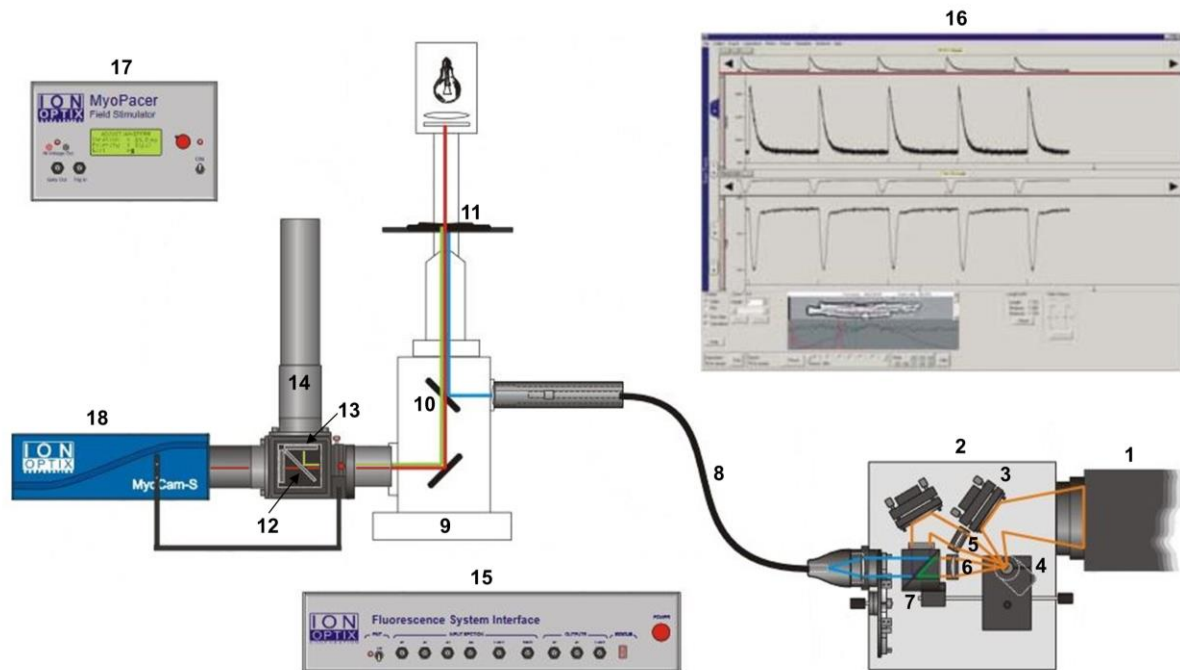


Abb. 6: Schematischer Versuchsaufbau der Epifluoreszenzmikroskopie (IonOptix Corp., modifiziert nach: http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Ca-and-Cont_HSW_digital.pdf, abgerufen am 22.01.2021).

Das Exzitationslicht (orange) der Xenonbogenlampe (1) wird im sogenannten HyperSwitch (2) über einen Vorderflächenspiegel (3) auf den galvanometrischen Spiegel (4) gelenkt. Durch die rasante Oszillation dieses Spiegels (bis zu 250 Hz) wird der Strahlengang abwechselnd durch die Bandpassfilter (5,6) für die beiden Exzitationswellenlängen 340 nm und 380 nm gelenkt. Über einen dichroitischen Spiegel (7) wird der Strahlengang beider Exzitationswellenlängen (blau) wieder vereint und über einen Flüssiglichtleiter (8) zum Inversmikroskop (9, Nikon Eclipse TE2000-U mit 40x-fach Öl-Immersionsobjektiv) geleitet, wo es nach Umlenkung über einen weiteren dichroitischen Spiegel (10) auf die Messkammer (11) mit den untersuchten Kardiomyozyten trifft. Das in Abhängigkeit von der aktuellen freien Kalziumkonzentration im Zytosol durch Fura-2 emittierte langwelligere Emissionslicht (510nm, grün) kann den dichroitischen Spiegel (10) passieren und gelangt über einen weiteren dichroitischen Spiegel (12) und einen vorgeschalteten 510 nm-Bandpassfilter (13) zum Photomultiplier (14), wo es in ein zur Fluoreszenzintensität proportionales elektrisches Signal umgewandelt wird. Im zentralen Steuergerät (15, Fluorescence System Interface, IonOptix Corp.) erfolgt eine Wandlung dieser analogen Signale in digitale Daten und die Verknüpfung der aufgezeichneten Emissionssignale mit den Informationen des HyperSwitch zur jeweiligen Exzitationswellenlänge. Diese Daten werden dann an dem angeschlossenen PC in der Software IonWizard Version 6.4.1.73 (IonOptix Corp.) aufgezeichnet und analysiert. Während der Experimente erfolgt eine kontinuierliche elektrische Stimulation (0,5 Hz, 20 V) der Kardiomyozyten mittels eines Feldstimulators (17, Myopacer, IonOptix Corp.) und einer in die Messkammer eingetauchten Platinelektrode. Über eine digitale Videokamera (18) kann dabei die Ausrichtung und Fokussierung der untersuchten Kardiomyozyte sowie das Ausblenden des Hintergrunds durch steuerbare Blenden kontrolliert werden.

Nun wurde das Experiment in der Messsoftware (IonWizard Version 6.4.1.73, IonOptix Corp.) gestartet, wodurch die Exzitationsbelichtung mit 340 bzw. 380 nm und eine Aufzeichnung der resultierenden Fluoreszenzemission bei 510 nm aktiviert wurde. Aus dem Emissionssignal bei Exzitation mit 340 nm (kalziumgebundener Zustand von Fura-2) und 380 nm (kalziumfreier Zustand von Fura-2) wurde die Fura-2 Ratio (angegeben als F_{340}/F_{380}) als semiquantitatives Maß der zytosolischen Kalziumkonzentration berechnet.

Das Messprotokoll sah zunächst über 30 Sekunden die Aufzeichnung der systolischen Kalziumtransienten unter kontinuierlicher Feldstimulation mit 0,5 Hz vor. Zur Bestimmung der SR Kalziumbeladung erfolgte anschließend die Aufzeichnung eines koffeininduzierten Kalziumtransienten. Hierzu wurde eine weitere Kanüle in der Messkammer, unmittelbar am Rand der Frontlinse des Objektivs und somit in direkter Nähe der untersuchten Zelle, platziert. Darüber erfolgte unter fortgesetzter Stimulation bei 0,5 Hz am Ende der Diastole die Applikation einiger Tropfen Tyrode-Lösung mit 10 mmol/l Koffein (siehe Kapitel 2.3.2) mittels eines elektronisch gesteuerten Applikationsgeräts (cFlow Perfusion Controller, Cell Micro Controls, Norfolk VA, USA). Gleichzeitig wurde die Feldstimulation gestoppt um Artefakte zu vermeiden. Koffein in derart hohen Konzentrationen bewirkt eine unmittelbare und anhaltende Öffnung des RyR2 mit vollständiger Depletion der SR Kalziumspeicher, so dass die Amplitude dieser Transienten mit der SR Kalziumbeladung der Zelle korreliert (Kitazawa 1988; Sitsapesan und Williams 1990; Smith et al. 1988). Nach jeder Messung erfolgte die jeweils mindestens 10-sekündige Aufzeichnung von zwei leeren Messfenstern identischer Größe in unmittelbarer Nachbarschaft der untersuchten Zelle zur späteren Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz. Nach Auslösung einer Koffeinapplikation erfolgte vor der nächsten Messung eine mindestens 5-minütige Superfusion der Messkammer zum Auswaschen des Koffeins, zusätzlich wurde bei der Auswahl der Zellen auf ein Vorgehen entgegen der Flussrichtung der Superfusion geachtet. Um mögliche zeitabhängige Effekte zu minimieren, wurde die Untersuchungsdauer pro Messkammer auf etwa 30–45 Minuten limitiert. Dabei erfolgte die Farbstoffinkubation der nächsten Messkammer parallel zur laufenden Messung, um einen nahtlosen Übergang zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu gewährleisten. Des Weiteren wurde die Reihenfolge der drei Versuchsgruppen kontinuierlich nach dem Rotationsprinzip geändert.

Die Datenauswertung erfolgte ebenfalls in der Software IonWizard. Hierzu war zunächst eine Anpassung der Fura-2 Ratio durch Subtraktion der aus den aufgezeichneten Leermessungen gemittelten Hintergrundfluoreszenz bei 340 bzw. 380 nm von den jeweiligen Fluoreszenzsignalen der untersuchten Zelle erforderlich. Anschließend wurden die aufgezeichneten systolischen Kalziumtransienten einer Zelle zu einem repräsentativen Transienten gemittelt. Artefaktüberlagerte oder arrhythmische Bereiche konnten dabei exkludiert werden. Anhand dieses gemittelten Transienten erstellte die Software eine Analyse des Transientenverlaufs mit Ausgabe der Fura-2 Ratio an der Grundlinie als semiquantitatives Maß für die diastolische Kalziumkonzentration und der Transientenamplitude als Maß der systolischen Kalzium-

freisetzung. Zur Betrachtung der Kalziumeliminationskinetik erfolgte die Berechnung der Zeitspanne zwischen dem Scheitelpunkt des Transienten bis zum Abfall auf 50% der Gesamtamplitude (RT50: *relaxation time 50%*). Bei der Auswertung der koffeininduzierten Transienten wurde analog hierzu vorgegangen. Auf Grund der fehlenden Möglichkeit zur Mittelung mehrerer Messungen sowie dem vermehrten Auftreten von Flussartefakten durch die rasche Koffeinapplikation in unmittelbarer Nähe der Zelle war hier jedoch zumeist eine händische Anpassung der Transienteninterpolation zur Erlangung valider Ergebnisse erforderlich. Es wurden lediglich solche Koffeintransienten berücksichtigt, die einen raschen Aufstrich der Fura-2 Ratio mit Beginn in der Diastole aufwiesen, da anderenfalls von einer inkompletten Erfassung des SR Kalziumgehalts durch unzureichende Anflutung des Koffeins oder falsches Timing der Koffeinapplikation auszugehen war.

2.3.5 Konfokale Laserscanmikroskopie

Die Vorbereitung und Farbstoffbeladung der untersuchten Kardiomyozyten erfolgte analog zu dem in Kapitel 2.3.4 beschriebenen Vorgehen bei der Epifluoreszenzmikroskopie, wobei die Inkubationszeit für den verwendeten nicht-ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM (10 $\mu\text{mol/L}$) 30 Minuten betrug. Auch die Zusammensetzung der verwendeten Messlösungen in den jeweiligen Versuchsgruppen (Kon, H89, AIP) und der Aufbau des Objektisches zur Ermöglichung einer kontinuierlichen Superfusion und elektrischen Feldstimulation der Messkammern war identisch. Verwendet wurde das konfokale Laserscansystem LSM 5 PASCAL kombiniert mit einem Axio Vert.A1 Inversmikroskop mit 40x-Öl-Immersionsobjektiv (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland). Als Exzitationslichtquelle diente ein Argon-Ionen-Laser mit 488 nm (Lasos Lasertechnik GmbH, Jena, Deutschland). Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde durch einen 505 nm Langpassfilter gefiltert. Die Funktionsweise des konfokalen Laserscanmikroskops und der Kalziumsparkerfassung in konfokalen Line-Scans werden in der Legende zu Abb. 7 erläutert.

Zum Auswaschen des extrazellulären Fluo-3 AM und vollständigen intrazellulären Hydrolyse der Acetoxymethylesterverbindungen erfolgte auch hier vor Beginn der Messungen eine fünfminütige Superfusion der Messkammern mit Tyrode-Lösung. Nach Auswahl einer morphologisch intakten Kardiomyozyte ohne erkennbare arrhythmische Kontraktionen wurde diese im Fokus des Objektivs platziert. Mittels eines orientierenden Laserscans wurde dann zunächst eine geeignete Fokusebene innerhalb der Zelle ausgewählt, in der der Scanpfad des geplanten Line-Scans parallel zur Längsachse der Kardiomyozyte unter Meidung erkennbarer Granula oder des Zellkerns geplant wurde. Durch einmaliges Abrastern der Linie wurden die Farbstoffbeladung der Zelle und die gewählten Lasereinstellungen überprüft. Die Aufzeichnung des eigentlichen Line-Scans (Scanparameter siehe Legende zu Abb. 7) erfolgte dann unter Ruhebedingungen nach vorheriger 10-sekündiger Feldstimulation (1 Hz, 20 V) zur Gewährleistung einer suffizienten Kalziumbeladung des SR.

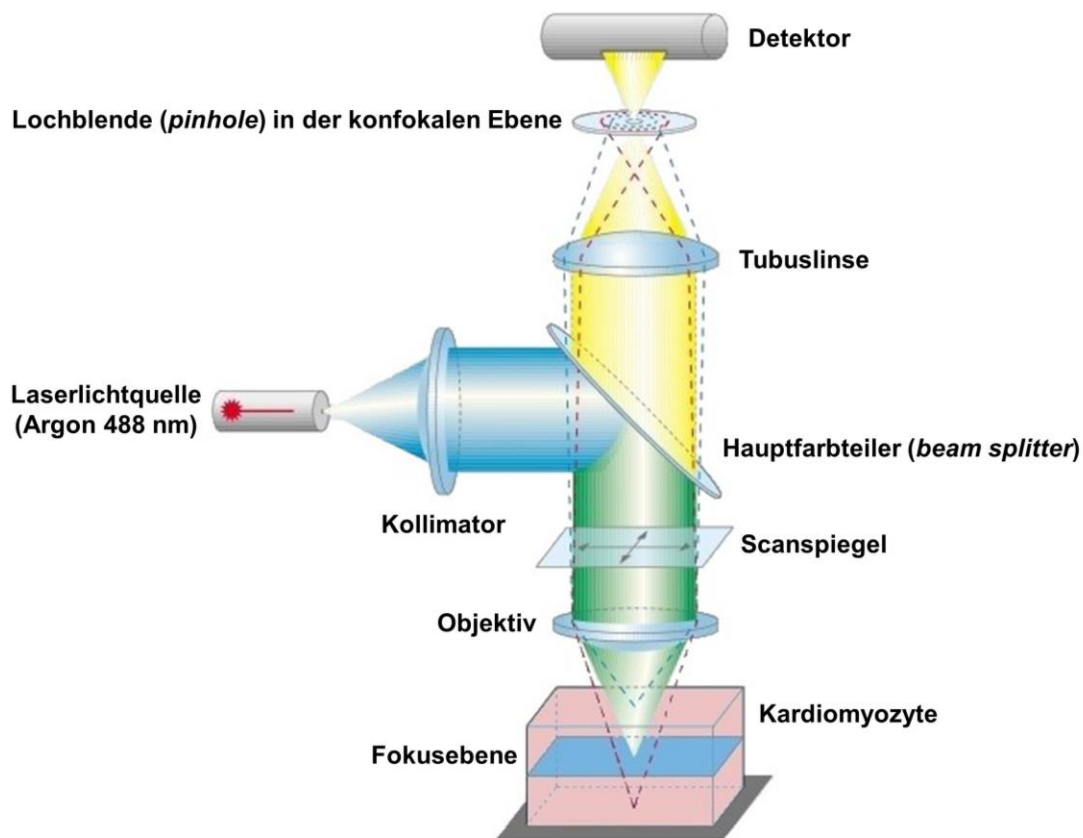


Abb. 7: Prinzip der konfokalen Laserscannmikroskopie (modifiziert nach: https://fcam.uni-frankfurt.de/files/documents/LSM510Confocor_d.pdf, abgerufen am 22.01.2021). Das Exzitationslicht (488 nm) des Argon-Ionen-Lasers wird über einen dichroitischen Spiegel, dem sogenannten Hauptfarbteiler oder *beam splitter*, in Richtung des Objektivs geleitet. Eine Anordnung von rasch beweglichen Scanspiegeln ermöglicht dabei eine Auslenkung des Laserstrahls in der x- und y-Achse und damit ein Abrastern des untersuchten Präparats, in diesem Fall der isolierten Kardiomyozyte. Trifft der Laserstrahl hier auf kalziumgebundenen Fluoreszenzfarbstoff (Fluo-3) kommt es zur Emission von langwelligerem Licht (505 nm), welches den Hauptfarbteiler passieren kann. Nach Bündelung durch die Tubuslinse trifft das emittierte Licht auf eine extrem feine Lochblende (*pinhole*) vor dem Detektor (Photomultiplier). Durch die Anordnung der Linsen und Spiegel liegen dabei der aktuelle Abtastpunkt des Lasers im Präparat und das *pinhole* stets zueinander „konfokal“, d.h. gleichzeitig im Fokus, während nicht aus der Fokusebene stammendes emittiertes Streulicht (gestrichelte Linien) durch die Lochblende ausgeblendet wird. Dies ermöglicht im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie deutlich kontrastreichere Bilder mit hoher lateraler und axialer Auflösung. Die registrierten Emissionssignale werden dabei einzelnen Bildpunkten (Pixeln) zugeordnet, deren Kantenlänge in den gewählten Versuchseinstellungen bei $0,075\ \mu\text{m}$ lag. Durch zeilenweises Abrastern des Messfeldes können hierüber zweidimensionale und durch graduelle Verschiebung der Fokusebene auch dreidimensionale zelluläre Strukturen erfasst werden. Zur Messung der SR Kalziumsparks in der vorliegenden Arbeit erfolgte ein sogenannter Line-Scan: Hierbei wurde eine zuvor definierte, parallel zur Längsachse der Kardiomyozyte verlaufende Linie von $38,4\ \mu\text{m}$ Länge (512 Pixel) innerhalb von $7,68\ \text{s}$ 10 000-mal durch den Scanlaser unidirektional abgetastet (1 302 Bildzeilen/s, Pixelzeit $0,64\ \mu\text{s}$). Durch Auftragung der entlang der Linie erfassten Emissionssignale gegen die Zeit entstand so eine zweidimensionale Bilddatei mit $512 \times 10\ 000$ Bildpunkten, auf Grundlage derer die Frequenz, Amplitude und Dimensionen der aufgezeichneten Kalziumsparks analysiert wurde.

Diese Schritte wurden in jeder Messkammer für etwa 10–15 Kardiomyozyten wiederholt. Hierbei wurde auch bei diesen Experimenten die Versuchsdauer pro Messkammer auf etwa 30 Minuten beschränkt und es erfolgte eine parallele Farbstoffinkubation der nächsten Versuchsgruppe um zeitabhängige Effekte so weit wie möglich zu reduzieren. Zusätzlich erfolgte zwischen den einzelnen Experimenten eine fortlaufende Rotation der Versuchsgruppenreihenfolge.

Die aufgezeichneten Bilddateien wurden in der Open Source Software ImageJ Version 1.47v (Schneider et al. 2012) unter Verwendung des SparkMaster-Plugins (Picht et al. 2007) analysiert. Diese Java-basierte Anwendung erlaubt die automatische Erkennung und anschließende Analyse der Dimensionen und Kinetik von Kalziumsparks in konfokalen Line-Scans. Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch Artefakte zu vermeiden erfolgte zusätzlich eine sorgfältige visuelle Verifizierung der identifizierten Kalziumsparks. Kardiomyozyten, die arrhythmische Kontraktionen, ausgeprägte Kalziumsparkwolken oder *calcium waves* aufwiesen, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Durch das Sparkmaster-Plugin erfolgte für jeden detektierten Kalziumspark die Berechnung der Kalziumsparkdauer und -breite (in ms bzw. μm) sowie der Kalziumsparkamplitude, welche sich aus dem Quotienten des maximalen Fluoreszenzsignals des detektierten Kalziumsparks und der umgebenden diastolischen Grundfluoreszenz (F/F_0) ergab. Als zusätzlicher Parameter wurde die maximale Aufstrichgeschwindigkeit des Fluoreszenzsignals der Kalziumsparks ($\Delta F/F_0 \cdot \text{s}^{-1}$) erfasst. Diese stellt ein Maß der maximalen Kalziumfreisetzungsgeschwindigkeit dar und korreliert somit mit der RyR2-Offenwahrscheinlichkeit und der hieraus resultierenden Anzahl der aktivierten RyR2 innerhalb eines *couplons* sowie der Triebkraft des diastolischen Kalziumausstroms aus dem SR.

Zur Berechnung der Kalziumsparkfrequenz einer Zelle wurde die Zahl der detektierten Kalziumsparks auf die Breite (abzüglich eventuell angeschnittener extrazellulärer Bereiche) und die Aufzeichnungsdauer des Line-Scans bezogen (umgerechnet auf $100 \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Unter Einbeziehung der oben genannten quantifizierbaren Kalziumsparkdimensionen erfolgte durch Multiplikation der Kalziumsparkfrequenz mit der durchschnittlichen Amplitude, Dauer und Breite der erfassten Kalziumsparks einer Kardiomyozyte die Berechnung des kumulativen SR Kalziumlecks der Zelle, welches als dimensionslose Größe in den grafischen Darstellungen stets auf die Vergleichsgruppe des jeweiligen Experiments normalisiert wurde. Diese Methode zur Approximation des SR Kalziumlecks ist gut etabliert (Sag et al. 2009; Sossalla et al. 2010).

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte in Abstimmung mit Herrn Dipl. Math. David Ellenrieder vom Institut für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen. Die in den Abbildungen dargestellten sowie den zugehörigen Textabschnitten beschriebenen experimentellen Daten sind als relative Häufigkeit (Abb. 11 B) oder als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben (übrige Abb.).

Zur Analyse der Western Blot und Epifluoreszenzdaten wurde ein Zweistichproben-t-Test verwendet, da hier die Teilvarianz, welche auf die Korrelation von Messwerten innerhalb eines Patienten zurückzuführen war, im Vergleich zur Gesamtvarianz der Messwerte gering war.

Die Analyse der Messdaten aus der konfokalen Laserscanmikroskopie erfolgte mittels einer Varianzanalyse mit Messwertwiederholung (*repeated measures ANOVA*) um der Ballung (*clustering*) der Messwerte innerhalb der einzelnen Patienten Rechnung zu tragen. Auf Grund der Austauschbarkeit der Messwerte wurde eine homogene Stichprobenvarianz und -korrelation (*compound symmetry*) angenommen. Bei der Untersuchung der Kalziumsparkfrequenz und des SR Kalziumlecks (Abb. 11 C+F, Abb. 13 B+F, Abb. 14 C+F, Abb. 15 B, Abb. 17 C+F) erfolgte die Analyse mittels eines nicht-parametrischen, rangbasierten *repeated measures ANOVA*, um der Verzerrung der Stichproben durch ein vermehrtes Vorkommen von Nullwerten durch Zellen ohne Kalziumsparks Rechnung zu tragen. In Analogie hierzu wurde für die Analyse des Anteils der sparkenden Zellen (Abb. 11 B) eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt, um die Ballung der Messwerte zu berücksichtigen.

Die Erstellung der Abbildungen und die statistische Analyse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism Version 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) und SAS Version 9.3 (SAS Institute, Cary NC, USA). P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Tab. 11 schlüsselt wichtige klinische und echokardiografische Parameter sowie die relevante kardiologische Medikation der untersuchten Patienten aus der kompensierten Hypertrophie und der terminalen Herzinsuffizienz sowie der Subgruppenanalyse der Patienten ohne Betablockermedikation in der terminalen Herzinsuffizienz (siehe Kapitel 3.2.1) auf.

Tab. 11: Klinische Daten der untersuchten Patientengruppen

	<i>Hy</i> (<i>n=25</i>)	<i>HF</i> (<i>n=27</i>)	<i>HF ohne</i> <i>β-Blocker</i> (<i>n=5</i>)
Männliches Geschlecht (%)	60,0	81,0	80,0
Alter (Jahre)	72,6±1,7	51,2±2,5	53,4±3,0
LVEF (%)	58,1±1,0	20,1±1,0	18,0±1,3
Interventrikuläres Septum (mm)	15,2±0,5	8,6±0,5	6,0±0,7
linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (mm)	44,4±2,4	68,7±2,5	72,3±5,9
Aortenklappenöffnungsfläche (cm ²)	0,69±0,04	n.a.	n.a.
Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe (mmHg)	53,5±4,4	n.a.	n.a.
Pharmakologische Therapie mit:			
ACE-Inhibitoren (%)	37,5	69,6	60,0
β-Blocker (%)	70,8	91,3	0,0
Diuretika (%)	65,2	91,3	80,0
Digoxin (%)	4,3	30,4	20,0
Katecholaminen (%)	4,3	34,8	80,0
Amiodaron (%)	4,3	26,1	40,0
AT1-Rezeptorantagonisten (%)	13,0	13,0	20,0
Aldosteronantagonisten (%)	0,0	69,6	40,0
Phosphodiesteraseinhibitoren (%)	0,0	39,1	80,0
Kalziumkanalblocker (%)	34,8	0,0	20,0

Klinische und echokardiografische Parameter sowie kardiologische Medikation der untersuchten Patientengruppen aus der kompensierten kardialen Hypertrophie (Hy), terminalen Herzinsuffizienz (HF) und der Subgruppenanalyse von HF-Patienten ohne Betablockermedikation. Angabe als Mittelwert ± SEM oder Anteil in Prozent. Es konnten nur die für den jeweiligen Patienten zum Zeitpunkt der Operation vorliegenden Daten eingeschlossen werden. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

3.2 Kalziumstoffwechsel in der kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz

3.2.1 Schlüsselproteine des Kalziumstoffwechsels

Die Expression und Phosphorylierung von Schlüsselproteinen des Kalziumstoffwechsels wurde mittels Western Blot Analysen in Myokardproben aus der kompensierten nachlastinduzierten Hypertrophie und der terminalen Herzinsuffizienz untersucht und mit Gewebeproben aus gesunden Spenderherzen verglichen.

Im Vergleich zum gesunden Kontrollmyokard zeigte sich in der kardialen Hypertrophie eine um $95\pm 24\%$ erhöhte Expression des RyR2 (n=5 vs. 12; $P<0,05$; Abb. 8 A). Die auf die Expression normalisierte Phosphorylierung des RyR2 war jedoch weder an der Phosphorylierungsstelle der PKA Ser2809 ($84\pm 7\%$; n=5 vs. 12; $P=0,36$; Abb. 8 B), noch an der für die CaMKII beschriebenen Phosphorylierungsstelle Ser2815 signifikant verändert ($113\pm 16\%$; n=5 vs. 12; $P=0,66$; Abb. 8 C).

In der terminalen Herzinsuffizienz war keine Veränderung der RyR2-Expression im Vergleich zu gesunden Spenderherzen nachweisbar ($89\pm 9\%$; n=8 vs. 4; $P=0,56$; Abb. 8 D). Während sich die Phosphorylierung an Ser2809 erneut unverändert darstellte ($123\pm 12\%$; n=8 vs. 4; $P=0,24$; Abb. 8 E), fand sich jedoch eine ausgeprägte Hyperphosphorylierung an Ser2815 ($311\pm 72\%$; n=8 vs. 4; $P<0,05$; Abb. 8 F). Da ein Großteil der terminal herzinsuffizienten Patienten im Rahmen einer leitliniengerechten Herzinsuffizienztherapie einen β -Blocker erhielt, konnte eine iatrogene Beeinflussung der PKA-Aktivität nicht sicher ausgeschlossen werden. Um dies näher zu betrachten, wurden Patienten identifiziert, die beispielsweise auf Grund von hämodynamischer Unverträglichkeit oder Komorbiditäten vor der Transplantation keinen β -Blocker einnahmen und mit Patienten verglichen, die präoperativ einen β -Blocker erhalten hatten. Interessanterweise konnte jedoch auch hier kein Unterschied in der PKA-vermittelten Phosphorylierung des RyR2 an Ser2809 festgestellt werden ($110\pm 11\%$; n=4 vs. 7; $P=0,68$; Abb. 8 G).

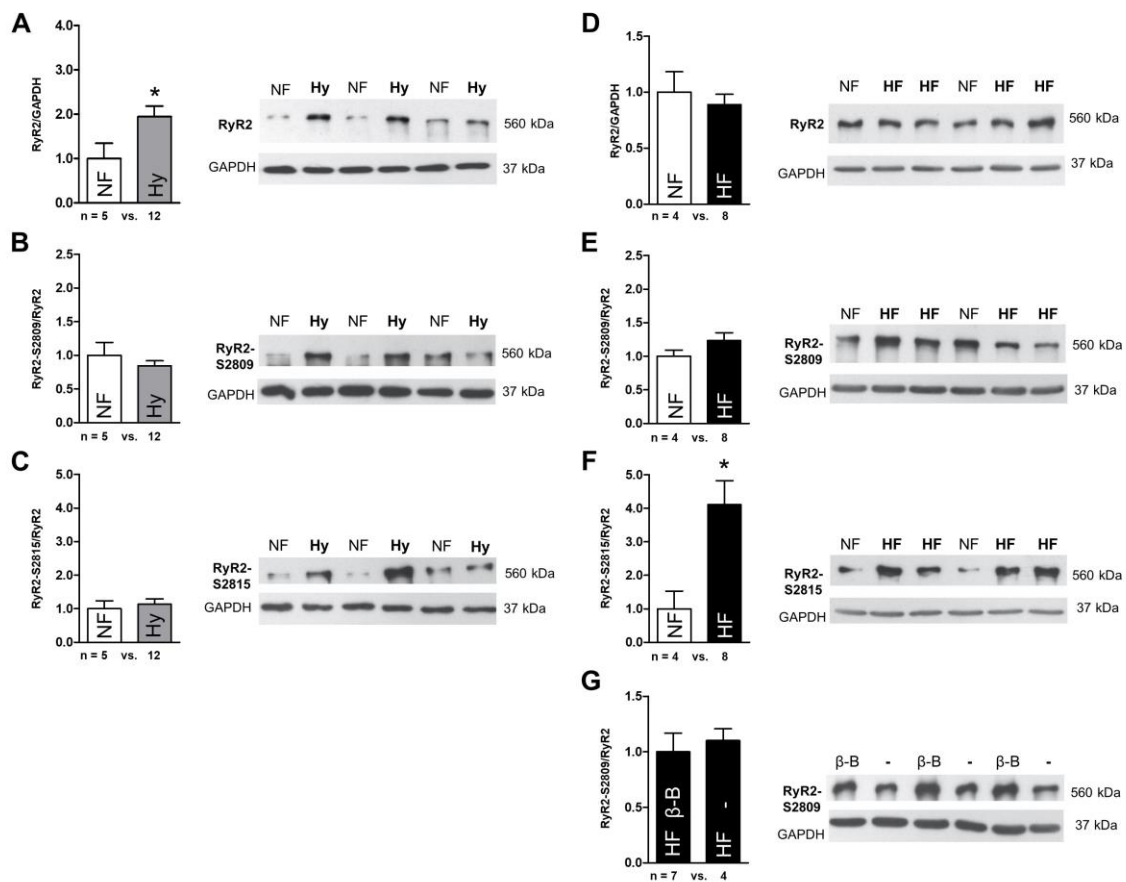


Abb. 8: Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus des RyR2 in der nachlastinduzierten kardialen Hypertrophie (Hy, grau) und terminalen Herzinsuffizienz (HF, schwarz) im Vergleich zu gesundem Kontrollmyokard (NF, weiß) sowie Einfluss einer β -Blocker Medikation (β -B) auf die PKA-vermittelte RyR2-Phosphorylierung. Dargestellt sind jeweils repräsentative Western Blots und die zugehörige Quantifizierung. **A)** In der Hy war im Vergleich zum NF eine erhöhte Expression des RyR2 (normalisiert auf GAPDH, $P < 0,05$) nachweisbar. Die auf die Expression bezogene Phosphorylierung des RyR2 wies in der Hy keine Regulation auf, weder an der **B)** PKA-Zielstelle Ser2809 ($P = 0,36$), noch an der **C)** CaMKII-Zielstelle Ser2815 ($P = 0,66$). **D)** In der HF stellten sich die Expression des RyR2 (normalisiert auf GAPDH, $P = 0,56$) und die **E)** PKA-vermittelte Phosphorylierung an Ser2809 (normalisiert auf die RyR2-Expression, $P = 0,24$) im Vergleich zum NF unverändert dar. **F)** An der CaMKII-Zielstelle Ser2815 hingegen zeigte sich in der HF eine deutliche Hyperphosphorylierung im Vergleich zum NF (normalisiert auf die RyR2-Expression, $P < 0,05$). **G)** Einfluss einer Betablockertherapie auf die Phosphorylierung des RyR2 an Ser2809 (bezogen auf die RyR2-Expression). Es wurde kein Unterschied zwischen Patienten mit (β -B) und ohne (-) Betablockermedikation festgestellt ($P = 0,68$).

Als ein weiteres Substrat der PKA in einem anderen subzellulären Kompartiment wurde außerdem Troponin I untersucht. Auch hier zeigte sich in der terminalen Herzinsuffizienz eine unveränderte Expression im Vergleich zum gesunden Kontrollmyokard ($95 \pm 8\%$; $n = 8$ vs. 4 ; $P = 0,73$; Abb. 9 A). Die Phosphorylierung an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle Ser23/24 war in der Herzinsuffizienz sogar um $48 \pm 9\%$ vermindert ($n = 8$ vs. 4 ; $P < 0,05$; Abb. 9 B).

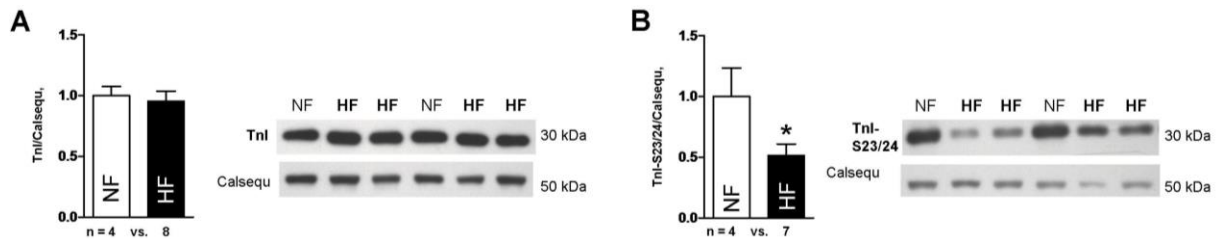


Abb. 9: Proteinexpression und PKA-vermittelte Phosphorylierung von Troponin I in gesundem Kontrollmyokard (NF, weiß) und terminaler Herzinsuffizienz (HF, schwarz). Dargestellt sind jeweils repräsentative Western Blots und die zugehörige Quantifizierung. **A)** In der HF war die auf Calsequestrin (Calsequ.) normalisierte Expression von Troponin I (TnI) im Vergleich zum NF unverändert ($P=0,73$). **B)** Es zeigte sich jedoch eine signifikant verminderte Phosphorylierung an Ser23/24 ($P<0,05$).

3.2.2 Kalziumhomöostase in der kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz

Zur funktionellen Analyse des kardiomyozytären Kalziumstoffwechsels wurden frisch isolierte Kardiomyozyten aus beiden untersuchten Pathologien mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Unter konstanter Feldstimulation bei 0,5 Hz wurde zunächst die Amplitude der systolischen Kalziumtransienten sowie die Grundlinie der Fluoreszenzenratio als Maß der diastolischen Kalziumkonzentration ausgewertet. Repräsentative Epifluoreszenzmessungen sind in Abb. 10 A dargestellt. Im Vergleich zur kompensierten kardialen Hypertrophie zeigte sich in der terminalen Herzinsuffizienz eine verminderte systolische Kalziumfreisetzung ($F_{340}/F_{380}=0,22\pm 0,03$ vs. $0,15\pm 0,01$; n Zellen/Patienten=9/5 vs. 42/4; $P<0,05$, Abb. 10 B) während die diastolischen Kalziumspiegel signifikant erhöht waren ($F_{340}/F_{380}=0,53\pm 0,05$ vs. $0,71\pm 0,03$; n Zellen/Patienten=15/6 vs. 53/4; $P<0,01$; Abb. 10 C).

Abschließend wurde durch direkte Applikation von Koffein die Menge des im SR gespeicherten Kalziums untersucht, repräsentative Messspuren aus beiden Pathologien sind in Abb. 10 D abgebildet. Auch hier zeigte sich eine signifikant verringerte Amplitude der koffeininduzierten Kalziumtransienten in der terminalen Herzinsuffizienz im Vergleich zur kardialen Hypertrophie ($F_{340}/F_{380}=0,25\pm 0,02$ vs. $0,34\pm 0,02$; n Zellen/Patienten=26/5 vs. 11/5; $P<0,05$; Abb. 10 B) als Zeichen einer verminderten Beladung der zellulären Kalziumspeicher.

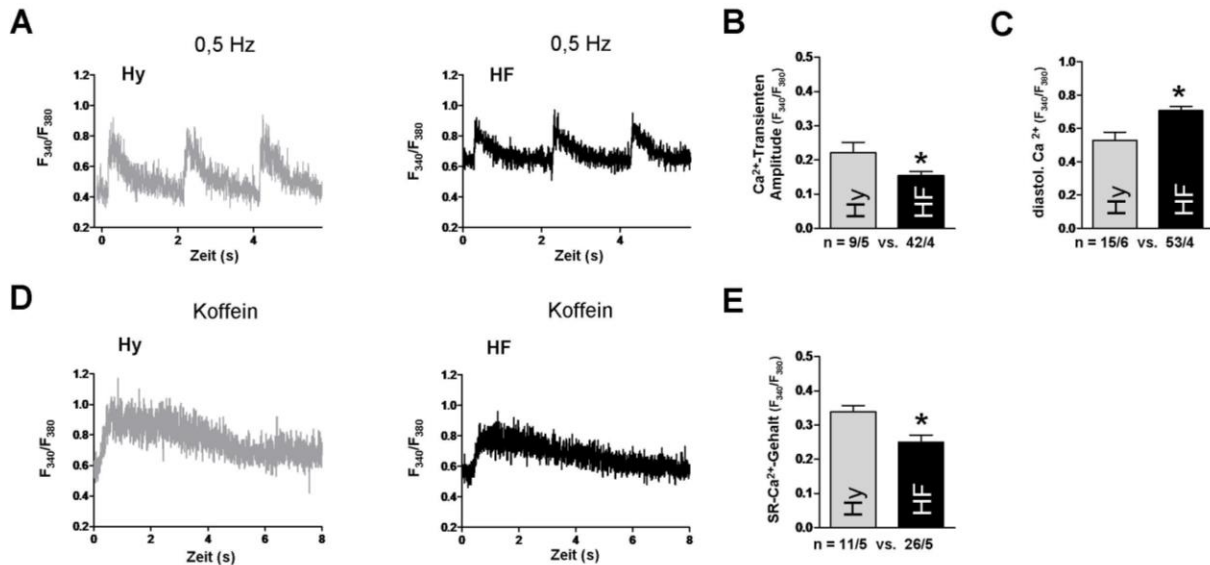


Abb. 10: Funktionelle Parameter des Kalziumstoffwechsels in der kompensierten kardialen Hypertrophie (Hy, grau) und terminalen Herzinsuffizienz (HF, schwarz). **A)** Repräsentative originale Epifluoreszenzaufzeichnungen (Fura-2 AM) von stimulierten systolischen Kalziumtransienten (0,5 Hz) in der Hy und HF. **B)** In der HF zeigte sich im Vergleich zur Hy eine verminderte Amplitude der systolischen Kalziumtransienten ($P < 0,05$), während **C)** die diastolischen Kalziumspiegel signifikant erhöht waren ($P < 0,01$). **D)** Repräsentative Epifluoreszenzaufzeichnungen von koffeininduzierten (10 mmol/L) Kalziumtransienten in der Hy und HF. **E)** Die Amplitude der koffeininduzierten Kalziumtransienten ist in der HF im Vergleich zur Hy signifikant vermindert ($P < 0,05$) als Zeichen einer verminderten Kalziumbeladung des SR.

3.2.3 SR Kalziumleck in der kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz

Als Maß für das diastolische Kalziumleck wurden die Frequenz und Dimensionen von lokalen spontanen diastolischen Kalziumfreisetzungen aus dem SR (Kalziumsparks), mittels konfokaler Laserscannmikroskopie in isolierten Kardiomyozyten von Patienten mit kompensierter kardialer Hypertrophie und terminaler Herzinsuffizienz bestimmt. Abb. 11 A zeigt repräsentative Ausschnitte aus konfokalen Line-Scans von isolierten Kardiomyozyten aus beiden Pathologien.

In der terminalen Herzinsuffizienz war im Vergleich zur kardialen Hypertrophie der Anteil der Zellen, die Kalziumsparks aufwiesen, signifikant erhöht (n Zellen=63/103 vs. 37/107; $P < 0,01$; Abb. 11 B). Insgesamt zeigte sich eine Verdoppelung der gemittelten Kalziumsparkfrequenz ($0,73 \pm 0,14$ vs. $1,46 \pm 0,19 \cdot 100 \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; n Zellen/Patienten=107/10 vs. 103/11; $P < 0,05$; Abb. 11 C). Weiterhin wiesen die detektierten Kalziumsparks in der terminalen Herzinsuffizienz eine leicht erhöhte Amplitude ($F/F_0 = 1,71 \pm 0,02$ vs. $1,63 \pm 0,02$; n Kalziumsparks/Patienten=352/11 vs. 186/9; $P < 0,05$; Abb. 11 D) sowie eine gesteigerte maximale Geschwindigkeit der Kalziumfreisetzung auf ($\Delta F/F_0 \cdot \text{s}^{-1} = 133,4 \pm 2,8$ vs. $110,2 \pm 3,4$; n Kalziumsparks/Patienten=352/11 vs. 186/9; $P < 0,05$; Abb. 11 E). Die Breite ($3,30 \pm 0,08$ vs. $3,18 \pm 0,12 \mu\text{m}$; n Kalziumsparks/Patienten=352/11 vs. 186/9; $P = 0,41$) und

Dauer ($50,00 \pm 1,94$ vs. $47,99 \pm 3,08$ ms; n Kalziumsparks/Patienten=352/11 vs. 186/9; $P=0,56$) der Kalziumsparks hingegen zeigten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Pathologien. In der Zusammenschau bedeutete dies eine annähernde Verdoppelung des errechneten SR Kalziumlecks (Kalziumsparkfrequenz x -amplitude x -breite x -dauer) in der terminalen Herzinsuffizienz im Vergleich zur kardialen Hypertrophie ($581,0 \pm 113,8$ vs. $300,9 \pm 82,3$; n Zellen/Patienten=107/10 vs. 103/11; $P<0,05$; Abb. 11 F).

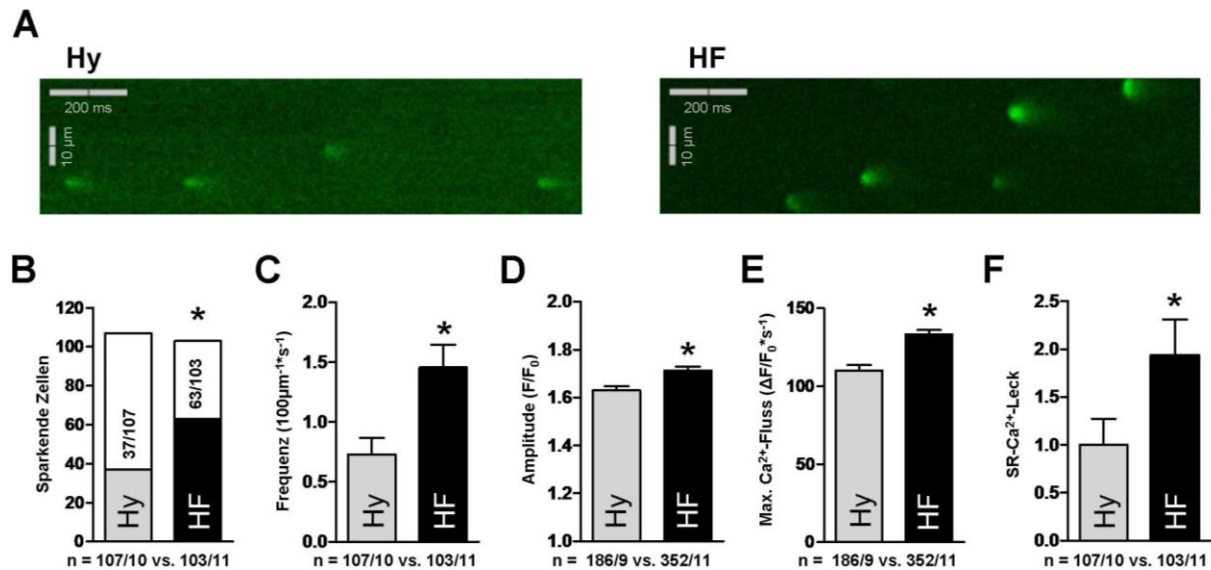


Abb. 11: Diastolisches SR Kalziumleck in der kompensierten kardialen Hypertrophie (Hy, grau) und terminalen Herzinsuffizienz (HF, schwarz). **A)** Repräsentative Ausschnitte aus konfokalen Line-Scans von isolierten humanen Kardiomyozyten aus der Hy und HF. **B)** Der Anteil der sparkenden Zellen ($P<0,01$) und **C)** die gemittelte Kalziumsparkfrequenz ($P<0,05$) waren in der HF im Vergleich zur Hy signifikant erhöht. **D)** Die Kalziumsparks wiesen in der HF eine höhere Amplitude ($P<0,05$) sowie **E)** eine gesteigerte maximale Geschwindigkeit der Kalziumfreisetzung auf ($P<0,05$). **F)** In der Summe ergab dies eine signifikante Erhöhung des errechneten SR Kalziumlecks (Kalziumsparkfrequenz x -amplitude x -breite x -dauer, normalisiert auf den Mittelwert der Hy) in der HF im Vergleich zur Hy ($P<0,05$).

3.3 PKA- und CaMKII-Inhibition in der kardialen Hypertrophie

Um die Rolle der PKA und CaMKII in der Regulation des RyR2 bei Patienten mit kompensierter nachlastinduzierter Hypertrophie näher zu betrachten, wurden die Effekte einer spezifischen Inhibition der PKA mit H89 und der CaMKII mit AIP auf relevante Parameter des Kalziumstoffwechsels in isolierten humanen Kardiomyozyten untersucht.

In der Epifluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine signifikante Abnahme der Amplitude der systolischen Kalziumtransienten bei 0,5 Hz (Abb. 12 A) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, sowohl nach Inhibition der PKA als auch der CaMKII (Kon vs. H89 vs. AIP; $F_{340}/F_{380}=0,24\pm 0,03$ vs. $0,15\pm 0,02$ vs. $0,14\pm 0,02$; n Zellen/Patienten=8/4 vs. 6/3 vs. 8/3; $P<0,05$ und $P<0,01$; Abb. 12 B). Weiterhin deutete sich unter beiden Inhibitoren die Tendenz zu höheren diastolischen Kalziumspiegeln (Kon vs. H89 vs. AIP; $F_{340}/F_{380}=0,50\pm 0,04$ vs. $0,60\pm 0,07$ vs. $0,56\pm 0,05$, n Zellen/Patienten=8/4 vs. 6/3 vs. 8/3, $P=0,20$ und $0,31$; Abb. 12 C) sowie unter H89 eine verlangsamte Kalziumeliminationskinetik an, dargestellt als Zeit bis zur Kalziumelimination auf 50% der maximalen systolischen Transientenhöhe (*relaxation time 50%*, RT50: $0,46\pm 0,04$ vs. $0,52\pm 0,05$ vs. $0,51\pm 0,07$ s; n Zellen/Patienten=8/4 vs. 6/3 vs. 8/3; $P=0,37$ und $0,57$, Abb. 12 D).

Die Inhibition der CaMKII bewirkte in der kardialen Hypertrophie außerdem eine signifikante Verringerung der Amplitude von koffeininduzierten Kalziumtransienten (Abb. 12 E) als Zeichen einer niedrigeren Kalziumbeladung des SR, während unter PKA-Inhibition kein Einfluss auf die SR Beladung nachweisbar war (Kon vs. AIP vs. H89; $F_{340}/F_{380}=0,34\pm 0,02$ vs. $0,22\pm 0,03$ vs. $0,32\pm 0,04$; n Zellen/Patienten=11/5 vs. 7/4 vs. 9/3; $P<0,01$ und $P=0,70$; Abb. 12 F).

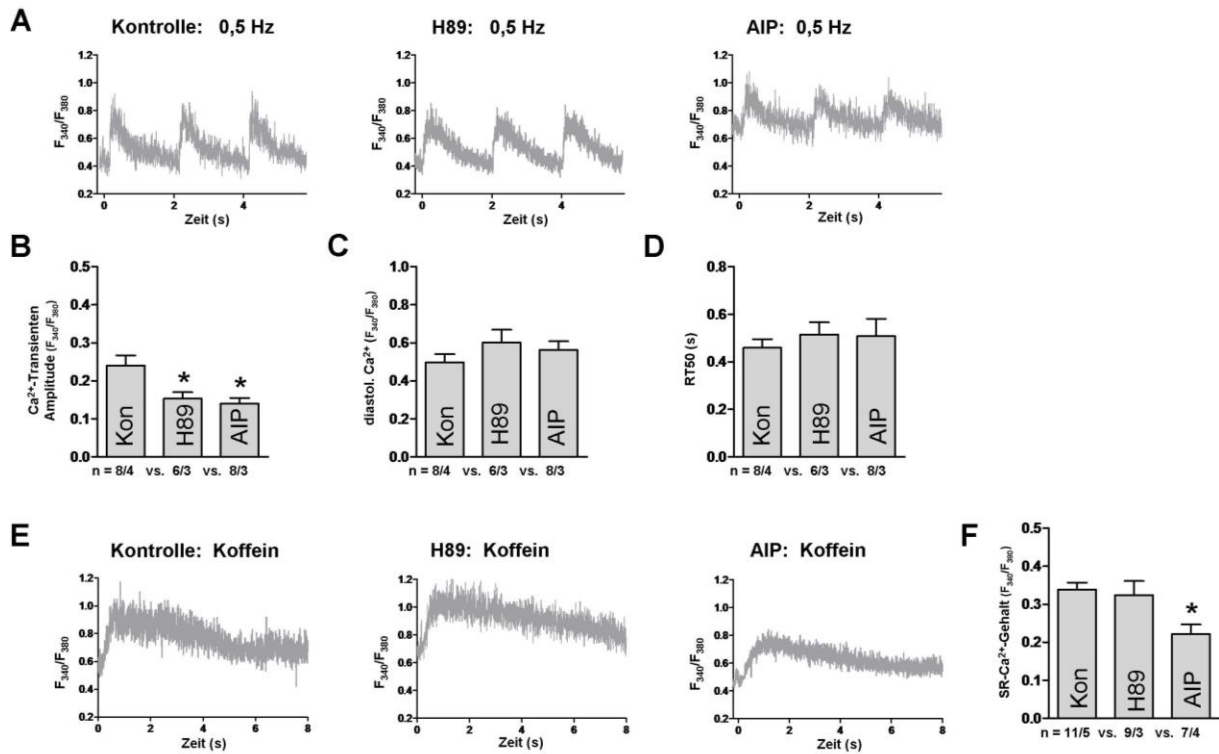


Abb. 12: Einfluss der PKA- und CaMKII-Inhibition auf die systolische und koffeininduzierte Kalziumfreisetzung in der kardialen Hypertrophie. **A)** Repräsentative Epifluoreszenzaufzeichnungen von isolierten humanen Kardiomyozyten unter konstanter Feldstimulation bei 0,5 Hz unter Kontrollbedingungen (Kon) und nach Inkubation mit H89 (5 μ mol/L) bzw. AIP (1 μ mol/L). **B)** Die Amplitude der systolischen Kalziumtransienten ist sowohl unter PKA-Inhibition mit H89 als auch unter CaMKII-Inhibition mit AIP signifikant verringert (jeweils $P < 0,05$). **C)** Unter beiden Inhibitoren zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Tendenz zu höheren diastolischen Kalziumkonzentrationen ($P = 0,20$ und $0,31$) und **D)** einer verlängerten Kalziumeliminationszeit (RT50, $P = 0,37$ und $0,57$). **E)** Repräsentative Epifluoreszenzaufzeichnungen von koffeininduzierten Kalziumtransienten in isolierten humanen Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit H89 bzw. AIP. **F)** Die Amplitude der koffeininduzierten Kalziumtransienten war unter AIP signifikant vermindert ($P < 0,01$), während H89 keinen Einfluss auf die SR Kalziumbeladung zeigte ($P = 0,70$).

Zusätzlich wurde mittels konfokaler Laserscannmikroskopie der Effekt einer akuten Proteinkinaseinhibition auf das diastolische SR Kalziumleck in der kardialen Hypertrophie untersucht. Abb. 13 A stellt repräsentative Ausschnitte aus konfokalmikroskopischen Line-Scans mit Kalziumsparks aus der unbehandelten Kontrollgruppe und unter CaMKII-Inhibition mit AIP dar. AIP verringerte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant die Kalziumsparkfrequenz ($0,41 \pm 0,09$ vs. $0,76 \pm 0,15 \cdot 100 \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; n Zellen/Patienten=100/9 vs. 91/9; $P < 0,05$; Abb. 13 B). Die aufgezeichneten Kalziumsparks (n Sparks/Patienten=95/9 vs. 162/8) zeigten bei unveränderter Amplitude ($F/F_0 = 1,63 \pm 0,02$ vs. $1,64 \pm 0,02$; $P = 0,82$; Abb. 13 C) unter AIP eine deutliche Tendenz zu einer verringerten Breite ($2,87 \pm 0,14$ vs. $3,24 \pm 0,13 \mu\text{m}$; $P = 0,07$; Abb. 13 D) und eine vergleichbare Sparkdauer ($42,70 \pm 3,54$ vs. $49,41 \pm 3,33$ ms; $P = 0,19$, Abb. 13 E). Insgesamt ergibt dies eine deutliche Reduktion des errechneten SR Kalziumlecks ($124,7 \pm 44,2$ vs. $325,3 \pm 94,1$; n Zellen/Patienten=100/9 vs. 91/9; $P = 0,05$; Abb. 13 F) unter Inhibition der CaMKII in der kompensierten nachlastinduzierten kardialen Hypertrophie.

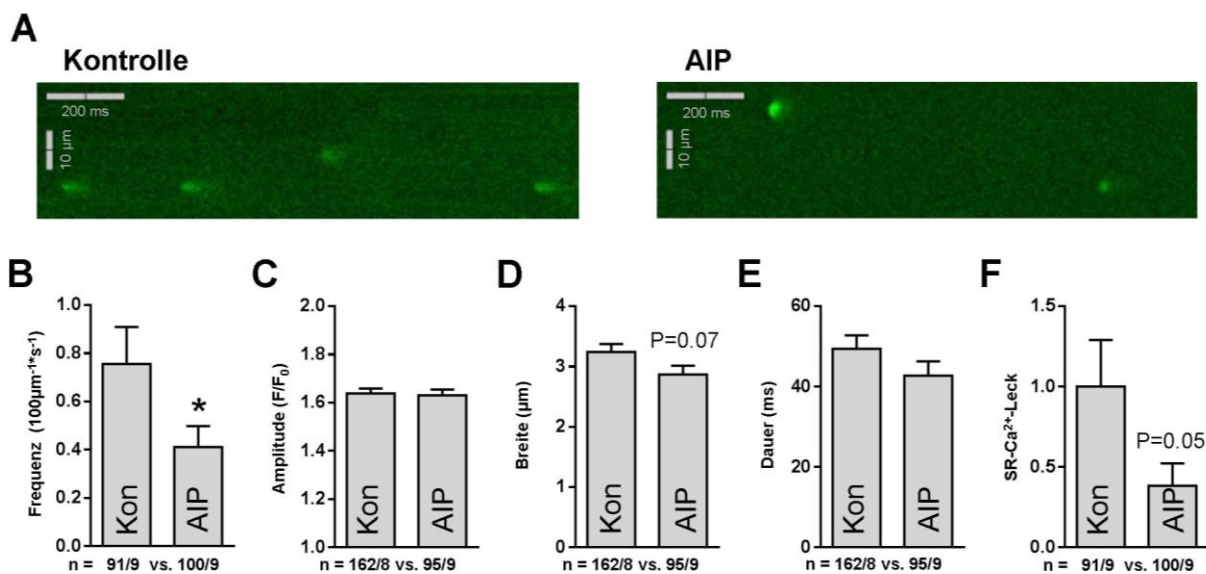


Abb. 13: Einfluss der CaMKII-Inhibition auf das diastolische SR Kalziumleck in der kompensierten kardialen Hypertrophie. **A)** Repräsentative Ausschnitte aus konfokalen Line-Scans von isolierten humanen Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (Kon) und nach Inkubation mit AIP ($1 \mu\text{mol/L}$). **B)** Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Kalziumsparkfrequenz in der AIP-Gruppe ($P < 0,05$), **C)** während kein Effekt auf die Kalziumsparkamplitude nachweisbar war ($P = 0,82$). **D)** Es bestand jedoch eine Tendenz zu schmaleren ($P = 0,07$) Kalziumsparks bei **E)** unveränderter Sparkdauer ($P = 0,19$) in der AIP-Gruppe. **F)** Eine Inhibition der CaMKII mit AIP reduzierte in der kardialen Hypertrophie das errechnete SR Kalziumleck (Kalziumsparkfrequenz \times -amplitude \times -breite \times -dauer; normalisiert auf Kon; $P = 0,05$).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Inhibition der PKA (repräsentative Originalabbildungen siehe Abb. 14 A). Nach Inkubation mit H89 nahm die Kalziumsparkfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ab ($0,38 \pm 0,08$ vs. $0,68 \pm 0,14 \cdot 100 \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; n Zellen/Patienten=129/9 vs. 101/9; $P < 0,05$; Abb. 14 B). Ebenso ergab sich auch unter H89 bei unveränderter Amplitude ($F/F_0 = 1,64 \pm 0,02$ vs. $1,63 \pm 0,02$; $P = 0,77$; Abb. 14 C) eine in der Tendenz verringerte Breite ($2,87 \pm 0,12$ vs. $3,21 \pm 0,13 \mu\text{m}$; $P = 0,07$; Abb. 14 D) und Dauer ($40,9 \pm 2,9$ vs. $49,1 \pm 3,3$ ms; $P = 0,08$; Abb. 14 E) der erfassten Kalziumsparks (n Sparks/Patienten=121/7 vs. 162/8). Hieraus resultierte eine signifikante Abnahme des errechneten SR Kalziumlecks bei Inhibition der PKA in der kardialen Hypertrophie ($106,9 \pm 33,8$ vs. $275,0 \pm 80,5$; n Zellen/Patienten=129/9 vs. 101/9; $P < 0,05$; Abb. 14 F).

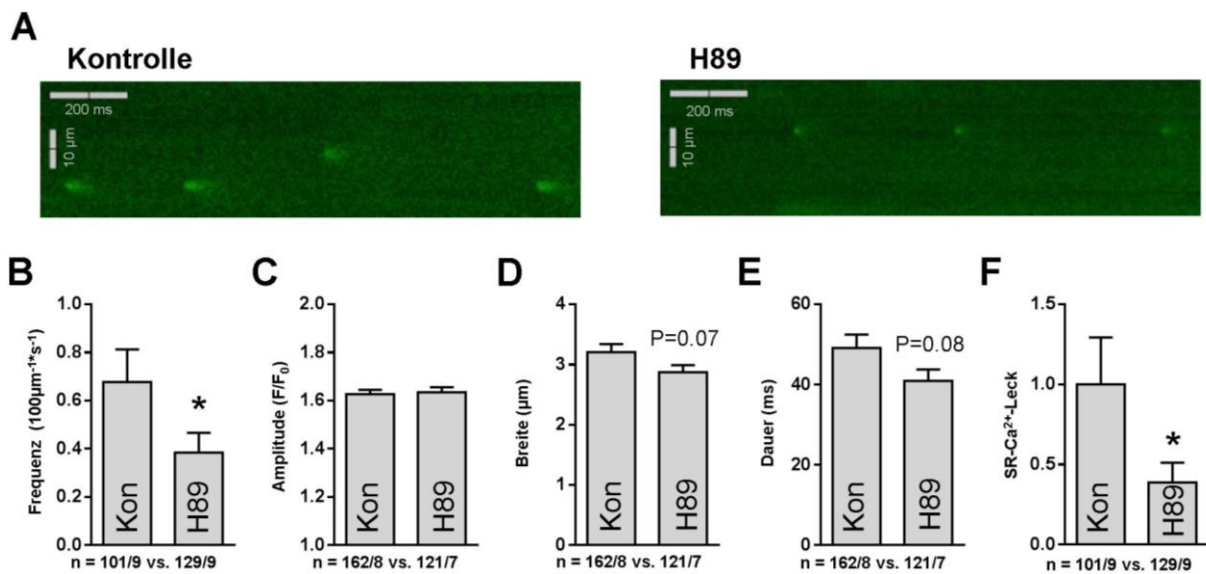
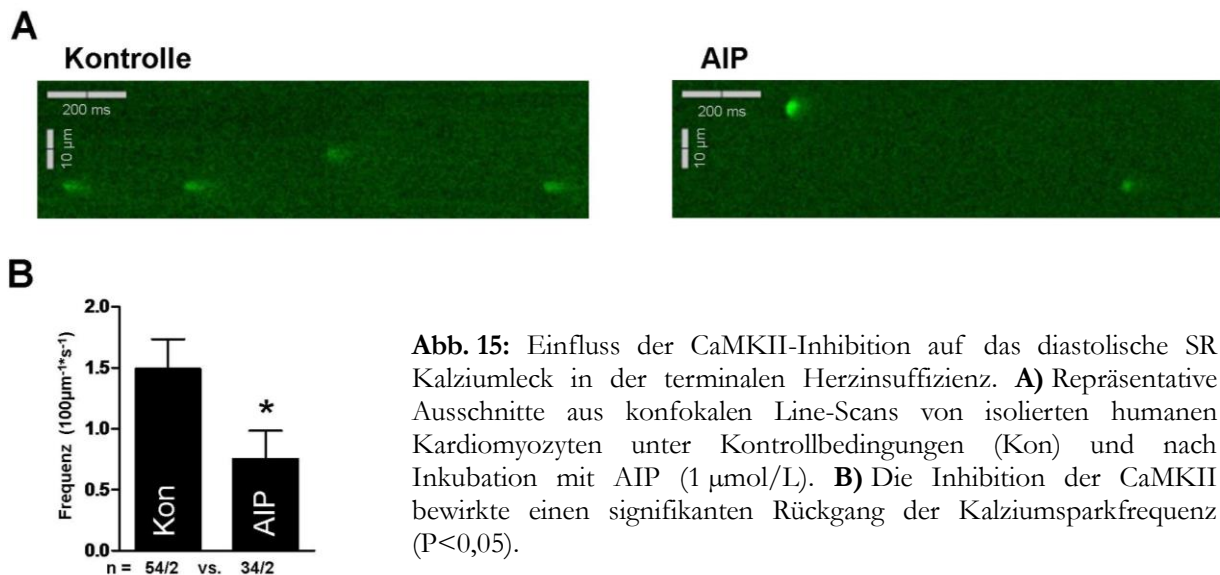


Abb. 14: Einfluss der PKA-Inhibition auf das diastolische SR Kalziumleck in der kompensierten kardialen Hypertrophie. **A)** Repräsentative Ausschnitte aus konfokalen Line-Scans von isolierten humanen Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (Kon) und nach Inkubation mit H89 ($5 \mu\text{mol/L}$). **B)** Die Behandlung mit H89 hatte eine signifikant verminderte Kalziumsparkfrequenz ($P < 0,05$) zur Folge, **C)** bei unveränderter Kalziumsparkamplitude ($P = 0,77$). Sowohl die Breite, **E)** als auch die Dauer der Kalziumsparks zeigten sich unter H89 tendenziell vermindert, ohne das geforderter Signifikanzniveau zu erreichen ($P = 0,07$ bzw. $P = 0,08$) **F)** Zusammenfassend bewirkte eine Inhibition der PKA in der kardialen Hypertrophie eine signifikante Senkung des errechneten SR Kalziumlecks (Kalziumsparkfrequenz x -amplitude x -breite x -dauer; normalisiert auf den Mittelwert der Kon; $P < 0,05$).

3.4 PKA- und CaMKII-Inhibition in der terminalen Herzinsuffizienz

In Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Inhibition der CaMKII den Kalziumstoffwechsel in der terminalen Herzinsuffizienz positiv beeinflusst und zu einer signifikanten Reduktion des SR Kalziumlecks führt. Hieraus resultierte eine erhöhte Kalziumbeladung des SR und eine gesteigerten Kontraktilität (Sossalla et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt erneut bestätigt werden und es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Kalziumsparkfrequenz (siehe repräsentative Originalabbildungen in Abb. 15 A) unter Inhibition der CaMKII mit AIP im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,75 \pm 0,23$ vs. $1,49 \pm 0,24 \cdot 100 \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; n Zellen/Patient=34/2 vs. 54/2; $P < 0,05$; Abb. 15 B).



Hierauf aufbauend wurde die Rolle der PKA in der terminalen Herzinsuffizienz unter Verwendung des Inhibitors H89 untersucht. Im Gegensatz zur Inhibition der CaMKII hatte eine Inhibition der PKA keinen positiven Effekt auf den veränderten Kalziumstoffwechsel in der Herzinsuffizienz, siehe hierzu auch die repräsentativen Epifluoreszenzaufzeichnungen in Abb. 16 A. In den mit H89 behandelten Kardiomyozyten (n Zellen/Patienten=30/4 vs. 43/4) zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sogar eine weitere Abnahme der Amplitude der systolischen Kalziumtransienten bei 0,5 Hz ($F_{340}/F_{380} = 0,11 \pm 0,01$ vs. $0,16 \pm 0,02$; $P < 0,05$; Abb. 16 B) und eine Tendenz zu einer verlangsamten Kalziumeliminationskinetik ($RT_{50} = 0,63 \pm 0,04$ vs. $0,54 \pm 0,04$ s; $P = 0,11$; Abb. 16 D). Ebenso wurde die diastolische Grundlinie der Fluoreszenzratio, als Maß des diastolischen Kalziumspiegels, durch H89 gesenkt ($F_{340}/F_{380} = 0,62 \pm 0,03$ vs. $0,71 \pm 0,03$; n Zellen/Patient=34/4 vs. 53/4; $P < 0,05$; Abb. 16 C). Auch die Amplitude der koffeininduzierten Kalziumtransienten (Abb. 16 E) war unter Inhibition der PKA im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert ($F_{340}/F_{380} = 0,19 \pm 0,02$ vs. $0,24 \pm 0,02$;

n Zellen/Patient=25/5 vs. 27/5; Abb. 16 F). Dies weist auf eine verminderte Kalziumbeladung des SR hin.

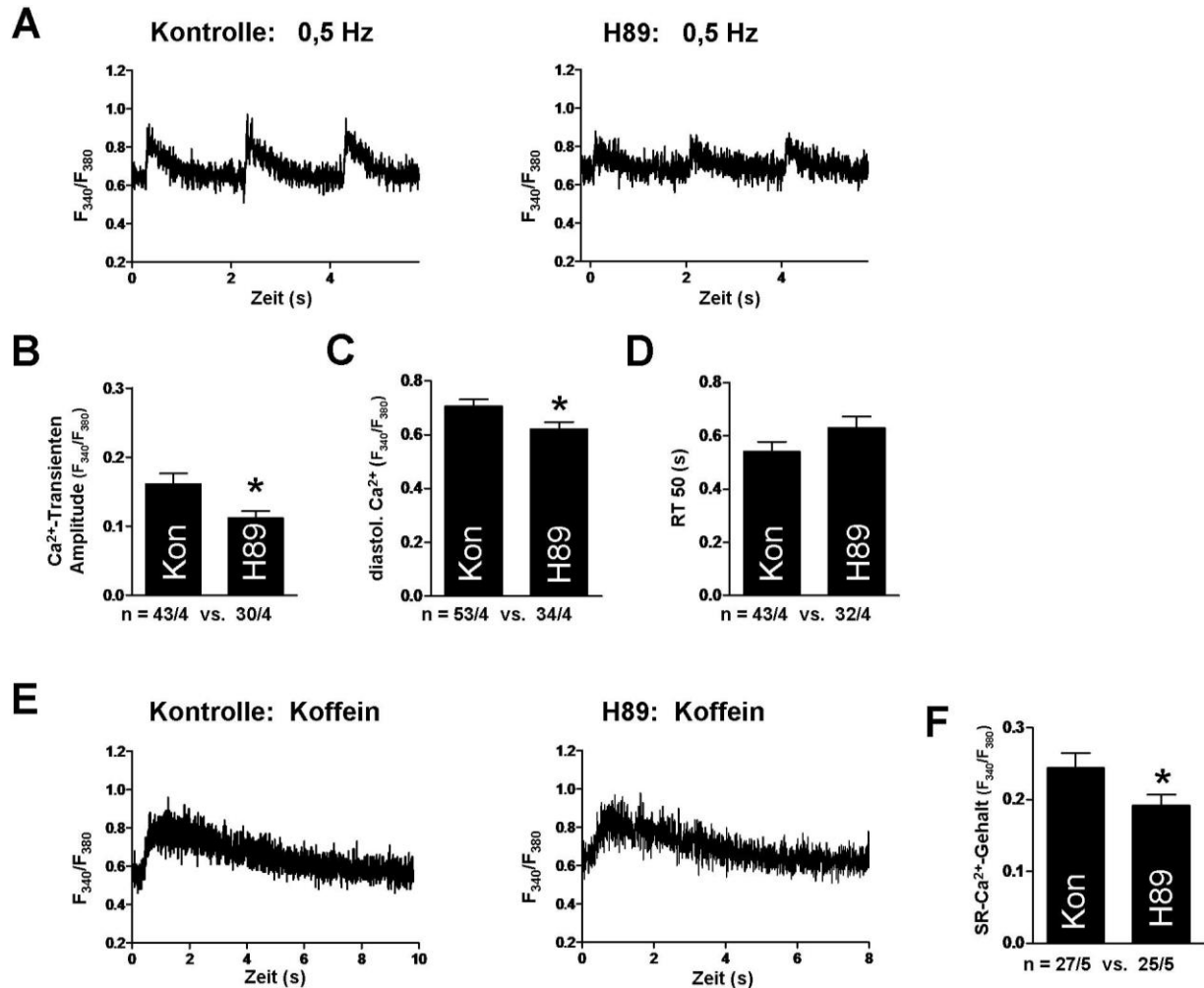


Abb. 16: Einfluss der PKA-Inhibition auf die systolische und koffeininduzierte Kalziumfreisetzung in der terminalen Herzinsuffizienz. **A)** Repräsentative Epifluoreszenzaufzeichnungen von isolierten humanen Kardiomyozyten unter konstanter Feldstimulation bei 0,5 Hz unter Kontrollbedingungen (Kon) und nach Inkubation mit H89 (5 µmol/L). **B)** Unter PKA-Inhibition mit H89 waren die Amplitude der systolischen Kalziumtransienten sowie **C)** das diastolische Kalzium signifikant verringert (jeweils P<0,05). **D)** Weiterhin zeigte sich unter H89 die Tendenz zu einer verlängerten halbmaximalen Relaxationszeit (P=0,11). **E)** Repräsentative Epifluoreszenzaufzeichnungen von koffeininduzierten Kalziumtransienten in isolierten humanen Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit H89 **F)** Die PKA-Inhibition mit H89 hatte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Abnahme der SR Kalziumbeladung zur Folge (P<0,05).

In der konfokalen Laserscannmikroskopie hatte die Behandlung mit H89 keinen Einfluss auf die mittlere Frequenz ($1,28 \pm 0,21$ vs. $1,29 \pm 0,20 \cdot 100 \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; n Zellen/Patienten=74/7 vs. 85/7; $P=0,85$; Abb. 17 B), die Amplitude ($F/F_0=1,66 \pm 0,02$ vs. $1,64 \pm 0,01$; $P=0,49$; Abb. 17 C), die Breite ($3,23 \pm 0,11$ vs. $3,17 \pm 0,10 \mu\text{m}$; $P=0,70$; Abb. 17 D) oder die Dauer ($47,66 \pm 2,17$ vs. $46,80 \pm 2,23$ ms; $P=0,78$, Abb. 17 E) der erfassten Kalziumsparks (n Sparks/Patienten=218/7 vs. 258/7). Repräsentative Line-Scans finden sich in Abb. 17 A. Somit ergab sich insgesamt ein unverändertes SR Kalziumleck ($456,3 \pm 124,5$ vs. $454,0 \pm 102,7$; n Zellen/Patienten=74/7 vs. 85/7; $P=0,95$; Abb. 17 F) unter Inhibition der PKA in der terminalen Herzinsuffizienz.

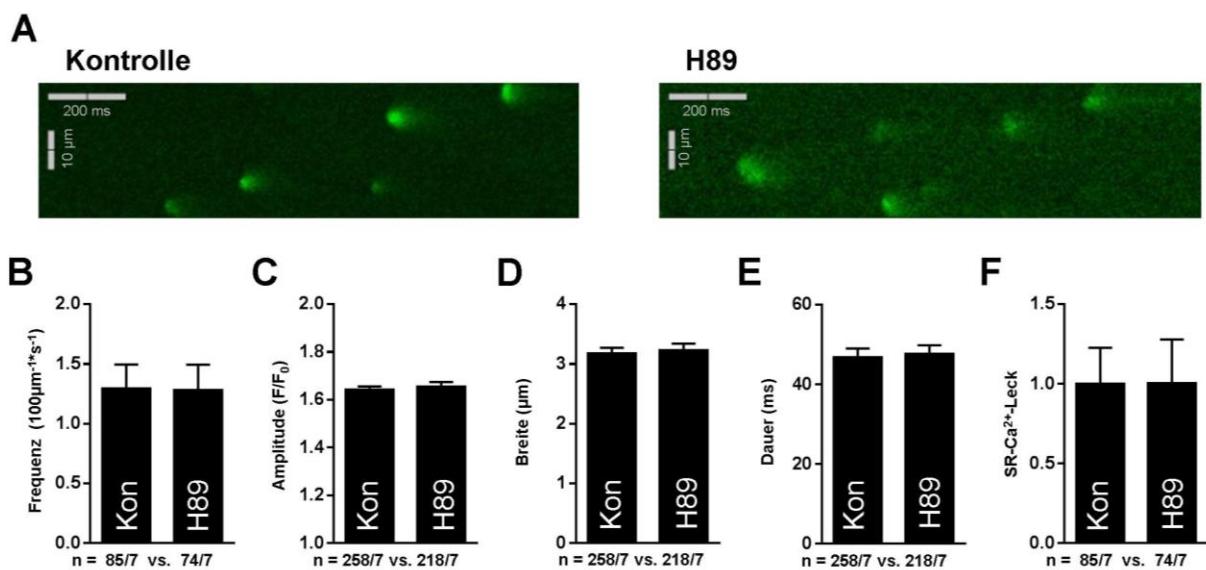


Abb. 17: Einfluss der PKA-Inhibition auf das diastolische SR Kalziumleck in der terminalen Herzinsuffizienz. **A)** Repräsentative Ausschnitte aus konfokalen Line-Scans von isolierten humanen Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (Kon) und nach Inkubation mit H89 ($5 \mu\text{mol/L}$). **B)** In der terminalen HF hatte H89 keinen Einfluss auf die Kalziumsparkfrequenz ($P=0,85$). **C)** Weder die Amplitude ($P=0,48$), **D)** noch die Breite ($P=0,70$) **E)** oder Dauer ($P=0,78$) der detektierten Kalziumsparks zeigten einen Effekt der PKA-Inhibition. **F)** Hieraus resultierte ein im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändertes SR Kalziumleck (Kalziumsparkfrequenz x -amplitude x -breite x -dauer; normalisiert auf den Mittelwert der Kon; $P=0,95$).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit hatte eine umfassende Untersuchung des kardialen Kalziumstoffwechsels und der zu Grunde liegenden Regulation durch die PKA und die CaMKII in der kompensierten kardialen Hypertrophie und der terminalen Herzinsuffizienz zum Ziel. Zusammenfassend lassen sich folgende zentrale Ergebnisse postulieren:

- I. Das diastolische SR Kalziumleck nimmt im Verlauf von der kompensierten kardialen Hypertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz deutlich zu. Hiermit einher gehen tiefgreifende Veränderungen der elektromechanischen Kopplung. Im Vergleich zur kardialen Hypertrophie findet sich in der terminalen Herzinsuffizienz eine ausgeprägte Hyperphosphorylierung des RyR2 an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser2815. Folglich konnte das SR Kalziumleck durch CaMKII-Inhibition gesenkt werden.
- II. Der Übergang von der kardialen Hypertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz geht nicht mit einer vermehrten PKA-abhängigen Phosphorylierung des RyR2 an Ser2809 einher. Eine Inhibition der PKA hat in der terminalen Herzinsuffizienz keinen Einfluss auf das SR Kalziumleck.
- III. In der kardialen Hypertrophie zeigte sich sowohl die PKA-abhängige als auch die CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR2 im Vergleich zu gesundem Kontrollmyokard unverändert. Eine Inhibition der untersuchten Kinasen führte jeweils zu einer Reduktion des basalen SR Kalziumlecks.

4.2 Kalziumstoffwechsel in der kompensierten kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben eine annähernde Verdoppelung des SR Kalziumlecks in der terminalen Herzinsuffizienz im Vergleich zur kompensierten kardialen Hypertrophie. Dies lässt auf eine deutlich erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 in der Diastole schließen. Aus dem gesteigerten SR Kalziumleck resultierten erhöhte diastolische Kalziumspiegel im Zytoplasma sowie eine verminderte SR Kalziumbeladung. Die Tatsache, dass die erhöhte Kalziumsparkfrequenz und die gesteigerte maximale Geschwindigkeit der Kalziumfreisetzung trotz einer in Folge reduzierter SR Kalziumbeladung verminderten Triebkraft für den diastolischen Kalziumausstrom auftreten, unterstreicht diesen Funktionsverlust des RyR2 in der terminalen Herzinsuffizienz noch zusätzlich. Zieht man außerdem die erhöhte Expression des RyR2 in der Hypertrophie in Betracht, welche in der terminalen Herzinsuffizienz nicht mehr nachweisbar war, so ergibt sich bezogen auf den einzelnen Rezeptor eine sogar noch größere Zunahme des Kalziumleckstroms als es die kumulierten Werte andeuten. Als Folge des gesteigerten diastolischen Kalziumverlustes zeigten die untersuchten Kardiomyozyten in der terminalen Herzinsuffizienz eine verminderte systolische Kalziumfreisetzung. Diese Befunde decken sich mit einer früheren Untersuchung von Lindner et al. (1998), die eine positive Korrelation zwischen linksventrikulärer Ejektionsfraktion und SR Kalziumbeladung und eine Abnahme der SR Kalziumspiegel in der humanen terminalen Herzinsuffizienz demonstrieren konnte. Die aktuellen Ergebnisse widersprechen gleichzeitig deutlich einer Publikation der selben Arbeitsgruppe die besagt, dass die Kalziumsparkfrequenz in terminal insuffizientem Myokard im Vergleich zu gesunden Kontrollproben rückläufig sei und das diastolische SR Kalziumleck somit als Ursache des verminderten SR Kalziumgehaltes unwahrscheinlich scheine (Lindner et al. 2002). In verschiedenen tierexperimentellen Arbeiten an Mäusen (Maier et al. 2003; Sag et al. 2011), Kaninchen (Ai et al. 2005; Shannon et al. 2003) und Hunden (Belevych et al. 2011; Yano et al. 2000) konnte eine Zunahme des diastolischen SR Kalziumlecks in der Herzinsuffizienz jedoch bereits wiederholt nachgewiesen werden. Zudem konnte eine Folgeuntersuchung unserer Arbeitsgruppe zur Rolle der PP1 und PP2a in diesem Kontext die in der aktuellen Arbeit nachgewiesene signifikante Zunahme des SR Kalziumlecks von der humanen kompensierten kardialen Hypertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz und die hieraus resultierende Reduktion der SR Kalziumbeladung und systolischen Kalziumfreisetzung vollständig reproduzieren (Fischer et al. 2018).

Klinisch bedingt der vermehrte diastolische Kalziumverlust aus dem SR nicht nur eine systolische kontraktile Dysfunktion, auch die Störung der diastolischen Relaxation in der Herzinsuffizienz lässt sich anhand der gezeigten Steigerung der zytoplasmatischen Kalziumspiegel erklären. Weiterhin kann ein erhöhtes SR Kalziumleck über den Vorwärtsmodus des sarkolemmalen NCX späte Nachdepolarisationen auslösen, die einen entscheidenden arrhythmogenen Trigger darstellen und somit letztlich auch zur Mortalität der Erkrankung beitragen. Dieser Mechanismus gewinnt in der Herzinsuffizienz noch

zusätzlich an Bedeutung, da mehrere Studien eine verminderte Expression der SERCA2a bei gleichzeitiger Überexpression des NCX nachweisen konnten (Hasenfuss 1998; Pieske et al. 1999). Mohamed et al. (2018) postulieren nach einer Untersuchung des direkten RyR2-Stabilisators S36 in einem Mausmodell der nachlastinduzierten Herzinsuffizienz durch operative transverse Konstriktion der Aorta thoracalis (TAC-Operation) sogar, dass die arrhythmogenen Effekte des SR Kalziumlecks gegenüber dessen Rolle in der Entwicklung einer kontraktilen Dysfunktion klar im Vordergrund stünden.

4.3 PKA- und CaMKII abhängige Regulation des SR Kalziumlecks in der kardialen Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz

Als entscheidenden Auslöser der Dysregulation der RyR2-Funktion in der humanen Herzinsuffizienz lassen die erhobenen Daten auf eine Hyperphosphorylierung des Rezeptors durch die CaMKII schließen. Insgesamt zeigte sich im Vergleich zur kompensierten kardialen Hypertrophie eine 4-fache Erhöhung der RyR2-Phosphorylierung an Ser2815 in der terminalen Herzinsuffizienz. Im Gegensatz hierzu ergaben die aktuellen molekularbiologischen Untersuchungen keine Belege für einen PKA-abhängigen Pathomechanismus des erhöhten SR Kalziumlecks in der humanen Herzinsuffizienz. Die Phosphorylierungsstelle der PKA am RyR2, Ser2809, zeigte in der terminalen Herzinsuffizienz keine Regulation, die PKA-abhängige Phosphorylierung von Troponin I an Ser23/24 war im Vergleich zur kompensierten Hypertrophie sogar verringert. Der Vergleich von Patienten, die vor der Transplantation einen β -Blocker erhielten, mit Patienten ohne diese Medikation ergab keinen Unterschied hinsichtlich der RyR2-Phosphorylierung an Ser2809 und lässt somit eine iatrogene Beeinflussung einer erhöhten intrinsischen PKA-Aktivität unwahrscheinlich erscheinen.

Dieser Befund bestätigte sich auch in den funktionellen Untersuchungen des Kalziumstoffwechsels unter pharmakologischer Inhibition der PKA mit H89 und der CaMKII mit AIP. In der kompensierten kardialen Hypertrophie bewirkte der Einsatz beider Inhibitoren eine Reduktion des diastolischen SR Kalziumlecks. Dies lässt darauf schließen, dass hier beide Kinasen an der Regulation des RyR2 beteiligt sind. Gleichzeitig hatte in der Epifluoreszenzmikroskopie sowohl die Inhibition der PKA als auch der CaMKII einen signifikanten Rückgang der systolischen Kalziumfreisetzung zur Folge. Hier spielt am ehesten eine verminderte PLB-Phosphorylierung und die hieraus resultierende vermehrte Inhibition der SERCA2a eine Rolle, wobei die durchgeführten Experimente, eventuell bedingt durch die begrenzte Patientenzahl, in der kardialen Hypertrophie nur für den CaMKII-Inhibitor AIP eine verminderte Kalziumbelastung des SR nachweisen konnten. Dies weist auf eine wichtige physiologische Bedeutung beider Kinasen für die Aufrechterhaltung eines regelrechten zellulären Kalziumstoffwechsels und einer ausreichenden Kontraktilität in der Patientengruppe mit kardialer Hypertrophie und erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion hin. Auch in einem Mausmodell der kardialen Hypertrophie konnten Toischer et al. (2010) zeigen, dass die erhöhte Nachlast nach TAC-Operation zu einer mutmaßlich kompensatorischen CaMKII-Aktivierung und hierüber zu einer erhöhten relativen Kalziumfreisetzung aus dem SR führt. Eine weitere Untersuchung legt nahe, dass die CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR2 von großer Bedeutung für die physiologische positive Kraft-Frequenz-Beziehung des Myokards ist, da diese in ansonsten gesunden Mäusen ausblieb, welche eine Loss-of-Function-Mutation an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle des RyR2 aufwiesen (Kushnir et al. 2010).

Anders stellt sich die Situation in der terminalen Herzinsuffizienz dar: Aufbauend auf die im Tiermodell bereits demonstrierten positiven Effekte einer CaMKII-Inhibition auf den gestörten zellulären

Kalziumstoffwechsel und die kontraktile Dysfunktion (Ai et al. 2005; Kohlhaas et al. 2006; Maier et al. 2003), konnten Sossalla et al. (2010) demonstrieren, dass eine akute CaMKII-Inhibition auch in der terminalen humanen Herzinsuffizienz über eine signifikante Reduktion des SR Kalziumlecks zu einer Steigerung der SR Kalziumbeladung sowie auch der myokardialen Kontraktilität führt. Diese signifikante Reduktion des diastolischen Kalziumlecks durch CaMKII-Inhibition in der humanen Herzinsuffizienz konnte aktuell erneut bestätigt werden. Dabei unterschieden weder Sossalla et al. (2010) noch die aktuelle Untersuchung zwischen ischämiebedingten und nicht-ischämischen Formen der terminalen Herzinsuffizienz. Inzwischen konnte unsere Arbeitsgruppe aber in einer Folgeuntersuchung die Übereinstimmung wesentlicher funktioneller und molekularer Parameter des SR Kalziumlecks in beiden Krankheitsentitäten bestätigen und die äquivalente Effektivität einer CaMKII-Inhibition nachweisen (Fischer et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden nun zusätzlich erstmalig die Effekte einer PKA-Inhibition in der terminalen humanen Herzinsuffizienz untersucht, da die Rolle der PKA-abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung in diesem Kontext zuletzt kontrovers diskutiert wurde (siehe unten). Es ergab sich keinerlei positiver Effekt einer PKA-Inhibition auf das erhöhte SR Kalziumleck oder die veränderte kardiomyozytäre Kalziumhomöostase in der terminalen Herzinsuffizienz. Die Amplitude und Kalziumeliminationsgeschwindigkeit der systolischen Kalziumtransienten als auch die Kalziumbeladung des SR waren unter Inhibition der PKA sogar verringert, was sich schlüssig durch eine verminderte Phosphorylierung von PLB und somit letztlich vermehrte Inhibition der SERCA2a erklären lässt. Eine PKA-abhängige Modulation des RyR2 scheint somit in der Progression der kompensierten kardialen Hypertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz nicht von mechanistischer Relevanz zu sein.

Damit widersprechen die aktuellen Ergebnisse einer zuvor durch Marx SO et al. (2000) beschriebenen PKA-abhängigen Hyperphosphorylierung des RyR2 in der humanen Herzinsuffizienz sowie auch zwei Studien im Tiermodell, die eine wichtige Rolle der PKA in der Entwicklung der Herzinsuffizienz propagieren: Wehrens et al. (2006) beschreiben in einer Untersuchung an transgenen RyR2-S2808A-Mäusen, deren RyR2 auf Grund einer Punktmutation mit Austausch von Ser2808 durch Alanin die entscheidende PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle fehlt, einen relativen Schutz vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach myokardialer Infarzierung. Die Imitation einer chronischen PKA-abhängigen Phosphorylierung des RyR2 im Mausmodell durch Austausch von Ser2808 mit Asparaginsäure führte hingegen zur Entwicklung einer altersabhängigen Herzinsuffizienz und erhöhten Mortalität nach myokardialer Infarzierung (Shan et al. 2010).

Neuere Studien in dem oben beschriebenen RyR2-S2808A Mausmodell konnten diese Befunde jedoch nicht reproduzieren: So sahen Zhang H et al. (2012) nach myokardialer Infarzierung keine signifikanten Abweichungen der kardialen Funktion und des Kalziumstoffwechsels der transgenen Tiere im Vergleich zum Wildtyp. Und auch unter einer erhöhten Nachlast nach TAC-Operation entwickelten die

RyR2-S2808A-Mäuse eine im Vergleich zum Wildtyp unveränderte Herzinsuffizienz mit einem erhöhtem diastolischen Kalziumleck bei weitestgehend intakter β -adrenerger Reaktion (Benkusky et al. 2007). Ergänzend hierzu konnten Li Y et al. (2002) demonstrieren, dass der in Wildtypmäusen wie erwartet auftretende deutliche Anstieg von Kalziumsparkfrequenz und -größe unter cAMP-Stimulation nach Knockout von PLB oder genetischer Alteration von dessen regulatorischen Phosphorylierungsstellen vollständig ausblieb. Dies suggeriert, dass der PKA-vermittelte Effekt auf die Kalziumsparkfrequenz vorrangig auf eine gesteigerte SR Kalziumbeladung durch vermehrte PLB-Phosphorylierung zurückzuführen ist und nicht auf eine PKA-abhängige Regulation der RyR2-Offenwahrscheinlichkeit.

So wiesen auch Respress et al. (2012) in Übereinstimmung mit den aktuellen Daten in der humanen nicht-ischämischen Herzinsuffizienz eine vermehrte Phosphorylierung des RyR2 an Ser2815 und nicht an Ser2809 nach. Diese CaMKII-abhängige Hyperphosphorylierung des RyR2 wurde schon wiederholt als Ursache eines erhöhten SR Kalziumlecks beschrieben (Maier et al. 2003; Sag et al. 2009; Sossalla et al. 2010). Übereinstimmend hiermit konnten Ai et al. (2005) in einem arrhythmogenen nicht-ischämischen Herzinsuffizienzmodell im Kaninchen eine signifikante Reduktion des SR Kalziumlecks durch Inhibition der CaMKII, nicht aber der PKA, erzielen. Dies deckt sich auch mit den Befunden einer Studie von Ling et al. (2009), die im Mausmodell die Auswirkungen einer Nachlasterrhöhung durch eine TAC-Operation untersucht hat: Während Wildtyp-Mäuse die bei diesem Eingriff erwartete linksventrikuläre Hypertrophie und schließlich einen Herzinsuffizienz-Phänotyp zeigten, war in Mäusen mit CaMKII-Knockout zwar ebenfalls eine Hypertrophie nachweisbar, diese Tiere entwickelten jedoch keine Herzinsuffizienz. Zuvor konnten bereits Zhang R et al. (2005) demonstrieren, dass die transgene Expression eines CaMKII-inhibierenden Peptids in Mäusen das kardiale Remodeling nach exzessiver β -adrenerger Stimulation oder myokardialer Infarzierung effektiv vermindert. Dementgegen resultierte im Mausmodell sowohl aus einer transgenen als auch akuten adenoviralen Überexpression der CaMKII ein vermehrtes SR Kalziumleck mit konsekutiver Reduktion der SR Kalziumbeladung und damit einhergehender verminderter Kontraktilität sowie auch potentiell vermehrter Arrhythmogenität (Kohlhaas et al. 2006; Maier et al. 2003).

Diese sich teils widersprechenden Befunde lassen sich möglicherweise auf Unterschiede in der angewandten experimentellen Methodik aber auch auf spezieabhängige Effekte zurückführen. In diesem Zusammenhang kann die vorliegende Arbeit wertvolle zusätzliche Erkenntnisse beitragen: Durch den Vergleich von gesundem Kontrollmyokard mit Proben von Patienten, die eine noch kompensierte Hypertrophie aufwiesen und schließlich explantierten Herzen als Endpunkt der Erkrankung gelang eine Betrachtung der schrittweisen Transition zur terminalen Herzinsuffizienz und nicht der bloße Vergleich erkrankter Individuen mit einer gesunden Kontrollgruppe. Die Durchführung aller molekularbiologischen sowie auch der funktionellen Experimente an humanen Myokardproben umgeht dabei die häufig unklare Übertragbarkeit tierexperimenteller Daten auf die humane Herzerkrankung. Die Validität der aktuellen Ergebnisse wird hierbei durch die Kongruenz der in den funktionellen Messungen des Kalzium-

stoffwechsels erhobenen Befunde mit den molekularbiologischen Untersuchungen in Myokardproben desselben Ursprungs zusätzlich unterstützt. Unter Berücksichtigung der erhobenen klinischen Daten (siehe Tab. 11) bilden die untersuchten Patientenkollektive hierbei durchaus realistisch die Patientenpopulationen mit kompensierter kardialer Hypertrophie bei hochgradiger Aortenklappenstenose sowie terminaler Herzinsuffizienz ab.

4.4 Limitationen der Arbeit

Die angewendeten experimentellen Methoden und das untersuchte humane Probenmaterial bedingen auch einige Limitationen der vorliegenden Arbeit:

- I. Die Ergebnisse der funktionellen Messungen basieren auf den akuten Effekten einer Inhibition der untersuchten Proteinkinasen in isolierten Kardiomyozyten. Dies begrenzt die Aussagekraft hinsichtlich der Langzeiteffekte einer Modulation der Proteinkinasenaktivität und lässt keine Rückschlüsse auf mögliche systemische Wirkungen zu (siehe auch Kapitel 4.5).
- II. Die Gewinnung der humanen Myokardproben bei Herzoperationen bzw. -transplantationen hat auf Grund des operativen Procedere und der Transportzeiten im Vergleich zum Tierexperiment verlängerte Ischämiezeiten zur Folge. Dies könnte die posttranslationale Modifikation von Proteinen beeinflussen. Um mögliche ischämiebedingte Veränderungen zu minimieren wurde auf eine schnelle und konstante Kühlung des Gewebes geachtet und in der Transportlösung BDM eingesetzt (siehe Kapitel 2.1).
- III. Aus logistischen und ethischen Gründen stand gesundes Kontrollgewebe lediglich in Form von Gefrierproben zur Verfügung, so dass ein direkter funktioneller Vergleich des Kalziumstoffwechsels der untersuchten Pathologien mit gesundem Myokard nicht möglich war. Die Ergebnisse aus dem Western Blot Experimenten zeigen jedoch noch keine Hyperphosphorylierung des RyR2 in der kompensierten kardialen Hypertrophie im Vergleich zu gesunden Myokardproben (siehe Abb. 8 B und Abb. 8 C) und legen somit nahe, dass in diesem Stadium der kardialen Erkrankung noch kein signifikant erhöhtes diastolisches Kalziumleck vorliegt.
- IV. Auf Grund der experimentellen Praktikabilität und der verbesserten Zellstabilität wurden die funktionellen Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Validierung bei 37°C wäre möglicherweise von Interesse.
- V. Mit Hilfe der angewendeten Methodik in der konfokalen Laserscanmikroskopie lässt sich nur der Kalziumspark-abhängige Anteil des SR Kalziumlecks untersuchen, der sogenannte *quarky calcium release* (siehe Kapitel 1.2.2) wird nicht erfasst. Bovo et al. (2011) konnten jedoch demonstrieren, dass dieser eng mit dem Auftreten von Kalziumsparks korreliert und eine unabhängige Regulierung in unterschiedlichen Zelltypen oder Pathologien unwahrscheinlich erscheint. Daher sollte die Interpretation der Ergebnisse nicht wesentlich beeinträchtigt sein, auch wenn die vorliegende Arbeit den sparkunabhängigen Anteil des diastolischen Kalziumverlustes nicht direkt untersucht hat.
- VI. Zusätzlich zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten RyR2-Phosphorylierungsstellen an Ser2809 und Ser2815 weisen einige Studien an verschiedenen Tiermodellen (Maus, Ratte, Kaninchen, Hund) Ser2830 als eine zusätzliche PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle am RyR2 aus (Xiao et al. 2005; Xiao et al. 2006). Gleichzeitig fand diese Arbeitsgruppe jedoch an keiner der

untersuchten Phosphorylierungsstellen eine PKA-abhängige Hyperphosphorylierung des RyR2 in einem Herzinsuffizienzmodell am Hund (Xiao et al. 2005). Andere Arbeiten stellen die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstelle im humanen Myokard grundsätzlich in Frage, da sie zeigen konnten, dass eine einzelne Punktmutation, Ser2809A, die PKA-abhängige Phosphorylierung des humanen RyR2 vollständig unterbindet (Marx SO et al. 2000; Wehrens et al. 2004).

- VII. Alle untersuchten Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz zeigten zum Zeitpunkt der Probengewinnung eine deutlich eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion (mittlere LVEF: $20,1 \pm 1,0\%$). Inwieweit die aktuellen Ergebnisse auf die Situation in der HFpEF übertragbar sind, lässt sich somit mit den vorliegenden Daten nicht zuverlässig beantworten und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

4.5 Ausblick und klinische Perspektive

Unter Berücksichtigung der oben genannten Ergebnisse lässt sich postulieren, dass eine therapeutische Inhibition der CaMKII sowie auch der PKA die myokardiale Kontraktilität in der kompensierten Hypertrophie negativ beeinflussen würden. Eine Reduktion der gesteigerten CaMKII-Aktivität in der humanen Herzinsuffizienz hingegen stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie der gestörten elektromechanischen Kopplung und erhöhten Arrhythmogenität dar. Die Möglichkeiten einer systemischen pharmakologischen Inhibition sind hierbei jedoch limitiert durch die physiologische Bedeutung der CaMKII auch außerhalb des Herzens, insbesondere für die neurokognitive Funktion (vergleiche u. a. Hell 2014). Hinzu kommen unspezifische Effekte auf andere Ionenkanäle oder Proteinkinasen der älteren allosterischen CaMKII-Inhibitoren sowie auch die schlechte Bioverfügbarkeit der aktuell verfügbaren substratbasierten Inhibitoren, beispielsweise des in der vorliegenden Arbeit verwendeten AIP (Pellicena und Schulman 2014). Mit GS-680 zeigte jedoch zuletzt ein für die kardiale Isoform CaMKII δ hochspezifischer substratbasierter Inhibitor in-vitro vielversprechende Ergebnisse in der humanen Herzinsuffizienz und im Vorhofflimmern (Lebek et al. 2018). Ein weiterer Ansatz besteht in der Erforschung einer zielgerichteten CaMKII-Inhibition mit niedermolekularen synthetischen Molekülen (*small molecules*) sowie auch in der Entwicklung gentherapeutischer Ansätze, beispielsweise unter Einsatz kardiomyozytenspezifischer viraler Vektoren (Pellicena und Schulman 2014).

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die Erforschung der vermehrten CaMKII-Aktivierung in der Herzinsuffizienz zugrundeliegenden Signalwege sowie auch der CaMKII-vermittelten Hyperphosphorylierung entgegenwirkenden zellulären Proteinphosphatasen dar. Hier konnten Arbeiten unserer Arbeitsgruppe über eine Inhibition des späten Natriumstroms (Sag et al. 2014) sowie auch über die Aktivierung der PP1 mittels eines neuartigen Peptids (Fischer et al. 2018) eine Reduktion des erhöhten SR Kalziumlecks in der humanen Herzinsuffizienz demonstrieren und somit interessante potentielle Therapieansätze aufzeigen.

Eine gezielte Inhibition der PKA in der terminalen Herzinsuffizienz hingegen erscheint vor dem Hintergrund der aktuellen Befunde nicht zielführend. Dies stellt nur scheinbar einen Widerspruch zu der klinisch unzweifelhaft belegten signifikanten Morbiditäts- und Mortalitätsreduktion und den antiarrhythmischen Effekten durch eine Betablockertherapie in der Herzinsuffizienz dar (Chatterjee et al. 2013), da deren Effektivität auf einer längerfristigen Inhibition der übergeordneten β -adrenergen Signalkaskade im Myokard aber auch der Gefäßmuskulatur beruht, deren Abbildung das aktuelle Experimentaldesign mit einer akuten selektiven Inhibition der PKA in isolierten Kardiomyozyten nicht zum Ziel hatte.

Außerdem existieren verschiedene Forschungsansätze zur direkten Stabilisierung der RyR2-Funktion. Hier konnte insbesondere das in der Therapie der malignen Hyperthermie bereits klinisch etablierte

Muskelrelaxans Dantrolen eine signifikante Reduktion des SR Kalziumlecks in der humanen Herzinsuffizienz und im Vorhofflimmern bewirken (Hartmann et al. 2017; Maxwell et al. 2012). Zusätzlich befindet sich mit den sogenannten *rycals* (*ryanodine receptor calcium release channel stabilizers*) eine neue Substanzklasse in der präklinischen und frühen klinischen Entwicklung, die durch Stabilisierung der Bindung von Calstabin an den Ryanodinrezeptor eine Reduktion des SR Kalziumlecks in menschlichen Herz- und Skelettmuskelzellen zeigen konnte (Dridi et al. 2020; Kushnir et al. 2020; Mohamed et al. 2018).

5 Zusammenfassung

Ein entscheidender Pathomechanismus der Herzinsuffizienz ist die Entwicklung eines erhöhten Kalziumlecks aus dem SR durch Hyperphosphorylierung des RyR2. Die resultierende, vermehrte spontane diastolische Kalziumfreisetzung begünstigt die Entstehung von Arrhythmien und kompromittiert die kardiale Kontraktilität. Als potentielle Verursacher der RyR2-Hyperphosphorylierung konnten die Proteinkinasen PKA und CaMKII identifiziert werden, der jeweilige Beitrag zur Genese der Herzinsuffizienz wurde in Tiermodellen jedoch kontrovers diskutiert. Eine Vorarbeit von Sossalla et al. (2010) konnte zeigen, dass eine Inhibition der CaMKII in der humanen Herzinsuffizienz das SR Kalziumleck reduziert und die Kontraktilität verbessert. Die vorliegende Arbeit untersucht erstmalig umfassend die Bedeutung beider Kinasen für die Dysregulation der kardiomyozytären Kalziumhomöostase in der humanen nachlastinduzierten Hypertrophie und terminalen Herzinsuffizienz.

Analysen der Expression und Phosphorylierung des RyR2 mittels Western Blots belegten eine gesteigerte RyR2-Expression in der kompensierten nachlastinduzierten Hypertrophie im Vergleich zu gesundem Herzgewebe. Die relative RyR2-Phosphorylierung war weder an der spezifischen Phosphorylierungsstelle der PKA noch der CaMKII signifikant verändert. In der terminalen Herzinsuffizienz hingegen ergab sich bei unveränderter RyR2-Expression eine deutliche Hyperphosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII, wohingegen eine PKA-abhängige Regulation nicht nachweisbar war. Hinweise auf eine iatrogene Beeinflussung einer PKA-abhängigen Hyperphosphorylierung durch eine Betablockermedikation fanden sich nicht. Weiterhin erfolgte eine Untersuchung des Kalziumstoffwechsels isolierter Kardiomyozyten mittels Epifluoreszenz- und konfokaler Laserscanmikroskopie. Im Vergleich zur kompensierten Hypertrophie zeigte sich in der terminalen Herzinsuffizienz eine annähernde Verdoppelung des errechneten SR Kalziumlecks. Dies ging mit einer signifikanten Reduktion der systolischen Kalziumfreisetzung und der SR Kalziumbelastung einher. Interessanterweise senkte eine Inhibition der PKA lediglich in der kompensierten Hypertrophie das SR Kalziumleck, nicht aber in der terminalen Herzinsuffizienz. Im Gegensatz hierzu hatte eine Inhibition der CaMKII in beiden untersuchten Pathologien eine signifikante Reduktion des SR Kalziumlecks zur Folge.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in der kompensierten kardialen Hypertrophie mit erhaltener LV-Funktion noch keine Hyperphosphorylierung des RyR2 vorliegt und beide Kinasen an der Regulation der zellulären Kalziumhomöostase beteiligt sind. Eine CaMKII-vermittelte Hyperphosphorylierung des RyR2 entsteht erst im Übergang zur terminalen Herzinsuffizienz und führt zu einem stark erhöhten SR Kalziumleck. Die Rolle der PKA in der Pathogenese der humanen terminalen Herzinsuffizienz erscheint somit von untergeordneter Bedeutung. Eine Inhibition der CaMKII hingegen stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Verbesserung der kardialen Kontraktilität und Reduktion von Arrhythmien dar.

6 Literaturverzeichnis

- Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ. Res.* 97, 1314-1322
- Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE (2009): Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM. *J. Vis Exp.*, e1067
- Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, Iung B, Lancellotti P, Lansac E, Rodriguez Muñoz D, et al. (2017): 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur. Heart J.* 38, 2739-2791
- Belevych AE, Terentyev D, Terentyeva R, Nishijima Y, Sridhar A, Hamlin RL, Carnes CA, Gyorke S (2011): The relationship between arrhythmogenesis and impaired contractility in heart failure: role of altered ryanodine receptor function. *Cardiovasc. Res.* 90, 493-502
- Benkusky NA, Weber CS, Scherman JA, Farrell EF, Hacker TA, John MC, Powers PA, Valdivia HH (2007): Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor. *Circ. Res.* 101, 819-829
- Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205
- Bers DM (2004): Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 417-429
- Bers DM (2008): Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 23-49
- Bers DM (2014): Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 107-127
- Bers DM, Despa S (2006): Cardiac myocytes Ca^{2+} and Na^{+} regulation in normal and failing hearts. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 315-322
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1992): Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85, 1046-1055
- Blaich A, Welling A, Fischer S, Wegener JW, Köstner K, Hofmann F, Moosmang S (2010): Facilitation of murine cardiac L-type $Ca(v)1.2$ channel is modulated by calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10285-10289

Bovo E, Mazurek SR, Blatter LA, Zima AV (2011): Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak by cytosolic Ca²⁺ in rabbit ventricular myocytes. *J. Physiol.* 589, 6039-6050

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

Chatterjee S, Biondi-Zoccai G, Abbate A, D'Ascenzo F, Castagno D, Van Tassel B, Mukherjee D, Lichstein E (2013): Benefits of β blockers in patients with heart failure and reduced ejection fraction: network meta-analysis. *BMJ* 346, f55

Chen J, Normand SL, Wang Y, Krumholz HM (2011): National and regional trends in heart failure hospitalization and mortality rates for Medicare beneficiaries, 1998-2008. *JAMA* 306, 1669-1678

Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB (1996): Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 270, C148-C159

Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H (1990): Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265, 5267-5272

Choi DJ, Rockman HA (1999): Beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cell Biochem. Biophys.* 31, 321-329

Cobbold PH, Rink TJ (1987): Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem. J.* 248, 313-328

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

Davis BA, Edes I, Gupta RC, Young EF, Kim HW, Steenaart NA, Szymanska G, Kranias EG (1990): The role of phospholamban in the regulation of calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem.* 92, 83-88

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

Dibb K, Eisner D (2010): A small leak may sink a great ship but what does it do to the heart? *J. Physiol.* 588, 4849

Dridi H, Kushnir A, Zalk R, Yuan Q, Melville Z, Marks AR (2020): Intracellular calcium leak in heart failure and atrial fibrillation: a unifying mechanism and therapeutic target. *Nat. Rev. Cardiol.* 17, 732-747

Efentakis P, Varela A, Chavdoula E, Sigala F, Sanoudou D, Tenta R, Gioti K, Kostomitsopoulos N, Papapetropoulos A, Tasouli A, et al. (2020): Levosimendan prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in time- and dose-dependent manner: implications for inotropy. *Cardiovasc. Res.* 116, 576-591

El-Armouche A, Eschenhagen T (2009): Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail. Rev.* 14, 225-241

Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245, C1-14

Fischer TH, Rokita AG, Maier LS (2011): Schlüsselrolle des Ca²⁺ in der Herzinsuffizienz und mögliche neue therapeutische Ansatzpunkte. *Der Kardiologe* 5, 80-90

Fischer TH, Maier LS, Sossalla S (2013a): The ryanodine receptor leak: how a tattered receptor plunges the failing heart into crisis. *Heart Fail. Rev.* 18, 475-483

Fischer TH, Neef S, Maier LS (2013b): The Ca-calmodulin dependent kinase II: a promising target for future antiarrhythmic therapies? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 58, 182-187

Fischer TH, Eiringhaus J, Dybkova N, Forster A, Herting J, Kleinwachter A, Ljubojevic S, Schmitto JD, Streckfuss-Bömeke K, Renner A, et al. (2014): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* 16, 1292-1300

Fischer TH, Eiringhaus J, Dybkova N, Saadatmand A, Pabel S, Weber S, Wang Y, Kohn M, Tirilomis T, Ljubojevic S, et al. (2018): Activation of protein phosphatase 1 by a selective phosphatase disrupting peptide reduces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 20, 1673-1685

Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V (1999): Shape, size, and distribution of Ca²⁺ release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.* 77, 1528-1539

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

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

Guo T, Cornea RL, Huke S, Camors E, Yang Y, Picht E, Fruen BR, Bers DM (2010): Kinetics of FKBP12.6 binding to ryanodine receptors in permeabilized cardiac myocytes and effects on Ca sparks. *Circ. Res.* 106, 1743-1752

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, 70-76

Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995): Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 270, 2074-2081

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52

Hartmann N, Pabel S, Herting J, Schatter F, Renner A, Gummert J, Schotola H, Danner BC, Maier LS, Frey N, et al. (2017): Antiarrhythmic effects of dantrolene in human diseased cardiomyocytes. *Heart Rhythm* 14, 412-419

Hasenfuss G (1998): Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 37, 279-289

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

Hell JW (2014): CaMKII: claiming center stage in postsynaptic function and organization. *Neuron* 81, 249-265

Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomstrom-Lundqvist C, Boriani G, Castella M, Dan GA, Dilaveris PE, et al. (2021): 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur. Heart J.* 42, 373-498

Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (1999): Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res.* 84, 713-721

Hook SS, Means AR (2001): Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 471-505

Huke S, Bers DM (2008): Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 80-85

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

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc. Res.* 42, 254-261

- Kitazawa T (1988): Caffeine contracture in guinea-pig ventricular muscle and the effect of extracellular sodium ions. *J. Physiol.* 402, 703-729
- Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM, et al. (2006): Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ. Res.* 98, 235-244
- Kranias EG, Hajjar RJ (2012): Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ. Res.* 110, 1646-1660
- Kupari M, Turto H, Lommi J (2005): Left ventricular hypertrophy in aortic valve stenosis: preventive or promotive of systolic dysfunction and heart failure? *Eur. Heart J.* 26, 1790-1796
- Kushnir A, Marks AR (2010): The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease. *Adv. Pharmacol.* 59, 1-30
- Kushnir A, Shan J, Betzenhauser MJ, Reiken S, Marks AR (2010): Role of CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10274-10279
- Kushnir A, Todd JJ, Witherspoon JW, Yuan Q, Reiken S, Lin H, Munce RH, Wajsberg B, Melville Z, Clarke OB, et al. (2020): Intracellular calcium leak as a therapeutic target for RYR1-related myopathies. *Acta Neuropathol.* 139, 1089-1104
- Lai Y, Nairn AC, Greengard P (1986): Autophosphorylation reversibly regulates the Ca²⁺/calmodulin-dependence of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4253-4257
- Lebek S, Plöbfl A, Baier M, Mustroph J, Tarnowski D, Lücht CM, Schopka S, Flörchinger B, Schmid C, Zausig Y, et al. (2018): The novel CaMKII inhibitor GS-680 reduces diastolic SR Ca leak and prevents CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 118, 159-168
- Lee TS, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, Kleppisch T, Welling A (2006): Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 281, 25560-25567
- Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM (2000): Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H769-779
- Li Y, Kranias EG, Mignery GA, Bers DM (2002): Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ. Res.* 90, 309-316

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

Lindner M, Brandt MC, Sauer H, Hescheler J, Bohle T, Beuckelmann DJ (2002): Calcium sparks in human ventricular cardiomyocytes from patients with terminal heart failure. *Cell Calcium* 31, 175-182

Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chen J, Bers D, et al. (2009): Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1230-1240

Lipp P, Niggli E (1998): Fundamental calcium release events revealed by two-photon excitation photolysis of caged calcium in Guinea-pig cardiac myocytes. *J. Physiol.* 508 (Pt 3), 801-809

Lochner A, Moolman JA (2006): The Many Faces of H89: A Review. *Cardiovasc. Drug Rev.* 24, 261-274

Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H (1986): Activation of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 9497-9501

Loughrey CM, Seidler T, Miller SL, Prestle J, MacEachern KE, Reynolds DF, Hasenfuss G, Smith GL (2004): Over-expression of FK506-binding protein FKBP12.6 alters excitation-contraction coupling in adult rabbit cardiomyocytes. *J. Physiol.* 556, 919-934

Maier LS, Bers DM (2007): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc. Res.* 73, 631-640

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

Marx N, Altiok E, Brandenburg V, Stierle U, Schwabe K, Giannitsis E, Krautzig S, H. Renz-Polster H, Schneider I: Herz. In: Braun J, Müller-Wieland D (Hrsg): *Basislehrbuch Innere Medizin*. 6. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2017, 26-180

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

Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E (2005): Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc. Res.* 68, 366-375

Maxwell JT, Domeier TL, Blatter LA (2012): Dantrolene prevents arrhythmogenic Ca²⁺ release in heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H953-963

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

Mohamed BA, Hartmann N, Tirilomis P, Sekeres K, Li W, Neef S, Richter C, Zeisberg EM, Kattner L, Didié M, et al. (2018): Sarcoplasmic reticulum calcium leak contributes to arrhythmia but not to heart failure progression. *Sci. Transl. Med.* 10

Morrow AG, Reitz BA, Epstein SE, Henry WL, Conkle DM, Itscoitz SB, Redwood DR (1975): Operative treatment in hypertrophic subaortic stenosis. Techniques, and the results of pre and postoperative assessments in 83 patients. *Circulation* 52, 88-102

Mosterd A, Hoes AW (2007): Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93, 1137-1146

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

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

Murray AJ (2008): Pharmacological PKA Inhibition: All May Not Be What It Seems. *Sci. Signal.* 1, re4

Nakamura M, Sadoshima J (2018): Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 387-407

Neef S, Maier LS (2007): Remodeling of excitation-contraction coupling in the heart: inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak as a novel therapeutic approach. *Curr. Heart Fail. Rep.* 4, 11-17

Parks RJ, Howlett SE (2012): H-89 decreases the gain of excitation-contraction coupling and attenuates calcium sparks in the absence of beta-adrenergic stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* 691, 163-172

Pellicena P, Schulman H (2014): CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front. Pharmacol.* 5, 21

Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM (2007): SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C1073-1081

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

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

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J.* 37, 2129-2200

Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, et al. (2015): 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *Eur. Heart J.* 36, 2793-2867

Reinecke H, Studer R, Vetter R, Holtz J, Drexler H (1996): Cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc. Res.* 31, 48-54

Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skardal K, et al. (2012): Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ. Res.* 110, 1474-1483

Sag CM, Kohler AC, Anderson ME, Backs J, Maier LS (2011): CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 749-759

Sag CM, Mallwitz A, Wagner S, Hartmann N, Schotola H, Fischer TH, Ungeheuer N, Herting J, Shah AM, Maier LS, et al. (2014): Enhanced late I_{Na} induces proarrhythmogenic SR Ca leak in a CaMKII-dependent manner. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 76, 94-105

Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, et al. (2009): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ. Heart Fail.* 2, 664-675

Schillinger W, Fiolet JW, Schlotthauer K, Hasenfuss G (2003): Relevance of Na⁺-Ca²⁺ exchange in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 57, 921-933

Schmidt RF: Erregungsphysiologie des Herzens. In: Schmidt RF (Hrsg): *Physiologie kompakt*. Springer, Berlin 2001, 197-204

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671-675

Schwinger RH, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999): Reduced Ca²⁺-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 479-491

Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR (1986): Reversible generation of a Ca²⁺-independent form of Ca²⁺(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J. Biol. Chem.* 261, 8581-8584

Shan J, Betzenhauser MJ, Kushnir A, Reiken S, Meli AC, Wronska A, Dura M, Chen BX, Marks AR (2010): Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and beta-adrenergic receptor blockade in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 4375-4387

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

Sitsapesan R, Williams AJ (1990): Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol.* 423, 425-439

Smith GL, Valdeolillos M, Eisner DA, Allen DG (1988): Effects of rapid application of caffeine on intracellular calcium concentration in ferret papillary muscles. *J. Gen. Physiol.* 92, 351-368

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittkopper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, et al. (2010): Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ. Res.* 107, 1150-1161

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.* 75, 443-453

Taylor SS, Zhang P, Steichen JM, Keshwani MM, Kornev AP (2013): PKA: lessons learned after twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 1271-1278

Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, Sag CM, Hund TJ, Mohler PJ, Belardinelli L, et al. (2013): Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 61, 111-122

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

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

Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S, et al. (2012): Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 125, 2059-2070

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

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, et al. (2006): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J. Clin. Invest.* 116, 3127-3138

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ. Res.* 94, e61-70

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR (2006): Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 511-518

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

World Medical Association (2013): World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 310, 2191-2194

Wu X, Bers DM (2007): Free and bound intracellular calmodulin measurements in cardiac myocytes. *Cell Calcium* 41, 353-364

Xiao B, Jiang MT, Zhao M, Yang D, Sutherland C, Lai FA, Walsh MP, Warltier DC, Cheng H, Chen SR (2005): Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ. Res.* 96, 847-855

Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H, Chen SR (2006): Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem. J.* 396, 7-16

Xie LH, Weiss JN (2009): Arrhythmogenic consequences of intracellular calcium waves. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H997-h1002

Xu A, Hawkins C, Narayanan N (1993): Phosphorylation and activation of the Ca²⁺-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 8394-8397

Xu L, Meissner G (1998): Regulation of cardiac muscle Ca²⁺ release channel by sarcoplasmic reticulum lumenal Ca²⁺. *Biophys. J.* 75, 2302-2312

Xu L, Mann G, Meissner G (1996): Regulation of cardiac Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺, H⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. *Circ. Res.* 79, 1100-1109

Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, et al. (2013): 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure. 62, e147-e239

Yano M, Ono K, Ohkusa T, Suetsugu M, Kohno M, Hisaoka T, Kobayashi S, Hisamatsu Y, Yamamoto T, Kohno M, et al. (2000): Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca²⁺ leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation* 102, 2131-2136

Zhang H, Makarewich CA, Kubo H, Wang W, Duran JM, Li Y, Berretta RM, Koch WJ, Chen X, Gao E, et al. (2012): Hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808 is not involved in cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Circ. Res.* 110, 831-840

Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE, Jr., Thiel W, Guatimosim S, Song LS, et al. (2005): Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat. Med.* 11, 409-417

Zhang T, Brown JH (2004): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 63, 476-486

Zima AV, Blatter LA (2006): Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc. Res.* 71, 310-321

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Samuel T. Sossalla sowie insbesondere dem wissenschaftlichen Betreuer meiner Dissertation PD Dr. med. Thomas H. Fischer für die engagierte Betreuung meiner Promotion aber auch das weit darüber hinaus gehende wissenschaftliche und klinische Mentoring bedanken. Ein Dank gilt auch Prof. Dr. med. Lars Maier als ehemaligen Leiter der Arbeitsgruppe für kardiovaskuläre experimentelle Elektrophysiologie und Bildgebung und Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß, der als Vorsitzender des Herzzentrums Göttingen hier hervorragende Bedingungen für die kardiovaskuläre Grundlagenforschung geschaffen hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken für die sorgfältige Einarbeitung in die experimentelle Methodik, zahlreiche anregende wissenschaftliche Diskussionen sowie die stets hilfsbereite und konstruktive Arbeitsatmosphäre im Labor. Besonders hervorzuheben sind hier Astrid Kleinwächter, Dr. rer. nat. Nataliya Dybkova sowie Dres. med. Nico H. Hartmann, Stefan Neef und Jörg Eiringhaus. Ebenso gilt mein Dank den technischen AssistentInnen der Arbeitsgruppe Felicia Steuer, Timo Schulte und Thomas Sowa für die Bereitstellung einer hervorragenden Laborinfrastruktur und die Unterstützung bei den molekularbiologischen Untersuchungen.

Mein Dank gilt ebenfalls den Kooperationspartnern in der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen Prof. em. Dr. med. Dipl.-Phys. Friedrich Schöndube und Prof. Dr. med. Theodor Tirilomis sowie Prof. Dr. med. Jan Gummert und Prof. Dr. rer. nat. Hendrik Milting am Herz- und Diabeteszentrum NRW in Bad Oeynhausen für die Bereitstellung der untersuchten humanen Myokardproben. Dies schließt auch die studentischen Hilfskräfte der Arbeitsgruppe ein, die durch Ihre Unterstützung bei der Probengewinnung und dem Transport des Myokards aus Bad Oeynhausen die Experimente an lebenden humanen Kardiomyozyten erst ermöglicht haben.

Abschließend möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung meines Studiums und der vorliegenden Dissertationsarbeit durch ein Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes e.V. sowie das Otto-Hess-Promotionsstipendium und den Otto-Hess-Promotionspreis der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie e.V. bedanken.