

**Die Bedeutung der subzellulären CaMKII δ -Überexpression auf
den intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsel in Herzmuskelzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Michael Kohlhaas
aus Bonn

Göttingen 2006

D7

Referent: Prof. Dr. R. Hardeland
Korreferent: Prof. Dr. D. Doenecke

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	6
II.	Zusammenfassung.....	8
1.	Einleitung	10
1.1	Die Anatomie des Herzens	10
1.2	Die Ultrastruktur des Herzens und der einzelnen Myozyte	11
1.3	Die elektromechanische Kopplung im Herzen.....	14
1.3.1	Der L-Typ Ca^{2+} -Kanal.....	17
1.3.2	Das sarkoplasmatische Retikulum (SR).....	22
1.3.2.1	Die SR Ca^{2+} -Ausschüttung: Ryanodin-Rezeptor (RyR)	24
1.3.2.2	Die SR Ca^{2+} -Aufnahme: SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und Phospholamban (PLB).....	27
1.3.3	Der Na^{+}/Ca^{2+} Austauscher (NCX)	30
1.3.4	Weitere Ca^{2+} -Transporter mit geringerer Bedeutung für die elektromechanische Kopplung	32
1.4	Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz.....	33
1.5	Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige ProteinkinaseII (CaMKII) und ihre Einflüsse auf die elektromechanische Kopplung	35
1.6	Die Bedeutung der CaMKII bei Herzinsuffizienz.....	37
1.7	Zielsetzungen und Fragestellungen.....	40
2.	Material und Methoden	41
2.1	Grundlagen und Erforschungsgeschichte.....	41
2.1.1	Adenoviren	41
2.1.2	Epifluoreszenz-Mikroskop	44
2.1.3	Das konfokale Mikroskop	49
2.1.4	Patch-Clamp-Technik.....	52
2.2	Markierung der Mäuse und Bestimmung des Genotyps mittels PCR.....	55
2.2.1	Markierung der Mäuse	55
2.2.2	Aufreinigung der DNA aus dem Mäuseohrgewebe	56
2.2.3	Bestimmung des Genotyps der Mäuse mittels PCR.....	58
2.3	Isolierung von Herzmuskelzellen (Myozyten) aus dem Herzen	59
2.3.1	Isolierung von Herzmuskelzellen aus Kaninchenherzen	59

2.3.2	Isolierung von Herzmuskelzellen aus Mauserherzen.....	61
2.4	Adenoviralvermittelter Gentransfer und Kultivierung von Kaninchen-Myozyten.....	62
2.5	Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten am Epi-fluoreszenz-Mikroskop	63
2.6	Elektrophysiologische Messungen mit der Patch-Clamp-Technik	68
2.7	Messungen der subzellulären Ca^{2+} -Konzentrationen am konfokalen Mikroskop	70
2.8	Erheben von biometrischen Daten	71
2.9	Auswertung der Daten.....	72
2.10	Statistik.....	73
2.11	Lösungen und Chemikalien.....	73
3.	Ergebnisse	79
3.1	Akute adenoviral vermittelte Überexpression der CaMKII δ_C in Kaninchenmyozyten.....	79
3.1.1	Die Kontraktions-Frequenz-Beziehung und die intrazellulären Ca^{2+} -Transienten	79
3.1.2	Die Post-Pausen-Beziehung	82
3.1.3	SR Ca^{2+} -Gehalt und NCX-Aktivität.....	83
3.1.4	L-Typ Ca^{2+} -Einstrom	85
3.1.5	Die unstimulierten SR Ca^{2+} -Entladungen (Ca^{2+} -Sparks).....	91
3.1.6	Biometrische Daten	95
3.2	Akute adenoviral vermittelte CaMKII δ_B -Überexpression in Kaninchenmyozyten.....	96
3.2.1	Die Kontraktions-Frequenz-Beziehung und die intrazellulären Ca^{2+} -Transienten	96
3.1.2	Die Post-Pausen-Beziehung	99
3.2.3	SR Ca^{2+} -Gehalt und NCX-Aktivität.....	99
3.2.4	L-Typ Ca^{2+} -Einstrom	101
3.2.5	Die unstimulierten SR Ca^{2+} -Entladungen (Ca^{2+} -Sparks).....	105
3.2.6	Biometrische Daten	106
3.3	Chronische CaMKII δ_B -Überexpression in transgenen Mäusen.....	107
3.3.1	Bestimmung des Genotyps mittels PCR	107

3.3.2	Die Kontraktions-Frequenz-Beziehung und die intrazellulären Ca^{2+} - Transienten	108
3.3.3	Die Post-Pausen-Beziehung	111
3.3.4	SR Ca^{2+} -Gehalt und NCX-Aktivität.....	112
3.3.5	L-Typ Ca^{2+} -Einstrom	114
3.3.6	Die unstimulierten SR Ca^{2+} -Entladungen (Ca^{2+} -Sparks)	116
3.3.7	Biometrische Daten	118
4.	Diskussion	119
4.1	Akute adenoviral vermittelte CaMKII δ_C -Überexpression in Kaninchenmyozyten.....	119
4.1.1	Überexpression der CaMKII δ_C und Hypertrophie	119
4.1.2	Einflüsse der CaMKII δ_C auf den L-Typ Ca^{2+} -Einstrom	120
4.1.3	Einflüsse der CaMKII δ_C auf den SR Ca^{2+} -Gehalt, den RyR, die SERCA und die Kontraktilität	121
4.2	Akute adenoviral vermittelte CaMKII δ_B -Überexpression in Kaninchenmyozyten im Vergleich zur chronischen Überexpression der CaMKII δ_B in transgenen Mäusen	126
4.2.1	Überexpression der CaMKII δ_B und Hypertrophie	127
4.2.2	Vergleich der Einflüsse von akuter bzw. chronischer CaMKII δ_B - Überexpression auf den SR Ca^{2+} -Gehalt, den RyR, die SERCA-Aktivität und die Kontraktilität	128
4.2.3	Einflüsse der akuten bzw. chronischen CaMKII δ_B -Überexpression auf den L-Typ Ca^{2+} -Einstrom.....	132
5.	Literaturverzeichnis.....	135
6.	Erklärungen.....	146
7.	Danksagung.....	147
8.	Lebenslauf.....	148

I. Abkürzungsverzeichnis

AC3-I	Autocamtide-2 inhibitory peptide
ad.	adenoviral
AIP	Autocamtide 2-related inhibitory peptide
AM	Azetoxymethylester
AP	Aktionspotential
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
CaM	Ca ²⁺ /Calmodulin
CaMKII δ_B	nukleäre Isoform der Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein Kinase II
CaMKII δ_C	zytosolische Isoform der Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein Kinase II
cAMP	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
CREB	cAMP response element binding protein
DAG	Diacylglycerol
DCLP	Dichroitischer Spiegel (long pass)
DCXR	Dichroitischer Spiegel (short pass)
dd H ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptoren
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGTA	Ethylene Glycol-bis-Tetraacetic Acid
HDACs	Typ II Histone Deacetylasen
HEK293	human embryonic kidney cell line 293
I _{Ca}	einwärtsgerichtete Ca ²⁺ -Ströme in die Myozyte
IP3	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
KN 93	2-[N-(2-hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)] amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methybenzylamine
MEF2	myocyte enhancer factor-2
MHC	“myosin heavy chain”
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
PCR	Polymerase Kettenreaktion

pfu	Plac forming unit
PK	Proteinkinase
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PMT	Photomultiplier
PP	Protein Phosphatasen
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur (20°C)
RyR	Ryanodin-Rezeptor
Ser	Serin
SERCA	SR Ca ²⁺ -ATPase
SR	Sakroplasmatisches Retikulum
TG	Transgen = gentechnisch veränderte Maus
Thr	Threonin
WT	Wild Typ = nicht veränderte Maus

II. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der intrazelluläre Ca^{2+} -Stoffwechsel von Kardiomyozyten an drei unterschiedlichen Modellen untersucht: Zunächst wurde die akute Überexpression der zytosolischen Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase $\text{II}\delta_{\text{C}}$ ($\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$) untersucht, im zweiten Teil der Arbeit die akute Überexpression der nukleären $\text{CaMKII}\delta_{\text{B}}$, beide jeweils über 24 Stunden in Kaninchenmyozyten, und schließlich wurde die chronische Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_{\text{B}}$ in einer transgenen Mauslinie untersucht.

In Vorarbeiten zur transgenen $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -Überexpression konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer massiven Herzhypertrophie und Dilatation mit stark gestörtem Ca^{2+} -Stoffwechsel und massiv eingeschränkter Kontraktilität kommt. Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob diese Veränderungen primär durch die Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ verursacht wurden oder sekundär im Rahmen der Entwicklung des Herzinsuffizienz-Phänotyps auftraten. Bei der chronischen Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_{\text{B}}$ in einer transgenen Mauslinie zeigte sich hingegen eine milde Herzhypertrophie mit nur leicht eingeschränkter Kontraktilität. Weitere funktionelle Daten auf Zellebene sind bisher jedoch noch nicht erhoben worden.

Für die akute Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ konnte erstmals gezeigt werden, dass sie zu einem gesteigerten diastolischen SR Ca^{2+} -Verlust (erhöhte SR Ca^{2+} -Sparkfrequenz) über den Ryanodin-Rezeptor (RyR) führt, mit der Folge eines reduzierten SR Ca^{2+} -Gehalts. Ein weiterer Effekt der $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -Überexpression war ein signifikant gesteigerter Ca^{2+} -Einstrom über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal. Dieser war durch eine verstärkte Ca^{2+} -Amplitude, eine verlangsamte Inaktivierung und eine verstärkte Facilitation charakterisiert. Diese Veränderungen auf den L-Typ Ca^{2+} -Einstrom sind bereits in der Vergangenheit als typische Einflüsse der CaMKII auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal beschrieben worden (XIAO et al., 1994; YUAN & BERS, 1994; DZHURA et al., 2000). Der reduzierte SR Ca^{2+} -Gehalt und der verstärkte L-Typ Ca^{2+} -Einstrom sind entgegengesetzte Effekte, die in ihrer Addition vermutlich dazu beitragen, dass sowohl die Kontraktilität als auch die Ca^{2+} -Transienten unverändert bleiben. Im Gegensatz zur chronischen Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ (MAIER et al., 2003) konnte keine veränderte Aktivität der SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und des $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX)

festgestellt werden. Schlussfolgern lässt sich durch die CaMKII δ_C -abhängige gleichzeitige Phosphorylierung des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals (YUAN & BERS, 1994; ANDERSON et al., 1994; XIAO et al., 1994) und des RyR (MAIER et al., 2003; CURRIE et al., 2003; WEHRENS et al., 2004; WITCHER et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 2003), der dadurch eine gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit zeigt (CURRIE et al., 2003; WITCHER et al., 1991), dass es bei akuter CaMKII δ_C -Überexpression trotz eines reduzierten SR Ca $^{2+}$ -Gehaltes zu keiner kontraktilen Dysfunktion kommt.

Die akute Überexpression der CaMKII δ_B führt im Gegensatz dazu zu keiner Veränderung in der elektromechanischen Kopplung. So bleiben Kontraktilität, Ca $^{2+}$ -Transienten, SR Ca $^{2+}$ -Gehalt, SERCA-Aktivität, NCX-Aktivität, SR Ca $^{2+}$ -Spark-Frequenz, die SR Ca $^{2+}$ -Sparkamplitude und somit die RyR-Öffnungswahrscheinlichkeit unverändert. Einzig beim L-Typ Ca $^{2+}$ -Einstrom zeigte sich eine verstärkte Ca $^{2+}$ -Amplitude. Dieser Effekt war allerdings nicht durch CaMKII-Inhibition auf das Kontrollniveau zurückzuführen. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die akute Überexpression der CaMKII δ_B keine funktionellen Einflüsse auf die elektromechanische Kopplung ausübt.

Bei der chronischen Überexpression der CaMKII δ_B zeigt sich ein ähnliches Bild. Auch hier waren auf Zellebene keine signifikanten Veränderungen der elektromechanischen Kopplung zu beobachten. Unbeeinflusst blieben die Kontraktilität, die Ca $^{2+}$ -Transienten, der SR Ca $^{2+}$ -Gehalt, die NCX-Aktivität, die Facilitation, die SR Ca $^{2+}$ -Sparkfrequenz, die SR Ca $^{2+}$ -Sparkamplitude und somit die RyR-Öffnungswahrscheinlichkeit. Der L-Typ Ca $^{2+}$ -Einstrom zeigt im Gegensatz zur akuten CaMKII δ_B -Überexpression eine verringerte Ca $^{2+}$ -Amplitude. Daher kann auch bei chronischer Überexpression der CaMKII δ_B die Schlussfolgerung gezogen werden, dass auf Zellebene keine funktionellen Veränderungen der elektromechanischen Kopplung stattfinden.

1. Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der intrazelluläre Ca^{2+} -Stoffwechsel von Herzmuskelzellen ausführlich untersucht. Die Untersuchungen wurden mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie, konfokaler Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie und der Patch-Clamp-Technik an isolierten Myozyten durchgeführt. Dabei handelte es sich entweder um über 24 Stunden kultivierte Kaninchenmyozyten oder um frisch isolierte Mausmyozyten. Die vorliegende Arbeit beginnt mit einem kurzen Einblick in die Anatomie des Herzens und seiner Ultrastruktur. Anschließend werden die elektromechanische Kopplung im Herzen, pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ausführlich vorgestellt.

1.1 Die Anatomie des Herzens

Bei einem Erwachsenen ist das Herz etwa faustgroß und wiegt ca. 300 g. Es stellt eine Pumpe dar, die auf der linken und rechten Seite jeweils in einen Vorhof, das Atrium, und eine Herzkammer, den Ventrikel, gegliedert ist (siehe Abb. 1.1).

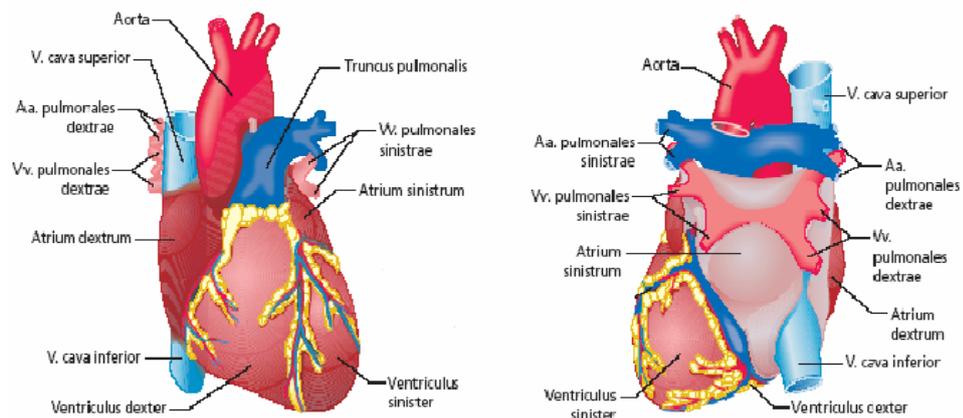


Abbildung 1.1: Die Anatomie des Herzens

Modifiziert aus SCHMIDT & UNSICKER (2003)

Das Herz ist in einen serösen Sack, den Herzbeutel, der ca. 20 ml einer serösen Flüssigkeit enthält, eingebettet. Die Körpervenen, die obere und untere Hohlvene, führen CO_2 -reiches Blut in das rechte Atrium. Aus diesem wird das Blut in den

rechten Ventrikel gepumpt und über die Pulmonalarterie (Lungenarterie) zur Lunge. Dort wird das Blut oxygeniert und O₂-reiches Blut erreicht über die Lungenvenen den linken Vorhof bzw. Ventrikel, aus dem das Blut durch die Aorta (Hauptschlagader) in den Körper transportiert wird.

Das Muskelgewebe des Herzens wird als Myokard bezeichnet. Das Myokard wird außen durch das Epikard, ein seröses Epithel, und innen durch das Endokard, das strukturell und biochemisch dem Gefäßendothel ähnelt, begrenzt.

Neben den muskulären Anteilen enthält das Herz auch Bindegewebe, das fein verteilt die Kammermuskulatur durchzieht. Es bildet zwischen Atrium und Ventrikel eine überwiegend bindegewebshaltige Stützstruktur für das gesamte Organ, das so genannte Herzskelett.

Das Herz wird durch ein eigenes Gefäßsystem, die Koronararterien, versorgt. Die linke und rechte Koronararterie entspringen unmittelbar oberhalb der Aortenklappe aus dem Aortenstamm. Beide verzweigen sich und versorgen so das Myokard mit Blut (SCHMIDT & UNSICKER, 2003).

1.2 Die Ultrastruktur des Herzens und der einzelnen Myozyte

Das Myokard besteht aus großen Einzelzellen (Myozyten) (siehe Abb. 1.2). Diese sind jedoch um den Faktor zehn schmaler und auch kürzer als Skelettmuskelzellen (BERS, 2001). Aufgrund dessen ist die Diffusion in den Myozyten vermutlich deutlich schneller im Vergleich zu den Skelettmuskelzellen. Die Muskelzellen des Atriums und des Ventrikels sind grundsätzlich gleich aufgebaut, wobei die Muskelzellen des Atriums schlanker und länger sind als die im Ventrikel und weniger sarkoplasmatisches Retikulum aufweisen.

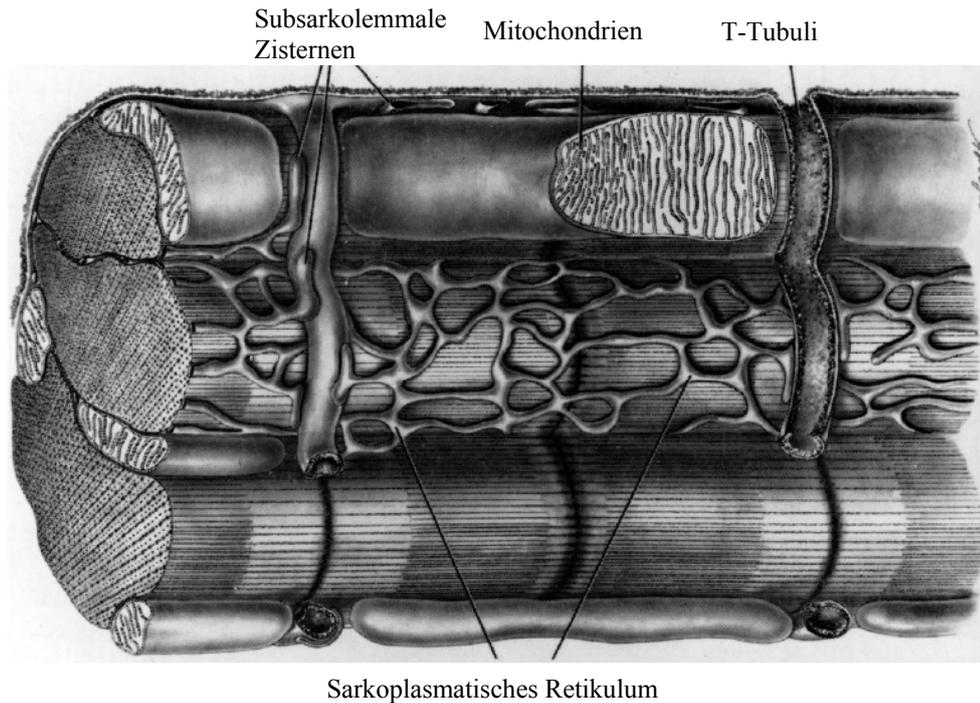


Abbildung 1.2: Ultrastruktur der Herzmuskelzelle

Modifiziert nach BERS (2001)

Die Herzmuskelzellen sind an ihren Enden durch sogenannte Glanzstreifen (Disci intercalares) verbunden. Diese erhielten ihren Namen durch die im polarisierten Licht doppelbrechende Membranstruktur. Im Glanzstreifen sind die Zellen untereinander stufenartig verzahnt. Hier erfolgt die mechanische Verbindung der Zellen untereinander durch dünne Filamente, der Myofibrillen, die durch mehrere Proteine am Zellende verankert sind. Außerdem erfolgt im Glanzstreifen die chemische und elektrische Kommunikation zwischen den Zellen durch Kanäle, die Gap Junctions. Diese bestehen aus mehreren Connexonen, die in sechs Connexine untergliedert sind und den eigentlichen Kanal bilden. Das Connexin 43 (Molekulares Gewicht: 43.000) ist das dominierende Connexin im Ventrikel, das Connexin 40 das im AV-Knoten. Durch die Kopplung über den Glanzstreifen bilden die so verbundenen Herzmuskelzellen ein funktionelles Syncytium. Da sich über die Gap Junctions auch Zellschäden verbreiten können, führt beispielsweise ein stark erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Gehalt (WEINGART et al., 1977) oder ein erniedrigter pH-Wert (REBERT & WEINGART, 1982) zum Verschluss der Gap Junctions.

Die Herzmuskelzelle ist von einer sarkolemmalen Zellmembran umschlossen, die in Form zahlreicher kleiner Einstülpungen, den transversalen (T-) Tubuli, in die Zelle hineinragt. Die Sarkolemmalmembran besteht aus einer Phospholipid-doppelschicht, in der Cholesterin und wichtige integrale Proteine verankert sind. Diese Proteine stellen verschiedene Kanäle oder Pumpen dar, durch die bestimmte Ionen entlang eines Konzentrationsgefälles passiv bzw. unter Energieverbrauch aktiv transportiert werden können, um bestimmte Konzentrationsgradienten aufrecht zu halten. Der Durchmesser der T-Tubuli ist in Herzmuskelzellen (ca. 200 nm) größer als in Skelettmuskelzellen (30-40 nm). In der Membran der T-Tubuli tritt verstärkt der L-Typ Ca^{2+} -Kanal auf, der spannungsabhängig Ca^{2+} in die Herzmuskelzelle entlässt (BERS, 2001). Die T-Tubuli stehen in engem räumlichen Kontakt zu den Endstücken, den sogenannten terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR).

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) stellt den internen Ca^{2+} -Speicher der Herzmuskelzelle dar. Es besteht aus longitudinalen (L-)Tubuli sowie terminalen Zisternen. Das Ca^{2+} wird im Inneren hauptsächlich durch das Ca^{2+} -bindende Protein Calsequestrin gepuffert. Herzmuskelzellen besitzen weniger SR als Skelettmuskelzellen, was sich durch die unterschiedliche Bedeutung des SR für die elektromechanische Kopplung beider Zellarten erklären lässt. In den Skelettmuskelzellen kommt das Ca^{2+} für die Kontraktionen ausschließlich aus dem SR, bei den Herzmuskelzellen dagegen nur zu 70-90%. In der Membran des SR sind zwei wichtige integrale Proteine eingebettet: Die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und der SR Ca^{2+} -Freisetzungskanal. Die SERCA pumpt unter Energieverbrauch Ca^{2+} aus dem Myoplasma, dem Zytosol der Myozyte, ins SR. Die SR Ca^{2+} -Freisetzungskanäle werden auch als Ryanodin-Rezeptoren (RyR) bezeichnet, da sie eine hohe Affinität zum neutralen Pflanzenalkaloid Ryanodin besitzen. Sie befinden sich in den terminalen Zisternen und somit in räumlicher Nähe zu den T-Tubuli und den spannungsabhängigen sarkolemmalen L-Typ Ca^{2+} -Kanälen. Diese räumliche Nähe ist von entscheidender Bedeutung für die elektromechanische Kopplung.

Ca. 50% des Volumens der Myozyte nehmen die Myofilamente ein. Diese setzen die elektrische Energie in die mechanische Verkürzung der Myozyte um. Die Myofilamente der Myozyten sind ähnlich aufgebaut wie in den Skelettmuskelzellen, aus parallel angeordneten dicken und dünnen Filamenten.

Die dicken Filamente bestehen vorwiegend aus Myosin, die dünnen aus Aktin. Nach der Gleitfilament-Theorie von HUXLEY (1969) findet die Kontraktion in Form einer gleitenden Parallelbewegung von Aktin und Myosin statt. Die Interaktion von Aktin und Myosin (Querbrückenbildung) findet jedoch nur bei einer ansteigenden intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ statt. Das Ca^{2+} bindet dabei an eine Untereinheit des Aktins, das Troponin C. Darauf folgt eine Rotation des Myosinköpfchens, die zur Verschiebung des Myosins gegenüber des Aktins führt. Die ansteigende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bedingt ebenfalls eine Steigerung der Aktivität der Adenosintriphosphatase (ATPase) des Myosinfilaments, dadurch erfolgt die Abspaltung eines vorher gebundenen ATP-Moleküls und die Myofilamente erreichen wieder ihren Ausgangszustand.

Die Mitochondrien nehmen 35% des Volumens der Myozyte ein und sorgen mittels ATP-Produktion unter Sauerstoffverbrauch für die Energieversorgung der Zelle. Die hohe Dichte der Mitochondrien innerhalb der Zelle und ihre dicht gepackten sogenannten Cristae, Membranstapel der inneren Mitochondrienmembran, die zur verbesserten ATP-Produktion beitragen, verdeutlichen den enormen Energiebedarf einer Herzmuskelzelle.

1.3 Die elektromechanische Kopplung im Herzen

Den Beweis, dass extrazelluläres Ca^{2+} für das Herz von herausragender Bedeutung ist, lieferte RINGER bereits 1883 durch ein historisches Experiment an einem isolierten Froschherz, da es in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} zu keiner Kontraktion kam.

Im Gegensatz dazu konnten ARMSTRONG et al. (1972) zeigen, dass isolierte Muskelstreifen aus der Skelettmuskulatur des Frosches trotz der Eliminierung von extrazellulärem Ca^{2+} in der Lage waren, mehrere Minuten lang weiter zu kontrahieren.

Der auslösende elektrische Reiz, der zur Kontraktion im Muskel führt, ist das Aktionspotential (AP). Dieses wirkt sowohl in der Herz- als auch in der Skelettmuskulatur als elektrischer Impulsgeber. In der Skelettmuskulatur erfolgt die Kraftregulierung durch die Anzahl der kontrahierenden Zellen mittels Rekrutierung einer unterschiedlichen Anzahl von motorischen Endplatten. Im Gegensatz hierzu breitet sich das AP im Herzen von Zelle zu Zelle über die Gap

Junctions aus (siehe Abschnitt 1.2). Daher erfolgt die Kraftregulierung im Herz über das Ausmaß der Kontraktion der einzelnen Zellen. Das AP im Herzen kann in fünf Phasen eingeteilt werden (BIRKELAND et al., 2005).

In der Phase 0 (Depolarisations-Phase) verursachen spannungsabhängige einwärtsgerichtete Na^+ -Kanäle eine Veränderung des Membranpotentials (E_m) von -80 mV (Ruhepotential) bis weit in den positiven Bereich (ca. $+30$ mV) hinein. Die Na^+ -Ionen folgen dem elektrochemischen Gradienten. Innerhalb von einer ms werden die Kanäle wieder geschlossen.

Phase I ist eine Repolarisierungs-Phase und wird durch auswärtsgerichtete K^+ -Ströme (I_{I_0}) verursacht. Die K^+ -Kanäle öffnen am Ende der Phase 0 und sind in der Zeit eines depolarisierten Membranpotentials aktiv.

Phase II stellt die Plateau-Phase dar; das E_m ist aufgrund der Balance zwischen auswärtsgerichteten K^+ - und einwärtsgerichteten Ca^{2+} -Strömen (I_{Ca}) stabil. In dieser Phase erfolgen die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung und die Kontraktion (s.u.).

Phase III ist erneut eine Repolarisations-Phase. Der einwärtsgerichtete Ca^{2+} -Strom nimmt ab, gleichzeitig nimmt der auswärtsgerichtete K^+ -Strom über die verzögert korrigierenden Kanäle („delayed rectifier channels“) zu. Die auswärtsgerichteten Ströme dominieren und das E_m nimmt den Wert des Ruhepotentials an. Gleichzeitig wird das Ca^{2+} aus dem Zytosol der Zelle eliminiert und die Zelle beginnt zu relaxieren.

In Phase IV bleibt das Ruhepotential stabil. Es wird durch eine Gruppe von Kanälen, die als „inward rectifier channels“ bezeichnet werden, gehalten. Diese öffnen nahe dem Ruhepotential und bleiben bis zum nächsten AP offen.

Die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (s. Abb. 1.3) in Phase II des AP führt im gesunden Herzen zu einem Anstieg der freien Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol der Zelle von ca. 100 nM auf über 1 μM (BERS, 2001). Der Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca} , s. Abb. 1.3) erfolgt über die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in den transversalen Tubuli (T-Tubuli) und zu geringerem Anteil durch den sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) im “reverse mode“. Dieser verursacht eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung (s. Abb. 1.3) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den SR Ca^{2+} -Ausschüttungskanal oder Ryanodin-Rezeptor (RyR; BERS, 2001). Ein zu hoher intrazellulärer Ca^{2+} -Gehalt hemmt jedoch die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung. Dieses wird als inhibitorischer Effekt auf Ca^{2+} -Kanäle beschrieben. Dem internen

Ca^{2+} -Anstieg folgt die Kontraktion der Zelle (s. Abschnitt 1.2). Hier kommt es zu mehreren Anheftungs- (Querbrückenbildungen) und Ablösungszyklen der kontraktilen Proteine (Myofilamente). Je nach Spezies unterscheidet sich das Verhältnis der Ca^{2+} -Menge, die über die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle von extrazellulär einströmt und derjenigen, die aus dem SR über die Ausschüttungskanäle freigesetzt wird. Beim Mensch und beim Kaninchen sind etwa 30-40% des Ca^{2+} extrazellulären Ursprunges, wogegen ca. 60-70% aus dem SR stammen. Bei der Ratte und der Maus hingegen speichert das SR sogar über 90 % des Ca^{2+} . Diese Werte gelten jeweils nur für sog. Gleichgewichtsbedingungen bei niedriger Hertz- bzw. Stimulationsfrequenz (0,5 – 1 Hz; BERS, 2001; MAIER et al., 2000 B). Während der diastolischen Relaxationsphase (ab Phase III des AP) wird das Ca^{2+} aus dem Zytosol (s. Abb. 1.3) über den sarkolemmlen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) nach außen und durch die Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA) in das SR zurückgepumpt (BERS, 2001).

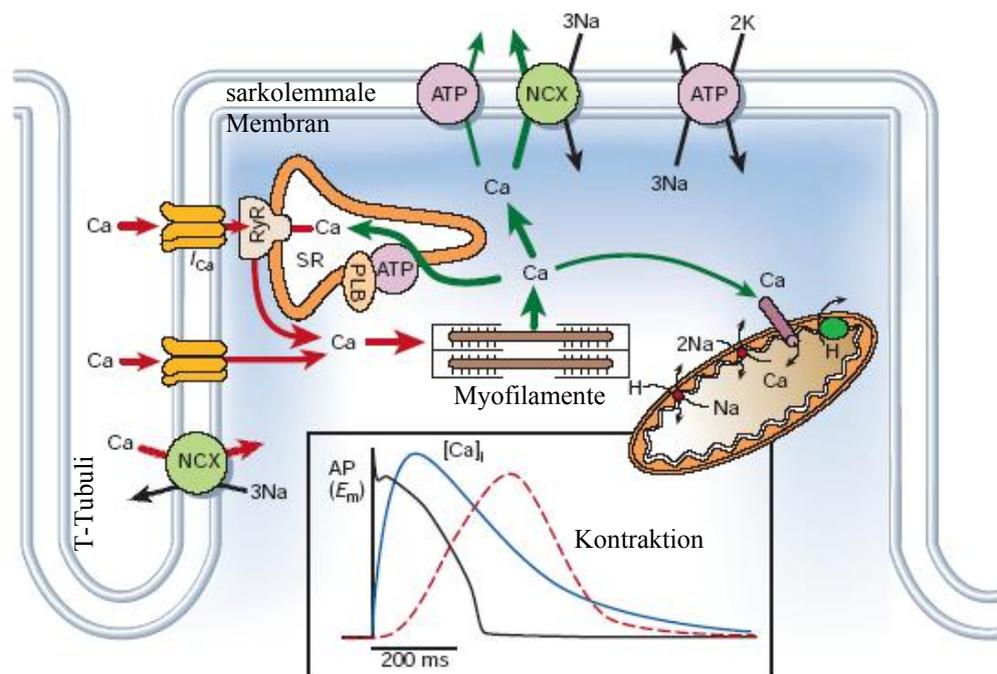


Abbildung 1.3: Elektromechanische Kopplung am Herzen

Die roten Pfeile stellen den Ca^{2+} -Einstrom und die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung während der Systole und der Phase II des AP dar. Die grünen Pfeile stellen den Rücktransport des Ca^{2+} ins SR oder nach extern während der Relaxation dar. Im Kasten ist die Beziehung von Aktionspotential (AP, schwarz) zu intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}]_i$, blau), und zur Kontraktion (rot) verdeutlicht. Modifiziert nach BERS, 2002.

Zu geringen Anteilen wird Ca^{2+} durch die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase transsarkolemmal eliminiert. Dabei gelangt nur diejenige Menge des vorher eingeströmten Ca^{2+} über den NCX und über die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase nach außen zurück. Die Anzahl der Querbrückenbildungen in den Myofilamenten pro Zeiteinheit verringert sich, und die Zelle beginnt zu relaxieren.

Auf die elektromechanische Kopplung am Herzen können weitere Botenstoffe wie bsp. Inositol-(1,4,5)-triphosphat (IP3) Einfluss nehmen. Durch Binden eines Agonisten erfolgt die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) über ein G-Protein, welches aus Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat IP3 und Diacylglycerol (DAG) produziert. Durch IP3 wird die Ca^{2+} -Freisetzung im Zellkern stimuliert, was vermutlich zur Aktivierung der CaMKII-abhängige Signalwege führt (BARE et al., 2005), DAG hingegen aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Die PKC modifiziert den Ca^{2+} -Einstrom und die Ca^{2+} -Sensitivität der Kontraktileproteine.

Die Theorie der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung wird durch die Experimente von NÄBAUER et al. (1989) unterstützt. An Herzmuskelzellen konnte mittels simultaner Registrierung des Membranpotentials und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Fura2 gezeigt werden, dass eine kontrollierte Depolarisation der Membran einen Ca^{2+} -Einstrom und eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR verursacht. Wurde jedoch das extrazelluläre Ca^{2+} vollständig mit EGTA abgepuffert, kam es nach einer Depolarisation zu einem Na^+ -Einstrom über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal, jedoch zu keiner Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Mittels Koffein-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass im SR ausreichend Ca^{2+} vorhanden war, welches jedoch nicht freigesetzt wurde. Das ließ die Schlussfolgerung zu, dass transmembrane Ionenbewegungen sowie ein Einstrom anderer Ionen über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal nicht ausreichen, um eine Kontraktion der Herzmuskelzelle auszulösen.

1.3.1 Der L-Typ Ca^{2+} -Kanal

Der L-Typ Ca^{2+} -Kanal gehört zu einer Familie von Ca^{2+} -Kanälen, die nach NOWYCKY et al. (1985) in drei Typen-Gruppen eingeteilt werden.

Die **L-Typ** Ca^{2+} -Kanäle besitzen eine große Leitfähigkeit (**L**arge conductance; ca. 25 pS in 110 mM Barium (Ba^{2+})), eine lange Öffnungszeit (**L**ong lasting opening) mit Ba^{2+} als Ladungsträger, sind erst bei großen Depolarisationen (**L**arge depolarisation; maximaler Strom bei 0 mV) der Zellmembran aktiv und sind

sensitiv gegenüber 1,4-Dihydropyridin (DHP). Daher stammt auch die Bezeichnung Dihydropyridin-Rezeptoren (DHPR).

Die T-Typ Ca^{2+} -Kanäle besitzen eine geringe Leitfähigkeit (Tiny, ca. 8 pS in 110 mM Ba^{2+}), eine flüchtige Öffnung (Transient), sind nur bei negativeren Membranpotentialen (maximaler Strom bei -50 mV) aktiv, jedoch unsensibel gegenüber DHP.

Die N-Typen sind weder L- noch (Neither) T-Typ Ca^{2+} -Kanal und befinden sich vorwiegend in Neuronen, wobei sie sowohl leitungs- als auch spannungsabhängig sind.

Des Weiteren werden noch P/Q- und R-Typen von Ca^{2+} -Kanälen nach elektrophysiologischen und pharmakologischen Phänotypen unterschieden. Diese befinden sich ebenfalls in Neuronen.

Diese Einteilung der Ca^{2+} -Kanäle ist sehr vereinfacht, da es außerdem innerhalb der einzelnen Typen große Unterschiede gibt.

In Herzmuskelzellen kommen ausschließlich L- und T-Typ Ca^{2+} -Kanäle vor. Wie oben bereits erwähnt, besitzen die T-Typ Ca^{2+} -Kanäle nur eine geringe Leitfähigkeit und sind nur bei sehr negativen Membranpotentialen aktiv. Für den Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) während des AP (HESS, 1988) sind sie vernachlässigbar, da dieser überwiegend durch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal erfolgt. Der Ca^{2+} -Einstrom wird schnell während der Phase II des AP durch die Depolarisation der Membran aktiviert. Die Inaktivierung erfolgt einerseits durch das Membranpotential und andererseits durch die steigende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Der totale Ca^{2+} -Einstrom wird durch die SR Ca^{2+} -Freisetzung um 50% reduziert (von zwölf auf sechs $\mu\text{mol Ca}^{2+}$ pro Liter Zytosol) (BERS, 2002). Die steigende Ca^{2+} -Konzentration hat also ein lokales negatives Feedback auf den Ca^{2+} -Einstrom, denn bei einer zu hohen Konzentration wird ein weiterer Ca^{2+} -Einstrom unterbunden. Dieser Effekt ist eine einzigartige Form der biologischen Regulation der Ca^{2+} -Konzentration im Zwischenraum von T-Tubuli und terminalen Zisternen des SR, die während der elektromechanischen Kopplung bis zu 50 μM erreichen kann. Diese Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals wird vermutlich durch Calmodulin (CaM) vermittelt, das am C-Terminus der $\alpha_{1\text{C}}$ -Untereinheit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals innerhalb der Autoregulationsdomäne bindet. Als Beweis für die Ca^{2+} -abhängige Komponente der Inaktivierung dienen Experimente mit Ba^{2+} als Ladungsträger, bei denen die Inaktivierung wesentlich langsamer fortschreitet.

Der sarkolemmale L-Typ Ca^{2+} -Kanal ist zwar in der gesamten sarkolemmalen Membran vorhanden, jedoch konzentriert in den T-Tubuli. Diese befinden sich in räumlicher Nähe zu den terminalen Zisternen und dem SR Ca^{2+} -Freisetzungskanal (vergl. Abschnitt 1.2). Der Raum zwischen den T-Tubuli und den terminalen Zisternen wird als „dyadic cleft“ bezeichnet und ist ca. zehn nm breit (BIRKELAND et al., 2005). Einem L-Typ Ca^{2+} -Kanal sind drei bis fünf SR Ca^{2+} -Freisetzungskanäle co-lokalisiert (FLUCHER et al., 1996). Eine funktionelle Einheit, die einen Ca^{2+} -Spark (elementare Ca^{2+} -Ausschüttungseinheit aus dem SR) produziert, besteht aus zehn bis 200 SR Ca^{2+} -Freisetzungskanälen und viermal weniger L-Typ Ca^{2+} -Kanälen (BIRKELAND et al., 2005). Dieses deutet darauf hin, dass die Anzahl der aktiven L-Typ Ca^{2+} -Kanäle die Menge der aktiven SR Ca^{2+} -Freisetzungskanäle bedingt bzw. die aus dem SR freigesetzte Ca^{2+} -Menge von der Menge des einströmenden Ca^{2+} abhängig ist. Einen Hinweis für diesen Sachverhalt stellt der gleiche glockenförmige Zusammenhang zwischen Kontraktilität bzw. L-Typ Ca^{2+} -Einstrom zum Membranpotential dar.

Eine Modulation des L-Typ Ca^{2+} -Kanals in der Zelle ist durch β -adrenerge Stimulation möglich. Dabei bindet ein β -adrenerger Antagonist an einen β -Rezeptor, wodurch die Adenylatzyklase stimuliert wird. Dadurch erfolgt eine vermehrte Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Die erhöhte cAMP-Konzentration aktiviert die Proteinkinase A, diese phosphoryliert den L-Typ Ca^{2+} -Kanal, was einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom verursacht (BERS, 2001).

Die Bedeutung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals zeigten bereits die erwähnten Experimente von RINGER (1883) aber auch die Experimente von BERS et al. (1983), die eine Abnahme des extrazellulären Ca^{2+} während der Kontraktion zeigten. Ohne den L-Typ Ca^{2+} -Kanal und das extrazelluläre Ca^{2+} erfolgt keine Kontraktion, im Vergleich zur SR Ca^{2+} -Ausschüttung bedingt das extrazelluläre Ca^{2+} jedoch nur fünf bis zehn Prozent der maximalen Kontraktionskraft.

Der L-Typ Ca^{2+} -Kanal am Herzen ist ein Heterotetramer (s. Abb. 1.4), bestehend aus der α_{1C} -, $\alpha_{2/\delta}$ - und β -Untereinheit. In manchen Gewebetypen kommt die γ -Untereinheit hinzu. In allen erregbaren Geweben ist der L-Typ Ca^{2+} -Kanal unverändert aufgebaut aus den α_{1C} -, $\alpha_{2/\delta}$ - und β -Untereinheiten. Die assoziierten Untereinheiten ($\alpha_{2/\delta}$ und β) sind fest, jedoch nicht kovalent, an die α_{1C} -Untereinheit gebunden und modulieren die biophysikalischen Eigenschaften

sowie die Leitungseigenschaften der α_1 -Untereinheit. So wurde erst kürzlich gezeigt, dass die Phosphorylierungsstelle des L-Typ Ca^{2+} -Kanals für die CaMKII an der β -Untereinheit zu finden ist (GRUETER et al., 2006).

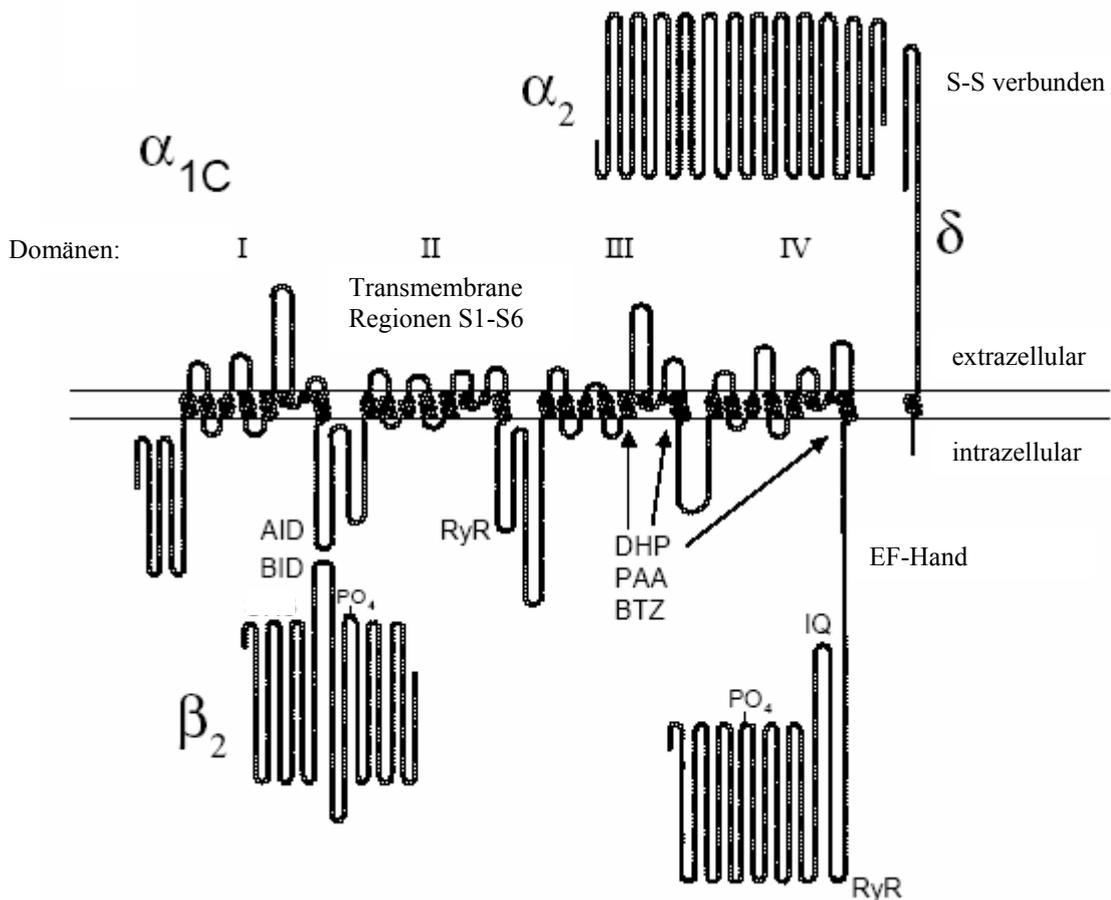


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des kardialen L-Typ Ca^{2+} Kanals

Dargestellt ist die α_{1C} -Untereinheit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals mit ihren Domänen I bis IV und deren transmembranären Regionen S1 – S6. Durch Pfeile sind die Bindungsstellen von den Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten Dihydropyridin (DHP), Phenylalkylamin (PAA) und Benzothiazepin (BTZ) markiert. Mögliche Interaktionsstellen mit dem Ryanodin-Rezeptor (RyR) sind markiert, ebenso wie Phosphorylierungsstellen (PO_4) und die Bindungsstellen von Calmodulin (IQ-Motiv und EF-Hand). An der mit AID markierten Stelle (Interaktionsdomäne) findet die Interaktion von der α_{1C} und der β -Untereinheit (BID) statt. Auch diese besitzt eine Phosphorylierungsstelle (PO_4). Die δ und die α_2 -Untereinheiten sind durch Schwefel (S)-Brücken verbunden. Modifiziert nach BERS (2001)

Die α_1 -Untereinheit besteht aus vier homologen Motiven oder Domänen (I-IV), alle bestehen aus sechs membrandurchspannenden α -Helices (S1 bis S6), verbunden durch variable zytoplasmatische Loops zwischen S5 und S6 (BODI et

al., 2005). Zur Zeit sind zehn $\alpha 1$ -Untereinheiten (zwischen 170 und 240 kD) und deren Gene bekannt. Diese werden in drei Klassen eingeteilt:

$Ca_v1.1$ ($\alpha 1_S$), 1.2 ($\alpha 1_C$), 1.3 ($\alpha 1_D$) und 1.4 ($\alpha 1_F$). Nur die $\alpha 1_C$ ist DHP-sensitiv und wird in hohem Maß im Herzen exprimiert.

$Ca_v2.1$ ($\alpha 1_A$), 2.2 ($\alpha 1_B$) und 2.3 ($\alpha 1_E$) sind P/Q-, N- und eventuell R-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, diese sind im Gehirn lokalisiert.

$Ca_v3.1$ ($\alpha 1_G$), 3.2 ($\alpha 1_H$) und 3.3 ($\alpha 1_I$) sind T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und im Gehirn, der Leber und im Herzen lokalisiert.

Die $\alpha 1$ -Untereinheit beherbergt die ionenselektive Pore, den Spannungssensor, die Öffnungsmechanik und die Bindestellen für die kanalmodifizierenden Stoffe sowie die Autoregulierungsdomäne. Die S4-Helix ist der Spannungssensor. Es gibt mehrere Hypothesen, wie die Konformationsänderung zustande kommt, die zur Öffnung des Kanals führt. Einmal verlagert sich die S4-Helix nach der Depolarisation in den extrazellulären Bereich (BEZANILLA, 2002), oder die S4-Helix mit oder ohne S3-Helix führen eine spiralförmige oder rotierende Bewegung aus.

Die $\alpha 2/\delta$ -Untereinheit ist eng assoziiert mit der $\alpha 1$ -Untereinheit durch oberflächliche Interaktion und intrazellulär durch Disulfidbrücken zu einem kleineren Protein, der δ -Untereinheit. Die $\alpha 2$ -Untereinheit ist extrazellulär. Die δ -Untereinheit besitzt eine transmembrane und eine kleinere intrazelluläre Region. Die $\alpha 2$ - und die δ -Untereinheit werden durch das gleiche Gen codiert und durch proteolytische Spaltung separiert. Es existieren vier Isomere ($\alpha 2/\delta_{1-4}$), jeweils codiert durch ein unterschiedliches Gen. Die $\alpha 2/\delta$ -Untereinheit beeinflusst die Kanal-Dichte, das Ausmaß der Ladungsbewegung über den Kanal und die Affinität von Rezeptorantagonisten der $\alpha 1$ -Untereinheit. Außerdem ermöglicht sie zusammen mit der β -Untereinheit die korrekte Lokalisation der $\alpha 1$ -Untereinheit in der Membran. Die $\alpha 2/\delta_1$ -Untereinheit ist ubiquitär und weist eine hohe Affinität zu GABA-Antagonisten auf. Dagegen besitzt die $\alpha 2/\delta_2$ -Untereinheit nur eine geringe und die $\alpha 2/\delta_{3-4}$ -Untereinheiten gar keine Affinität zu GABA-Antagonisten.

Die γ -Untereinheit wird nicht im Herzen exprimiert und daher an dieser Stelle nicht weiter beschrieben.

Bei der β -Untereinheit sind vier Isoformen beschrieben worden. Alle sind hydrophil, nicht glycosyliert und intrazellulär. Nur für die β_2 -Untereinheit wurde gezeigt, dass diese mit dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal interagiert. Sie ist fest an einem hoch konservierten Motiv zwischen den Motiven I und II der α_1 -Untereinheit gebunden sowie an einer weiteren Stelle. Die β_2 -Untereinheit erhöht die Dichte des L-Typ Ca^{2+} -Kanals und modifiziert die biophysikalischen Eigenschaften, dadurch kommt es zu einer Linksverschiebung („leftward shift“) im Strom-Spannungs-Verhältnis. Ohne die β -Untereinheit ist die α_1 -Untereinheit durch das β -adrenerge System und pH-Veränderungen nicht mehr regulierbar (BODI et al., 2005).

1.3.2 Das sarkoplasmatische Retikulum (SR)

Das sarkoplasmatische Retikulum ist ein membranumgebenes Kompartiment. Es ist in zwei große Bereiche unterteilt: die longitudinalen Tubuli (L-Tubuli) und die terminalen Zisternen (T-Tubuli). Die Hauptaufgaben des SR sind die Ca^{2+} -Speicherung, -Freisetzung und -Wiederaufnahme. Die Ca^{2+} -Speicherung erfolgt durch die Ca^{2+} -bindenden Proteine, wie Calsequestrin, das histidinreiche Ca^{2+} -bindende Protein, Junctate und Sarcalumenin (ROSSI et al., 2006).

Das wichtigste Ca^{2+} -Speicher-Protein ist Calsequestrin. Es umfasst einen Anteil von ca. 27% aller bindenden Proteine im SR und wurde nach seiner Eigenschaft, Ca^{2+} (engl. **Calcium**) im SR zu „beschlagnahmen“ (engl. **sequester**), benannt. Es besitzt einen sehr niedrigen pH-Wert und ist innerhalb des SR hydrophob an Junctin, Triadin oder den SR Ca^{2+} -Ausschüttungskanal gebunden. Junctin und Triadin sind membranständige Ankerproteine. Die Affinität des Calsequestrin zu Ca^{2+} beträgt 40 μM (K_d), seine Ca^{2+} -Speicherkapazität von 40 mol Ca^{2+} pro mol Protein bei einem pH-Wert im SR von 7,5 (ROSSI et al., 2006) bzw. 35-40 Ca^{2+} -Ionen pro Molekül Calsequestrin (BERS, 2001) ist sehr hoch. Es existieren zwei Isoformen, eine kardiale und eine skelettale. Diese unterscheiden sich nur in der Anzahl der sauren Reste am C-terminalen Ende. Die kardiale Isoform besitzt mehr saure Reste, dies scheint jedoch keine Auswirkungen auf die Ca^{2+} -bindenden Eigenschaften zu haben. Calsequestrin existiert als Monomer bei Ca^{2+} -Konzentrationen unter zehn μM , als Dimer bei Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen zehn und 100 μM und bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen als Polymer. Unter

normalen Bedingungen (Ca^{2+} -Konzentration ca. ein mM) im SR tritt es als stabiles Polymer auf.

Das zweite wichtige Ca^{2+} -speichernde Protein im Lumen des SR ist das sogenannte histidinreiche Ca^{2+} -bindende Protein. Es ist ebenfalls über Triadin in der SR Membran verankert.

Junctate ist das dritte luminale Ca^{2+} -speichernde Protein im SR. Seine Ca^{2+} -Affinität ($K_d=217 \mu\text{M}$) ist wesentlich geringer als die von Calsequestrin, ebenso wie seine Ca^{2+} -Speicherkapazität von 21 mol Ca^{2+} pro mol Protein.

Sarcalumenin ist ein weiteres Ca^{2+} -speicherndes Protein im SR. Auch seine Ca^{2+} -Affinität mit einem K_d -Wert von ca. $300 \mu\text{M}$ ist äußerst gering. Seine Ca^{2+} -Speicherkapazität dagegen ist mit 35 mol Ca^{2+} pro mol Protein sehr hoch.

Der SR Ca^{2+} -Gehalt ist abhängig von den Ca^{2+} -bindenden Proteinen im Lumen des SR. Diese halten innerhalb des SR die freie Ca^{2+} -Konzentration bei ungefähr einem mM (ROSSI et al., 2006).

Die Ca^{2+} -Wiederaufnahme und -Freisetzung werden über zwei funktionell herausragende Proteine, die in der Membran integriert sind, vermittelt. Diese sind die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die Ca^{2+} unter Energieverbrauch ins SR aufnimmt, und die Ca^{2+} -Ausschüttungskanäle, die aufgrund ihrer hohen Affinität für das neutrale Pflanzenalkaloid Ryanodin auch Ryanodin-Rezeptoren (RyR) genannt werden (INUI et al., 1986). Die RyR befinden sich in den terminalen Zisternen, nahe den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen, die SERCA befindet sich in den L-Tubuli (vergl. Abschnitt 1.2). Beide funktionellen Proteine werden im späteren Textverlauf ausführlicher beschrieben.

Ist der SR Ca^{2+} -Gehalt deutlich erhöht, steigt die Anzahl der Ca^{2+} -Freisetzungseignisse (Ca^{2+} -Sparks) deutlich an und damit die Wahrscheinlichkeit spontaner Arrhythmien. Digitalis, das die Na^+/K^+ -ATPase inhibiert und dadurch die intrazelluläre Na^+ -Konzentration erhöht, führt ebenfalls zur SR Ca^{2+} -Überladung (über sekundären Ca^{2+} -Einstrom durch den NCX) und somit zu Arrhythmien. Liegt der SR Ca^{2+} -Gehalt dagegen bei nur ca. 50% des normalen Ca^{2+} -Spiegels, findet keine Kontraktion der Zelle statt. Ferner wird in keinem Fall das gesamte Ca^{2+} aus dem SR entlassen, da dieses durch die Ca^{2+} -induzierte Inhibition der Ca^{2+} -Freisetzung verhindert wird (BIRKELAND et al., 2005).

Die Stärke der entwickelten Kontraktionskraft des Herzens bzw. der Herzmuskelzelle hängt von der im SR gespeicherten Ca^{2+} -Menge ab (BERS, 2001;

MAIER & BERS, 2002). Mit steigender Stimulationsfrequenz (bzw. Herzfrequenz) erhöht sich die im SR gespeicherte Ca^{2+} -Menge. Bedingt wird dies durch einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom über die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und eine dadurch verursachte erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme ins SR durch die SERCA. Die zusätzlich gespeicherten Ca^{2+} -Ionen im SR führen im Folgenden zu einer verstärkten Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR und somit zu einer vermehrten Kontraktionskraft. Beim Mensch und den meisten Säugetieren nimmt mit steigender Stimulationsfrequenz daher die Kontraktionskraft zu, was als positive Kraft-Frequenz-Beziehung bezeichnet wird (BERS, 2001; PIESKE et al., 1995; MAIER et al., 2002 A). Bei der terminalen Herzinsuffizienz des Menschen ist eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung zu beobachten (BEUCKELMANN et al., 1992; BÖHM et al., 1992; HASENFUSS et al., 1992; SCHWINGER et al., 1993; PIESKE et al., 1995; MAIER et al., 2000 A). Diese trägt im wesentlichen Ausmaß zur kontraktile Dysfunktion und dem damit verbundenen Pumpversagen des Herzens bei.

1.3.2.1 Die SR Ca^{2+} -Ausschüttung: Ryanodin-Rezeptor (RyR)

Der SR Ca^{2+} -Ausschüttungskanal wird auch als Ryanodin-Rezeptor (RyR) bezeichnet, aufgrund seiner hohen Affinität zum neutralen Pflanzenalkaloid Ryanodin (INUI et al., 1986). Es sind drei Isoformen des RyR in Säugetieren bekannt, RyR1, RyR2 und RyR3, die von separaten Genen kodiert werden. Ein Vergleich der drei Isoformen ergibt einen zu 66% identischen Aufbau. RyR1 wird primär in der Skelettmuskulatur exprimiert, RyR2 ist die Hauptisoform in der Herzmuskulatur, und RyR3 tritt in geringen Mengen in verschiedenen Geweben, unter anderem im Gehirn, auf. Gentechnisch veränderte Mäuse, die kein Gen für den RyR1 tragen, versterben perinatal an Ateminsuffizienz bedingt durch Skelettmuskulatur-Versagen (TAKESHIMA et al., 1994). Ein Fehlen des Gens für den RyR2 führt zur embryonalen Letalität (TAKESHIMA et al., 1998). Im Gegensatz dazu zeigt das Fehlen des RyR3-Gens keine veränderten Muskelfunktionen (TAKESHIMA et al., 1996). RyR1 und RyR3 sind für die vorliegende Arbeit nicht von Interesse, auf eine genaue Beschreibung wird daher verzichtet.

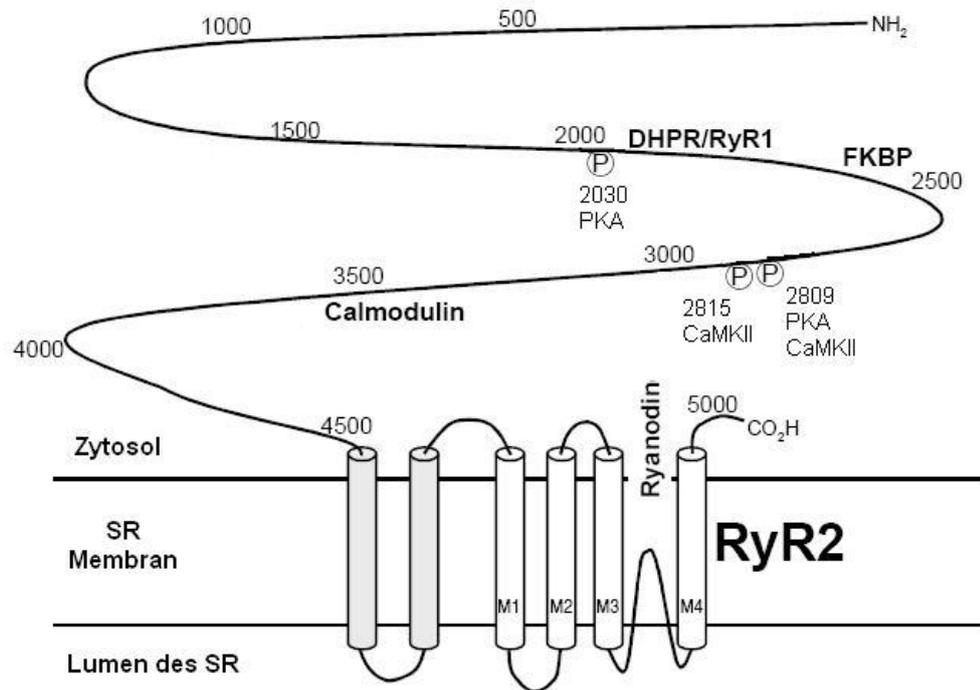


Abbildung 1.5: Strukturmodell eines RyR2-Monomers

Dargestellt ist der Ryanodin-Rezeptor mit vier transmembranären Domänen M1 bis M4. Zwei werden derzeit noch diskutiert. Markiert sind die Phosphorylierungstellen von PKA und CaMKII und die Interaktionsstellen des RyR mit Ryanodin, Calmodulin, FKBP und dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal (DHPR/RyR1). Modifiziert nach BERS (2001)

Das RyR2-Monomer hat ein molekulares Gewicht von 564,711 Da (OTSU et al., 1990). Der RyR ist ein Homotetramer, dessen tetramerische Struktur eine Masse von 2.260.000 Da impliziert (BERS, 2001). Die genaue Struktur der RyR2-Monomere ist noch nicht geklärt, in der Diskussion sind vier bis zwölf Transmembrandomänen, wobei für die Domänen M1 bis M4 umfassende übereinstimmende Daten vorliegen. Ein Vergleich mit den Daten der verwandten IP3-Rezeptoren, die sechs Transmembrandomänen aufweisen, deutet darauf hin, dass ein RyR2-Monomer aus vier bis sechs Transmembrandomänen aufgebaut ist (s. Abb. 1.5). MARX et al. (2000) zeigten, dass der kardiale RyR einen Megakomplex aus FK-Bindeprotein 12.6 (FKBP12.6), einem PKA Ankerprotein (mAKAP) und zwei Phosphatasen PP1 und PP2A darstellt. Hinzu kommen Interaktionen mit Calmodulin, Junctin und Triadin.

Wie bereits in Abschnitt 1.3 beschrieben, erfolgen sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung des RyR bei der elektromechanischen Kopplung durch den Einfluss von Ca^{2+} , bzw. durch unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen. Ebenso

kann durch Koffein, Ryanodin und ATP bei bestimmten Ca^{2+} -Konzentrationen eine Öffnung des RyR verursacht werden. Eine Aktivierung durch Koffein und Ryanodin hat zur Folge, dass das SR entladen wird und es zu einer starken Kontraktion der Muskelzelle kommt. Im Gegensatz zur Aktivierung durch Ryanodin ist die Öffnung des RyR bei Koffein-Anwendung reversibel.

Die Regulationsmechanismen beim RyR sind vielfältig. Von herausragender Bedeutung ist die Regulation durch Phosphorylierung mittels c-AMP-abhängiger Proteinkinase (PKA) und Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiger Proteinkinase (CaMKII), jedoch auch durch die Bindung von Calmodulin und FKBP.

Die Phosphorylierung mittels PKA erfolgt an Serin (Ser) 2809 (MARX et al., 2000). XIAO et al. (2006) zeigte allerdings in Rattenmyozyten, dass Ser 2030 und nicht Ser 2808 (im Kaninchen Ser 2809) die wichtigere PKA-Phosphorylierungsstelle am RyR darstellt. Ferner ist Ser 2808 unter PKA-Inhibition weiterhin phosphoryliert, Ser 2030 hingegen nicht. Phosphorylierungen an beiden Stellen verursachen übereinstimmend faszinierende Effekte auf das Öffnungsverhalten des Kanals.

Die CaMKII phosphoryliert ebenfalls an Serin 2809 (WICHTER et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 2003). Als mögliche zweite Phosphorylierungsstelle wurde auch Serin 2815 beschrieben (WEHRENS et al., 2004).

Die direkten Effekte der Calmodulin-Bindung an den RyR sind noch nicht vollständig geklärt bzw. eventuelle Einflüsse anderer als die sekundär durch die CaMKII vermittelten Faktoren. Allerdings inhibiert die Calmodulin-Bindung bei einer höheren Ca^{2+} -Konzentration als 100 nM die Ca^{2+} -, die Koffein- und die AMP-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung. Die Bindung von Calmodulin an den RyR ist positiv Ca^{2+} -abhängig, d.h., bei steigender Ca^{2+} -Konzentration bindet mehr Calmodulin an den RyR. Die Bindungsstelle von Calmodulin am RyR liegt nur ca. neun nm entfernt von der FKBP-Bindestelle (BERS, 2001).

FKBP ist ein FK Bindungsprotein und besteht aus Peptid-Isomerasen, die an den RyR binden, deren Isomerase-Aktivität jedoch nicht essentiell für ihre Effekte auf den RyR ist. Im Herzen werden zwei Isoformen exprimiert. Obwohl FKBP12 dominiert, ist FKBP12.6 aufgrund seiner höheren Affinität (ca. 600fach) an den RyR assoziiert. Das Binden von FK-506 an FKBP verursacht die Ablösung des FKBP vom RyR. Infolge dessen sind das Öffnungsverhalten und die Ca^{2+} -Regulation des RyR verändert. Es kommt wahrscheinlich zu einer erhöhten Ca^{2+} -

Spark-Frequenz unter Ruhebedingungen. Eine Hypothese ist daher, dass FKBP das koordinierte Öffnen der vier RyR2 in einem Homotetramer positiv beeinflusst, so dass es bei der Öffnung zu einem direkten Übergang vom vollständig geschlossenen zum vollständig offenen Zustand kommt. Der gesamte Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR mit an den RyR gebundenem FKBP ist jedoch bei gleicher Ca^{2+} -Konzentration geringer als ohne FKBP (MARX et al., 2000).

1.3.2.2 Die SR Ca^{2+} -Aufnahme: SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und Phospholamban (PLB)

Die Sarko(endo)plasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) stellt den Hauptmechanismus, Ca^{2+} aus dem Zytosol zu entfernen, dar. Dieses erfolgt unter Verbrauch von einem Molekül ATP pro Transport von zwei Ca^{2+} -Ionen (TADA et al., 1982). Beim Kaninchen wird ca. 70% des systolischen Ca^{2+} über die SERCA ins SR transportiert, ca. 28% werden durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) befördert und ca. 2% über die sarkolemmale Ca^{2+} -Pumpe. Bei der Ratte und der Maus werden ca. 92% des Ca^{2+} über die SERCA, 7% durch den NCX und nur 1% mittels der sarkolemmalen Ca^{2+} -Pumpe transportiert. Diese Werte gelten nur für Gleichgewichtsbedingungen. Bei Menschen sind die Verhältnisse ähnlich wie beim Kaninchen (BIRKENLAND et al., 2005). Die SERCA trägt somit maßgeblich zur diastolischen Relaxation bei (INESI, 1985; SCHATZMANN, 1989), ist in der Membran der L-Tubuli des SR lokalisiert und gehört zur Familie der P-Typ Ca^{2+} -ATPasen (ROSSI et al., 2006). Es gibt fünf wichtige Isoformen der SERCA. Diese werden durch drei Gene kodiert: ATP2A1 (SERCA1), ATP2A2 (SERCA2) und ATP2A3 (SERCA3). Die SERCA1 befindet sich in schnell zuckenden Skelettmuskelzellen. Durch alternatives „splicen“ der letzten zwei Exons des ATP2A1 Gens entsteht entweder die adulte (SERCA1a) oder die neonatale Isoform (SERCA1b). Aus einem ähnlichen „Splicevorgang“ des ATP2A2 Gens resultieren sowohl die beiden C-terminalen Splicevarianten SERCA2a und SERCA2b als auch die äußerst seltenen SERCA2-Isoformen c und d. SERCA2a ist die dominante Isoform in Herzmuskelzellen, in langsam zuckenden und in neonatalen Skelettmuskelzellen. Die Isoform SERCA2b tritt in Nichtmuskelgewebe und in glatter Muskulatur auf. Die SERCA3 ist allgemein verteilt z.B. in Lymph- und Endothelzellen. Trotz signifikanter struktureller und

Primärsequenz-Übereinstimmungen legt die gewebespezifische Verteilung der SERCA-Isoformen funktionelle Unterschiede nahe (ROSSI et al., 2006).

Da die SERCA2a die herzspezifische Isoform darstellt, wird nur diese ausführlich behandelt. Diese besitzt vier Aminosäuren weniger als die SERCA1, deren Molekulargewicht 110.331 Da beträgt.

Die SERCA besitzt zehn Transmembrandomänen (M1-M10), wovon fünf (M1-M5) zusätzlich eine α -helikale „Stalk“-Region (S1-S5) im Zytoplasma tragen, eine ATP-(Nukleotid)-Bindedomäne, eine Phosphorylierungsseite (Asp-351) sowie eine β -„Haar“-Domäne und eine „Scharnier“-Region (s. Abb. 1.6). Ferner ist die Ca^{2+} -bindende Region in den Transmembrandomänen M1 bis M6 und M8 lokalisiert (s. Abb. 1.6, CLARK et al., 1989 A,B).

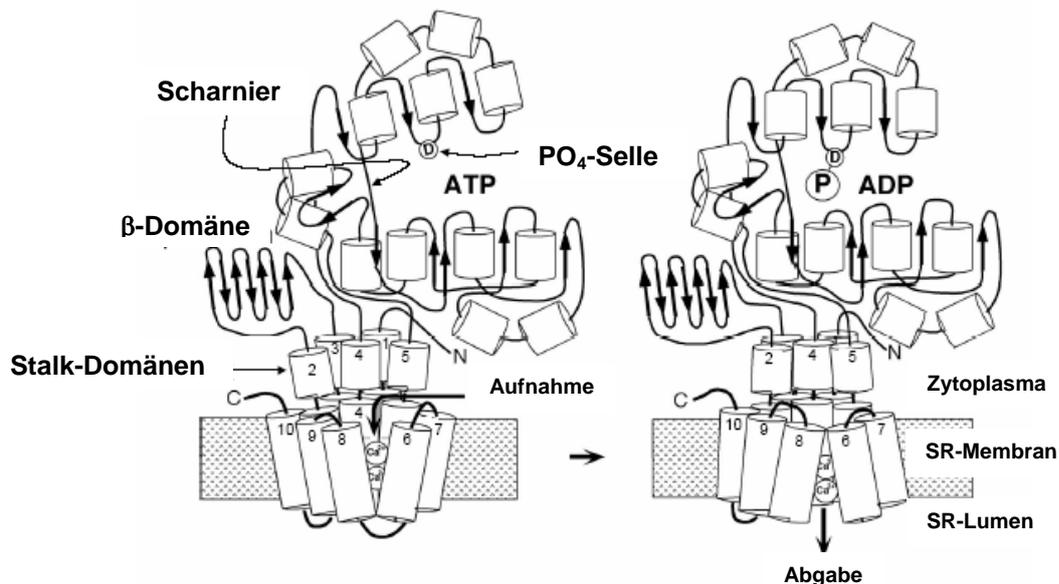


Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau der SERCA und des Ca^{2+} -Transportes in das SR

Dargestellt ist eine schematische Struktur der SERCA mit ihren zehn transmembranären Domänen, den fünf Stalk(Stiel)-Domänen sowie der β -Domäne und der als Scharnier bezeichneten Region. Ferner ist die Phosphorylierungsstelle markiert (PO_4 -Stelle). Der Transport von Ca^{2+} und die damit einhergehende Konformationsänderung sind durch die zwei Teilabbildungen der Abbildung verdeutlicht. Modifiziert nach BERS (2001).

Der Ca^{2+} -Transport vom Zytosol in das SR erfolgt, sobald zwei Ca^{2+} -Ionen und ein ATP-Molekül an die SERCA gebunden haben. Das terminale Phosphat des ATP wird auf das Asp-351 übertragen, wodurch das Ca^{2+} nicht mehr entlassen werden kann. Außerdem kommt es durch die Phosphorylierung zu einer Struktur-

Veränderung der SERCA, so dass die Ca^{2+} -Ionen nur noch in das Lumen des SR abgegeben werden können. Gleichzeitig erfolgt eine Reduktion der Ca^{2+} -Affinität, und die Ca^{2+} -Ionen werden ins Lumen des SR entlassen. Diese Affinitätsveränderung ist zwingend erforderlich, um die Ca^{2+} -Ionen freizugeben, da im Lumen des SR eine höhere Ca^{2+} -Konzentration vorliegt als im Zytosol (BERS, 2001).

Die SERCA2a unterliegt einem Regulationsmechanismus durch das Protein Phospholamban (PLB; KIRCHBERGER et al., 1974; TADA et al., 1975). Im dephosphorylierten Zustand hemmt PLB die SERCA, im phosphorylierten Zustand entfällt die Hemmung (KIM et al., 1990; JAMES et al., 1989; INUI et al., 1986). Durch die Abdissoziation von phosphoryliertem PLB kommt es zu einer Änderung der Ca^{2+} -Affinität der SERCA (TADA & INUI, 1983; ODERMATT et al., 1996). PLB kann im Herzen durch drei unterschiedliche Proteinkinasen an drei verschiedenen Stellen phosphoryliert werden: Durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A an Serin 16, durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) an Threonin 17 und die Ca^{2+} /Phospholipid-abhängige Proteinkinase C (PKC) an Serin 10 (SIMMERMAN et al., 1986; LePEUCH et al., 1979; KRANIAS, 1985; TADA et al., 1975). Die Phosphorylierungen sind reversibel, unter anderem durch die am SR assoziierten Phosphatasen (KRANIAS & Di SALVO, 1986). PLB besteht aus 52 Aminosäuren und hat als Monomer ein Molekulargewicht von 6080 Da. Durch die Phosphorylierung erfolgt das Lösen des PLB von der SERCA und es kommt zur Homopentamer-Bildung (MW 22.000 Da). PLB besitzt eine hydrophobe und eine hydrophile Domäne. Es kann die SERCA-Isoformen 1a und 2a hemmen, jedoch nicht die SERCA3 (BERS, 2001). PLB kommt in hohen Mengen in ventrikulären Myozyten vor. Etwa zwei Monomere sind pro SERCA-Protein gebunden (COLYER & WANG, 1991). In atrialen Myozyten befindet sich ca. zehnmal weniger PLB. Geringere Konzentrationen sind ebenfalls in der Skelett- und glatten Muskulatur gefunden worden. REDDY et al. (1995) zeigten, dass eine maximale Hemmung der SERCA durch drei PLB Monomere pro SERCA-Molekül verursacht wird.

Auch die SERCA2A scheint neuesten Befunden nach eine Phosphorylierungsstelle zu besitzen, an der eine Phosphorylierung durch CaMKII erfolgen kann (BASSANI et al., 1995; BERS, 2001). Diese führt zu einer beschleunigten Aufnahme von Ca^{2+} ins SR (DeSANTIAGO, MAIER & BERS, 2002).

Ferner ist die SERCA pH-sensitiv, denn unter Acidose reduziert sich die Pumpleistung. Diese kann durch Thapsigargin (THASTRUP et al., 1990), das die höchste Affinität und Spezifität zur SERCA besitzt (DAVISON & VARHOL, 1995), durch Cyclopiazonsäure (GOEGER et al., 1988) und durch 2,5-di(tert-butyl)-1,4-Benzohydroquinon (NAKUMURU et al., 1992) gehemmt werden.

1.3.3 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX)

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (exchanger) NCX trägt neben der SERCA ebenfalls zur diastolischen Relaxation der Herzmuskelzellen bei, zu ca. 28% beim Kaninchen und zu ca. 7% bei Ratte und Maus (vergl. Abschnitt 1.3.2.2). Er transportiert dabei passiv ein Ca^{2+} -Ion im Austausch für drei Na^+ -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten. Dieser Gradient wird von der Na^+/K^+ -ATPase in Form des Na^+ -Konzentrationsgradienten erzeugt (REUTER & SEITS, 1968). Die Transportrichtung des NCX ist also vom elektrochemischen Gradienten, von Na^+ und Ca^{2+} abhängig. Da jedoch durch den NCX eine positive Ladung (Ca^{2+} vs. $3\times\text{Na}^+$) über die sarkolemmale Membran verschoben wird, besteht ebenfalls eine Abhängigkeit vom Membranpotential. Daher kann es bei einem höheren Membranpotential (größer als -40 mV) auch zu einem Ca^{2+} -Einstrom über den NCX kommen („reverse mode“ des NCX). Während der Depolarisationsphase des Aktionspotentials ermöglichen die äußeren Bedingungen daher den „reverse mode“, so dass der Ca^{2+} -Einstrom über den NCX den RyR stimulieren kann. Der Einstrom ist jedoch sehr gering (BIRKENLAND et al., 2005). Bei deutlich negativen Membranpotentialen (kleiner als -40 mV) ist der Ca^{2+} -Ausstrom begünstigt.

Der NCX ist in der sarkolemmalen Membran und in den T-Tubuli zu finden. Es gibt drei NCX-Isoformen, die durch separate Gene kodiert werden. Alle Isoformen haben ähnliche, jedoch nicht identische funktionelle Eigenschaften (LINCK et al., 1998). Die NCX1-Isoform befindet sich im Herzen und zeichnet sich durch ein alternatives „Splicing“ des F-Loops aus. Im Herzen tritt auch die größte Konzentration von NCX auf. Die Isoformen NCX2 und NCX3 sind im Gehirn und der Skelettmuskulatur angesiedelt (LI et al., 1994 und NICOLL et al., 1996). Die NCX-Aktivität ist im Herzmuskel mehr als zehnfach höher im Vergleich zu glatter und Skelettmuskulatur und zu neuronalen Geweben (BERS, 2001).

Der NCX besteht aus 970 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 108 kDa. Während des Transportes zur sarkolemmalen Membran werden die ersten 32 Aminosäuren und die erste Transmembrandomäne, die ein Signalpeptid trägt, abgespalten und der NCX am späteren extrazellulären Aminoterminalen-Ende glykolysiert. Frühere NCX-Strukturmodelle gingen von der Existenz von elf Transmembrandomänen aus, neueste Erkenntnisse aus Versuchen mit epitrop-spezifischen Antikörpern und mit Sulfhydryl-Reagentien zum Ersetzen der Cystein-Reste deuten jedoch nur auf das Vorhandensein von neun Transmembrandomänen hin (NICOLL et al., 1990; IWAMOTO et al., 1999; DOERING et al., 1998).

Im derzeitigen Modell (s. Abb. 1.7) sind fünf Transmembrandomänen auf der Aminoseite des Moleküls und vier auf der Carboxylseite angesiedelt. Mutmaßlich kommt hier noch eine Domäne hinzu, die einem P-Loop ähnelt. Zwischen den Transmembrangruppen befindet sich ein großer zytoplasmatischer F-Loop, bestehend aus 550 Aminosäuren (ca. 59% des gesamten Moleküls). Eine Deletion des F-Loop zeigte, dass dieser für den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Transport nicht essentiell ist, jedoch Einfluss nimmt auf die allosterische Regulation durch Na^+ und Ca^{2+} (MATSUOKA et al., 1993). Ferner enthält der NCX zwei einander gegenüberliegende „ α -repeats“ (Regionen mit intramolekularer Homologie) und Regionen, die der Na^+/K^+ -ATPase und der SERCA ähnlich sind. Es wird vermutet, dass diese Regionen in den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Transport involviert sind (CLARK et al., 1989 B; NICOLL et al., 1996). Außerdem ist im F-Loop eine XIP-Region (exchanger inhibitory peptide) lokalisiert, die Ähnlichkeit einer Calmodulin-Binderegion aufweist und autoinhibitorisch wirken könnte.

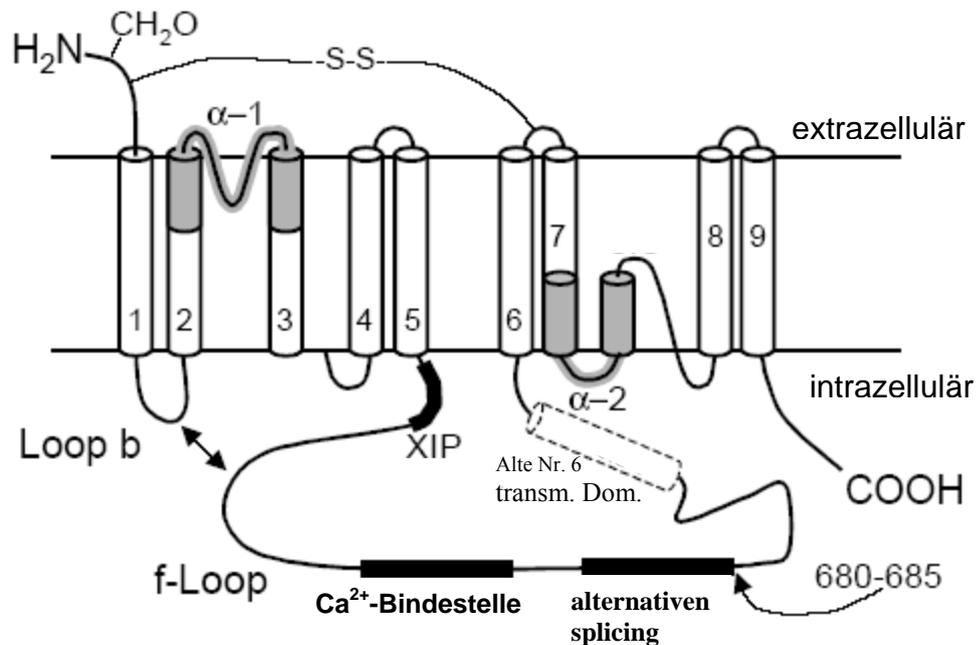


Abbildung 1.7: Arbeitsmodell des NCX

Dargestellt ist ein Strukturmodell des NCX mit den neun transmembranären Domänen (transm. Dom.), der Glycosylierungsstelle (CH_2O), den α -Wiederholungen (intramolekulare Homologien: $\alpha 1$ und $\alpha 2$) und der Domäne des alternativen Splicings (alternatives splicing). Ferner sind die Ca^{2+} -Bindestelle und XIP-Bindestelle markiert. Modifiziert nach BERS (2001).

Bis heute liegen keine Ergebnisse vor, die eine Regulierbarkeit des NCX über eine Phosphorylierung nachweisen (BERS, 2001). Der NCX ist jedoch durch viele Stoffe oder andere äußere und innere Faktoren modulierbar. Die Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationsunterschiede über der Membran und das Membranpotential haben einen Einfluss auf die Transportrichtung des NCX (s.o.). Ferner wird der NCX durch Alkalose und hohe Mengen von ATP stimuliert, eine Acidose dagegen wirkt hemmend. Auch durch Nickel oder Kadmium kann der NCX gehemmt werden. Eine Hemmung, die ausschließlich den „reverse mode“ des NCX bedingt, kann durch die Substanz KB-R7943 erreicht werden (BIRKENLAND et al., 2005).

1.3.4 Weitere Ca^{2+} -Transporter mit geringerer Bedeutung für die elektromechanische Kopplung

Es gibt noch zwei weitere Ca^{2+} -Transporter innerhalb der Herzmuskelzelle, die während der elektromechanischen Kopplung eine untergeordnete Rolle spielen, die sarkolemmale Ca^{2+} -Pumpe und der mitochondriale Uniporter, der an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt wird.

Die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase transportiert Ca^{2+} unter Verbrauch von ATP nach extern. Sie besitzt zwar eine sehr hohe Ca^{2+} -Affinität, erreicht jedoch nur geringe Transportraten (ca. 200fach geringer als die der SERCA und 30fach geringer als die des NCX (BERS, 2001)). Ihre Bedeutung ist eher in der langzeitigen Regulation zu suchen. Die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase ist ebenfalls eine P-Typ-ATPase und funktioniert ähnlich wie die SERCA. Das gereinigte Protein hat ein Molekulargewicht von 138 kDa und ist strukturell der SERCA sehr ähnlich (NIGGLI et al., 1981; VERMA et al., 1988). Wie die SERCA besitzt die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase zehn Transmembrandomänen (TM1-10), die nur ca. 20% des Proteinvolumens ausmachen und zytoplasmatische Domänen, die ca. 80% des Proteins einnehmen. Es wird vermutet, dass die Transmembrandomänen TM4-6 in die Ca^{2+} -Translokation involviert sind. Der TM2-3 Loop funktioniert analog der „Scharnier“-Domäne der SERCA. Die ATP-Binderegion ist im TM4-5 Loop lokalisiert. Ferner befinden sich in einer Region aus 30 Aminosäuren am Carboxyl-Terminalende die Calmodulin-Bindedomäne sowie eine Regulationsseite, die von PKA bzw. PKC phosphoryliert wird (JAMES et al., 1988 und 1989; WANG et al., 1991).

1.4 Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein Versagen der physiologischen Pumpfunktion und geht zumeist mit einer Ventrikeldilatation einher. In den westlichen Industrieländern ist die Herzinsuffizienz statistisch gesehen die häufigste Todesursache. Es gibt drei wichtige Gruppen von Ursachen:

- Myokardiale Zellschädigung bedingt durch ischämische oder entzündliche Prozesse. Infolge dessen kommt es zu einer reduzierten Inotropie und im weiteren zur Dilatation.
- Lang anhaltende Druckbelastung entstanden durch pulmonale oder systemische Widerstandserhöhung (z.B. arterielle Hypertonie), zumeist aufgrund chronischer Gefäßerkrankungen. Als Folge hypertrophiert das Myokard, was bei längerer Dauer ebenfalls zur Dilatation führt.
- Chronische Volumenbelastung, aufgrund einer Insuffizienz der Herzklappen. Dadurch entstehen pendelnde Blutvolumina, die die Volumenbelastung des Ventrikels verursachen.

Unabhängig von der konkreten Ursache ähneln sich die terminalen Stadien der Herzinsuffizienz (SCHMIDT & UNSICKER, 2003). Klinisch wird die Herzinsuffizienz in vier Stadien nach der New York Heart Association in NYHA I bis IV eingeteilt. Das Stadium NYAH IV ist die dekompensierte Herzinsuffizienz. Es kann zwischen ischämischer (ICM) und dilatativer (DCM) Kardiomyopathie (Herzmuskelerkrankung) unterschieden werden. Die ICM ist mit 70% die häufigste Kardiomyopathie-Isoform (GOODWIN & OAKLEY, 1972) und der Endzustand einer ischämischen Schädigung als Folge einer koronaren Herzerkrankung. Ursachen für die DCM können Virusinfekte (BOWWELS et al., 1989), Autoimmunprozesse (MAISCH et al., 1983) oder auch alkoholtoxische Einflüsse (BRAUNWALD et al., 1989) sein.

Beim Vergleich von insuffizienten und nicht insuffizienten Myokard konnten interessante Unterschiede gezeigt werden:

- SCHULTHEISS et al. (1995) wiesen nach, dass es aufgrund einer verminderten mitochondrialen ADP/ATP-Transportrate zu einer Störung der Energiebereitstellung innerhalb der Myozyte kommt.
- Von HIRZEL et al. (1985) wurde eine 20%-ige Zunahme des Bindegewebsanteils im insuffizienten Myokard bei DCM festgestellt. Dies ist eine mögliche Erklärung für die diastolische Relaxationsstörung.
- Auf der Ebene der kontraktilen Proteine wurden ebenfalls Veränderungen gefunden. So ist im insuffizienten Myokard beispielsweise eine verminderte myofibrillare ATPase-Aktivität zu beobachten (ALPERT & GORDON, 1962) oder eine Veränderung im Querbrückenzyklus durch eine Verlängerung der Querbrückenanheftung pro Zeiteinheit (HASENFUSS et al., 1992).
- Ebenso kommt es zu einer mit der Schwere der Herzinsuffizienz korrelierenden Abnahme der β -Adrenorezeptoren (BRODDE, 1996). Ferner wurde eine Zunahme der inhibitorischen G-Proteine beobachtet. Beides führt zu einer Abnahme der Adenylatzyklase-Aktivität, woraus wiederum eine verminderte cAMP-Konzentration folgt. Dieses resultiert in abgeschwächter Kontraktilität.
- Des Weiteren kommt es zu Veränderungen in der elektromechanischen Kopplung. HASENFUSS et al. (1994a) und MEYER et al. (1995) konnten nachweisen, dass die SERCA auf Proteinebene im insuffizienten Myokard

vermindert exprimiert wird. Daraus folgt eine verminderte SR Ca^{2+} -Aufnahme und im Weiteren eine verminderte SR Ca^{2+} -Ausschüttung, die zur geringeren Kontraktilität führt. Weiterhin konnten STUDER et al. (1994) zeigen, dass der NCX als Ausgleich zu einer verminderten SERCA-Aktivität verstärkt exprimiert wird. Dieses wiederum führt zu einer gesteigerten transsarkolemmalen Elimination des Ca^{2+} und infolge dessen zu einem reduzierten SR Ca^{2+} -Gehalt. Außerdem wurde ein verlängertes AP nachgewiesen, woraus eine Begünstigung des „reverse mode“ des NCX und gleichzeitig eine Hemmung des „forward mode“ und der SERCA-Aktivität folgt, so dass die Zellen langsamer relaxieren (BIRKENLAND et al., 2005). MAIER et al. (2003) konnten an einem gentechnisch veränderten Mausmodell der $\text{CaMKII}\delta_C$, das eine Herzinsuffizienz entwickelt, einen gesteigerten Ca^{2+} -Verlust aus dem SR über den RyR durch vermehrte Ca^{2+} -Sparks nachweisen.

1.5 Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige ProteinkinaseII (CaMKII) und ihre Einflüsse auf die elektromechanische Kopplung

Die Familie der CaMK besteht aus der CaMK I, II und IV. Bei der CaMKII sind vier Gene, α , β , γ und δ bekannt, die in unterschiedlichen Gewebetypen exprimiert werden. Die $\text{CaMKII}\delta$ ist die vorherrschende Variante im Herzen. Von der $\text{CaMKII}\delta$ existieren zwei Splice-Varianten δ_B und δ_C . Die δ_B ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, δ_C dagegen im Zytoplasma der Zelle. $\text{CaMKII}\delta_B$ unterscheidet sich von δ_C durch eine elf Aminosäuren lange Kernlokalisationssequenz (ZHANG et al., 2002; ZHANG & BROWN, 2004). Die CaMKII enthält eine katalytische Domäne, eine zentrale Regulationsdomäne und eine Verbindungsdomäne (s. Abb. 1.8A). In der zentralen Regulationsdomäne überlappen sich die Autoinhibitionsregion und die Ca^{2+} /Calmodulin-Binderegion. Die Verbindungsdomäne ist verantwortlich für die Oligomerisation der CaMKII. Die CaMKII ist ein Holoenzym bestehend aus einem Homo- oder Heteromultimer von sechs bis zwölf Untereinheiten, die in einer ringförmigen Struktur angeordnet sind (s. Abb. 1.8B). Die CaMKI und IV sind dagegen nur Monomere.

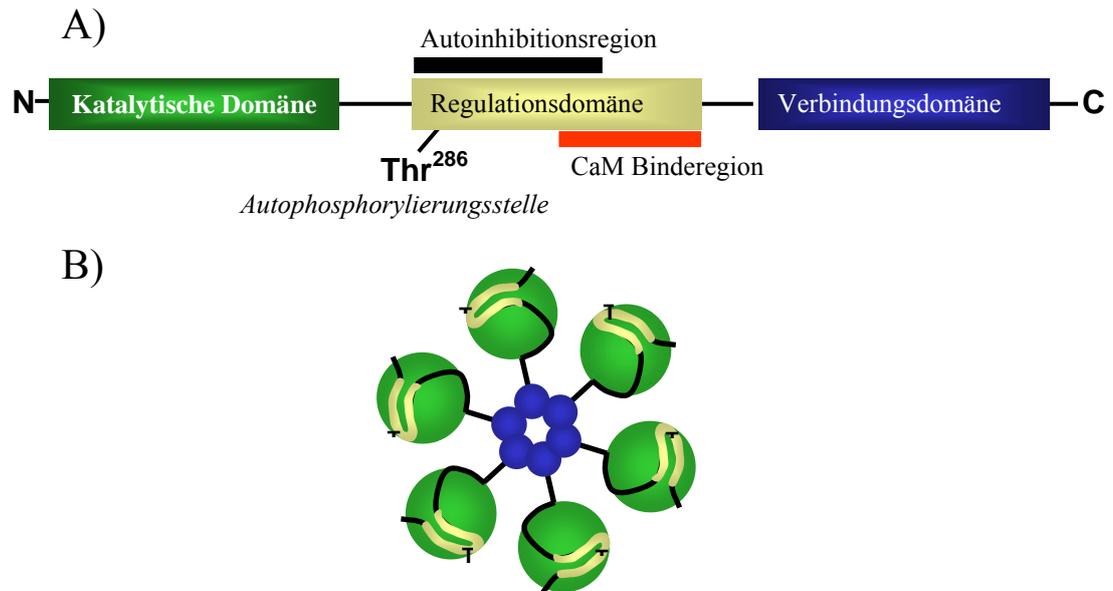


Abbildung 1.8: Aufbau und Struktur der CaMKII

A) Aufbau der CaMKII B) Strukturmodell der CaMKII (Modifiziert nach MAIER & BERS, 2002)

Die Aktivierung der CaMKII erfolgt durch Binden von Ca^{2+} /Calmodulin an die Regulationsdomäne, dadurch wird die Autoinhibitionsdomäne verdeckt. Ferner folgt eine Konformationsänderung, so dass die aktive Seite der katalytischen Domäne zum Zielsubstrat Zugang hat. Bei steigenden zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen erfolgt die Aktivierung der CaMKII durch Ca^{2+} /Calmodulin mit halbmaximaler Geschwindigkeit. Durch Autophosphorylierung an Threonin (Thr) 286 wird eine autonome Aktivität der CaMKII erreicht. Die Autophosphorylierung ist nicht essentiell für die Aktivierung der CaMKII, hat jedoch interessante Konsequenzen. So steigt die Affinität des Kinase-Calmodulin-Komplexes und Calmodulin wird in der Autophosphorylierungsregion gebunden (MAIER, 2005). Dieses hat zur Folge, dass eine längere CaMKII-Aktivität möglich ist (von mehreren Sekunden), obwohl die Ca^{2+} -Konzentration bereits wieder auf diastolische Werte zurückgegangen ist. Die Autophosphorylierung deaktiviert die Autoinhibitionsregion, woraus eine autonome Aktivität von etwa 20-80% resultiert. Vollständig deaktiviert werden kann die CaMKII dann ausschließlich durch Dephosphorylierung z.B. durch die Phosphatasen PP1, PP2A oder PP2C.

Als organische Inhibitoren der CaMKII können KN62 und KN93 eingesetzt werden. Sie wirken relativ selektiv, haben jedoch auch CaMKII-unabhängige Effekte. Ferner können Peptid-Inhibitoren verwendet werden, wie „Autocamtide 2-related inhibitory peptide“ (AIP) mit 13 Aminosäuren oder „Autocamtide-2

inhibitory peptide“ (AC3-I). Diese wirken äußerst selektiv und besitzen keine zur Zeit bekannten Nebeneffekte.

Die CaMKII ist eines der wichtigsten Ca^{2+} -abhängigen Proteine, die eine Modulation der elektromechanischen Kopplung ermöglichen. So können der Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}), die Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR und die Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins SR beeinflusst werden (MAIER & BERS, 2002). Dabei werden verschiedene Proteine phosphoryliert, nämlich der L-Typ Ca^{2+} -Kanal, der RyR, PLB und die SERCA2a. Auch als inaktives Protein, Ca^{2+} -frei, kann die CaMKII bereits mit verschiedenen Ionenkanälen und Transportproteinen assoziiert sein (HUDMAN et al., 2002), ebenso wie das inaktive Calmodulin, genannt Apocalmodulin (PETERSON et al., 1999; SCHUHMACHER et al., 2001). Somit sind lokale Regulationsmechanismen möglich, ohne dass andere zytosolische Proteine aktiviert werden. Zusätzlich zu den akuten Effekten beeinflusst die CaMKII auch längerfristig die Gentranskription. Durch ansteigende Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytosol, beispielsweise bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz transloziert Calmodulin in den Zellkern, wo es verstärkt exprimiert wird (MAIER et al., 2002 B). Dies führt möglicherweise zu einer Aktivierung der CaMKII, die dann die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element binding protein) und die Transkription von *c-fos* (Hypertrophiemarker) (HOOK & MEANS, 2001) zur Folge hat. Ferner phosphoryliert die CaMKII Typ II Histone Deacetylasen (HDACs). Diese lösen sich daraufhin vom „myocyte enhancer factor-2“ (MEF2), worauf das Hypertrophieprogramm der kardialen Genexpression aktiviert wird (WU et al., 2006). Die genauen Signaltransduktionswege der CaMKII sind jedoch vielfältig und am Myokard noch nicht vollständig bekannt.

1.6 Die Bedeutung der CaMKII bei Herzinsuffizienz

Untersuchungen an einer transgenen Mauslinie (TG), die im Herzen $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ dreifach überexprimiert, zeigten ein doppelt gesteigertes Herz-/Körpergewichtsverhältnis bei drei Monate alten Mäusen mit einer schweren Herzinsuffizienz (s. Abb. 1.9). Die Herzinsuffizienz zeigt sich als deutliche Kardiomyopathie mit im Echokardiogramm messbarer ventrikulärer Dysfunktion. Ebenso waren die isolierten Herzmuskelzellen aus dem transgenen Herzen doppelt so groß wie die Kontrollzellen (ZHANG et al., 2003).

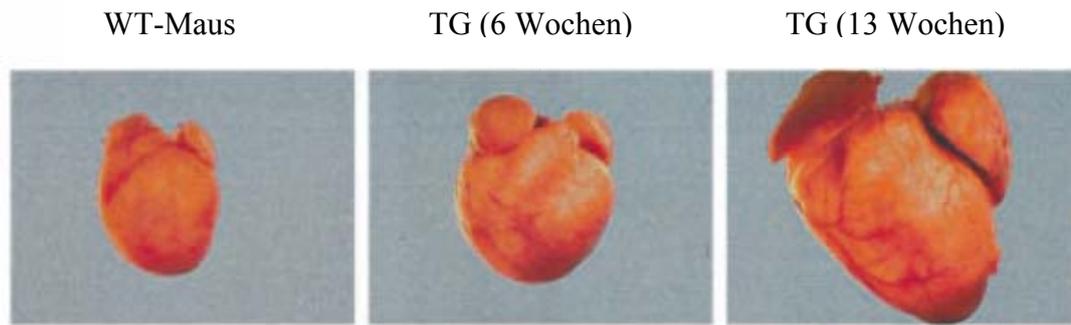


Abbildung 1.9: Vergleich von WT und transgenen Herzen bei CaMKII δ_C -Überexpression

Modifiziert nach ZHANG et al. (2003)

Auch das bei Hypertrophie typische Anschalten des fetalen Genprogramms konnte auf mRNA-Ebene beobachtet werden. Hier zeigten der „atrial natriuretic factor“ (ANF), die „ β -myosin heavy chain“ (β -MHC) und das „ α -skeletale actin“ (α -SA) ein gesteigertes Expressionsmuster. Mittels phosphospezifischen Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass PLB an Threonin-17 (der CaMKII-spezifischen Stelle), jedoch nicht an Serin-16 (der PKA-Stelle) vermehrt phosphoryliert war. Diese CaMKII-spezifischen Effekte konnten auch bei vier bis fünf Wochen alten Mäusen, die noch keine Dilatation des Ventrikels zeigten, reproduziert werden (ZHANG et al., 2003). Auf zellulärer Ebene konnten eine um 50% signifikant verminderte Kontraktilität und Ca^{2+} -Transienten gemessen werden. Mittels Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten konnten sowohl ein signifikant geringerer SR Ca^{2+} -Gehalt als auch eine signifikant verstärkte NCX-Aktivität nachgewiesen werden. Mittels Western Blot konnte die verstärkte Expression des NCX bestätigt werden. Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik zeigten einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom, der durch CaMKII-Inhibition unter Wirkung von KN93 auf WT-Niveau rückführbar war. Dieses stellt daher einen direkten Effekt der CaMKII dar. Ebenso konnte ein verlängertes Aktionspotential gemessen werden. Trotz des oben erwähnten verringerten SR Ca^{2+} -Gehaltes wurde bei den transgenen Mäusen eine signifikant erhöhte Ca^{2+} -Spark-Frequenz gemessen. Diese war auf eine verstärkte Phosphorylierung des RyR zurückzuführen. Die verstärkte Phosphorylierung führte zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR. Mittels Co-Immunopräzipitation konnte erstmals eine direkte Assoziation der CaMKII und des RyR nachgewiesen werden (MAIER et al., 2003).

Inwieweit diese Befunde direkt auf die CaMKII-Überexpression zurückzuführen sind oder sekundär aufgrund des Herzinsuffizienz-Phänotyps auftreten, ist unklar. Die Klärung dieser wichtigen Frage ist ein Teil der vorliegenden Arbeit.

Für die transgene Mauslinie, die CaMKII δ_B im Herzen zehnfach überexprimiert, liegen derzeit nur wenige physiologische Untersuchungen vor. Es konnte lediglich nachgewiesen werden, dass es auch hier zu einem gesteigerten Herz-/Körpergewichtsverhältnis bei vier Monaten alten transgenen Mäusen kommt (s. Abb. 1.10). Messungen des mRNA-Expressionsmusters zeigten eine Vermehrung bei ANF, β -MHC und α -SA und eine Verringerung bei α -MHC, SERCA und PLB. Auf Protein-Ebene konnten allerdings keine Unterschiede bei SERCA- und PLB-Expression festgestellt werden.

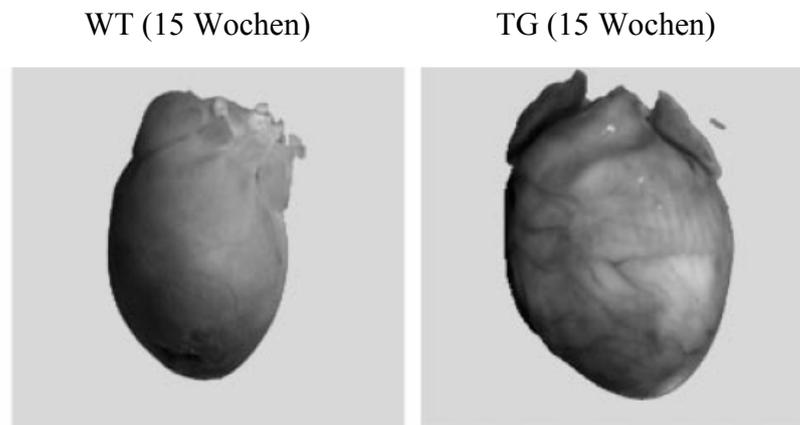


Abbildung 1.10: Vergleich von WT und transgenen Herzen bei CaMKII δ_B -Überexpression

Modifiziert nach ZHANG et al., 2002

Hämodynamische Messungen *in vivo* bei dieser Maus ergaben eine nur leichtgradig verringerte Kontraktion und eine verlangsamte Relaxation. Mittels phosphospezifischer Antikörper konnte überraschenderweise eine verringerte Phosphorylierung von PLB sowohl an Threonin 17 als auch an Serin 16 festgestellt werden. Dafür wurde die vermehrte Aktivität der PP2A in der partikulären Fraktion verantwortlich gemacht (ZHANG et al., 2002). Genauere physiologische Untersuchungen dieser transgenen Maus auf Zellebene sind weitere Bestandteile der vorliegenden Arbeit.

1.7 Zielsetzungen und Fragestellungen

Zur Unterscheidung, ob die CaMKII-Überexpression direkt für die funktionellen Veränderungen auf Zellebene verantwortlich ist, oder diese sekundär durch den Herzinsuffizienz-Phänotyp bedingt sind, wurde die folgende Hypothese untersucht.

- 1) Sind die Veränderungen des Ca^{2+} -Stoffwechsels, die bei chronischer Überexpression von CaMKII δ_C in transgenen Mäusen beobachtet wurden, auch bei akuter Überexpression durch adenoviralen Gentransfer in Kaninchenmyozyten zu beobachten?

Des Weiteren wurden erstmals Untersuchungen über die funktionellen Auswirkungen der nukleären CaMKII-Überexpression durchgeführt, mit folgender Hypothese.

- 2) Welche Veränderungen im Ca^{2+} -Stoffwechsel sind bei der Überexpression von CaMKII δ_B (nukleäre Isoform) im Vergleich zur Überexpression von CaMKII δ_C in den Modellen zu beobachten:
 - Bei chronischer Überexpression in transgenen Mäusen.
 - Bei akuter Überexpression (durch adenoviralen Gentransfer) in Kaninchenmyozyten.

2. Material und Methoden

2.1 Grundlagen und Erforschungsgeschichte

2.1.1 Adenoviren

Adenoviren dienten im Rahmen dieser Arbeit zum Gentransfer in kultivierten Kaninchenmyozyten über 24 Stunden.

Die Bezeichnung Virus (lat. Gift) bedeutete ursprünglich „unbekanntes krankheitserregendes Agens“. 1892 entdeckte Iwanovskij eine Erregergruppe, die es vermochte, Bakterienfilter zu passieren. Seitdem werden diese Erreger als Viren bezeichnet. Sie besitzen nur einen Typ von Nukleinsäure nämlich DNA oder RNA. Viren sind nicht fähig, sich außerhalb lebendiger Zellen zu vermehren. D.h., sie sind keine selbständigen Organismen sondern auf Wirtszellen angewiesen. Ihre Vermehrung hat den Tod der Wirtszelle zur Folge (SCHLEGEL, 1992). Bis heute sind mehr als 40 verschiedene Serotypen und 93 verschiedene Variationen von Adenoviren bekannt. Die humanen Adenoviren werden in sechs Untergruppen unterteilt, nämlich nach ihrem oncogenen Potential in Nagetieren, den Übereinstimmungen der DNA, der Fähigkeit zur Transformation von Rattenzellen, dem Muster der Hämagglutination und anderen Eigenschaften. Die in der Forschung am häufigsten verwendeten Serotypen sind 2 und 5 der Untergruppe C. Das humane Adenovirus besteht aus einem nicht eingehüllten Kapsid in der Form eines Ikosaeder. Das Kapsid besteht aus 240 Hexonen und 12 Pentonbasen sowie 12 Faserproteinen und Knaufdomänen. Es umschließt die DNA und hat einen Durchmesser von 80-90 nm ohne und ca. 140 nm mit Faserproteinen und Knauf-Domänen (s. Abb. 2.1). Die DNA des Adenovirus ist ein linearer, nicht segmentierter Doppelstrang, dessen Größe zwischen 30 und 40 Kilobasen (kb) variiert.

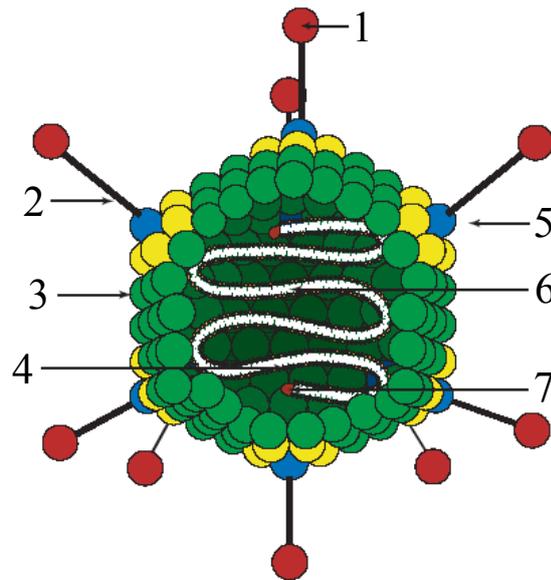


Abbildung 2.1: Morphologie des Adenovirus

1. Knaufdomäne; 2. Faserproteine; 3. Hexon-Proteine; 4. Kernproteine; 5. Penton-Proteine; 6. Linearer Doppelstrang DNA; 7. Endständiges Protein (modifiziert aus dem Adenovirator™ Handbuch (Version 1.1) von Qbiogen).

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Adenoviren wurde die E1-Region des Genoms eliminiert. Die E1-Region ist von essentieller Bedeutung für die Vermehrung des Virus in Wirtszellen, so dass in normalen Wirtszellen keine Vermehrung mehr möglich ist. Einzig in der „human embryonic kidney cell line 293“ (HEK293), welche die E1-Region in ihrem Genom trägt, können diese Adenoviren vermehrt werden (GRAHAM et al., 1977) (s. Abb. 2.3). Diese Zelllinie wird als komplementierend bezeichnet. Es gibt allerdings zwei Ausnahmen von dieser Regel. Der Verlust der E1-Region kann durch eine zu hohe „Multiplicity of Infection“ (MOI in „Plac forming unit“ (pfu)/Zelle) und durch E1-analoge Aktivität in der infizierten Zelle kompensiert werden (IMPERIALE et al., 1984; SPERGEL et al., 1992).

Durch die Interaktion der Knaufdomänen auf dem Kapsid des Adenovirus mit einem spezifischen Rezeptor auf der Membran der Wirtszelle, dem sog. Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR), kommt es zur Rezeptor-vermittelten Endozytose (s. Abb. 2.2). In der Zelle erfolgt die Lyse der endosomalen Membran (des Clathrin-ummantelten Vesikels), vermittelt durch die Pentonproteine, noch bevor diese mit dem Sortierungsendosom verschmilzt (s. Abb. 2.3). Dadurch gelangt das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle und „wandert“ zum Kern, wo es das virale Genom entlässt und es zur Expression der viralen Gene kommt.

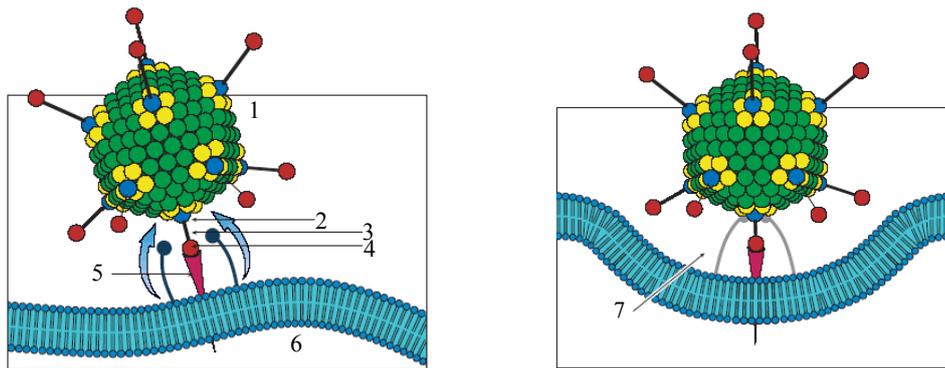


Abbildung 2.2: Rezeptor-vermittelte Endozytose

Das Adenovirus (1) bindet mit der Knaufdomäne (4) an den Cocksackievirus-Adenovirus-Rezeptor (5), der sich in der Membran der Zelle (6) befindet. Nun kommt es zu einer Interaktion der Pentonprotein (2) mit den Integrinen (7), schließlich erfolgt die Internalisation des Virus. (3) Faserprotein (modifiziert aus dem AdenoviratorTM Handbuch (Version 1.1) von Qbiogen).

Ein Adenovirus kann ein oder mehrere Zielproteine gleichzeitig zur robusten Expression in der Wirtszelle bringen und hat eine maximale Kapazität von 7,5 kb. Die Adenoviren ermöglichten als potente Vektoren für den DNA-Transfer neue Forschungsgebiete und potenzielle Therapieansätze in der Medizin.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Viren wurden uns von Dr. Tong Zhang und Dr. Joan Heller Brown (UCSD, USA) zur Verfügung gestellt und wurden mit dem AdenoVatorTM Vector System der Firma Qbiogen hergestellt.

Die Konstruktion eines rekombinanten Adenovirus verläuft typischerweise in drei Schritten. Im ersten Schritt wird die gewünschte Expressionskassette, bestehend aus dem zu exprimierenden Gen sowie einem Promotor und einer Kontrollregion, in einen Transfervektor integriert. Dieser wird im zweiten Schritt mittels homologer Rekombination in das adenovirale Genom, dem die Gene E1 und E3 fehlen, eingebaut. Im Weiteren wird dieses adenovirale Genom in HEK293A Zellen, welche die adenoviralen Gene E1 exprimieren, transferiert. In diesen Zellen erfolgt der dritte Schritt, die Produktion und Vermehrung des vollständigen rekombinanten Adenovirus (s. Abb.2.3).

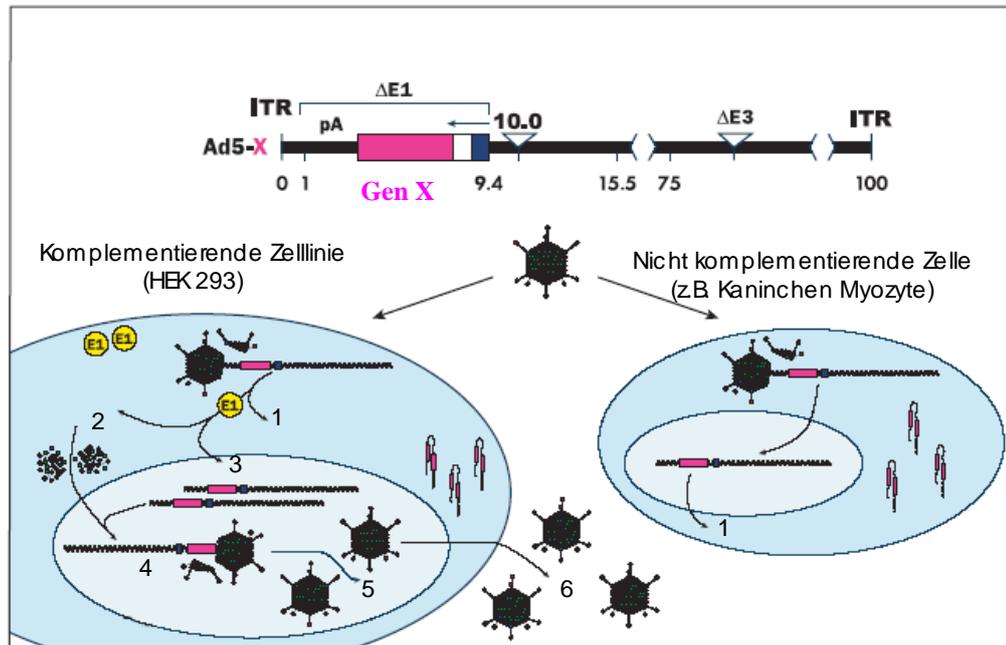


Abbildung 2.3 : Prinzip der Vermehrung von Adenoviren und des adenoviralen Gentransfer

In der Abbildung ist das Genom eines Adenovirus mit den deletierten Genen E1 und E3 sowie die Position des zu transfizierenden Gens X dargestellt. Außerdem ist die Vermehrung des Virus zu erkennen. In den komplementierenden Zellen erfolgt die transgene Expression (1) des Gens X und gleichzeitig die Vermehrung. Hier kommt es zur adenoviralen Proteinexpression (2) und zur Vervielfältigung des adenoviralen Genoms (3). Anschließend werden die Adenoviren (5) zusammengesetzt (4) und durch Lyse der Zelle freigesetzt (6). Bei einer nicht komplementierenden Zelle erfolgt einzig die transgene Expression des Gens X (1). Modifiziert aus dem AdenoviratorTM Handbuch (Version 1.1) von Qbiogen.

2.1.2 Epifluoreszenz-Mikroskop

Das Mikroskop stellt eine Weiterentwicklung der Lupe dar. Der Erfinder kann nicht genau benannt werden. Nach eigener Erklärung entwickelten Zacharias Janssen und sein Vater Hans um 1590 die erste als Mikroskop zu bezeichnende Konstruktion. Allerdings wird auch Galileo Galilei als Erfinder des Mikroskops angesehen, da er 1609 ein Mikroskop bestehend aus einer konvexen und einer konkaven Linse konstruierte. Als einer der ersten bedeutenden Anwender ist Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) zu erwähnen, der mit einem einfachen Ein-Linsen-Mikroskop bereits die ersten einzelligen Bakterien und Protozoen, sog. Animalkulen, entdeckte. Er erschloss das Mikroskop für die Biologie. Das Mikroskop unterlag seitdem einer ständigen Weiterentwicklung durch technische Verbesserungen und ein verbessertes Verständnis der Wellenausbreitung des

Lichts. Die Funktionsweise ist relativ einfach. Das Licht, das vom untersuchten Objekt reflektiert oder durch dieses hindurchgeleitet wird, gelangt über eine Reihe von Linsen und Spiegeln zum Betrachter (Auge oder Kamera), dabei wird das Objekt vergrößert (s. Abb. 2.4). Das Auflösungsvermögen des Mikroskops hängt direkt von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ab. Eine besondere Anwendung ist die Fluoreszenzmikroskopie.

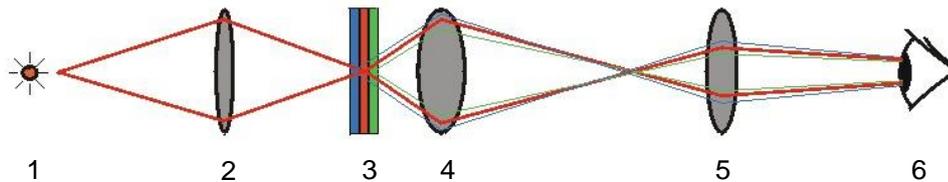


Abbildung 2.4: Prinzip der Mikroskopie

Das von der Lichtquelle (1) ausgesandte Licht wird durch die Kondensatorlinse (2) gebündelt und auf das Objekt (3) projiziert. Die Lichtstrahlen der unterschiedlichen Ebenen des Objekts (blau, rot und grün) werden durch die Objektivlinse (4) und das Okular (5) zum Betrachter (6) geleitet. Dieser sieht sowohl die optisch fokussierte Ebene (rot) als auch die nicht fokussierten (blau und grün). Modifiziert nach MINSKY (1988)

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf Fluoreszenzfarbstoffen (auch als Fluoreszenzindikatoren bezeichnet), die selektiv ein Ion zu binden vermögen. Die Fluoreszenzfarbstoffe bilden mit freien Ionen, z.B. Ca^{2+} , Chelatkomplexe und werden zumeist aus Chelatoren entwickelt, z.B. Fura-2 und Indo-1 aus BAPTA (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) von TSIEN und Mitarbeitern (TSIEN, 1980; TSIEN et al., 1982; GRYNKIEWICZ et al., 1985) (s. Abb. 2.5). Die gebildeten Chelatkomplexe liefern Fluoreszenzsignale, die deutlich über der Eigenfluoreszenz von Zellen liegen. Durch die Bindung des Ions an den Fluoreszenzfarbstoff werden dessen Eigenschaften quantitativ und qualitativ verändert. Zu diesen Eigenschaften zählen die Anregungswellenlängen, die Emissionswellenlängen und die Emissionsintensität.

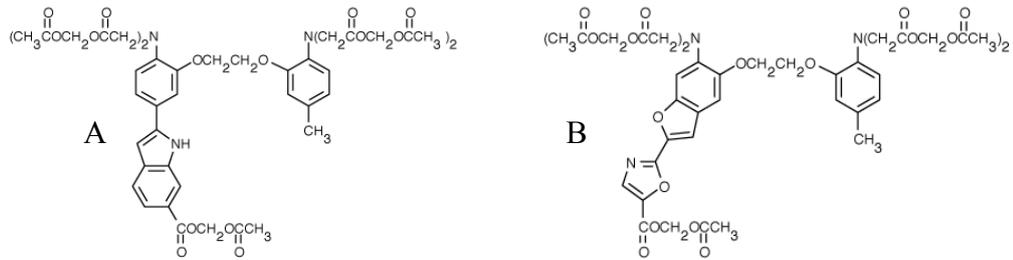


Abbildung 2.5: Strukturformeln von Indo-1,AM (A) und Fura-2,AM (B)

Modifiziert nach „The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies“ 10. Auflage von Molecular Probes.

Diese beiden Fluoreszenzfarbstoffe zeichnen sich ähnlich wie BAPTA durch eine hohe Ca^{2+} -Selektivität gegenüber anderen Kationen aus, ihre Dissoziationskonstanten (K_d) liegen bei 224 nM (Fura-2) und 250 nM (Indo-1) (GRYNKIEWICZ et al., 1985). Diese Fluoreszenzfarbstoffe liefern bereits bei geringen Konzentrationen (10-50 μM) Fluoreszenzsignale, die deutlich über der Eigenfluoreszenz von Zellen liegen. Dadurch sind quantitative intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen im nanomolaren Bereich möglich. Die obere Grenze für messbare Konzentrationsunterschiede liegt bei ca. 10^{-4} M. Bedingt durch die Bindungs- und Dissoziationskinetiken der Fluoreszenzfarbstoffe beträgt die maximale zeitliche Auflösung einer Ca^{2+} -Messung ca. fünf ms (KAO & TSIEN, 1988; JACKSON et al., 1987; COBBOLD & RINK, 1987).

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden in zwei Gruppen eingeteilt, die ratiometrischen und die nicht ratiometrischen Farbstoffe. Bei den ratiometrischen Farbstoffen kommt es unter Ca^{2+} -Bindung zu einer Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima im kurzwelligen Bereich, die auch als „Spektralshift“ bezeichnet wird. Bei Fura-2 verschiebt sich das Absorptionsmaximum mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration (s. Abb. 2.7B). Bei Indo-1 hingegen verschiebt sich durch die Bindung des Ca^{2+} bei unverändertem Absorptionsmaximum das Emissionsmaximum von 480 nm nach 405 nm. Die Fluoreszenzintensität des emittierten Lichtes im Anregungslicht von 355 nm nimmt daher mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration bei 405 nm zu und bei 480 nm ab (s. Abb. 2.6A). In den Schnittpunkten der Kurvenscharen ist die Fluoreszenz der Farbstoffe unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration (isosbestische Punkte).

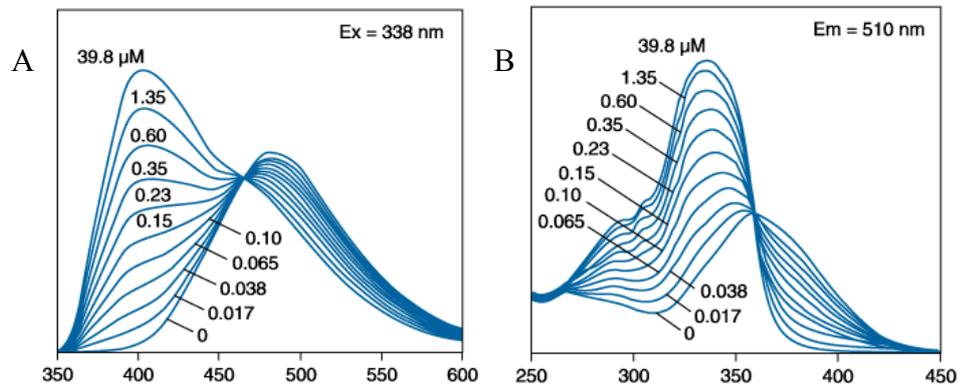


Abbildung 2.6: Fluoreszenzspektrum von Indo-1 (A) und Fura-2 (B) in Lösung

Auf der X-Achse der Diagramme ist jeweils die Wellenlänge in nm aufgetragen. Die Zahlen in den Diagrammen geben die jeweilige freie Ca^{2+} -Konzentration an. Bei Indo-1 (A) ist das Emissionsspektrum dargestellt, die Y-Achse zeigt die Intensität der Emission, die Anregung erfolgt bei 338 nm. Bei Fura-2 ist das Immissionsspektrum dargestellt, die Y-Achse zeigt die Intensität der Immission, die Emission erfolgt bei 510 nm. Modifiziert nach „The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies“ 10. Auflage von Molecular Probes.

Die Anwendung ratiometrischer Farbstoffe bietet den Vorteil, dass quantitative Aussagen über die Ionen-Konzentration ermöglicht werden, da die Emissionsintensitäten, die unterschiedlichen Emissionsmaxima (bei Indo-1) oder die unterschiedlichen Absorptionsmaxima (Fura-2), in einem festen Verhältnis (Ratio) stehen. Der Zusammenhang zwischen den ermittelten Ratiowerten und der Ca^{2+} -Konzentration wurde in folgender Formel erstmals beschrieben (GRYNKIEWICZ et al., 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times ((R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)) \times (S_{f2} / S_{b2})$$

- R berechneter Ratiowert der aufgenommenen Fluoreszenzintensität (z.B. bei $\lambda_{\text{EX}} = 405\text{nm}/480\text{ nm}$)
- R_{\min} Ratiowert der Fluoreszenzintensität im „ Ca^{2+} -freien“ Eichpräparat ($[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-9}\text{ M}$)
- R_{\max} Ratiowert der Fluoreszenzintensität im „ Ca^{2+} -gesättigten“ Eichpräparat ($[\text{Ca}^{2+}] \geq 10^{-4}\text{ M}$)
- K_d Dissoziationskonstante
- S_{f2} Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (480 nm) im „ Ca^{2+} -freien“ Eichpräparat
- S_{b2} Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (480 nm) im „ Ca^{2+} -gesättigten“ Eichpräparat

Der Quotient S_{f2}/S_{b2} stellt einen Korrekturfaktor dar, der die Einflüsse von Geräteparametern und Versuchsbedingungen auf die Arbeitsweise des Fluoreszenzfarbstoffes berücksichtigt (GOLLNICK, 1992). Daraus ergibt sich ein weiterer Vorteil, der darin besteht, dass die gemessenen Werte relativ unabhängig von der Konzentration des Farbstoffes, dem Farbstoffverlust, dem Ausbleichen des Farbstoffes, der Dicke des untersuchten Objektes und eventueller Schwankungen in der Intensität der Anregungswellenlänge sind. Da sich diese Störfaktoren gleichermaßen auf die Fluoreszenzintensität beider Wellenlängen auswirken, kürzen sich die potentiellen Fehler bei der Division der Helligkeitswerte heraus.

Bei den nicht ratiometrischen Farbstoffen ändert sich die Intensität der Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von der Bindung an das jeweilige Ion. Bei ihnen sind sowohl Absorptionsmaximum als auch Emissionsmaximum unabhängig von der Ca^{2+} -Bindung. Als Beispiel für nicht ratiometrische Farbstoffe sind Fluo-3 und Fluo-4 zu nennen (s. Abb. 2.7A). Ihr Vorteil besteht in einem günstigeren Verhältnis vom Signal zum Hintergrundrauschen. Fluo-3 wurde ebenfalls von Tsien und Mitarbeitern entwickelt, vor allen für die Verwendung im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop mit einer Anregungswellenlänge im sichtbaren Bereich des Lichts (Absorptionsmaxima 488 nm und Emissionsmaxima ca. 525 nm). Seine Dissoziationskonstante (K_d) liegt bei ca. 390 nM und ohne Ca^{2+} -Bindung entsteht keine messbare Fluoreszenz, aber es zeigt sich eine ca. 100fache Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzsteigerung (s. Abb. 2.7B).

Jeder dieser Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht den Einblick in den Ionen-Haushalt einer Zelle, ohne deren Integrität selbst zu verletzen. Um die Beladung der Zellen mit den membranimpermeablen, geladenen Farbstoffen zu ermöglichen, werden diese verestert. Die Ester gelangen durch Diffusion über die Zellmembran in die Zelle, dort erfolgt die Freisetzung des Farbstoffes durch zytosolische Esterasen mittels Abspaltung der Azetat- oder Azetoxy-Methylresten. Der so freigesetzte Farbstoff ist aufgrund seiner Ladungen in der Lage, die Ionen zu binden, ohne die Zelle durch die Membran verlassen zu können. Die meisten Farbstoffe sind als Azetoxymethylester (AM) erhältlich. Die Fluoreszenzfarbstoffe können auch als Salze oder in dextran-gebundener Form verwendet werden, hier wird jedoch die Beladung der Zellen erschwert, weil diese nicht membranpermeabel sind. Auf diese Anwendungsform wurde daher im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

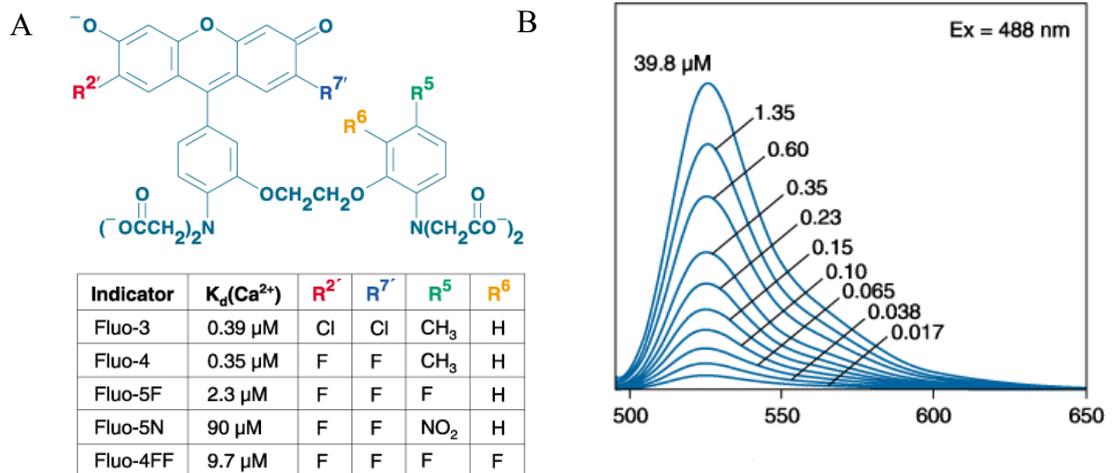


Abbildung 2.7: Strukturformel von Fluo-Analogs (A) und Emissionsspektrum (B) von Fluo-3 in Lösung

Auf der X-Achse des Diagrammes (B) ist die Emissionswellenlänge in nm aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Intensität der Emission, die Anregung erfolgt bei 488 nm. Die Zahlen in den Diagramm geben die freie Ca^{2+} -Konzentration an. Modifiziert nach der „The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies“ 10. Auflage von Molecular Probes.

2.1.3 Das konfokale Mikroskop

Bei der konfokalen Mikroskopie wird das Licht, welches nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. Dieses wird durch einen komplizierten Aufbau von Linsen und Lochblenden erreicht (s. Abb. 2.8). Im Unterschied zum konventionellen Mikroskop erzeugt das konfokale Mikroskop zunächst nur einen Bildpunkt, der allerdings genau einen Punkt aus der Brennebene des Objektivs darstellt. Das Bild entsteht erst, indem das Objekt Punkt für Punkt gerastert wird und die Punkte im Computer zu einem Bild zusammengefügt werden. Dieses kann einerseits erreicht werden, in dem das Objekt oder der Lichtstrahl bewegt wird. Der Lichtstrahl wird mittels einer Nipkow-Scheibe oder verstellbaren Spiegeln über das Objekt bewegt (MINSKY, 1988). Bei den meisten modernen Konfokalmikroskopen wird nicht das Objekt bewegt, sondern ein Laserstrahl wird Punkt für Punkt über das Objekt geführt, dabei handelt es sich um die sogenannte Laserscanning-Konfokalmikroskopie.

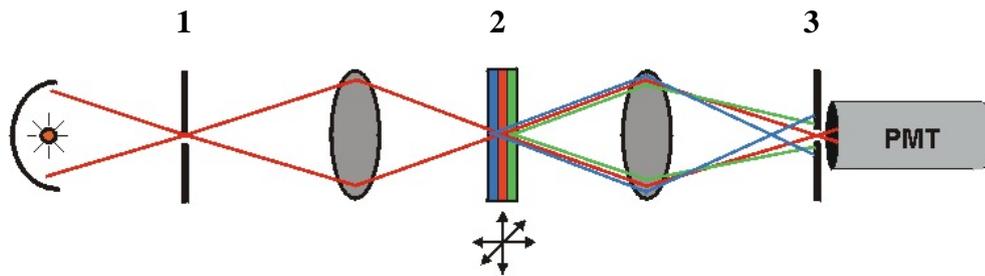


Abbildung 2.8: Prinzip der konfokalen Mikroskopie

Die Kondensorlinse wird durch eine Linse ersetzt, die der Objektivlinse identisch ist. Die Ausleuchtung des Objekts wird durch eine Lochblende (1) beschränkt, die auf dem Objekt (2) scharf abgebildet wird. Eine zweite Lochblende (3) beschränkt das Sichtfeld auf einen Punkt. Durch den symmetrischen Aufbau dieses Systems sind beide Blenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal. Der Durchmesser der Blenden wird so klein gewählt, dass Licht aus Bereichen des Objekts, die nicht in der Brennebene liegen, nicht in die Apertur der Blende (3) fallen und damit ausgeblendet werden (hier: grüne und blaue Strahlen). In den Photomultiplier (PMT) gelangt deshalb nur Licht aus der Brennebene des Objekts. Modifiziert nach MINSKY (1988).

Laserlicht eignet sich für diese Anwendung besonders gut, weil ein Laserstrahl monochromatisches Licht mit hoher Intensität auf einen kleinen Punkt fokussieren kann. Zur Bilderzeugung steuert ein Computer über Stellmotoren die Spiegel, die das Laserlicht in X- und Y-Achse ablenken (s. Abb. 2.11). Das Fluoreszenzlicht wird über dieselben Spiegel zurück zum Detektor geleitet. Über einen dritten Stellmotor kann der Computer das Objekt in der Z-Achse verschieben. So kann der Computer durch Erstellen und Überlagerung von konfokalen Bildern, sogenannten optischen Schnitten, in den einzelnen Z-Ebenen ein dreidimensionales Bild des Objektes rekonstruieren.

Zur Durchführung von laserkonfokalen Messungen werden folgende Geräte benötigt: Laser, Scan-Modul, Photomultiplikatoren, Steuermodul, Computer und das Mikroskop. Über den Laser erfolgt die punktgenaue Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes. Das Scan-Modul beinhaltet die Spiegel, inklusive der Steuerungsmotoren für die X- und Y-Achse, mit denen der Laserstrahl über das Objekt bewegt wird und das Fluoreszenzlicht zurück zum Detektor (Photomultiplikator) geleitet wird. Die Photomultiplikatoren nehmen die Fluoreszenzsignale auf, wandeln sie verstärkt in elektrische Spannung um und leiten sie weiter. Das Steuermodul ist der Mittler zwischen Fluoreszenz-Setup und dem Computer, es enthält den AD/DA-Wandler. Der AD/DA-Wandler wandelt analoge Signale, z.B. elektrische Spannung, in digitale Signale um und umgekehrt.

Der Computer steuert das gesamte Setup und dient gleichzeitig zur Aufnahme, Verarbeitung, Speicherung und Analyse der Daten. Das Mikroskop dient zur Visualisierung der zu untersuchenden Objekte und als Grundlage für das Setup.

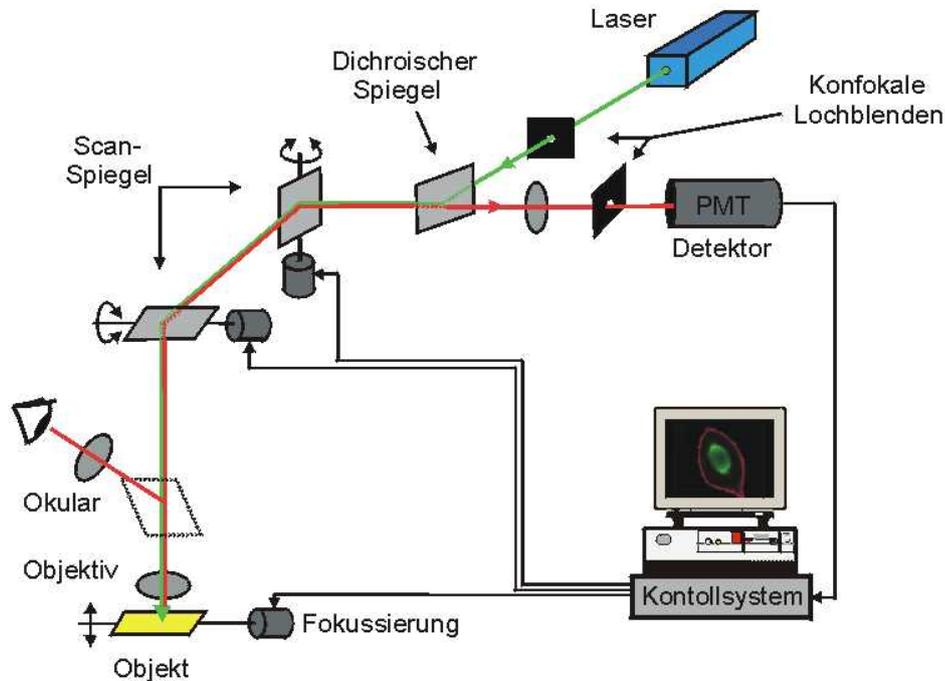


Abbildung 2.9: Schematisches Prinzip eines Laserkonfokalmikroskops

Um ein Bild zu erzeugen, wird das Objekt Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgerastert. Zwei **Scan-Spiegel** sind dazu nötig: für die Punkte innerhalb einer Zeile (X-Richtung) und für die Zeilen des Bildes (Y-Richtung). Das Fluoreszenzlicht (**rot**) wird über dieselben Spiegel zum Detektor geleitet. Ein Rechner steuert über zwei Stellmotoren die Position der beiden Scan-Spiegel und rekonstruiert aus der gemessenen Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Punktes ein Bild des Objekts. Über einen dritten Stellmotor kann das Objekt in der Z-Achse verschoben werden, so können optische Schnitte hergestellt werden. Diese können durch den Computer zu dreidimensionalen Bildern zusammengefügt werden. Nach Pawley, J.B. (1995).

Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 ist ein Analogon von Fluo-3, bei dem zwei Chloratome durch zwei Fluoratome ersetzt wurden (s. Abb. 2.7A). Es besitzt einen K_d -Wert von 345 nM. Das Absorptionsmaximum von Fluo-4 ist im Vergleich zu dem von Fluo-3 um ca. 12 nm ins blaue verschoben und liegt bei ca. 488 nm, so dass bei der Lasermikroskopie stärkere Signale, ungefähr eine Verdoppelung im Vergleich zu Fluo-3, liefert.

2.1.4 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik dient zur Messung der Aktivität von Ionenkanälen in der Zellmembran, die elektrische Reize verursachen. Die Grundlagen der Elektrophysiologie gehen weit zurück bis in das Jahr 1791, als der berühmte Arzt und Naturforscher Luigi Galvani (1727-1798) in seiner Veröffentlichung „*De viribus electricitatis in motu muscularis coentarius*“ um die Existenz „tierischer Elektrizität“ vermutete. Das genaue Prinzip blieb jedoch zunächst unklar. Im Lauf der Zeit gelangen zunächst direkte Messungen von elektrischen Strömen am Muskel. Weitere Versuche ermöglichten die Entwicklung der Ionentheorie, die postulierte, dass die Zellmembran von wasserdurchlässigen ionenleitenden Kanälen durchsetzt ist. Auf dieser Grundlage konnte ein Ruhepotential errechnet werden, das bei einer Reizung der Zelle durch Zunahme der „Ionenpermeabilität“ der Zellmembran abnimmt. Später gelang der Nachweis, dass die elektrischen Signale, z.B. das Aktionspotential, durch Ionenströme verursacht werden, die dem elektrochemischen Gradienten folgen. In weiterführenden Forschungen wurden die Eigenschaften der Kanäle in der Membran, sowie die Größe und der Zeitverlauf des Aktionspotentials genauer beschrieben. Einzelne Kanäle konnten erst mit der von E. Neher und B. Sakmann (1976) entwickelten Patch-Clamp-Technik untersucht werden. Zunächst erwies sich ein starkes elektrisches Hintergrundrauschen als problematisch, das durch ständige Verbesserungen der Technik beseitigt werden konnte. Dazu wurden einzelnen Kanäle mit einer Glaspipette abgeschirmt und der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Außenmedium erhöht. Neher entdeckte 1980, dass der Abdichtwiderstand von 10 bis 50 Mega Ω um drei Größenordnungen auf 100 Giga Ω , der dann als Gigaseal (von engl. seal: Dichtung) bezeichnet wird, erhöht werden konnte, wenn die Pipette unter einem geringen Unterdruck auf die Zelloberfläche aufgebracht wurde. Die Häufigkeit der Erzeugung eines Gigaseals stieg signifikant an, wenn die Pipette unter geringem Überdruck in die Lösung eingetaucht wurde, so konnte eine Verstopfung der Pipette durch Schmutz aus der Badlösung verhindert werden. Nach der Erzeugung eines Gigaseals war das Hintergrundrauschen nahezu vollständig beseitigt, es verblieb lediglich das Rauschen der elektronischen Komponenten. Dieses konnte durch weitere technische Weiterentwicklungen und Verbesserungen zunehmend verringert bzw. eliminiert werden. Durch Erzeugung eines Gigaseals ergeben sich zahlreiche Manipulationsmöglichkeiten, ohne dass

die Verbindung zwischen Membran und Glaspipette gelöst wird. Außer den Einzelkanalmessungen, durch Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran (Cell-attached-Konfiguration), können auch die gesamten Ströme über die Zellmembran gemessen werden, indem das Membranstück durch einen starken Saugimpuls unter der Pipette durchbrochen wird (Whole-Cell-Konfiguration). Ferner wurde die Möglichkeit erkannt, das Membranstück durch Zurückziehen der Pipette aus der Zellmembran zu lösen und auf diese Weise die Kanäle zellfrei zu messen. Dabei können durch verschiedene Manipulationen zwei Konfigurationen erreicht werden, die „Inside-out-Konfiguration“, bei der die zytoplasmatische Seite des Kanals zur Badlösung zeigt und die „Outside-in-Konfiguration“, bei der die extrazelluläre Seite des Kanals zur Badlösung zeigt (s. Abb.2.10).

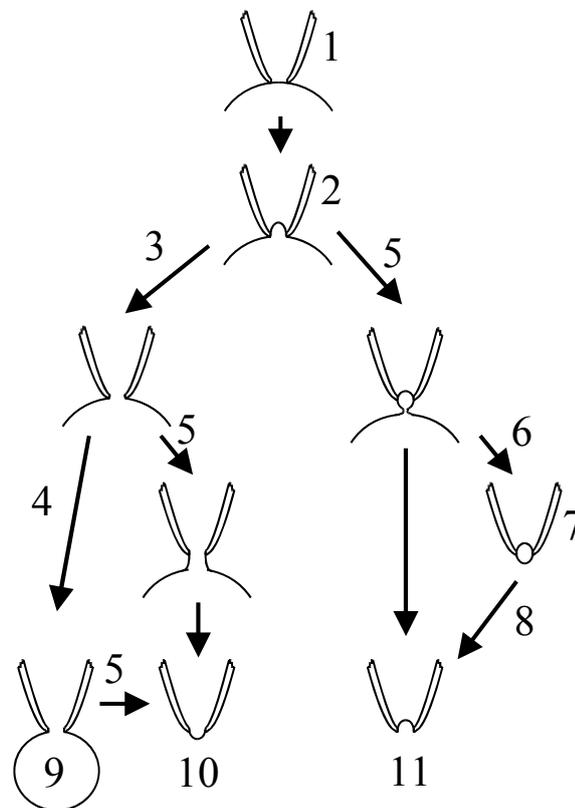


Abbildung 2.10: Die Messkonfigurationen und ihre Herstellung

1. Loose Patch-Clamp 2. **Cell-attached** 3. Membran durchbrechen 4. Messbedingungen optimieren
5. Pipette zurückziehen 6. Membran abziehen 7. Vesikelbildung 8. Luftkontakt 9. **Whole-Cell** 10.
Outside-out 11. **Inside-out** Verändert nach HAMILL et al., 1981

Die Patch-Clamp-Technik hat sich in den zurückliegenden Jahren als vielseitig und universell erwiesen und wird von vielen Wissenschaftler auf der ganzen Welt für die unterschiedlichsten Anwendungen benutzt.

Zur Durchführung von Patch-Clamp-Experimenten werden verschiedene Geräte benötigt: ein schwingungsgedämpfter Tisch, ein Faraday'scher Käfig, ein Mikroskop (invers), ein Verstärker, ein Pipettenhalter, ein Mikromanipulator, ein Computer, Glaspipetten und ein Pipettenpuller (s. Abb. 2.11).

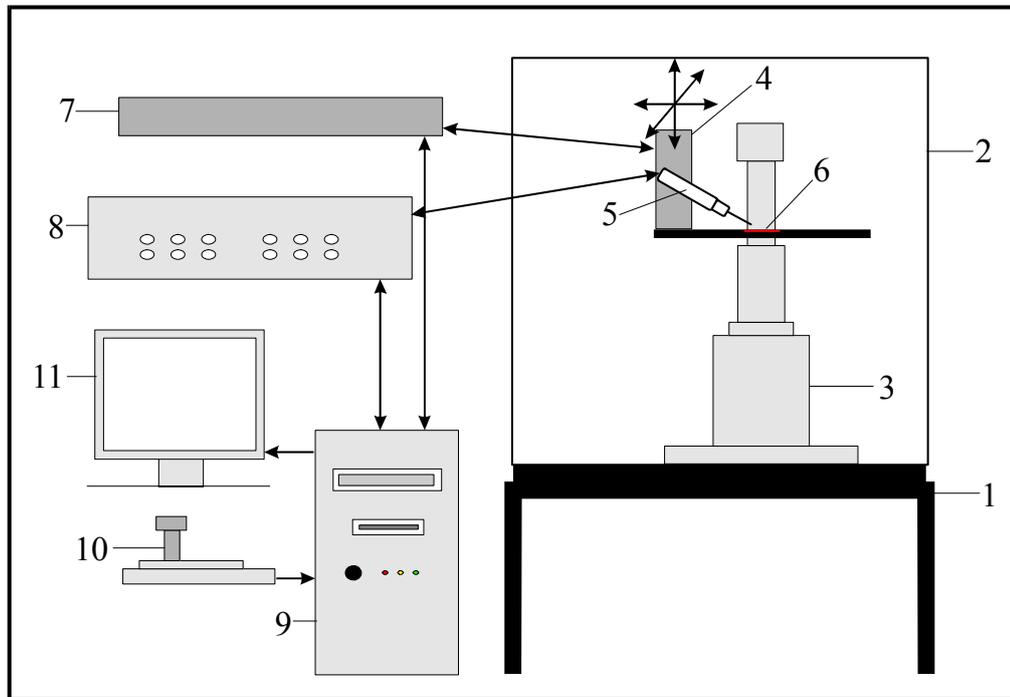


Abbildung 2.11: Schematischer Aufbau einer Patch-Clamp-Messstation

1. Schwingungsgedämpfter Tisch; 2. Faraday'scher Käfig; 3. inverses Mikroskop; 4. Motoreinheit des Mikromanipulators; 5. Vorverstärker mit Pipettenhalter und Pipette; 6. Versuchskammer mit Myozyten; 7. Mikromanipulator MIM 4 (Steuereinheit); 8. Haupt- bzw. Nachverstärker mit AD/DA-Wandler; 9. Computer; 10. Joy-Stick und 11. Bildschirm

Der schwingungsgedämpfte Tisch verhindert, dass sich die Pipette ungewollt zur Zelle bewegt und diese evtl. schädigt. Schwingungen aller Art werden abgefedert, einerseits durch gefederte Lagerung der Tischplatte und andererseits durch eine hoch gelagerte Tischplatte, die somit ein träges Gewicht darstellt. Der geerdete Faraday'sche Käfig schirmt den Messplatz gegenüber elektromagnetischen Schwingungen ab die ansonsten die Messungen stören können (z.B. das 50 Hz Brummen). Das inverse Mikroskop dient zur Darstellung der Zellen und zur Erleichterung des Heranfahrens der Pipette an die Zelle. Der Verstärker besteht aus zwei Komponenten, dem Vorverstärker und dem Hauptverstärker. Der Vorverstärker misst die Stromsignale, liest sie als Spannung aus und enthält die Erdung über die Badelektrode. Der Haupt- oder Nachverstärker kann die vom

Vorverstärker kommenden Signale nochmals verstärken und filtern. Ferner enthält er sowohl das Steuer- und Stimulationsgerät, die über den Computer bedient werden, als auch den AD/DA Wandler, der die analogen Signale in digitale umsetzt und umgekehrt, so dass eine Kommunikation zwischen Computer und Verstärkereinheit erfolgen kann. Der Pipettenhalter stellt die Verbindung zwischen Pipette und Vorverstärker über den chlorierten Silberdraht her. Er muss die Pipette stabil fixieren und gleichzeitig abdichten, damit die Drücke angelegt werden können. Der Mikromanipulator wird ebenfalls über den Computer gesteuert und dient zum Annähern und zum Stabilisieren der Pipette an der Zelle. Der Computer dient als Steuerungseinheit und zur Datenaufnahme, -speicherung und -auswertung. Die Pipette stellt den stabilen Kontakt zu Zelloberfläche her und wird charakterisiert durch ihren Widerstand und Wandstärke. Der Pipettenpuller gibt der Pipette ihre Form und ihren Widerstand.

Alle nicht gesondert markierten Informationen wurden dem Buch „Patch-Clamp-Technik“ von M. NUMBERGER und A. DRAGUHM, erschienen im Spektrum Akademischer Verlag GmbH, entnommen.

2.2 Markierung der Mäuse und Bestimmung des Genotyps mittels PCR

2.2.1 Markierung der Mäuse

Die Versuchsmäuse stammten aus zwei Mauslinien mit dem selben genetischen Hintergrund (black swiss). Eine Mauslinie überexprimierte die CaMKII δ_C heterozygot (MAIER et al., 2003), die andere Mauslinie die CaMKII δ_B (ZHANG et al., 2002). Jede Mauslinie bestand zu ca. 50% aus Wildtyp-Mäusen (WT) und 50% aus transgenen (TG), da jeweils ein WT-Weibchen mit einem heterozygoten transgenen Männchen verpaart wurde.

Zur Unterscheidung wurden die Mäuse drei bis vier Wochen nach der Geburt mittels einer Lochzange (Modell 292-B2, EBECO) markiert (s. Abb. 2.12).

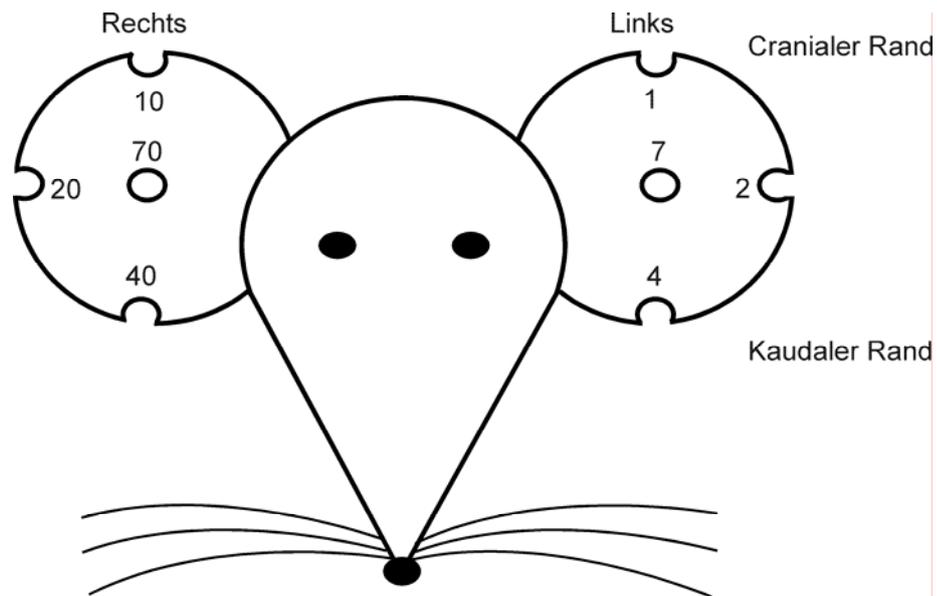


Abbildung 2.12: Ohrloch-Markierungsschema der Mauslinien

Die Markierung der Mäuseohren erfolgte mit einer Lochzange. Die Nummer der Maus wurde entsprechend dem Schema aus dem jeweiligen Ohr herausgestanzt. Aus dem rechten Ohr für die Zehnerstelle und aus dem linken Ohr für die Einerstelle. Die Mäuse mit der Nummer 100, 200 usw. wurden durch Kürzen des Schwanzes markiert.

Die ausgestanzten Ohrgewebeteile wurden einzeln mittels einer Pinzette in beschriftete sterile 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff (-70°C) schockgefroren. Um Verunreinigungen des Mäuseohrgewebes zu vermeiden, wurden die Lochzange und die Pinzette nach jeder Behandlung einer Maus gründlich mit Ethanol (70%) gereinigt.

2.2.2 Aufreinigung der DNA aus dem Mäuseohrgewebe

Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurde die DNA aus den Mäuseohrteilen aufgereinigt und in einer PCR der Genotyp detektiert.

Die Aufreinigung der DNA aus den Mäuseohrteilen erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit von QIAGEN. Zu einem Mäuseohrstück wurden $20\ \mu\text{l}$ des Proteinkinase K-Puffers gegeben. Das 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde verschlossen in einen Thermomixer (Eppendorf) gegeben, wo es bei 55°C bis zum folgenden Tag inkubiert wurde. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen von 15 Sekunden für 15 Sekunden mit 850 rpm geschüttelt. Anschließend sollte das ausgestanzte Mausgewebe aufgelöst sein. Das Reaktionsgefäß wurde erneut für zehn bis 15 Sekunden bei Raumtemperatur (RT) gevortext (Scientific Industrie), bevor $400\ \mu\text{l}$ des Puffers AL-Ethanol hinzugegeben wurden. Dieses Gemisch

wurde erneut für 10 bis 15 Sekunden bei RT gevortext, bevor es in das „DNeasy Mini spin column“, welches sich in einem 2ml-Auffang-Reaktionsgefäß befand, überführt wurde. Dieses wurde bei RT mit mindestens 6.000g für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit dem Auffang-Reaktionsgefäß verworfen und das „DNeasy Mini spin column“ in ein neues zwei ml-Auffang-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 500 µL des Puffers AW1 auf die Membran des „DNeasy Mini spin column“ gegeben und erneut bei RT und mindestens 6.000g für eine Minute zentrifugiert. Auch jetzt wurde der Durchfluss wieder mit dem Auffang-Reaktionsgefäß verworfen und das „DNeasy Mini spin column“ in ein neues zwei ml-Auffang-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 500 µL des Puffers AW2 auf die Membran des „DNeasy Mini spin column“ gegeben und bei RT und mindestens 20.000g für drei Minuten zentrifugiert. Auch jetzt wurde der Durchfluss mit dem Auffang-Reaktionsgefäß verworfen und das „DNeasy Mini spin column“ vorsichtig in ein frisches 1,5 ml Auffang-Reaktionsgefäß überführt. Das „DNeasy Mini spin column“ durfte nicht mit dem Durchfluss in Berührung kommen, ansonsten hätte die obenstehende Prozedur wiederholt werden müssen. Anschließend wurden 200 µL des Puffers AE direkt auf die Membran des „DNeasy Mini spin column“ gegeben und für eine Minute bei RT inkubiert. Es folgte wiederum eine einminütige Zentrifugation bei RT und mindestens 6.000g. Der Durchfluss enthielt die DNA. Der DNA-Gehalt einer Probe wurde am Photometer (Biomate5 von Thermo Spectronic) mit einem Programm, welches die Absorbtion bei 280 und 260 nm gemessen hat, bestimmt. Daraus wurden sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der DNA bestimmt. Als Referenz diente Aqua demin in einer Quarz-Küvette. Von der Probe wurde ein µl in 69 µl Aqua demin gegeben.

2.2.3 Bestimmung des Genotyps der Mäuse mittels PCR

Die aus dem ausgestanzten Mäusegewebe gewonnene DNA wurde zur Bestimmung des Genotyps der Maus in eine PCR eingesetzt. Die für die PCR eingesetzten Primer waren spezifisch für das Insert, welches nur die transgenen Mäuse in ihrem Genom tragen. Der Primer EJ7 (5'-TTG AAG GGT GCC ATC TTG ACA-3') ist spezifisch für einen Abschnitt des Insertionsplasmides und daher für beide Mäuselinien verwendbar. Die Primer hGH (5'-GGT CAT GCA TGC CTG GAA TC-3') und SK (5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3') sind jeweils spezifisch für das jeweilige Gen (CaMKII δ_C : hGH oder CaMKII δ_B : SK) der Mauslinien. Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

36,6	µl	DEPC H ₂ O (siehe Absatz 2.11)
5,0	µl	10x PCR-Puffer (Invitrogen: 18067-017)
3,0	µl	MgCL2 25 mM (Promega: A3511)
1,0	µl	dNTPs 10 mM (Invitrogen: 18427-013)
1,0	µl	Primer EJ7 (35 pmol)
1,0	µl	Primer hGH (53 pmol) oder SK (47 pmol)
0,4	µl	Taq Polymerase (Promega: M1861)
2,0	µl	DNA (ca. 20 ng)

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 50 µl und wurde in ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden nun in einen Thermocycler (PTC-150 Mini CyclerTM mit beheizbarem Deckel: Hot BonnetTM jeweils von MJ RESEARCH) überführt.

Das PCR-Programm enthielt folgende Schritte:

1. 94°C für fünf Minuten
2. 94°C für eine Minute
3. 63°C für eine Minute
4. 72°C für zwei Minuten
5. 35-fache Wiederholung der Schritte 2.-4.
6. 72°C für zehn Minuten
7. Lagerung bei 4°C

Die Analyse der PCR-Proben erfolgte in einer Agarosegelelektrophorese.

Jeweils 7 µl der Probe wurden mit 3,5 µl Loadingpuffer (10x Blue Juice, Invitrogen: 10816-015) gemischt und in eine Tasche eines 2% Agarosegels (0,8 g

Agarose von Invitrogen: 15510-019 in 40 ml TBE Puffer (siehe Absatz 2.11) mit 1,6 µl Ethidiumbromid (Invitrogen: 15585-011) überführt. Als Standard wurden in eine Tasche 10 µl einer 250bp DNA Leiter (Invitrogen: 10596-013) gegeben. Nur bei den transgenen Mäusen zeigte sich eine Bande bei ca. 1 kb.

Die Dokumentation der Ergebnisse aus der PCR wurde in der „Multimage™ Light Cabinet“ der Firma Alpha Innotech Corporation und deren Computerprogramm „Alpha Imagine“ vorgenommen.

2.3 Isolierung von Herzmuskelzellen (Myozyten) aus dem Herzen

Alle Tierexperimente waren von der örtlichen Ethikkommission genehmigt worden und wurden unter Berücksichtigung des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ NIH Publikationsnummer 85-23) durchgeführt. Die Myozytenisolierung ist in unserem Labor seit längerer Zeit etabliert (MAIER et al., 2003; WAGNER et al., 2003).

2.3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen aus Kaninchenherzen

Die wiederverwendbaren Materialien (z.B. Scheren, Pinzetten, temperierbare Kammern usw.) mussten vor der Benutzung sterilisiert bzw. autoklaviert werden. Alle Lösungen wurden steril filtriert, mit Carbogen-Gas (95% O₂ / 5% CO₂) begast und in einem Wasserbad auf 37°C temperiert, bevor sie verwendet werden konnten.

Das Kaninchen (weiblich, Chinchilla Bastard) bekam Heparin (15 ml Heparin + 25 ml physiologische NaCl-Lösung) zur Blutverdünnung in die linke laterale Ohrvene gespritzt. Anschließend wurde es durch Einspritzen einer Überdosis von Trapanal (0,5 g Trockensubstanz in 10 ml physiologischer NaCl-Lösung) betäubt. Beim Ausbleiben des Augenlid-Reflexes konnte von einer ausreichend tiefen Betäubung des Tieres ausgegangen werden. Die folgenden Arbeiten mussten nun zügig durchgeführt werden. Das Herz des Kaninchens wurde im Thorax freigelegt, entnommen und in eine temperierbare (37°C) Kammer gelegt. Die Aorta konnte nun am Zufluss für die Lösungen mit einer Aortenklammer fixiert und festgebunden werden. Die Aortenklammer wurde anschließend wieder entfernt. Das Herz wurde mit 37°C warmen Tyrode-Puffer (siehe Absatz 2.11) mit Ca²⁺ (ein

mM) gespült, bis es erneut zu schlagen begann. Dieser Vorgang diente zur Qualitätskontrolle der bisherigen Arbeit. Es folgte ein ca. 20-minütiges Durchspülen des Herzens mit 37°C warmem Ca^{2+} -freiem Tyrode-Puffer, um das restliche Ca^{2+} zu entfernen. Hierdurch wurden die Ca^{2+} -abhängigen intrazellulären Verbindungen, welche durch z.B. Cadherine und Integrine vermittelt werden, aufgelöst. Anschließend wurde das Herz für zehn bis 20 Minuten mit 37°C warmer Enzymlösung (siehe Absatz 2.11) gespült, bis es aufgeweicht war. Die Kontrolle musste durch einen Tastbefund erfolgen. Hierbei wurden die einzelnen Myozyten aus dem Zellverband herausgelöst. Die Enzymreaktion wurde mit der Stopp-Lösung (siehe Absatz 2.11) beendet, gleichzeitig wurden die Zellen durch Butanedionmonoxim (BDM), ein Zytotoxikum, stabilisiert. Anschließend wurde das Herz aus dem Lösungsmittelzulauf gelöst, in die Stopp-Lösung überführt, dort mit einer Schere zerkleinert und das zerkleinerte Herzmaterial zur Sedimentation über einen Filter (Porendurchmesser 200 μm) in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben. Dieser Vorgang diente zum Entfernen von Fettzellen und Zellverbänden. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und 40 ml Tyrode-Puffer mit 20 mM BDM und 50 μM Ca^{2+} hinzugeben. Die Zellen wurden nun gemischt und sedimentieren gelassen. Anschließend wurde der Überstand erneut entfernt, 40 ml Tyrode Puffer mit 50 μM Ca^{2+} hinzugeben und der Sedimentationsvorgang wiederholt. Dieser Schritt wurde mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentration (50, 125, 250, 500 und 1000 μM) mehrfach durchgeführt. Dadurch sollte der Ca^{2+} -Speicher (SR) der Zellen langsam wieder aufgefüllt, eine schlagartige Ca^{2+} -Überladung der Myozyten jedoch vermieden werden. Zum Schluss wurden die Myozyten in frischem Nährmedium (siehe Absatz 2.11) aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 50 μl im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Nun waren die inaktiven Zellen sichtbar und konnten in einer Neubauer-Zählkammer gezählt werden.

2.3.2 Isolierung von Herzmuskelzellen aus Mausherzen

Die Langendorff-Perfusions-Anlage musste jeweils zweimal vor und nach jeder Isolation mit destilliertem Wasser und anschließend mit 50 ml Isolations-Tyrode (siehe Absatz 2.11) gespült werden. Alle wiederverwendbaren Materialien wurden vor und nach der Isolation gründlich gereinigt. Die Transport- und Präparationsschale wurde mit ca. 8 ml Isolations-Tyrode befüllt. Die Langendorff-Perfusions-Anlage wurde mittels eines Wasserbades und temperierbaren Kammern/Schlangenhalskühlern auf 37°C eingestellt.

Die Maus wurde mit 800 µl Halothan (Eurim-Pharm Arzneimittel GmbH) in einem luftdichten Inkubator betäubt, um anschließend das Genick zu brechen. Das Herz konnte nun im Thorax freigelegt und entnommen werden. Es wurde gewogen, unter einem Bi-Okular über die Aorta kanüliert und auf der Kanüle mit einem 3-0 Polyesterfaden (Mersilene EH6483) und einer Bulldog-Klemme (Fine Science Tools) fixiert. Die Kanüle mit dem Herz wurde an eine Langendorff-Perfusions-Anlage angeschlossen. Zur Entfernung des restlichen Blutes (ca. fünf ml) musste das Herz mit Isolations-Tyrode gespült werden. Dann wurde die Collagenase-Lösung (siehe Abschnitt 2.11) ins Vorratsgefäß gegeben. Nach erfolgtem Verdau wurde das Herz zerschnitten. Zur Trennung von Myozyten und Geweberesten wurde das Gemisch aus Collagenase und Herzzellen durch einen Filter (Porendurchmesser 200 µm) in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben. Nach einer Sedimentationsphase der Myozyten wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde anschließend in Isolations-Tyrode mit 125 µM Ca²⁺ aufgenommen und erneut sedimentieren gelassen. Dieser Schritt war mit 250 und 500 µM Ca²⁺ erneut zu wiederholen, so dass ein langsamer Ca²⁺-Aufbau in den Myozyten stattfinden konnte. Die Myozyten wurden anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit Isolations-Tyrode mit 500 µM Ca²⁺ zur gewünschten Konzentration verdünnt.

Direkt nach der Isolation konnten die Mausmyozyten für Versuche verwendet werden.

2.4 Adenoviralvermittelter Gentransfer und Kultivierung von Kaninchen-Myozyten

Für die akute Überexpression der CaMKII δ_C und δ_B in Kaninchenmyozyten stand jeweils ein adenoviraler Vektor zur Verfügung. Als Kontrolle diente ein Adenovirus, das das Protein β -gal zur Überexpression brachte (ZHU et al., 2003). Alle Arbeiten, außer der Zentrifugation, erfolgten unter einer Sicherarbeitsbank (Typ: CA/RE5 von Clean Air) der Sicherheitsklasse G2 in einem S2-Sicherheitslabor. Die Kaninchenmyozyten wurden nach der Isolation mittels adenoviralem Gentransfer transfiziert, indem die jeweiligen Adenoviren zu den Zellen zu gegeben wurden, so dass eine Endkonzentration oder auch „Multiplicity of Infection“ (MOI in „Plac forming unit“ (pfu)/Zelle) von 100 bzw. 10 (MOI 100 bzw. 10) erreicht wurde. Hierfür wurden 8 ml auf ca. 37°C temperiertes Nährmedium (siehe Abschnitt 2.11) in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben. Dazu kamen 100.000 Myozyten aus der Isolation. Jetzt wurde das Virus, in einer vorher berechneten Konzentration zur Einstellung einer MOI 100 bzw. 10, hinzugegeben und das Röhrchen mehrfach vorsichtig geschwenkt, damit sich Myozyten und Virus gleichmäßig im Nährmedium verteilen und es zu einer gleichmäßigen Transfizierung der Myozyten kommen konnte. Dieses Gemisch wurde anschließend in sterile beschriftete 60 mm Kultivierungsschalen (Falcon, Easy Grip™ Tissue Culture Dish) gegeben. In einem Inkubator erfolgte dann eine 24 Stunden lange Kultivierung der Myozyten mit den Adenoviren (MCO-17AI IR SENSOR von SANYO) bei 37°C und 5% CO₂ im Nährmedium. Im Anschluß wurde die Kulturflüssigkeit in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Durch langsame Zentrifugation (Megafuge 2.0 R von Heraeus Instruments) mit 400 rpm bei RT für drei Minuten wurden die Adenoviren abgetrennt. Der Überstand mit den Viren wurde verworfen (und später autoklaviert, zum Abtöten der restlichen Viren) und frisches Nährmedium zugegeben, das in Abhängigkeit der gewünschten Myozyten-Konzentration pro ml Nährmedium zu bemessen war. Nun konnten Messungen an den transfizierten Myozyten durchgeführt werden.

2.5 Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten am Epifluoreszenz-Mikroskop

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Ca^{2+} -Konzentrationsmessung am Epifluoreszenz-Mikroskop die Farbstoffe Indo-1 und Fluo-3 (siehe Abschnitt 2.1.2) verwendet.

Um die Zellverkürzungs- und Ca^{2+} -Konzentrationsmessungen durchführen zu können, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zur Haftung der lebenden Myozyten auf dem Glasboden der Messkammer wurden auf diesem ein bis zwei μl Laminin (Sigma L2020) gleichmäßig verteilt. Nachdem das Laminin getrocknet war, konnten die Myozyten auf den Glasboden aufgetragen werden. Anschließend folgte eine mindestens 15minütige Ruhezeit der in der Messkammer befindlichen Myozyten im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 . Danach erfolgte die Inkubation mit dem Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff Indo-1, AM bzw. Fluo-3, AM (jeweils zehn μM) für ca. 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Nun konnte die Versuchskammer mit den Myozyten in die Halterung im Mikroskop eingespannt werden (s. Abb. 2.13). Anschließend musste der überschüssige Fluoreszenzfarbstoff, der nicht von den Zellen aufgenommen worden war, mindestens fünf Minuten lang mit Messtyrode (s. Abschnitt 2.11) ausgewaschen werden. Für die Messung mit dem CaMKII-Inhibitor KN 93 wurden die Zellen zunächst für zehn Minuten in Ruhe (ohne Stimulation) mit einer KN 93 (ein μM) enthaltenden Messtyrode umspült. Nun konnten die Verkürzung und die Veränderung des zytosolischen Ca^{2+} der Zelle gemessen werden.

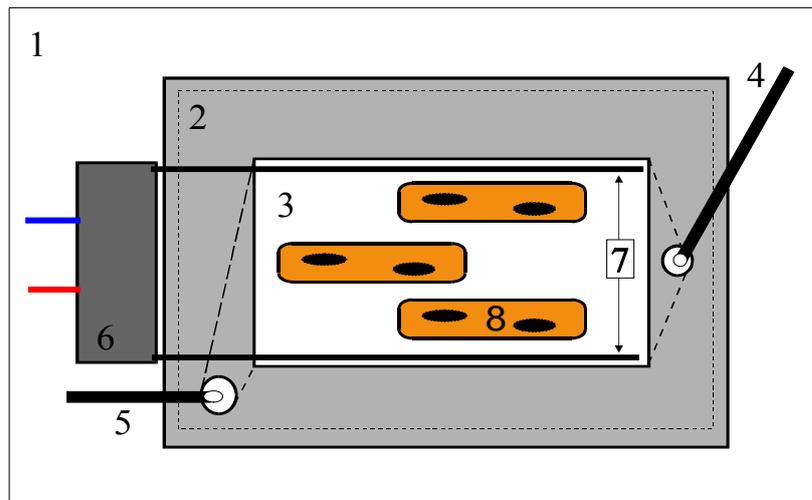


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung einer Messkammer mit Myozyten

Die Abbildung zeigt die Kammerhalterung (1), die im Objektisch des Mikroskops verankert ist, die Messkammer (2) aus thermostabilem Plastik, den Messraum (3), der einen Glasboden besitzt, auf dem die Myozyten (8) auf dem Laminin sitzen, den Zulauf (4) mit Heizung und bis zu acht Anschlüssen, den Abfluss (5) und den Stimulationsstecker (6), die an der Kammerhalterung verankert sind und die beiden Stimulationselektroden (7).

Zur Durchführung der Messungen wurde das Fluoreszenz-Setup der Firma ION OPTIX verwendet (s. Abb. 2.14).

Die Myozyte wurde mittels einer Kamera (Myocam) in ein Computerprogramm (IONWizard Acquire Version 4.) projiziert, welches die Sarcomerlänge bzw. die Verkürzung der Zelle bestimmen konnte. Nachdem der Ca^{2+} -Farbstoff mittels einer UV-Lampe (XENON SHORT ARC Lamp Typ UXL-75XE von USHIO Inc., Japan) angeregt worden war, wurde der Verlauf des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels beobachtet. Die genauen Strahlengänge sind in den Abbildungen 2.15. (Indo-1) und 2.16 (Fluo-3) dargestellt.

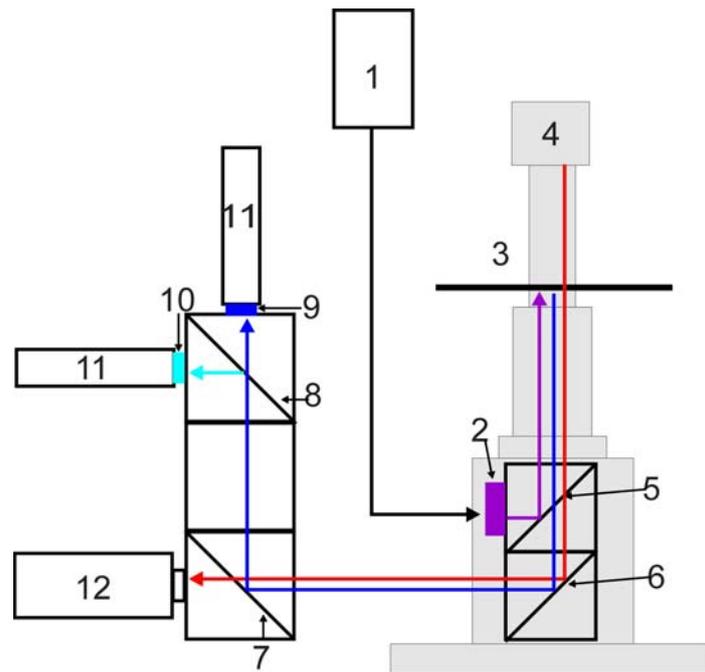


Abbildung 2.15: Strahlengang im Mikroskop bei Messungen mit Indo1, AM

1 UV-Lampe, 2 Filter ($D365 \pm 5$ nm); 3 Untersuchungsobjekt, 4 Rotlichtlampe mit Filter (695 nm long pass), 5 Dichroitischer Spiegel ($D380$ DCLP); 6 Spiegel, 7 Dichroitischer Spiegel ($D685$ DCLP), 8 Dichroitischer Spiegel (440 DCLP), 9 Filter ($D485 \pm 12,5$ nm), 10 Filter ($D405 \pm 15$ nm), 11 PMT und 12 Kamera

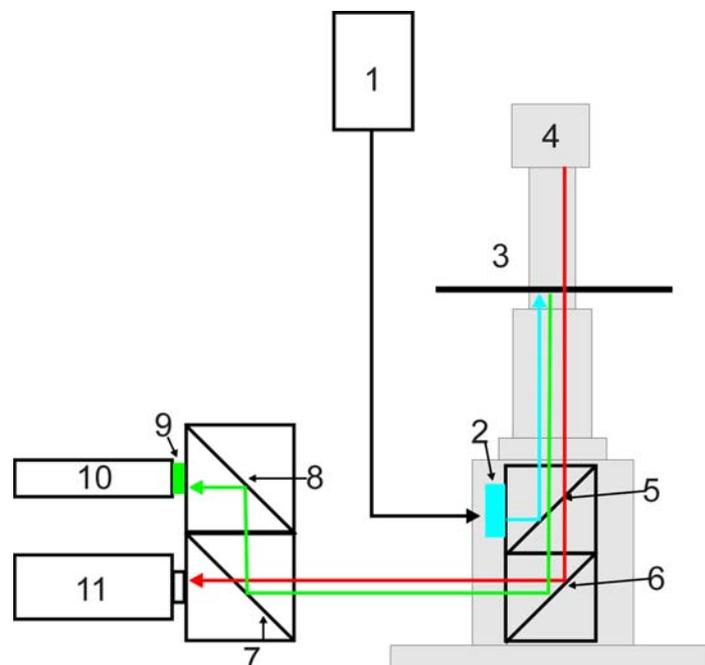


Abbildung 2.16: Strahlengang im Mikroskop bei Messungen mit Fluo3, AM

1 UV-Lampe, 2 Filter ($D480 \pm 15$ nm), 3 Untersuchungsobjekt, 4 Rotlichtlampe mit Filter (695 nm long pass), 5 Dichroitischer Spiegel ($D505$ DCLP), 6 Spiegel, 7 Dichroitischer Spiegel ($D685$ DCLP), 8 Spiegel, 9 Filter (535 ± 20 nm), 10 PMT und 11 Kamera

Die verschiedenen Wellenlängen zur Anregung konnten durch einen Filtersatz (Indo: D365±5 nm, Fluo: D480±15 nm) im Mikroskop eingestellt werden. Das Anregungslicht wurde über einen Filterspiegel (Indo: 380DCLP; Fluo: 505DCLP) auf das Objekt weitergeleitet. Das emittierte Licht der Farbstoffe und das Durchlicht des Mikroskops wurden über einen Seitenausgang des Mikroskops auf einen dichroitischen Spiegel (685DCLP), der im Winkel von 45° zum Strahlengang ausgerichtet war, geleitet. Dieser trennte das sichtbare Licht für die Kamera vom UV-Licht, das zu den Photomultipliern geleitet wurde. Für die Messungen mit Fluo3, AM gelangte das UV-Licht auf einen Spiegel, von dem es zum Photomultiplier umgeleitet wurde, diesem war ein Filter (D535±20 nm) vorgeschaltet. Bei den Messungen mit Indo1, AM traf das UV-Licht auf einen weiteren dichroitischen Spiegel (440DCLP); auch dieser war in einem Winkel von 45° zum Strahlengang ausgerichtet. Hier erfolgte die Auftrennung der beiden Wellenlängen des Zählers (405 nm) und des Nenners (480 nm). Die Wellenlängen unter 450 nm wurden auf einen Photomultiplier mit einem Filter (D405±15 nm) geleitet und die Wellenlängen größer als 450 nm auf einen anderen Photomultiplier mit einem Filter (D485± 12,5 nm). Alle hier erwähnten Filter und Filterspiegel stammen von der Firma Chroma Technologie Corp., USA. Die jeweilige Emission des Ca²⁺-Farbstoffes wurde von den jeweiligen Photomultipliern aufgenommen, verstärkt und in Spannung umgewandelt. Die Messwerte wurden im Fluoreszenz System Interface von ION OPTIX in computerlesbare Daten konvertiert. Diese Daten konnten nun ebenfalls im oben erwähnten Computer-Programm IONWizard dargestellt werden. Nun konnte eine Korrelation zwischen dem zytoplasmatischen Ca²⁺-Anstieg und der Verkürzung der Zelle durchgeführt und die erhobenen Daten gespeichert werden.

Zur Bestimmung der Kraft-Frequenz-Beziehung musste die Verkürzung bzw. der Kalziumgehalt bei verschiedenen Frequenzen, aufsteigend von 0,5, eins, zwei und drei Hz, gemessen werden.

Zur Messung des Ca²⁺-Gehaltes des SR wurde die Stimulation für zehn bzw. 30 Sekunden ausgeschaltet und die Verkürzung bzw. der Ca²⁺-Gehalt nach der Pause mit der Verkürzung bzw. dem Ca²⁺-Gehalt vor der Pause verglichen (Post-Pausen-Beziehung). Ferner konnte der Ca²⁺-Gehalt des SR durch Koffein-stimulierte Ca²⁺-Transienten bestimmt werden. Koffein bewirkte für die Dauer der Einwirkzeit eine reversible Öffnung des RyR. Dadurch entleerte sich das SR komplett vom Ca²⁺.

Das Ausmaß der Kontraktur bzw. die Höhe des Ca^{2+} -Transienten war ein Indikator für die SR Ca^{2+} -Beladung. Die Relaxation beruhte nur auf dem NCX, da die Ca^{2+} -Ionen, die von der SERCA zurück ins SR gepumpt wurden, gleichzeitig wieder über den geöffneten RyR2 freigesetzt wurden.

Aus der Relaxation unter Gleichgewichtsbedingungen konnte die SERCA-Aktivität bestimmt werden, da unter Gleichgewichtsbedingungen die Relaxation zu ca. 70% beim Kaninchen und zu 90% bei der Maus von der SERCA-Aktivität abhängig ist. Eventuelle Veränderungen der NCX-Aktivität spielten daher nur eine geringere Rolle.

2.6 Elektrophysiologische Messungen mit der Patch-Clamp-Technik

Die Myozyten wurden wie unter Abschnitt 2.5 beschrieben auf die Messkammern ausplattiert und ruhen gelassen. Anschließend erfolgte der Austausch des Nährmediums gegen die Umgebungslösung (siehe 2.11). An den Myozyten konnten danach die Ca^{2+} -Ströme mittels Patch-Clamp-Technik bei Raumtemperatur gemessen werden.

Die Glaspipetten, bestehend aus Borsilikatglas, wurden vor jedem Experiment mit dem Pipetten-Ziehgerät DMZ Universal Puller von Zeitz-Instruments GmbH aus Glasfilamenten (TW150F-3 von World Precision Instruments, Inc) gezogen. Die Glaspipette hatte einen Eigenwiderstand zwischen 2,5 und 3,5 M Ω . In dieser Pipette wurde die Pipettenlösung (siehe Abschnitt 2.11) mit oder ohne AIP („autocamtid-2-related inhibitory peptide“) oder KN93 (je ein μM) gegeben und in die Pipettenhalterung mit chloriertem Silberdraht des Vorverstärkers eingespannt. So konnten mit dieser Pipette gleichzeitig Ströme induziert und gemessen werden, dabei wurde der Patch-Clamp-Verstärker EPC 10 von HEKA Elektronik als Mittler benötigt. Die Datenaufnahme erfolgte wiederum mittels eines Computerprogramms PATCHMASTER 2,0 von HEKA Elektronik. Die Steuerung des Mikromanipulators erfolgte mit der Steuereinheit MIM4 und dem Computerprogramm POS2.1 jeweils von HEKA.

Zum Messen der Ströme wurde ein minimaler Überdruck in der Pipette erzeugt und diese mittels eines Mikromanipulators unter Sichtkontrolle an die Myozyte herangefahren. Um die Pipette auf die Membran aufzusetzen und somit einen

„Gigaseal“ zu erreichen, erfolgte das Annähern der Pipette an die Membran unter Beobachtung des angezeigten Widerstandes im Computerprogramm. Wenn dieser Widerstand sich vervier- bis verfünffacht hatte, musste der Überdruck abgelassen werden. Sollte die Pipette dann noch keinen lückenlosen Kontakt zur Membran haben (Gigaseal), konnte ein minimaler Unterdruck angelegt werden. Für den Fall, dass ein Kontakt zur Zellmembran hergestellt werden konnte, musste das Computerprogramm im „on-cell“-Modus benutzt werden. Anschließend folgte der Versuch, die Zellmembran zu durchbrechen, um einen Zugang zur Zelle (Whole-Cell-Konfiguration) herzustellen. Dieses wurde erreicht, indem kurzfristig eine großer Unterdruck an die Pipette angelegt wurde. Konnte ein Zugang zur Zelle hergestellt werden, musste das Computerprogramm auf den „whole-cell“-Modus umgestellt werden. War der Zugang zu der Zelle ohne „Leak“-Ströme, musste eine Wartezeit von fünf Minuten eingehalten werden, bis die Pharmaka (AIP oder KN93) ihre Wirkung entfalten konnten oder bis gleiche Bedingungen eingestellt waren. Nach der Einstellung des Membranpotentials auf -90 mV konnten die Messungen durchgeführt werden.

Für die Messung des Ca^{2+} -Einstroms über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal in Abhängigkeit der vorgegebenen Membranspannung wurde folgendes Protokoll (IV-Protokoll; s. Abb. 2.17 A) verwendet: das Membranpotential musste für 50 ms auf -90 mV eingestellt werden, anschließend folgte durch eine Depolarisation auf -45 mV für 50 ms die Inaktivierung des Na^+ -Kanals. Daraufhin konnte der eigentliche Messpuls auf -40 mV für 200 ms appliziert werden. Danach wurde wieder für 50 ms die Ausgangsmembranspannung von -90 mV eingestellt. Es folgten zwölf weitere Wiederholungen des Protokolls, wobei der Messpuls schrittweise um zehn mV erhöht wurde, so dass eine Spanne zwischen -40 mV bis $+80$ mV gemessen werden konnte.

Die Abhängigkeit des Ca^{2+} -Einstroms über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal von der Zeit wurde, wie oben beschrieben, gemessen. Die einzige Änderung bestand darin, dass beim Messpuls nur auf 0 mV depolarisiert wurde und mehrfache Wiederholungen, ca. 10mal, mit einer Frequenz von einem Hz folgten (s. Abb. 2.17 B). Das Verhalten des Ca^{2+} -Einstroms über die Zeit kann auch als Facilitation beschrieben werden, wobei genau genommen die Zunahme des Ca^{2+} -Einstroms nach wiederholten Depolarisationen gemeint ist.

Die Reaktivierbarkeit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals konnte folgendermaßen (s. Abb. 2.17 C) bestimmt werden: das Membranpotential wurde für 50 ms auf -90 mV eingestellt, anschließend erfolgte ein Konditionierungspuls auf -60 mV für 2 s, gefolgt von einem Prepuls von -40 mV für 10 ms zur Inaktivierung der Na^{+} -Kanäle. Anschließend konnte der eigentliche Messpuls auf 0 mV für 200 ms amplifiziert werden. Am Ende wurde das Membranpotential wieder auf -90 mV eingestellt. Dieses Protokoll musste 13mal wiederholt werden, wobei der Konditionierungsimpuls schrittweise um zehn mV erhöht wurde.

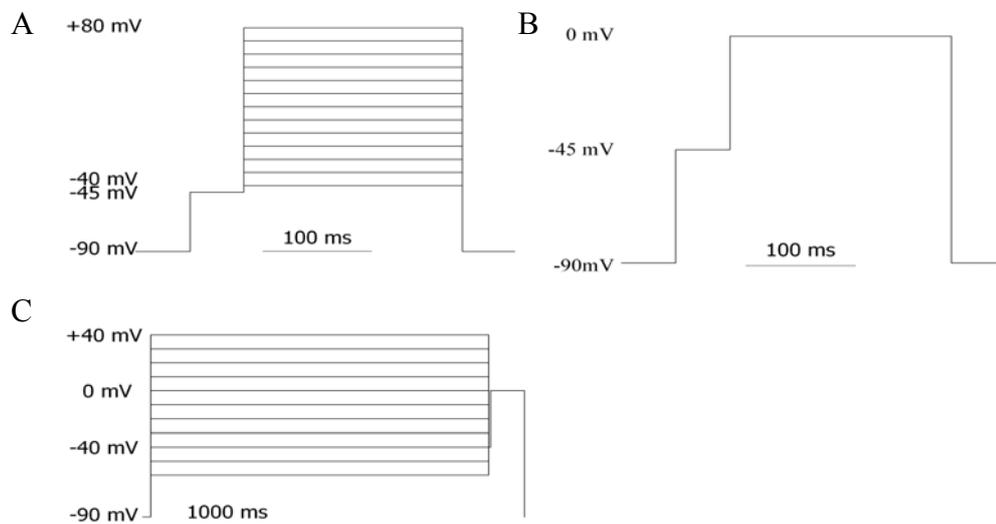


Abbildung 2.17: Darstellungen der Patch-Clamp-Protokolle

A: IV-Protokoll, **B:** Facilitations-Protokoll wurde mit einer Frequenz von einem Hz 30 mal wiederholt, **C:** Verfügbarkeits-Protokoll

2.7 Messungen der subzellulären Ca^{2+} -Konzentrationen am konfokalen Mikroskop

Die Myozyten wurden wie unter Abschnitt 2.5 beschrieben auf die Versuchskammern ausplattiert und anschließend mit Fluo-4, AM für 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach mussten 5 Minuten lang die überflüssigen Farbstoffmoleküle mit Messtyrode ausgewaschen werden, bevor die eigentlichen Messungen gestartet werden konnten.

Die Messung der Spark-Frequenz erfolgte für Mausmyozyten mit Messtyrode, die ein mM oder fünf mM Ca^{2+} enthielt, und bei Kaninchenmyozyten mit Messtyrode,

die zwei mM Ca^{2+} , zehn nM Isoprenalin und 100 nM Ascorbinsäure enthielt. Alle Versuche wurden bei RT durchgeführt. Das Protokoll war für beide Myozytenarten folgendermaßen: Zuerst wurde unter Stimulation (0,5 Hz) und anschließend in einer Stimulationspause gemessen. Die Messungen erfolgten im „Line-Scan“ Modus, wobei die folgenden Einstellungen gewählt wurden: 512 Pixel pro Linie, Pixelzeit 0,64 μs , Pixelgröße 0,07 μm x 0,07 μm , Pixeltiefe 12 bit, Scanbreite 38,4 μm (Zoomfaktor sechs), „Pinhole“-Öffnung 67 μm (Schichtdicke < 0,9 μm) und 5000 Linien hintereinander ohne Verzögerung.

Der Versuchsaufbau der Tetracain-Versuche wurde ähnlich dem von SHANNON et al. (2002) gewählt. Die Messungen des Tetracain-Einflusses erfolgten mit den Parametern: 512 Pixel pro Linie, Pixelzeit 1,28 μs , Pixelgröße 0,22 μm x 0,22 μm , Pixeltiefe zwölf bit, Scanbreite 115,2 μm (Zoomfaktor zwei), ohne Pinhole und 750 Linien hintereinander mit einer Verzögerung von 125 ms. Die Versuche wurden bei RT und mit einer Messtyrode, die zwei mM Ca^{2+} enthielt, durchgeführt. Die Experimente liefen folgendermaßen ab: Bis zur 150. Linie wurde mit 0,5 Hz stimuliert, ab der 200. Linie wurde die Hintergrundlösung gewechselt auf $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ -Lösung (siehe Abschnitt 2.11) mit oder ohne Tetracain (ein mM) für 30 Sekunden. Danach folgte eine Amplifikation von einer Messtyrode, die zehn mM Koffein und zwei mM Ca^{2+} enthielt, direkt auf die Zelle und die Umstellung auf eine Messtyrode mit zwei mM Ca^{2+} . Zwischen der Messung der Kontrolle (ohne Tetracain) und dem eigentlichen Messung mit Tetracain musste eine Pause von ca. zwei min liegen, um die $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ -Lösung vollständig aus der Messkammer auszuwaschen und den Myozyten Zeit zur Erholung zu geben. Pro Kammer konnte nur ein Kontroll- und ein Tetracain-Experiment durchgeführt werden, um eventuelle chronische Effekte von Tetracain auszuschließen. Die Tetracain-Lösung wurde nach zwei Kammern erneuert oder spätestens nach 60 min, weil Tetracain sowohl auf Licht als auch auf Sauerstoff empfindlich reagiert und sich daher sehr schnell zersetzt.

2.8 Erheben von biometrischen Daten

Das Herzgewicht der Mäuse wurde unmittelbar nach der Entnahme des Herzen auf einer Feinwaage (Sartorius analytic) gemessen. Das Körpergewicht der Mäuse ist

nach dem Tod der Mäuse aus gemessenem Körpergewicht plus Herzgewicht bestimmt worden.

Zum Bestimmen des Zellvolumens wurden die Kaninchenmyozyten unter dem Mikroskop vermessen. Hierfür wurden die Myozyten mit der ION-OPTIX-Software (IONWizard Acquire Version 4.4) auf den Computerbildschirm projiziert und mittels einem Lineal nach Länge und Breite hin vermessen. Hierbei entspricht ein gemessener cm 15 μm , dieses wurde mittels einer Eichskala bestimmt. Die Höhe der Zellen wurde bestimmt nach der Formel: Breite multipliziert mit dem Faktor 0,4. Aus der gemessenen Länge und Breite sowie der bestimmten Höhe wurde dann das Zellvolumen ermittelt.

2.9 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten aus den Messungen am Epifluoreszenz-Mikroskop erfolgte durch ein spezielles Computerprogramm (IONWizard Analyze Version 5.0 von ION OPTIX). Nach der Auswertung wurden die Daten in einer speziellen Excel-Datei gespeichert und verglichen.

Die Datensichtung der gemessenen Ströme aus den Messungen mit der Patch-Clamp-Technik erfolgte im gleichen Computerprogramm (PATCHMASTER 2,0; HEKA Elektronik) wie die Datenaufnahme. Zunächst fand eine Selektion auf verwertbare Datensätze statt, die anschließend in eine Text-Datei konvertiert und gespeichert wurden, wobei die ursprüngliche Datei erhalten blieb. Diese Text-Dateien wurden anschließend in Excel zur weiteren Analyse und Verarbeitung eingelesen. Die Berechnung der Relaxaktions-Parameter τ_1 und τ_2 erfolgte in einem separaten Computerprogramm (Clampfit Version 8.1 von Axon Instruments). In einer separaten Excel-Datei konnten alle Daten gesammelt und verglichen werden.

Die erzeugten Bilddateien aus den Messungen am konfokalen Mikroskop wurden im gleichen Computerprogramm (Zeiss) aufgezeichnet und ausgewertet. Unter der Verwendung der Mean-Funktion, die den Mittelwert der Intensität der Pixel in einer Linie berechnet, konnten die auszuwertenden Daten erstellt werden. Hierbei konnte eine beliebige Anzahl von Pixeln, die zu einer bestimmten Fläche im Verhältnis stehen, und eine beliebige Anzahl von Linien, die zur Messzeit im Verhältnis stehen, ausgewählt werden. Für die Analyse der Sparks wurden immer

30 Pixel pro Linie verwendet, bei den Tetracain-Messungen dagegen musste die Anzahl der Pixel in Abhängigkeit zur Größe der Zelle gewählt werden. Die Speicherung der Daten erfolgte in einer Text-Datei, bestehend aus einer Zeit/Intensitäts-Tabelle, die in Excel eingelesen und ausgewertet wurde. Die Spark-Frequenz und die Spark-Breite wurden im Computerprogramm von Zeiss bestimmt. Das F/F_0 und die RT50%, RT80%, RT90% und Länge wurden in einer Exceltabelle bestimmt, ebenso wie die Diastole vom Kontroll- und Tetracain-Experiment als auch der SR Ca^{2+} -Gehalt jeweils als F/F_0 . Die einzelnen Charakteristika der Sparks/Tetracain-Messungen wurden in einer separaten Excel-Datei gesammelt und verglichen.

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgt mittels t-Tests und für wiederholte Messungen mittels Zwei-Wege-ANOVA-Testes in Excel bzw. in GraphPad-Prism 3. Für einen Zwei-Wege-ANOVA-Test mit einer n-Zahl größer als 16 wurde SigmaStat 2.0 verwendet.

2.11 Lösungen und Chemikalien

Zu 2.2.3

DEPC H₂O:

Diethylpyrocarbonat (Sigma D-5758)	1,00	ml/l
Doppelt destilliertes (dd) H ₂ O	1,00	l

Die Lösungen wurden gut vermischt und 24 h unter einem Abzug inkubiert und anschließend für eine Stunde autoklaviert.

TBE Puffer:

Tris (Roth 5429.3)	89,15	mM
Borsäure (Roth 6943,1)	88,95	mM
EGTA (Sigma E-4378)	2,25	mM
DEPC H ₂ O	1,00	l

Auf pH 8,3 bei RT mit NaOH (Merk 1.09137.1000) eingestellt.

Zu 2.3.1

Tyrode-Puffer:

NaCl (Fluka 71378)	137,00	mM
KCl (Merck 1.04933.0500)	5,40	mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (Fluka 63140)	1,20	mM
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (Merck 6580)	1,20	mM
HEPES (Sigma H-4034)	20,00	mM
Glucose (Roth X997.2)	14,98	mM
Penizillin (Sigma P4333)	100,00	U/ml
Streptomycin (Sigma P4333)	0,10	g/l
ddH ₂ O	1,00	l

Auf pH 7,4 bei 37°C mit NaOH (Merk 1.09137.1000) eingestellt.

Enzymlösung:

Taurine (Sigma T9931)	60,00	mM
DL-Glutamic Acid (Sigma G1126)	8,00	mM
DL-Carnitine (Sigma C9500)	2,00	mM
Collagenasen CLSII (Biochrom AG)	ca. 20	Units
Protease XIV (Sigma P5147)	21,00	mg/l
CaCl ₂ (Fluka 21115)	25,00	µM

In Tyrode Puffer gelöst.

Stopp-Lösung:

Albumin Fraktion V (Sigma T9931)	20,00	g/l
Butanedionmonoxim (Sigma B0753)	20,00	mM
CaCl ₂ (Fluka 21115)	50,00	µM

In Tyrode Puffer gelöst

Modifiziertes M199-Medium (auch zu 2.3):

M199 Medium (Sigma M7528)	500,00	ml
Taurine (Sigma T9931)	5,00	mM
D,L-Carnitine (Sigma C9500)	5,00	mM
Kreatine (Sigma C0780)	6,55	mg/l
Penizillin (Sigma P4333)	100	U/ml
Streptomycin (Sigma P4333)	0,1	g/ml

L-glutamine (PAA M11-004)) 2,00 mM

Zu 2.3.2

Isolations-Tyrode:

NaCL (Fluka 71378)	137,00	mM
KCL (Merck 1.04933.0500)	5,40	mM
MgSO ₄ ·7 H ₂ O (Merck 8.14733.0100)	1,20	mM
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O (Merck 6580)	1,20	mM
HEPES (Sigma H-4034)	20,00	mM
Glucose (Roth X997.2)	14,98	mM
dd H ₂ O	1,00	l

Auf pH 7,54 bei RT mit NaOH (Merk 1.09137.1000) eingestellt.

Colagenasen-Lösung:

Collagenasen CLSII (Biochrom AG)	ca. 8,5	Units
CaCl ₂ (Fluka 21115)	25,00	µM

In Isolations-Tyrode gelöst.

Zu 2.5

Messtyrode:

NaCL (Fluka 71378)	140,00	mM
KCl (Merck 1.04933.0500)	4,00	mM
MgSO ₄ ·7 H ₂ O (Fluka 63140)	1,00	mM
HEPES (Sigma H-4034)	5,00	mM
Glucose (Roth X997.2)	10,00	mM
dd H ₂ O	1,00	l

Auf pH 7,4 bei 37°C mit NaOH (Merk 1.09137.1000) eingestellt.

Pluronic-Lösung:

Pluronic (Sigma P-2443) 20 % w/v

In DMSO (Fluka 41640) lösen.

Indo-1 (AM) Farbstofflösung:

Stocklösung:

2. Material und Methoden

Indo-1 AM (TEFLABS 0105) 1,00 mM

In DMSO (Fluka 41640) lösen und bei -20°C lagern.

Indo-1 (AM) (aus Stocklösung) 10,00 µM

Pluronic (aus Pluronic-Lösung) 0,02 % w/v

In Messtyrode lösen und zu 200 µl in lichtundurchlässigen 0,5 Tubes (Eppendorf 0030 121.155) aliquotieren und bei -20°C lagern.

Fluo-3 (AM) Farbstofflösung:

Stocklösung:

Fluo-3 (AM) (TEFLABS 0116) 1,00 mM

In DMSO (Fluka 41640) lösen und bei -20°C lagern.

Fluo-3 AM (aus Stocklösung) 10,00 µM

Pluronic (aus Pluronic-Lösung) 0,02 % w/v

In Messtyrode lösen und zu 200 µl in lichtundurchlässigen 0,5 Tubes (Eppendorf 0030 121.155) aliquotieren und bei -20°C lagern.

Zu 2.6

Umgebungslösung:

NaCl (Fluka 71378) 140,00 mM

CsCl (Sigma C3032) 4,00 mM

MgCl₂ (Merck 8.14733.0100) 1,00 mM

HEPES (Sigma H-4034) 5,00 mM

Glucose (Roth X997.2) 10,00 mM

dd H₂O 1,00 l

Auf pH 7,4 bei RT mit NaOH (Merk 1.09137.1000) eingestellt.

Umgebungslösung im Falle der Reaktivierbarkeitsmessung:

Tetramethylammoniumchlorid

(Merck 8.22156.0250) 140,00 mM

CsCl (Sigma C3032) 6,00 mM

MgCl (Merck 8.14733.0100) 1,00 mM

HEPES (Sigma H-4034) 5,00 mM

2. Material und Methoden

Glucose (Roth X997.2)	10,00	mM
CaCl ₂ (Fluka 21115)	2,00	mM
dd H ₂ O	1,00	l

Auf pH 7,4 bei RT mit CsOH (Aldrich 21351-79-1) eingestellt.

Pipettenlösung:

CsCL (Sigma C3032)	105,00	mM
BAPTA-4Cs (Molekular Probes B-1212)	5,00	mM
Di Br BAPTA (Molekular Probes B-1211)	1,00	mM
Mg-ATP(Sigma A-9187)	5,00	mM
HEPES (Sigma H-4034)	20,00	mM
CaCl (Fluka 21115)	1,49	mM
dd H ₂ O	25	ml

Auf pH 7,2 bei RT mit CsOH (Aldrich 21351-79-1) eingestell.

Zu 2.7

Messtyrode:

NaCL (Fluka 71378)	140,00	mM
KCl (Merck 1.04933.0500)	4,00	mM
MgSO ₄ ·7 H ₂ O (Fluka 63140)	1,00	mM
HEPES (Sigma H-4034)	5,00	mM
Glucose (Roth X997.2)	10,00	mM
dd H ₂ O	1,00	l

Auf pH 7,4 bei RT mit NaOH (Merk 1.09137.1000) eingestellt.

Fluo-4 (AM) Farbstofflösung:

Stocklösung:

Fluo-4 (AM) (TEFLABS 0151)	1,00	mM
----------------------------	------	----

In DMSO (Fluka 41640) lösen und bei -20°C lagern.

Fluo-4 (AM) (aus Stocklösung)	10,00	µM
-------------------------------	-------	----

Pluronic (aus Pluronic-Lösung)	0,02	% w/v
--------------------------------	------	-------

In Messtyrode lösen und zu 200 µl in lichtundurchlässigen 0,5 Tubes (Eppendorf 0030 121.155) aliquotieren und bei -20°C lagern.

0 Na⁺ und 0 Ca²⁺ Lösung:

LiCl (Sigma L-9650)	140,00	mM
EGTA (Sigma E-4378)	10,00	mM
KCl (Merck 1.04933.0500)	4,00	mM
MgCl (Merck 8.14733.0100)	1,00	mM
Glucose (Roth X997.2)	10,00	mM
Hepes (Sigma H-4034)	5,00	mM
dd H ₂ O	1,00	l

Auf pH 7.4 bei RT mit LiOH (Merck 1.05691.0100) eingestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Akute adenoviral vermittelte Überexpression der CaMKII δ_C in Kaninchenmyozyten

3.1.1 Die Kontraktions-Frequenz-Beziehung und die intrazellulären Ca²⁺-Transienten

Mittels der Kontraktions-Frequenz-Beziehung können Rückschlüsse auf den Ca²⁺-Haushalt der Myozyte gezogen werden. So ist es möglich, am Epifluoreszenzmikroskop der Kontraktion der Zelle bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen einen Ca²⁺-Anstieg im Zytoplasma zuzuordnen. Dafür wurden die Stimulationsfrequenzen schrittweise von 0,5 Hz auf ein, zwei Hz und auf drei Hz erhöht. Jeweils zehn bis 15 Zellverkürzungen/Ca²⁺-Transienten unter Gleichgewichtsbedingungen wurden gemittelt und aus dem Mittelwert die jeweiligen Parameter (Amplitude, Relaxation etc.) bestimmt.

In der LacZ-Kontrollgruppe kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Zellverkürzung bis zu einer Simulationsfrequenz von zwei Hz. Bei einer Frequenz von drei Hz nahm dagegen die Verkürzung der Zelle leicht ab (s. Abb. 3.1). Bei den CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten hingegen war lediglich eine Verstärkung der Verkürzung bis zu einer Stimulationsfrequenz von einem Hz zu beobachten und eine kontinuierliche Abnahme bei Frequenzen von zwei und drei Hz. Allerdings wiesen die statistischen Untersuchungen mittels Zwei-Wege-ANOVA aufgrund der hohen Variabilität, die sich in den Standardfehlern darstellte, keine signifikanten Unterschiede auf.

Bei den Ca²⁺-Transienten zeigte sich ein ähnliches Bild, mit niedrigerer Amplitude in den CaMKII δ_C -überexprimierenden Zellen im Vergleich zur LacZ-Kontrollgruppe. Bei beiden Gruppen nahmen die Amplituden der Ca²⁺-Transienten mit steigender Stimulationsfrequenz ab.

Die diastolischen Ausgangswerte für die Verkürzung und den Ca²⁺-Transienten unterschieden sich in den beiden Gruppen jeweils nicht.

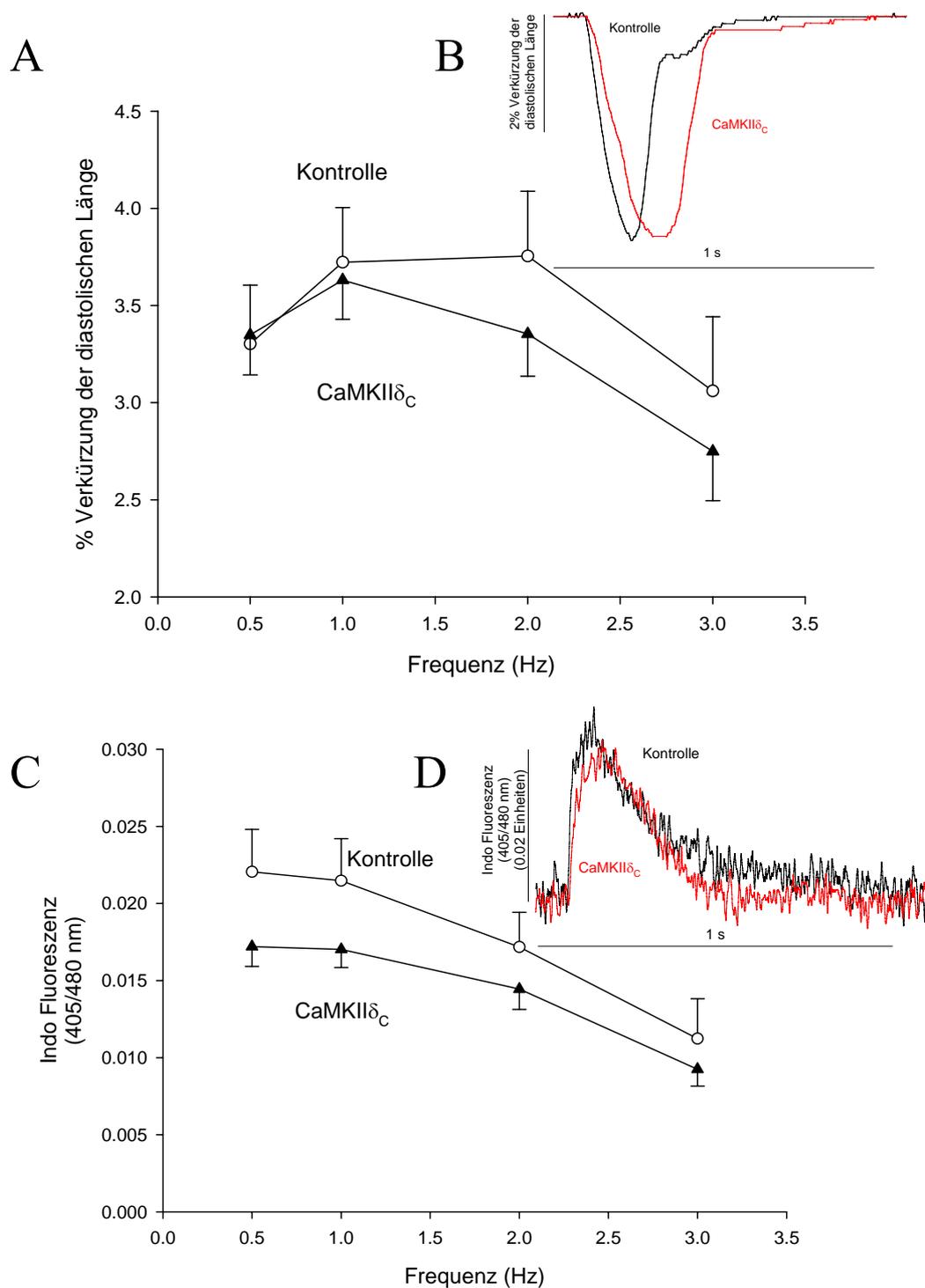


Abbildung 3.1: Frequenz-abhängige Änderung der Kontraktilität und der Ca²⁺-Transienten

A: Mittelwerte der Kontraktilitätsmessungen der LacZ-Kontrollgruppe (n= 30 bei einem Hz) und von CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten (n= 46 bei einem Hz); B: repräsentative Original-Kontraktionen einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz) und einer CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyte (rot); C: Mittelwerte der intrazellulären Ca²⁺-Amplitudenmessung der Kontrollgruppe (n= 19 bei einem Hz) und CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten (n= 38 bei einem Hz); D: repräsentative Original-Ca²⁺-Transienten einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz) und einer CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyte (rot).

Die Relaxation der Zelle bzw. die Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol (der Abfall des Ca^{2+} -Transienten) ist ein Maß für die SERCA-Aktivität. Beim Kaninchen kommen ca. 70% des zur Kontraktion beitragenden Ca^{2+} aus dem SR der Zelle und werden nach erfolgter Kontraktion wieder durch die SERCA ins SR zurückgepumpt. Daher beruht die Relaxation im Falle des Kaninchens zu ca. 70% auf der SERCA-Aktivität. Der Relaxationsparameter RT 50% beschreibt die Zeit, die benötigt wird, bis die Kontraktion bzw. der Ca^{2+} -Rückgang auf 50% des maximalen Wertes zurückgegangen ist.

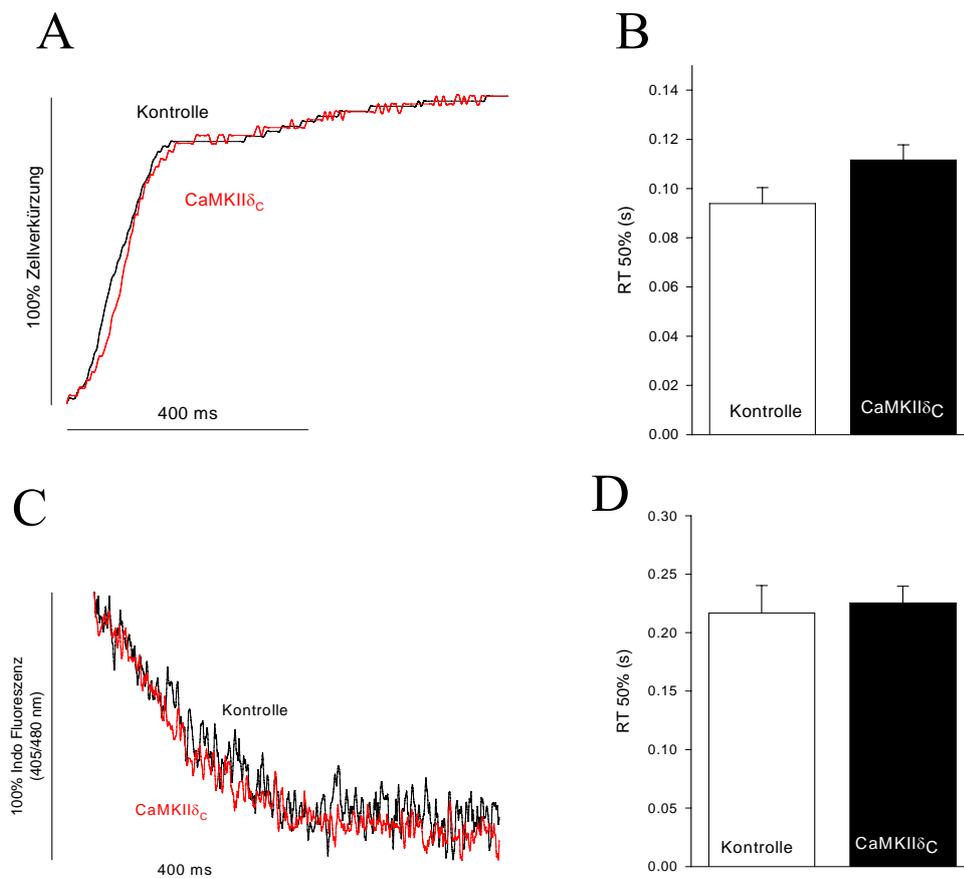


Abbildung 3.2: Relaxationsparameter RT50% der Kontraktilität/ Ca^{2+} -Transienten bei einem Hz

A: Original-Relaxation normiert auf die minimale Zelllänge einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz) bzw. einer $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -überexprimierenden Myozyte (rot); B: Mittelwerte der RT 50% Bestimmungen der Kontraktion bei einem Hz von Kontrollgruppe und $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -überexprimierenden Myozyten; C: Original- Ca^{2+} -Rückgang normiert auf das Maximum des Ca^{2+} -Transienten einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz) und einer $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -überexprimierenden Myozyte (rot), D: Mittelwerte der RT 50% Bestimmungen des Ca^{2+} -Rückgangs bei einem Hz von Kontrollgruppe und $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -überexprimierenden Myozyten

Das Relaxationsverhalten von CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollmyozyten verlangsamt, jedoch nicht in signifikantem Umfang. Beim Ca²⁺-Rückgang hingegen waren keinerlei Unterschiede zwischen CaMKII δ_C -Myozyten und der Kontrollgruppe erkennbar (s. Abb. 3.2).

Sofern keine Veränderung der NCX-Aktivität vorlag (s. Abschnitt 3.1.3), blieb auch die SERCA-Aktivität unverändert.

3.1.2 Die Post-Pausen-Beziehung

Die Post-Pausen-Beziehung lässt indirekt Rückschlüsse auf den SR Ca²⁺-Gehalt der Myozyte zu (BERS, 2001). Zur Bestimmung wurde bei einer Frequenz von einem Hz unter Gleichgewichtsbedingungen die Stimulation für eine bestimmte Zeit (zehn und 30 Sekunden) ausgesetzt. Anschließend wurden die Kontraktionen unter Gleichgewichtsbedingungen vor und nach der Pause verglichen.

Nach der Pause fiel die Kontraktion immer etwas geringer aus als unter Gleichgewichtsbedingungen, die Länge der Pause war dabei nicht maßgeblich. Für die Kontrollgruppe waren die Unterschiede jedoch in keinem Fall von statistischer Bedeutung. Bei den CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten dagegen war der Unterschied zwischen der Gleichgewichts-Kontraktion und der Kontraktion nach 30 Sekunden Pause signifikant (ungepaarter t-Test) (s. Abb. 3.3). Dieses deutet darauf hin, dass während der Pause in den CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten das SR Ca²⁺ verliert und der SR Ca²⁺-Gehalt geringer ist als in der Kontrollgruppe.

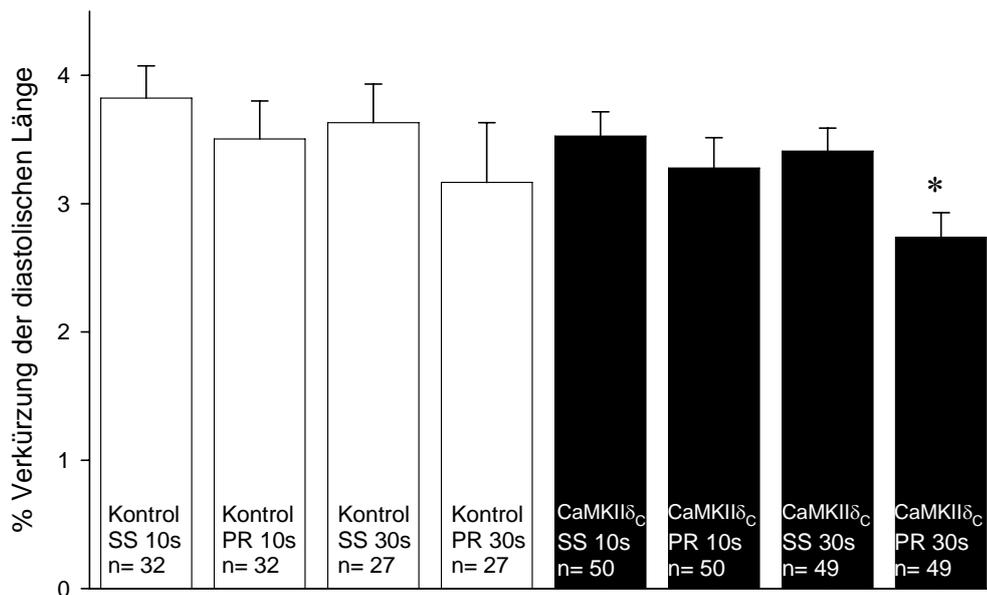


Abbildung 3.3: Post-Pausen-Beziehung

Dargestellt sind die Mittelwerte der Kontraktilitätsmessung jeweils vor (SS) und nach der Pause (PR), die Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer der Pause zwischen den beiden miteinander verglichenen Kontraktionen. * = $p < 0,05$ bestimmt mittels t-Test für CaMKII δ_C SS 30s und PR 30s.

3.1.3 SR Ca²⁺-Gehalt und NCX-Aktivität

Für eine direkte Untersuchung des SR Ca²⁺-Gehaltes wurde Koffein verwendet. Koffein bindet reversibel an den RyR und veranlasst dadurch eine Öffnung desselben, was zur Ausschüttung des gesamten Ca²⁺ des SR ins Zytosol führt. Um den SR Ca²⁺-Gehalt einer Myozyte zu ermitteln, wurde mit einer Frequenz von einem Hz stimuliert, die Stimulation für eine Sekunde unterbrochen und unmittelbar eine Koffein-Lösung auf die Zelle geleitet. Die Stimulation wurde erst bei vollständiger Relaxation der Myozyte wieder eingeschaltet.

Der Koffein-induzierte Ca²⁺-Transient in den CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten war signifikant geringer als der in der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.4). Das ließ eindeutig den Rückschluss zu, dass der SR Ca²⁺-Gehalt in den CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten geringer war als in der Kontrollgruppe.

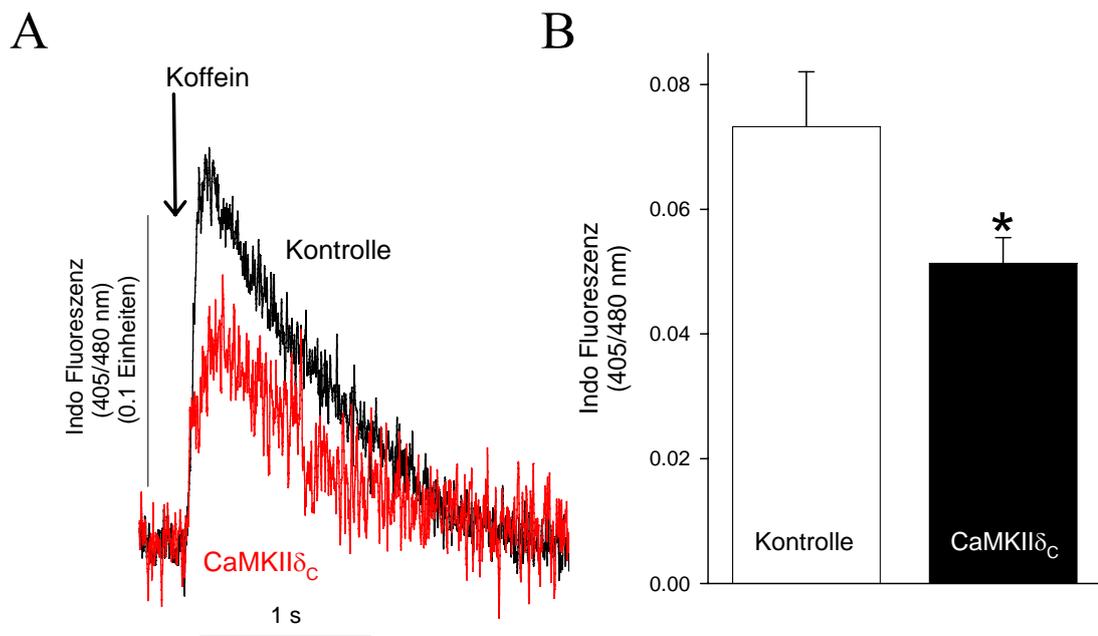


Abbildung 3.4: SR Ca^{2+} -Gehalt

A: Repräsentative Ca^{2+} -Transienten nach Koffein-Stimulation einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz) und einer $\text{CaMKII}\delta_C$ -überexprimierenden Myozyte (rot); B: Mittelwerte der Amplituden der Koffein-stimulierten Ca^{2+} -Transienten von Kontrollgruppe (n= 43) und $\text{CaMKII}\delta_C$ -überexprimierenden Myozyten (n= 31) * = $p < 0,05$ bestimmt mittels t-Test für $\text{CaMKII}\delta_C$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der Ca^{2+} -Rückgang nach einem Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten beruht zu 100% auf der NCX-Funktion. Die SERCA-Aktivität bleibt zwar unbeeinflusst durch das Koffein. Durch den in Anwesenheit von Koffein ständig offenen RyR gelangt jedoch das durch die SERCA ins SR beförderte Ca^{2+} direkt wieder zurück in das Zytosol. Somit ist der Relaxationsparameter RT 50% des Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten ein guter Indikator für die NCX-Aktivität.

Der Relaxationsparameter RT 50% der $\text{CaMKII}\delta_C$ -überexprimierenden Myozyten war identisch mit dem der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.5). Daher konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die NCX-Funktion keiner Regulation durch die $\text{CaMKII}\delta_C$ unterliegt.

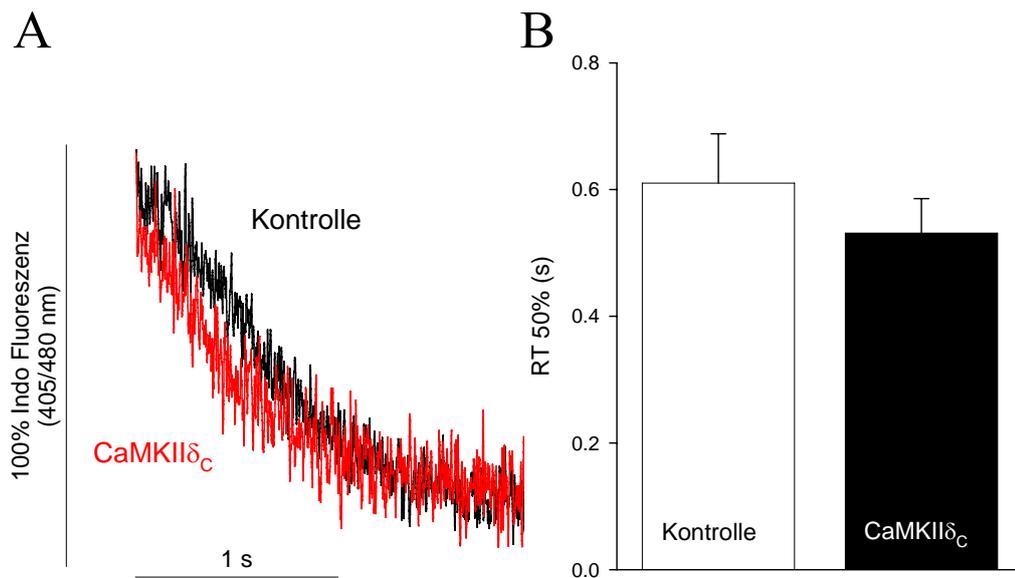


Abbildung 3.5: Der Relaxationsparameter $\text{RT}_{50\%}$ als Indikator für die NCX-Funktion

A: Ca^{2+} -Rückgang nach Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz) und $\text{CaMKII}\delta_C$ -überexprimierenden Myozyte (rot); B: Mittelwerte der $\text{RT}_{50\%}$ Bestimmung der Kontrollgruppe (n= 39) und von $\text{CaMKII}\delta_C$ -überexprimierenden Myozyten (n= 31).

3.1.4 L-Typ Ca^{2+} -Einstrom

Zur genaueren Betrachtung des Ca^{2+} -Stoffwechsels in der Kardiomyozyte wurde mittels der „Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik“ der Ca^{2+} -Einstrom über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal gemessen. Dafür wurden drei Protokolle zur Charakterisierung des Ca^{2+} -Einstroms verwendet: die Strom-Spannungs-Beziehung (IV-Protokoll), das Facilitations- und das Reaktivierbarkeits-Protokoll.

Mit dem IV-Protokoll wurde der Ca^{2+} -Einstrom bei vorgegebenem Membranpotential gemessen. Dabei wurde ausgehend von -90 mV zunächst der Na^+ -Kanal durch eine Polarisierung der Membran auf -45 mV für 50 ms inaktiviert. Anschließend folgte der eigentliche Messimpuls von -40 bis $+80$ mV schrittweise steigend mit jedem Puls, für jeweils 200 ms. Zum Schluss wurde das Membranpotential jeweils wieder auf -90 mV eingestellt. Dadurch konnte das Strom-Spannungs-Verhältnis des Ca^{2+} -Einstroms über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal bestimmt werden.

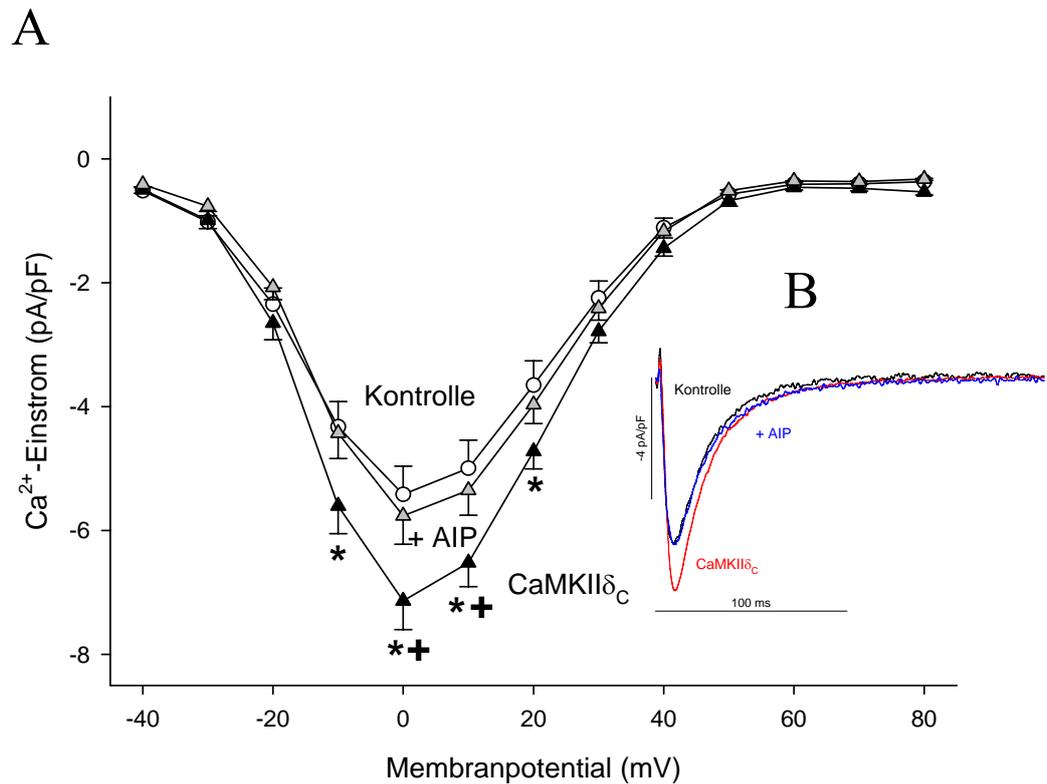


Abbildung 3.6: Strom-Spannungs (IV)-Verhältnis des L-Typ Ca²⁺-Kanals bei der Kontrollgruppe, CaMKIIδ_C-überexprimierenden Kaninchenmyozyten mit und ohne CaMKII-Inhibitor AIP

A: Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des Ca²⁺-Einstroms über den L-Typ Ca²⁺-Kanal von Kontrollgruppe (n= zwölf), CaMKIIδ_C-überexprimierenden Myozyten ohne (n= elf) und mit dem CaMKII-Inhibitor AIP (n= 13); B: Original-Registrierungen des Ca²⁺-Einstroms bei 0 mV einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz), einer CaMKIIδ_C-überexprimierenden Myozyte ohne (rot) und mit AIP (blau); Statistische Untersuchungen mittels Zwei-Wege-ANOVA-Test ergaben jeweils einen signifikanten Unterschied von CaMKIIδ_C-überexprimierenden Myozyten zu den beiden anderen Gruppen. Zusätzlich zeigte der t-Test für die markierten Datenpunkte signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (*) und zu +AIP (+).

Die Amplitude des Ca²⁺-Einstroms bei CaMKIIδ_C-überexprimierenden Kaninchenmyozyten war signifikant verstärkt im Vergleich zu den Kontrollmyozyten, die das Protein β-Gal (LacZ) überexprimierten (s. Abb. 3.6).

Durch den CaMKIIδ_C-Inhibitor AIP konnte der Ca²⁺-Einstrom bei CaMKIIδ_C-überexprimierenden Kaninchenmyozyten signifikant auf das Kontrollniveau reduziert werden.

Die Ergebnisse ließen die Folgerung zu, dass bei der Verstärkung des Ca²⁺-Einstroms über den L-Typ Ca²⁺-Kanal eine CaMKIIδ_C-Abhängigkeit besteht.

Mittels einer biexponentiellen Funktion konnte die Inaktivierung des Ca^{2+} -Einstroms bestimmt werden. Dafür wurde im Programm Clampfit 8.1 von Axon Instruments Inc. ein biexponentieller Fit an den abfallenden Bereich des Ca^{2+} -Einstroms angelegt. Die daraus resultierenden Parameter τ_1 und τ_2 waren ein Maß für die Inaktivierung, bei größeren τ -Werten verlief die Inaktivierung zunehmend langsamer. Die Inaktivierung zusammen mit der Amplitude ließen Rückschlüsse auf die Menge des eingeströmten Ca^{2+} zu.

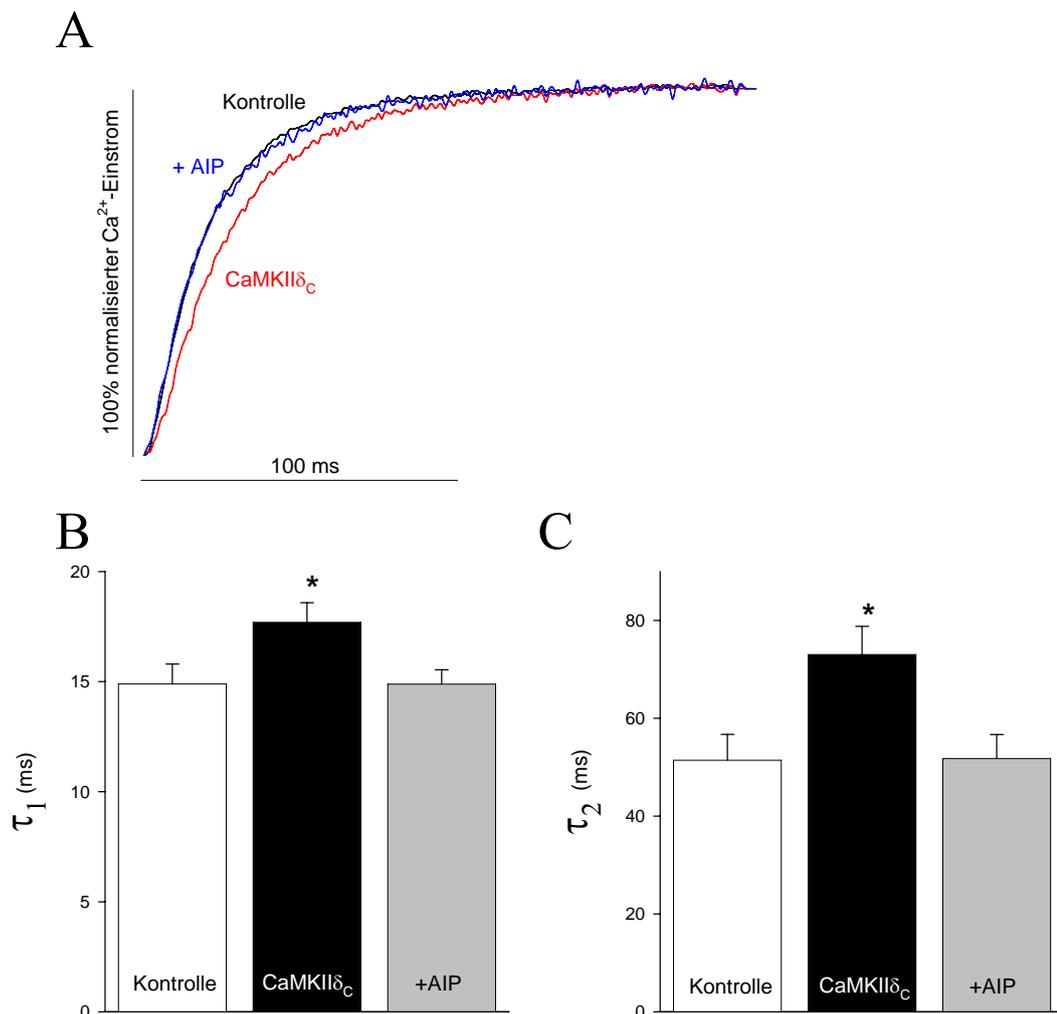


Abbildung 3.7: Inaktivierungsparameter τ_1 und τ_2 des Ca^{2+} -Einstroms

A: Vergleich von Original-Registrierungen normalisiert auf den maximalen Ca^{2+} -Einstrom einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz), einer CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyte ohne (rot) und mit CaMKII-Inhibitor AIP (blau); B: Mittelwerte der Bestimmung von τ_1 und C: Mittelwerte der Bestimmungen von τ_2 der Kontrollgruppe (n= zehn), von CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten ohne (n= elf) und mit AIP (n= 13);

Die Parameter τ_1 und τ_2 bei CaMKII δ_C -überexprimierenden Kaninchenmyozyten in normierten Original-Registrierungen (A) und in den Mittelwerten (B & C) waren signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollmyozyten (s. Abb. 3.7). Durch Behandlung mit AIP konnten beide Inaktivierungsparameter auf das Kontrollniveau zurückgeführt werden. D.h., die Inaktivierung war unter dem Einfluss von CaMKII δ_C signifikant verlangsamt. Zusammengenommen mit der verstärkten Amplitude zeigten die Ergebnisse einen deutlich vergrößerten Ca²⁺-Einstrom die in die Zelle an.

Mit dem Facilitations-Protokoll wurde das Verhalten des repetitiven Ca²⁺-Einstroms in Abhängigkeit von der Zeit gemessen, es ließ Rückschlüsse auf eventuelle Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen des L-Typ Ca²⁺-Kanals zu. Auch hier wurde von -90 mV ausgehend zunächst der Na⁺-Kanal inaktiviert, anschließend folgte eine Depolarisation auf 0 mV für 200 ms. Zum Schluss wurde das Membranpotential wieder auf -90 mV eingestellt. Das gesamte Protokoll wurde mit einer Frequenz von einem Hertz (Hz) ca. zehnmal wiederholt. Die einzelnen Ca²⁺-Einströme wurden jeweils auf den ersten Ca²⁺-Einstrom normiert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Vor jeder Messung wurde die Myozyte für einen Zeitraum von fünf Minuten nicht depolarisiert.

Abbildung 3.8 zeigt die Original-Registrierungen der Kontrollgruppe (A) und CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten (B) und den Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen (C). Es ist deutlich zu erkennen, dass es unter Einfluß von CaMKII δ_C zu einer stärkeren Facilitation kam als bei der Kontrollgruppe. Allerdings ist auch in der Kontrollgruppe eine Facilitation zu sehen, was wahrscheinlich auf einer Aktivität der endogenen CaMKII beruht. Allerdings ergab die statistische Untersuchung mittels Zwei-Wege-ANOVA keine signifikanten Unterschiede.

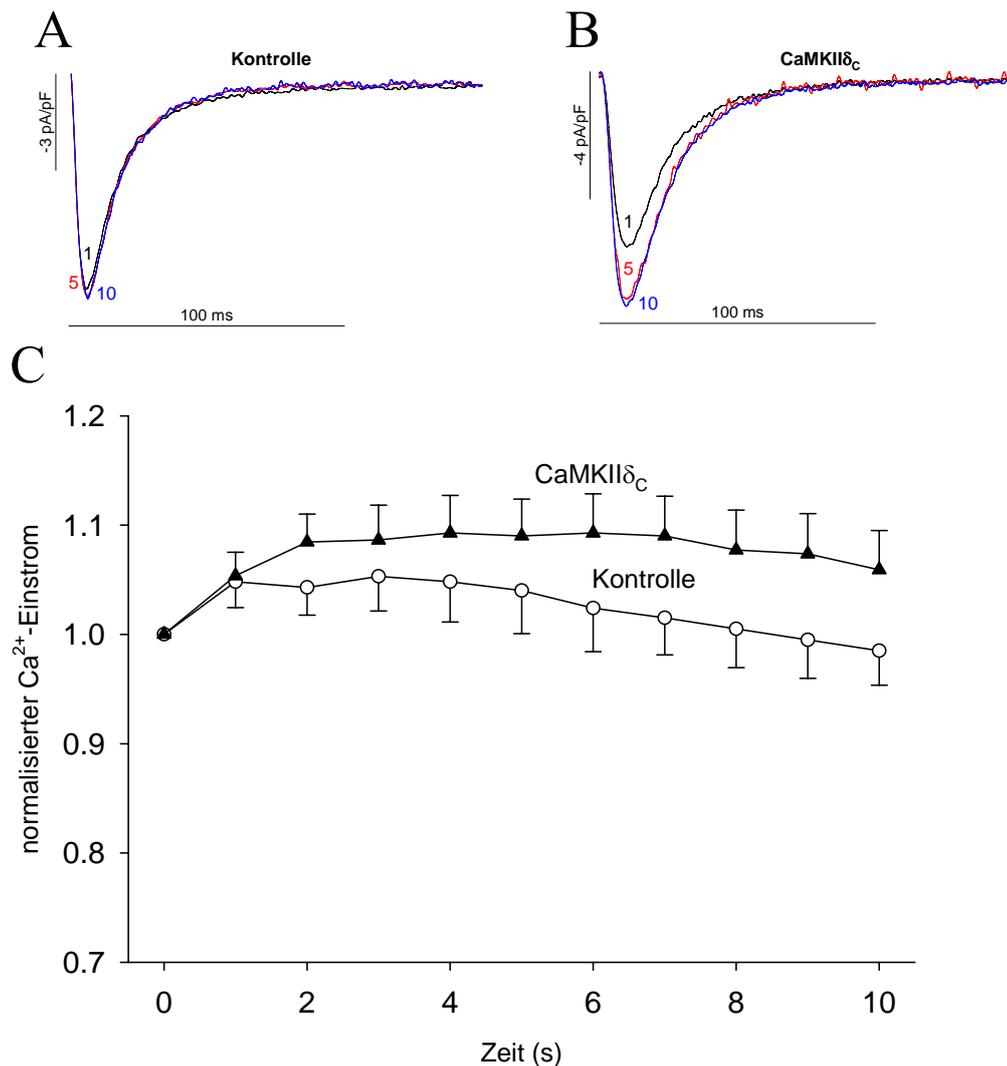


Abbildung 3.8: Facilitation des Ca^{2+} -Einstroms über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal

A: Repräsentative Original-Registrierungen des ersten, fünften und zehnten Ca^{2+} -Einstroms einer Myozyte aus der Kontrollgruppe; B: Repräsentative Original-Registrierung von einer CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyte; C: Vergleich der Mittelwerte der normalisierten Ca^{2+} -Eindröme von Kontrollgruppe (n= zehn) und der CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten (n= elf).

Sowohl in den CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten als auch unter der Kontrollgruppe blieb die Facilitation unter einer CaMKII δ_C -Blockade (durch Zugabe von KN93) aus (s. Abb. 3.9).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CaMKII δ_C durch Phosphorylierung den L-Typ Ca^{2+} -Kanal aktiviert, was einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom bewirkt.

Dieser vergrößerte Ca^{2+} -Einstrom ist durch eine $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -Blockade vollständig aufhebbar. Somit ist die $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ von essentieller Bedeutung für die Facilitation.

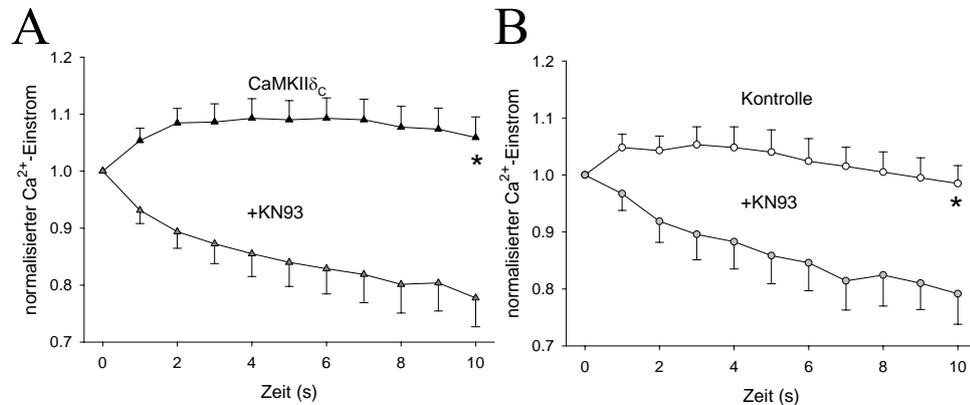


Abbildung 3.9: Einfluss von KN93 als $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -Inhibitor auf die Facilitation

A: Vergleich der Mittelwerte des normalisierten Ca^{2+} -Einstroms von $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -überexprimierenden Myozyten mit ($n=$ acht) und ohne KN93 ($n=$ elf); B: Vergleich der Mittelwerte des normalisierten Ca^{2+} -Einstroms der Kontrollgruppe mit ($n=$ sieben) und ohne KN93 ($n=$ zehn). Die Unterschiede sind jeweils signifikant (*).

Das Reaktivierbarkeits-Protokoll untersucht die Verfügbarkeit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals nach einer vorangegangenen Aktivierung bei unterschiedlichen Membranpotentialen. Dieser Vorgang besteht aus einem Konditionierungsimpuls, der ausgehend von -60 mV pro Durchgang um zehn mV erhöht wird (bis $+60$ mV) und zwei s dauert, und einem Messimpuls, der für 200 ms konstant bei 0 mV bleibt. Auch dieser Versuch startet und endet bei einem Membranpotential von -90 mV. Vor dem Messimpuls werden erneut die Na^{+} -Kanäle durch eine Polarisierung der Membran für zehn ms auf -45 mV inaktiviert.

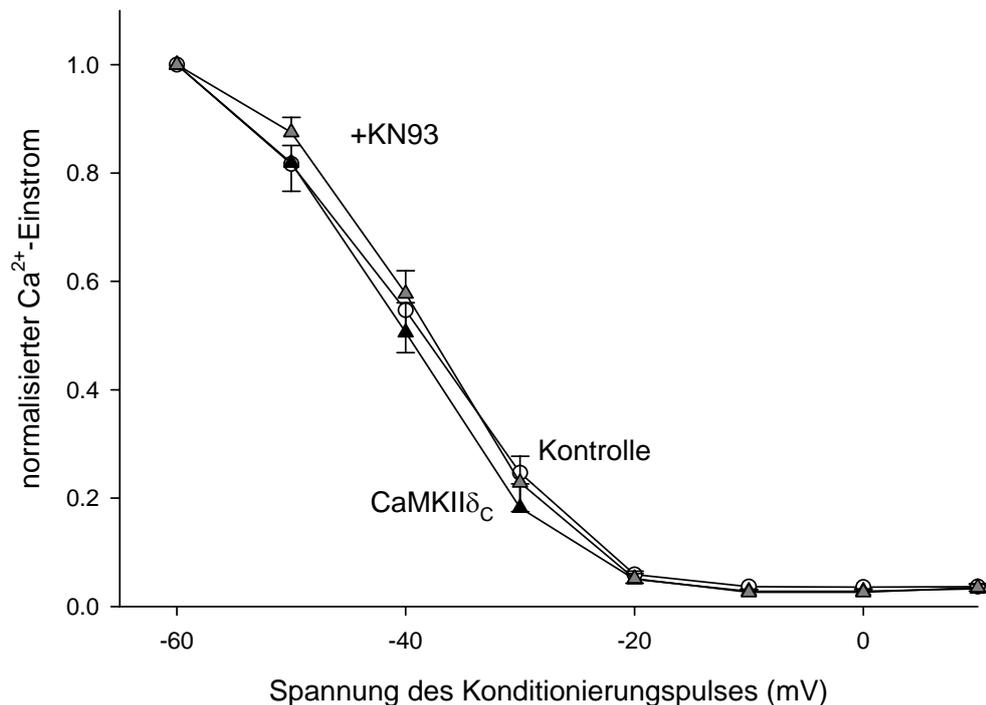


Abbildung 3.10: Verfügbarkeit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals

Mittelwerte der normierten Ca^{2+} -Einströme des Verfügbarkeitsprotokolls der Kontrollgruppe (Kreis; n= neun), von CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten mit (graues Dreieck; n= elf) und ohne KN93 (schwarzes Dreieck; n= zehn).

Die Kurvenverläufe der Messwerte der Kontrollgruppe und der CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten mit und ohne Zugabe von KN93 sind praktisch identisch (s. Abb. 3.10).

Das lässt den Schluss zu, dass die CaMKII δ_C keinen Einfluss auf die Verfügbarkeit bzw. auf die Reaktivierung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals besitzt.

3.1.5 Die unstimulierten SR Ca^{2+} -Entladungen (Ca^{2+} -Sparks)

Einen weiteren wichtigen Faktor im Ca^{2+} -Stoffwechsel der Myozyte stellt das SR mit den beiden wichtigen Kanalproteinen SERCA und RyR dar. Der SR Ca^{2+} -Gehalt der CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten ist signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (s. Abschnitt 3.1.2). Außerdem belegen die Experimente eine unveränderte SERCA-Aktivität. Daher wurde die Funktion des RyR mittels konfokaler Laser-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dafür wurden die Myozyten mit dem Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff (Fluo4, AM) beladen. Da die Kaninchenmyozyten unter normalen Bedingungen sehr wenige Ca^{2+} -Sparks

zeigten, wurden die Messungen in Gegenwart von Isoprenalin (zehn nM) durchgeführt. Die Line-Scans am Laserkonfokalmikroskop wurden unter konstanten Parametern (s. Abschnitt 2.6) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei RT und mit einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz, gefolgt von einer Pause von drei Sekunden. Die Auswertung der Line-Scans erfolgte wie unter Abschnitt 2.7 beschrieben.

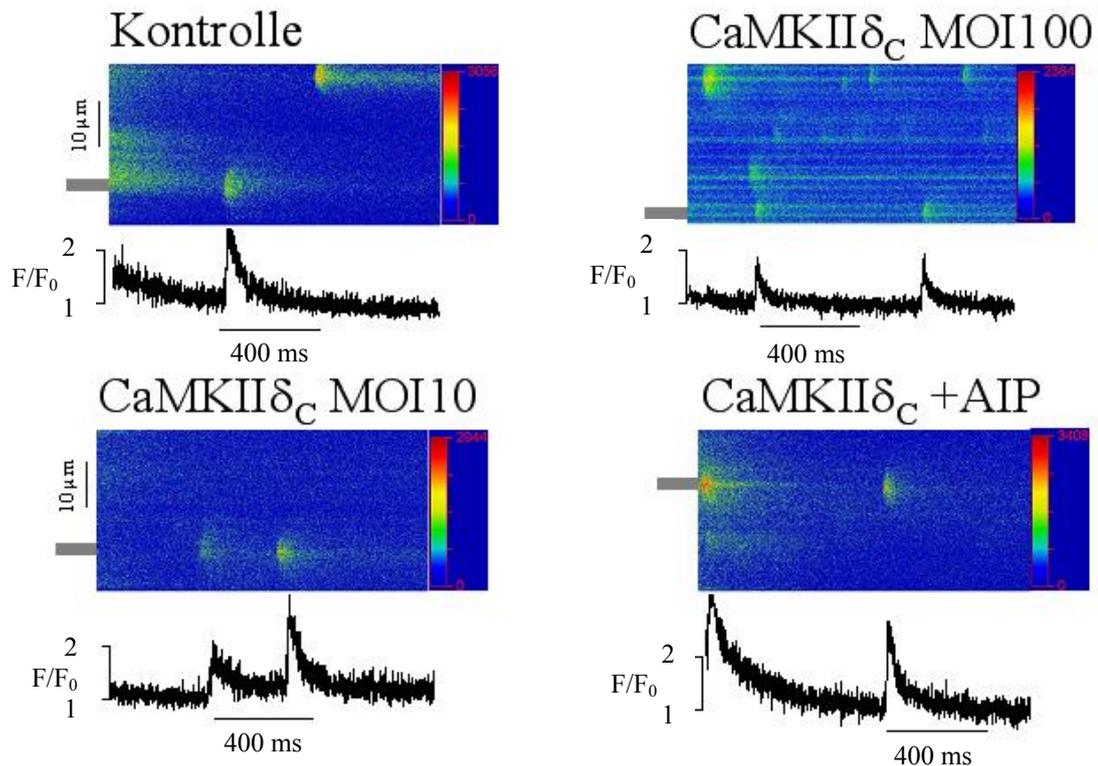


Abbildung 3.11: Ausschnitte aus den Original-Line-Scans

Dargestellt sind jeweils Ausschnitte aus Original-Line-Scans. Die grauen Balken vor den Line-Scans zeigen, aus welcher Region die Spark-Kurven (schwarz) gemittelt wurden. Die Farbpalette rechts neben jedem Line-Scan übersetzt die Farbkodierung in die gemessenen Intensitäten des Fluoreszenzsignals.

Die Ausschnitte der Original-Line-Scans zeigen, dass bei der Kontrollgruppe nur eine geringe Anzahl von Ca^{2+} -Sparks zu erkennen ist im Vergleich zu den $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -überexprimierenden Myozyten (MOI 100) (s. Abb. 3.11). Die aus den Line-Scans resultierenden Ca^{2+} -Spark-Kurven zeigen außerdem deutlich, dass die Ca^{2+} -Sparks unterschiedliche Amplituden aufweisen. Die Original-Line-Scans der $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -überexprimierenden Myozyten (MOI 10) und $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -über-

expremierenden Myozyten (MOI 100) unter CaMKII-Inhibition mittels AIP zeigen keine messbaren Unterschiede zur Kontrollgruppe.

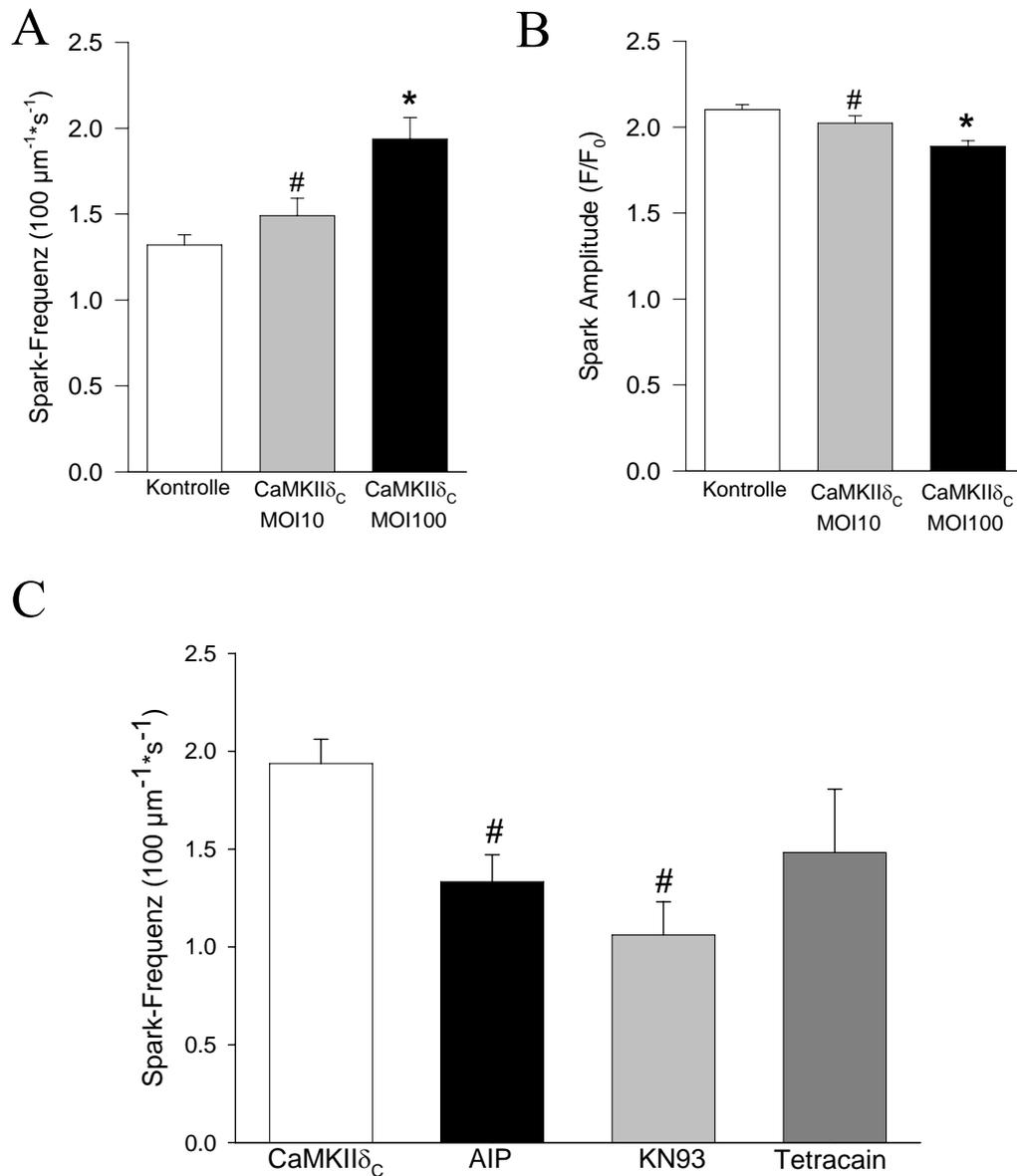


Abbildung 3.12: Frequenzen und Amplituden der Ca^{2+} -Spark-Messungen

A: Mittelwerte der Spark-Frequenzen der Kontrollgruppe ($n= 168$), von CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten MOI10 ($n= 75$) und MOI100 ($n= 112$); B: Mittelwerte der Amplituden der gemessenen Ca^{2+} -Sparks der Kontrollgruppe ($n= 279$), von CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten MOI10 ($n= 145$) bzw. MOI100 ($n= 273$); C: Vergleich der Ca^{2+} -Spark-Frequenzen von CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten MOI100, mit AIP ($n= 48$), mit KN93 ($n= 16$) und mit Tetracain ($n= \text{sechs}$). * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe; # = $p < 0,05$ im Vergleich zu CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten, jeweils bestimmt mittels t-Test.

Die statistische Auswertung der Line-Scans zeigte einen signifikanten Anstieg der Ca^{2+} -Spark-Frequenz in CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten (MOI 100) im Vergleich zur Kontrollgruppe und im Vergleich zu einer reduzierten CaMKII δ_C -Transfektionsrate (MOI 10) (s. Abb. 3.12). Letztere wiesen nur eine geringfügig höhere Ca^{2+} -Spark-Frequenz als die Kontrollgruppe auf. Dieses Ergebnis wurde durch einen ungepaarten t-Test bestätigt. Die Amplitude der Ca^{2+} -Sparks verhielt sich entgegengesetzt zur Frequenz. Unter starker CaMKII δ_C -Wirkung (MOI 100) war diese signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe und im Vergleich zur reduzierten CaMKII δ_C -Transfektionsrate (MOI 10). Die Amplitude der Ca^{2+} -Sparks in der CaMKII δ_C MOI 10 Gruppe war nur geringfügig niedriger als die der Kontrollgruppe. Auch dieses Ergebnis wurde mittels eines ungepaartem t-Tests bestätigt. Unter Blockade der CaMKII δ_C (hier MOI 100) durch AIP und KN93 konnte die Ca^{2+} -Spark-Frequenz in signifikantem Maß reduziert werden. Die Untersuchungen der Ca^{2+} -Spark-Frequenz mit Tetracain (ein mM) erwiesen sich als kompliziert, da die Anzahl der Ca^{2+} -Sparks-zeigenden Myozyten deutlich geringer ausfiel. Allerdings zeigte sich auch hier eine Reduzierung der Ca^{2+} -Spark-Frequenz, aufgrund der geringen Anzahl an Myozyten mit Ca^{2+} -Sparks zeigte der ungepaarte t-Test jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Daher wurde der Versuchsaufbau ähnlich dem von SHANNON et. al. (2002) gewählt und die Veränderung der diastolischen Ca^{2+} -Fluoreszenz als ein Maß benutzt, um die Reduzierung der Ca^{2+} -Spark-Frequenz zu verdeutlichen.

Die Original-Registrierung (A) zeigt deutlich, dass die diastolische Ca^{2+} -Fluoreszenz unter Einfluss von Tetracain, einem RyR-Inhibitor, deutlich absank. Die Mittelwerte (B) der nach 30 Sekunden Einwirkzeit gemessenen diastolischen Ca^{2+} -Fluoreszenz waren sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten signifikant geringer unter Tetracain-Einfluss als ohne Tetracain (s. Abb. 3.13). Diese Ergebnisse wurden durch einen ungepaarten t-Test bestätigt. Ebenso zeigt die Original-Registrierung einen Tetracain-Einfluss auf den SR Ca^{2+} -Gehalt. Da weniger Ca^{2+} aus dem SR ins Zytoplasma gelangte, war der SR Ca^{2+} -Gehalt tetracainbedingt gesteigert.

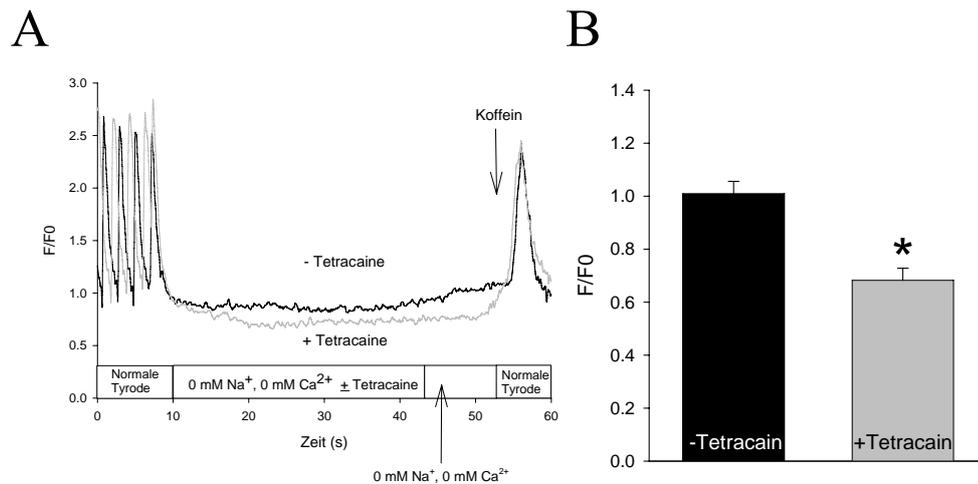


Abbildung 3.13: Tetracain-Experimente

A: Exemplarische Original-Registrierung von einem Experiment mit CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten ohne (schwarz) und mit (grau) Tetracain und anschließendem Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten; B: Mittelwerte der diastolischen Ca²⁺-Konzentration gemessen nach einer Einwirkzeit von 30 Sekunden bei CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten ohne (n= 20) und mit Tetracain (n= 20). * = p < 0,05 im Vergleich zu ohne Tetracain bestimmt mittels t-Test.

3.1.6 Biometrische Daten

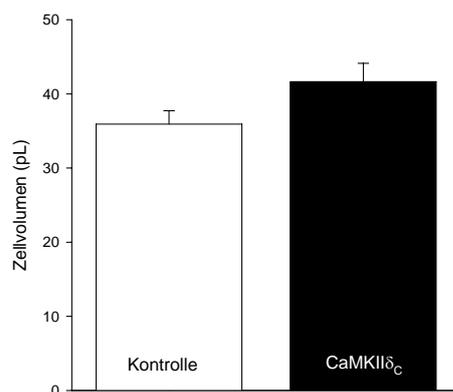


Abbildung 3.14: Zellvolumen von über 24 Stunden kultivierten und transfizierten Myozyten

Für die Kontrollgruppe wurden 154 und für die Gruppe der CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten 66 Myozyten vermessen.

Da es bei transgener chronischer CaMKII δ_C -Überexpression zu einer kardialen Hypertrophie und Dilatation kam, sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft

werden, ob dies bereits nach 24 Stunden CaMKII δ_C -Überexpression auf Zellebene zu beobachten ist. Die Erhebung des Zellvolumens bei den über 24 Stunden kultivierten und transfizierten Myozyten zeigte lediglich eine Tendenz zur Vergrößerung, jedoch keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 3.14).

3.2 Akute adenoviral vermittelte CaMKII δ_B -Überexpression in Kaninchenmyozyten

3.2.1 Die Kontraktions-Frequenz-Beziehung und die intrazellulären Ca²⁺-Transienten

Ebenso wie bei den CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten wurde bei den CaMKII δ_B -überexprimierenden Kardiomyozyten die Kontraktions-Frequenz-Beziehung ermittelt (vergl. Abschnitt 3.1.1). Allerdings erfolgte diese Untersuchung in einer getrennten Serie an Experimenten im Vergleich zur Überexpression der zytolischen CaMKII δ_C .

Sowohl bei den CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten als auch in der Kontrollgruppe kam es nur im Frequenzbereich von 0,5 auf ein Hz zu einer Verstärkung der Verkürzung, bei höheren Frequenzen nahm die Verkürzung der Zellen stark ab (s. Abb. 3.15). Beide Kurven zeigen einen nahezu identischen Verlauf, daher konnten mittels Zwei-Wege-ANOVA-Test keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Amplitude der Ca²⁺-Transienten zeigte bei steigender Stimulationsfrequenz ebenfalls keine Zunahme in beiden Gruppen. Die CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten wiesen dabei eine etwas größere, jedoch nicht signifikante (durch Zwei-Wege-ANOVA-Test ermittelt) Amplitude auf.

Zwischen den beiden Gruppen gab es keine Unterschiede bezüglich der diastolischen Ausgangswerte für die Verkürzung und die Ca²⁺-Transienten.

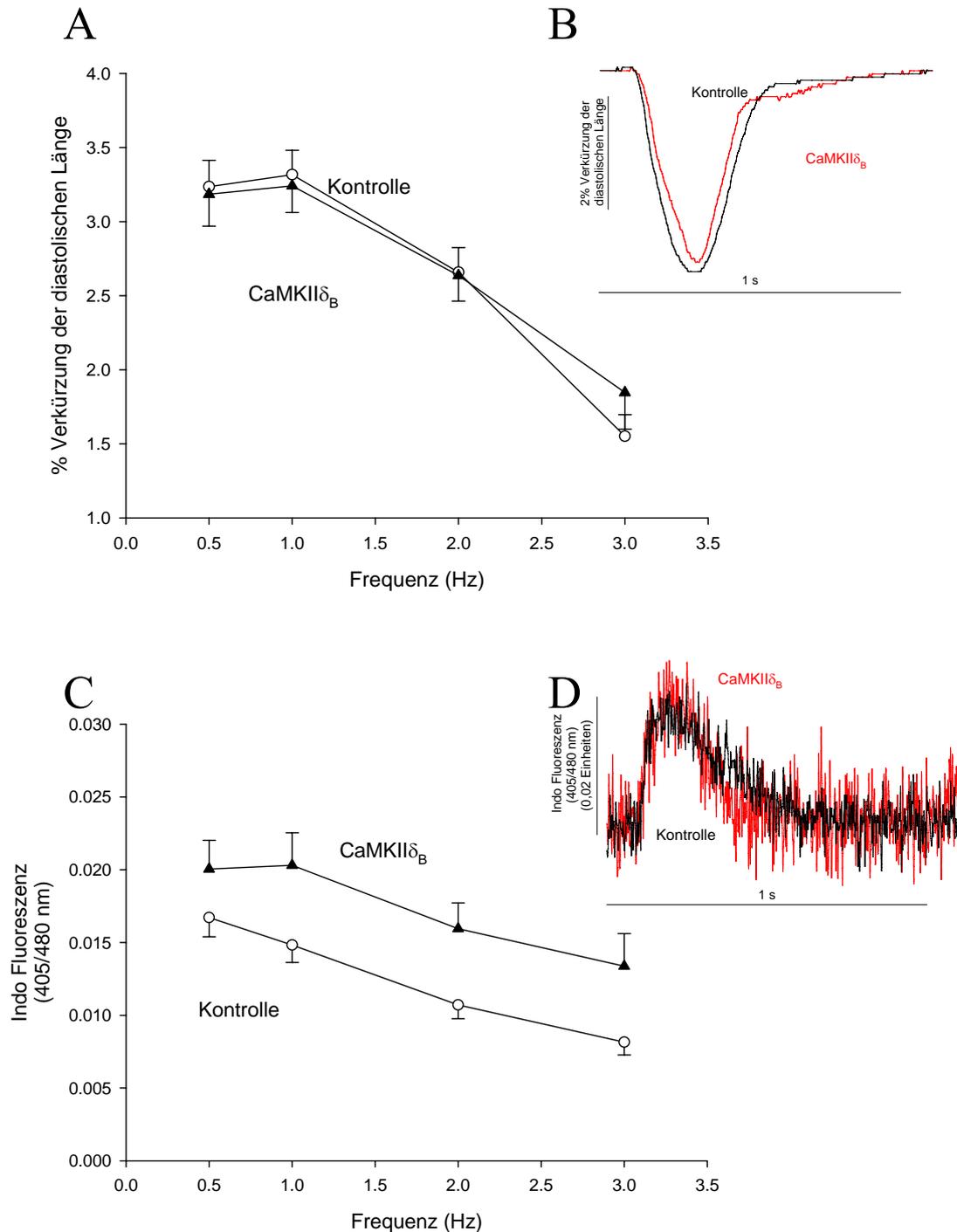


Abbildung 3.15: Frequenz-abhängige Änderung der Kontraktilität und der Ca^{2+} -Transienten

A: Mittelwerte der Kontraktilitätsmessungen der Kontrollgruppe ($n=44$ bei einem Hz) und von CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten ($n=41$ bei einem Hz); B: repräsentative Original-Kontraktionen einer Myozyte aus der Kontrollgruppe (schwarz) und einer CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyte (rot); C: Mittelwerte der intrazellulären Ca^{2+} -Amplitudenmessung der Kontrollgruppe ($n=42$ bei einem Hz) und von CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten ($n=36$ bei einem Hz); D: repräsentative Original- Ca^{2+} -Transienten mit Indo1,AM einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz) und einer CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten (rot).

Auch bei den CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten wurde die Relaxation als eine Indiz für die SERCA-Aktivität bestimmt. Sowohl bei der Relaxation der Zellverkürzung als auch beim Rückgang der Ca²⁺-Transienten bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten und der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.16).

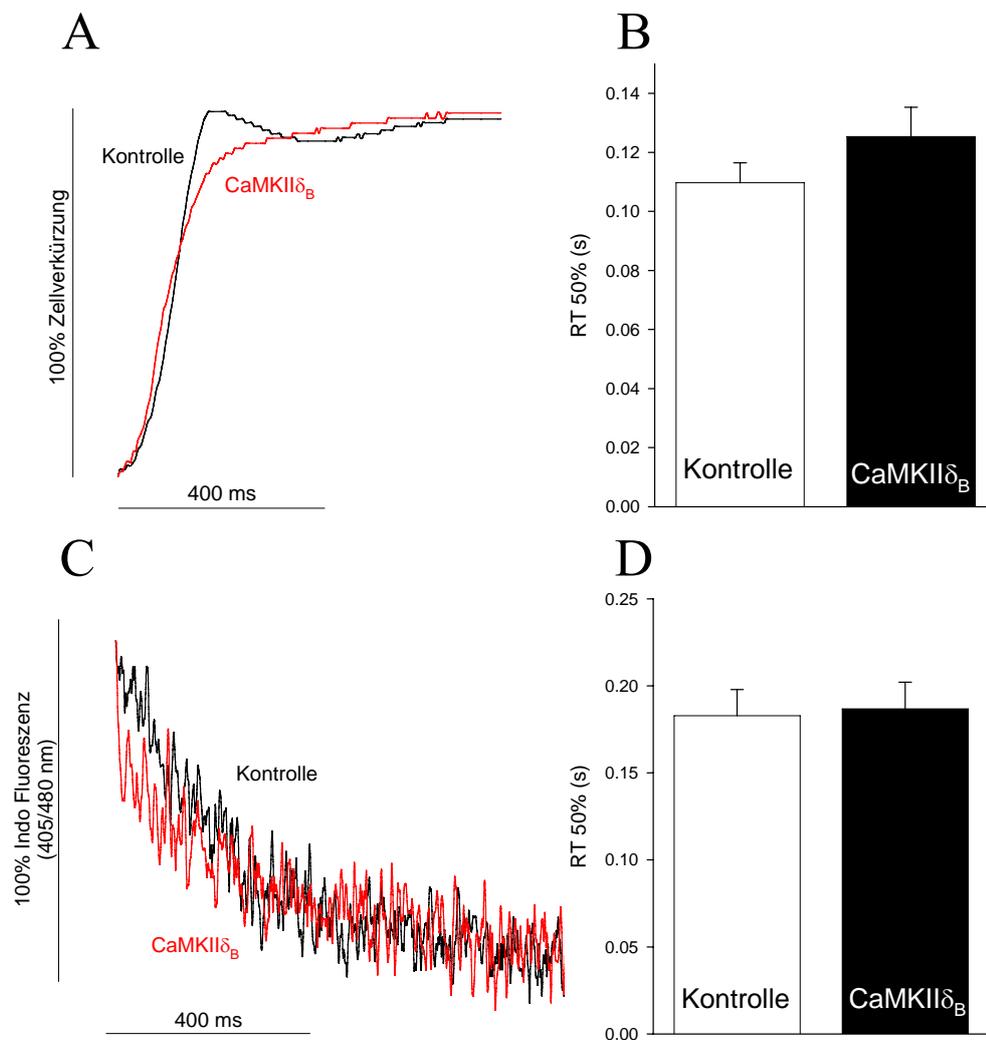


Abbildung 3.16: Relaxationsparameter RT50% der Kontraktilität und Ca²⁺-transienten bei einem Hz

A: Original-Relaxation normiert auf die minimale Zelllänge einer Myozyte aus der Kontrollgruppe (schwarz) und von einer CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyte (rot); B: Mittelwerte der RT50%-Bestimmungen der Kontraktion bei einem Hz der Kontrollgruppe und von CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten; C: Original-Ca²⁺-Rückgang normiert auf das Maximum des Ca²⁺-Transienten einer Myozyte aus der Kontrollgruppe (schwarz) und von einer CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyte (rot), D: Mittelwerte der RT50%-Bestimmungen des Ca²⁺-Rückgangs bei einem Hz der Kontrollgruppe und von CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten.

3.1.2 Die Post-Pausen-Beziehung

Auch für die CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten wurde die Post-Pausen-Beziehung ermittelt, wie unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Post-Pausen-Beziehung (s. Abb. 3.17) deuteten auf einen unveränderten SR Ca²⁺-Gehalt hin, da sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten weder nach der zehn noch nach der 30 Sekunden langen Pause signifikante Reduzierungen der Zellverkürzung festgestellt werden konnten.

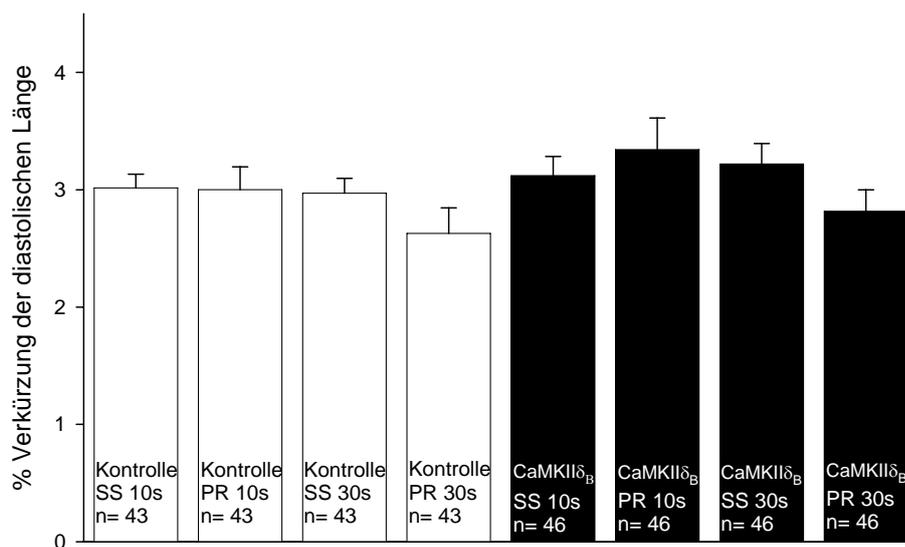


Abbildung 3.17: Die Post-Pausen-Beziehung

Dargestellt sind die Mittelwerte der Kontraktilitätsmessung jeweils vor (SS) und nach der Pause (PR). Die Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer der Pause zwischen den beiden miteinander verglichenen Kontraktionen

3.2.3 SR Ca²⁺-Gehalt und NCX-Aktivität

Analog zu den Untersuchungen an CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten (s. Abschnitt 3.1.3) wurden zur Bestimmung des SR Ca²⁺-Gehaltes und der NCX-Funktion unter CaMKII δ_B -Überexpression Versuche mit Koffein durchgeführt.

Die Amplitude des Koffein-induzierten Ca²⁺-Transitenten war bei der Kontrollgruppe und den CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten nahezu gleich hoch, wie sowohl den Original-Abbildungen (A) als auch den Mittelwerten (B) zu entnehmen ist (s. Abb. 3.18).

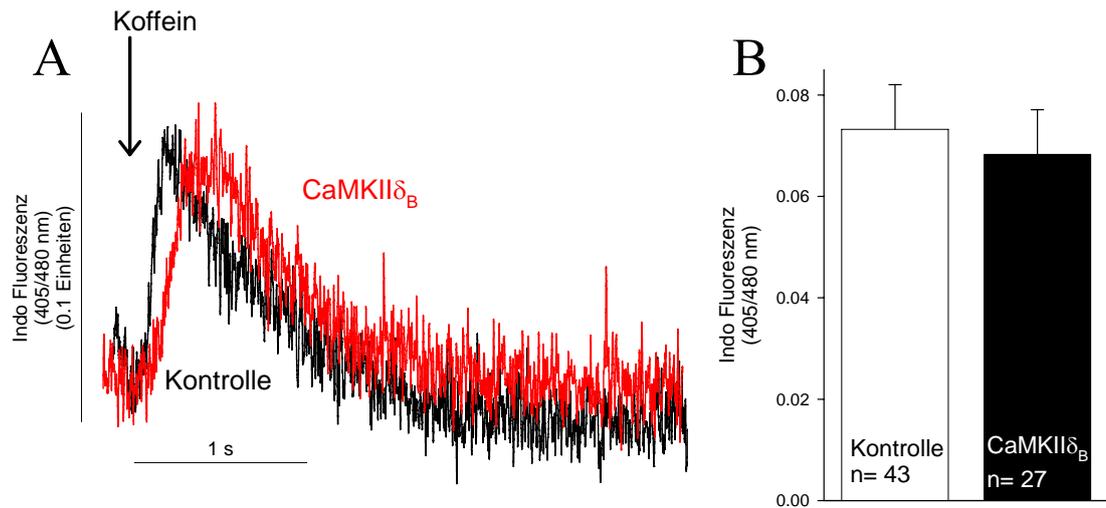


Abbildung 3.18: SR Ca²⁺-Gehalt

A: Repräsentative Ca²⁺-Transienten nach Koffein-Stimulation einer Myozyte aus der Kontrollgruppe (schwarz) und von einer CaMKIIδ_B-überexprimierenden Myozyte (rot); B: Mittelwerte der Amplituden der Koffein-stimulierten Ca²⁺-Transienten der Kontrollgruppe (n= 43) und von CaMKIIδ_B-überexprimierenden Myozyten (n= 27)

Des Weiteren wurde der Relaxationsparameter RT50% als Indikator für die NCX-Funktion bestimmt. Beim Vergleich der Kontrollgruppe und CaMKIIδ_B-überexprimierenden Myozyten fielen sowohl in den normalisierten Original-Registrierungen (A) als auch beim Vergleich der Mittelwerte (B) zwar leichte Unterschiede auf (s. Abb. 3.19), die jedoch kein signifikantes Niveau erreichten, was ein ungepaarter t-Test ergab. Als Ursache ist die große Streuung der Daten anzusehen.

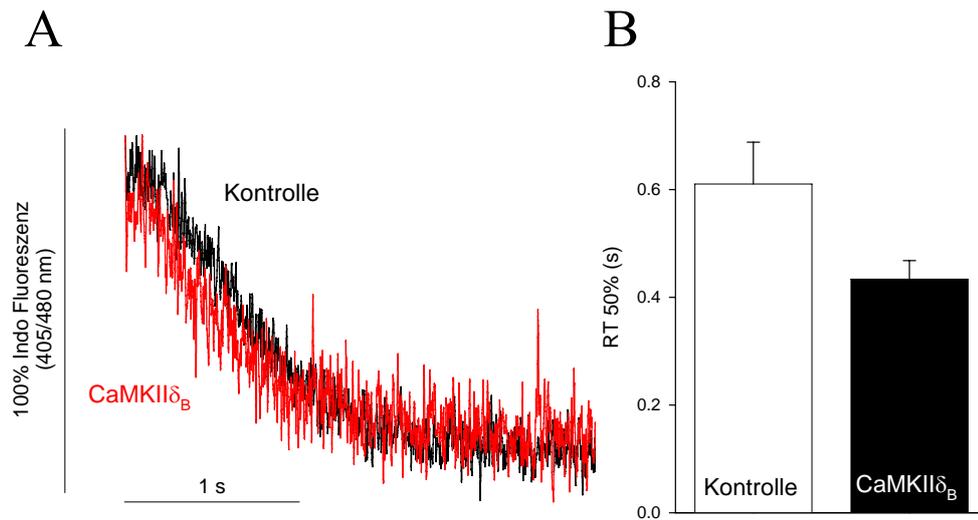


Abbildung 3.19: Relaxationsparameter RT50% als Indikator für die NCX-Funktion

A: Original- Ca^{2+} -Rückgang nach Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten einer Myozyte aus der Kontrollgruppe (schwarz) und einer $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyte (rot); B: Mittelwerte der RT50%-Bestimmung der Kontrollgruppe (n= 39) und von $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten (n= 24).

3.2.4 L-Typ Ca^{2+} -Einstrom

Wie bei den $\text{CaMKII}\delta_C$ -überexprimierenden Myozyten wurden auch bei $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten im Vergleich mit einer Kontrollgruppe von Kaninchenmyozyten, die das β -gal-Protein überexprimieren, jeweils die drei unter Abschnitt 3.1.4 beschriebenen Versuche, das IV-, das Facilitations- und das Reaktivierbarkeits-Protokoll, durchgeführt.

Die $\text{CaMKII}\delta_B$ -Überexpression führte zu einer signifikant verstärkten Amplitude des Ca^{2+} -Einstroms im Vergleich zur Kontrollgruppe, was anhand der Original-Registrierungen (B) und der Mittelwerte (A) erkennbar ist (s. Abb. 3.20). Die statistische Untersuchung mit einem Zwei-Wege-ANOVA-Test ergab signifikant unterschiedliche Kurvenverläufe der Messwerte von $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten und der Kontrollgruppe. Der ungepaarte t-Test zeigte zusätzlich für die Datenpunkte 0 und zehn mV einen signifikanten Unterschied von $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten zur Kontrollgruppe. Durch CaMKII -Blockade mittels KN93 oder AIP kam es zu keiner Reduktion der

Amplitude des Ca^{2+} -Einstroms auf Kontrollniveau. Die statistische Untersuchung mittels Zwei-Wege-ANOVA-Test lieferte keine signifikant unterschiedlichen Kurvenverläufe der Werte von $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten unter Zugabe von AIP oder KN93 im Vergleich zur Kurve der Messwerte unter $\text{CaMKII}\delta_B$ -Überexpression. Außerdem wies der ungepaarte t-Test für die Datenpunkte -10 , 0 , 10 und 20 mV signifikante Unterschiede zwischen $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten mit AIP-Zugabe und der Kontrollgruppe nach.

D.h., dass die verstärkte Amplitude des Ca^{2+} -Stroms durch die $\text{CaMKII}\delta_B$ -Überexpression induziert wurde, im Gegensatz zur $\text{CaMKII}\delta_C$ -Überexpression jedoch nicht akut inhibierbar war.

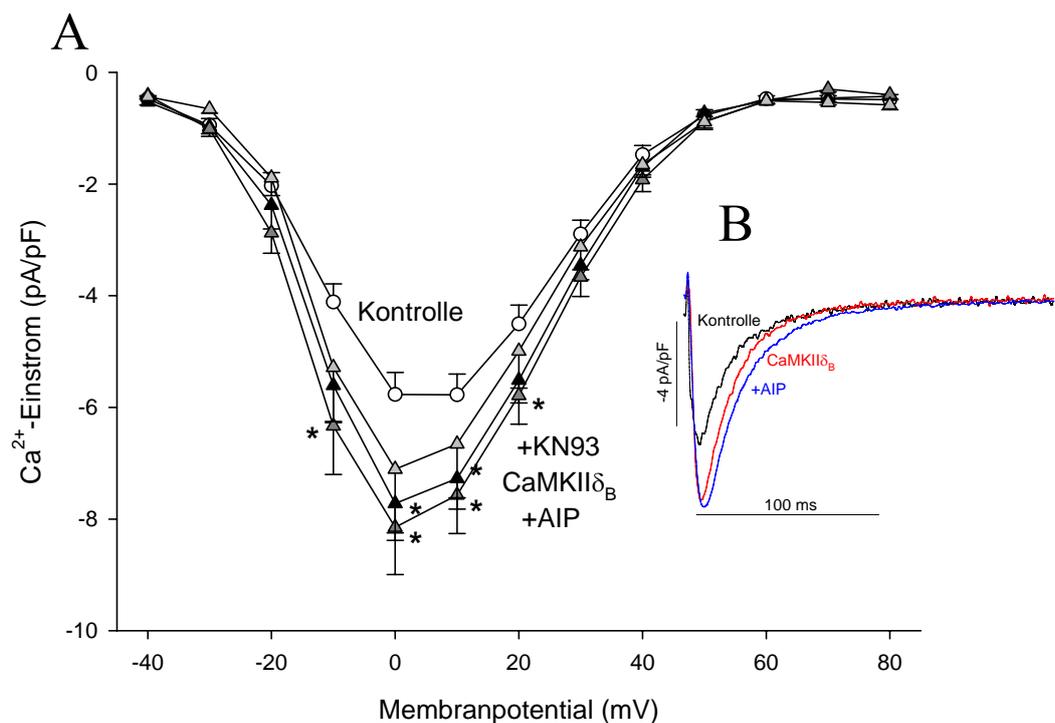


Abbildung 3.20: Strom-Spannungs(IV)-Verhältnis des L-Typ Ca^{2+} -Kanals

A: Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des Ca^{2+} -Einstromes über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal der Kontrollgruppe ($n=14$), von $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten ohne ($n=14$) und mit dem CaMKII -Inhibitor AIP ($n=$ zehn) oder KN93 ($n=$ sieben); B: Original-Registrierungen von Ca^{2+} -Einstromen bei 0 mV aus einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz), von einer $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyte ohne (rot) und mit AIP (blau); (*) markierten Datenpunkte, an denen nach t-Test signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe bestehen.

Die weitere Analyse der Ca^{2+} -Einstromkinetik zeigte, dass die Inaktivierung des Ca^{2+} -Einstroms nicht von der $\text{CaMKII}\delta_B$ beeinflusst wurde (s. Abb. 3.21). Sowohl in der normalisierten Original-Registrierung als auch in den Mittelwerten sind keine Unterschiede zu erkennen. Auch eine Blockade von $\text{CaMKII}\delta_B$ durch KN93 oder AIP zeigte keine Wirkung auf die Inaktivierungsparameter. Die statistischen Untersuchungen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

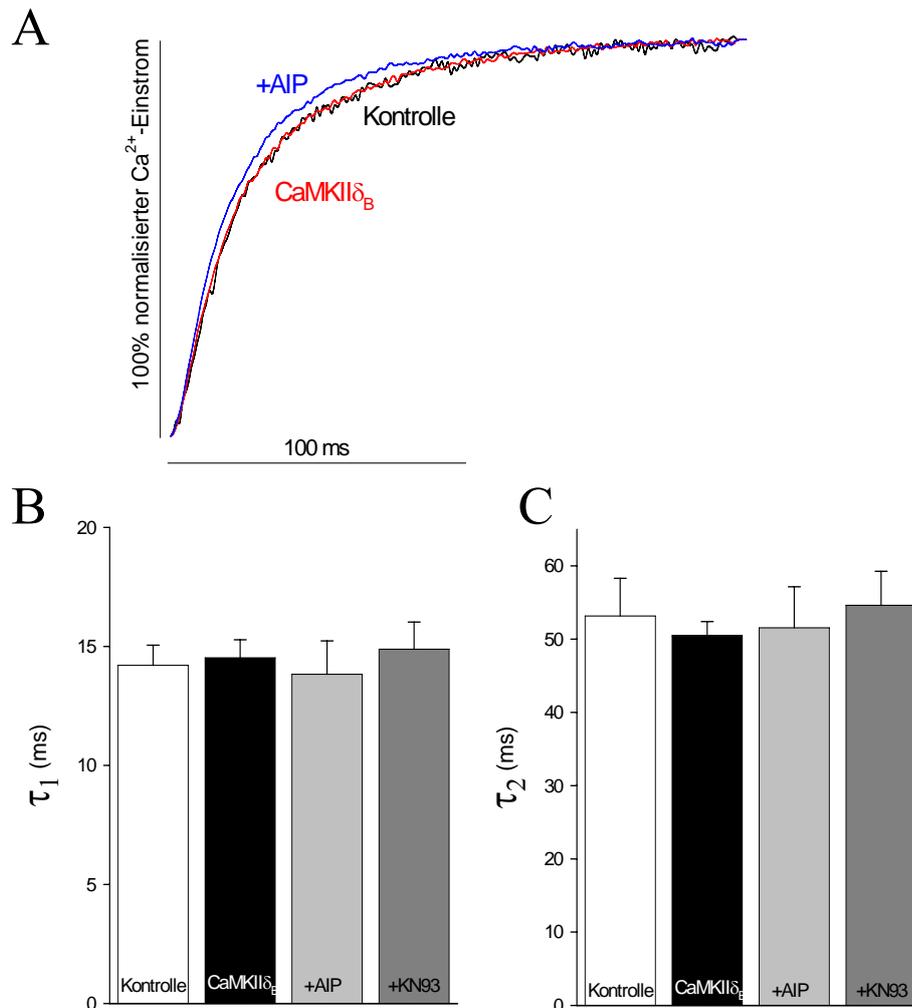


Abbildung 3.21: Inaktivierungsparameter τ_1 und τ_2 des Ca^{2+} -Einstroms

A: Vergleich von Original-Registrierungen normalisiert auf den maximalen Ca^{2+} -Einstrom aus einer Myozyte der Kontrollgruppe (schwarz), einer $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyte ohne (rot) und mit AIP (blau); B: Mittelwerte der Bestimmung von τ_1 und C: Mittelwerte der Bestimmungen von τ_2 der Kontrollgruppe (n= 13); von $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten ohne (n= 14) bzw. mit den $\text{CaMKII}\delta_C$ -Inhibitoren AIP (n= zehn) bzw. KN93 (n= sieben).

Unter dem Einfluss von $\text{CaMKII}\delta_B$ fand im Gegensatz zur Kontrollgruppe keine Facilitation statt (s. Abb. 3.22). Die statistische Untersuchung mit einem Zwei-

Wege-ANOVA-Test wies keinen signifikant unterschiedlichen Verlauf der Kurven der Werte von CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten und denen der Kontrollgruppe nach.

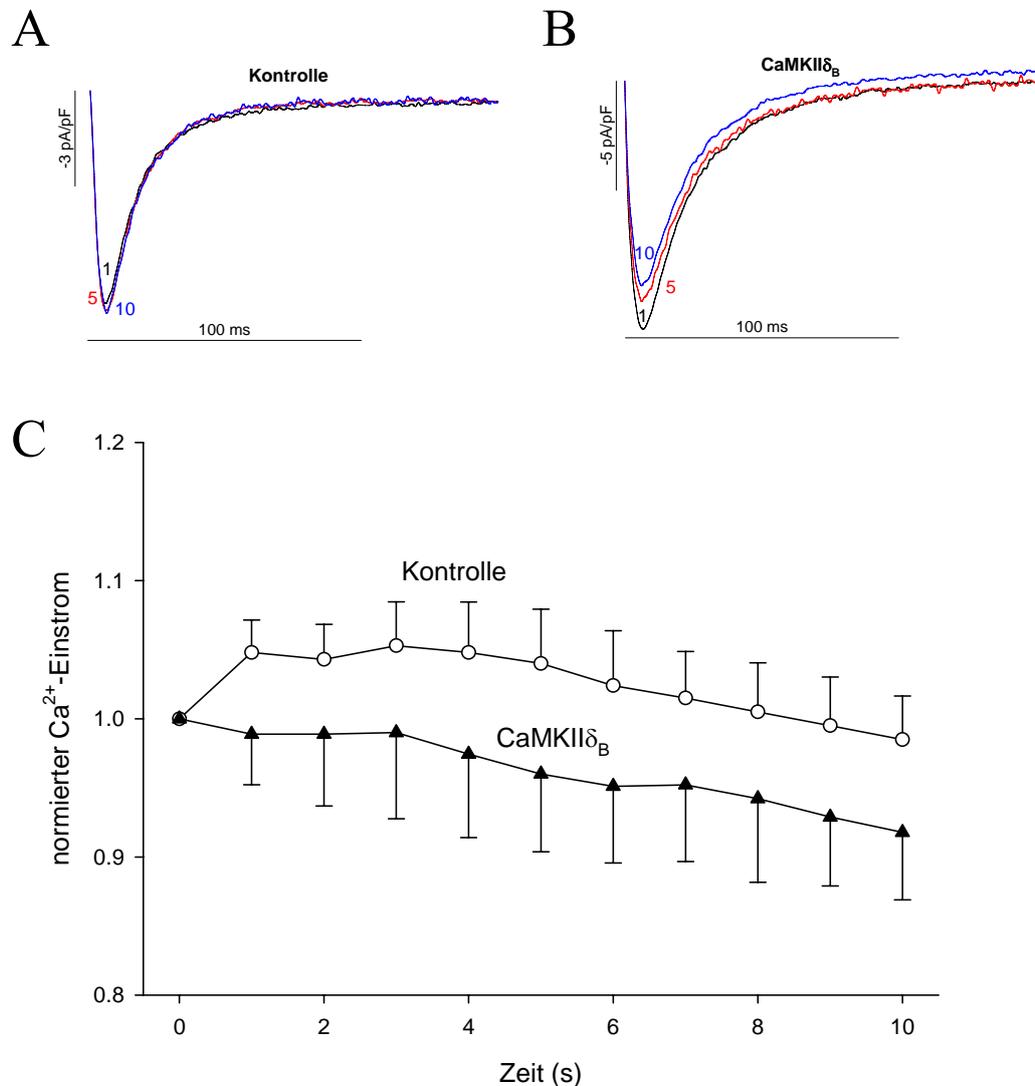


Abbildung 3.22: Facilitation des Ca²⁺-Einstroms über den L-Typ Ca²⁺-Kanal

A: Repräsentative Original-Registrierungen des ersten, fünften und zehnten Ca²⁺-Einstroms einer Myozyte der Kontrollgruppe; B: Repräsentative Original-Registrierung einer CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyte; C: Vergleich der Mittelwerte der normalisierten Ca²⁺-Einstrome der Kontrollgruppe (n= zehn) und von CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten (n= neun).

Die CaMKII δ_B schien keinen Einfluss auf die Reaktivierbarkeit des L-Typ Ca²⁺-Kanals zu besitzen, da die Untersuchungen an CaMKII δ_B -überexprimierenden Myozyten mit bzw. ohne KN93 und der Kontrollgruppe praktisch identische Ergebnisse lieferten (s. Abb. 3.23). Auch die statistische Auswertung zeigte keine signifikanten Unterschiede.

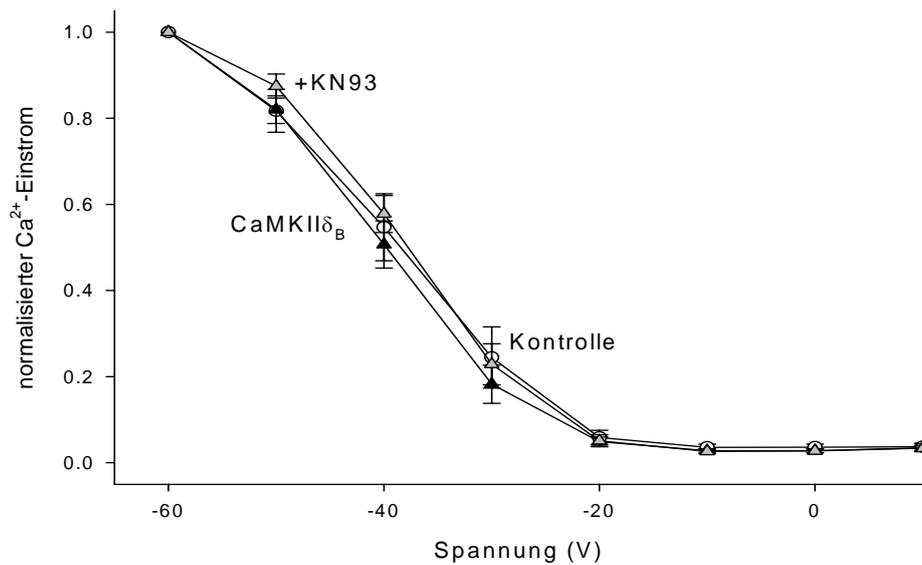


Abbildung 3.23: Verfügbarkeit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals

Mittelwerte der normierten Ca^{2+} -Eintröme des Verfügbarkeitsprotokolls der Kontrollgruppe (n= neun), von $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten mit (n= acht) und ohne KN93 (n= zehn).

3.2.5 Die unstimulierten SR Ca^{2+} -Entladungen (Ca^{2+} -Sparks)

Die Bestimmung der RyR-Funktion der $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den $\text{CaMKII}\delta_C$ -überexprimierenden Myozyten (s. Abschnitt 3.1.5).

Die Original-Line-Scans lassen keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten erkennen (s. Abb. 3.24). Die Mittelwerte bestätigen diesen Eindruck. Nach statistischer Untersuchung mit ungepaartem t-Test bestanden weder für die Frequenz noch für die Amplitude der Ca^{2+} -Sparks signifikante Unterschiede. Daher wurden keine weiteren Untersuchungen mit CaMKII -Inhibitoren oder Tetracain durchgeführt.

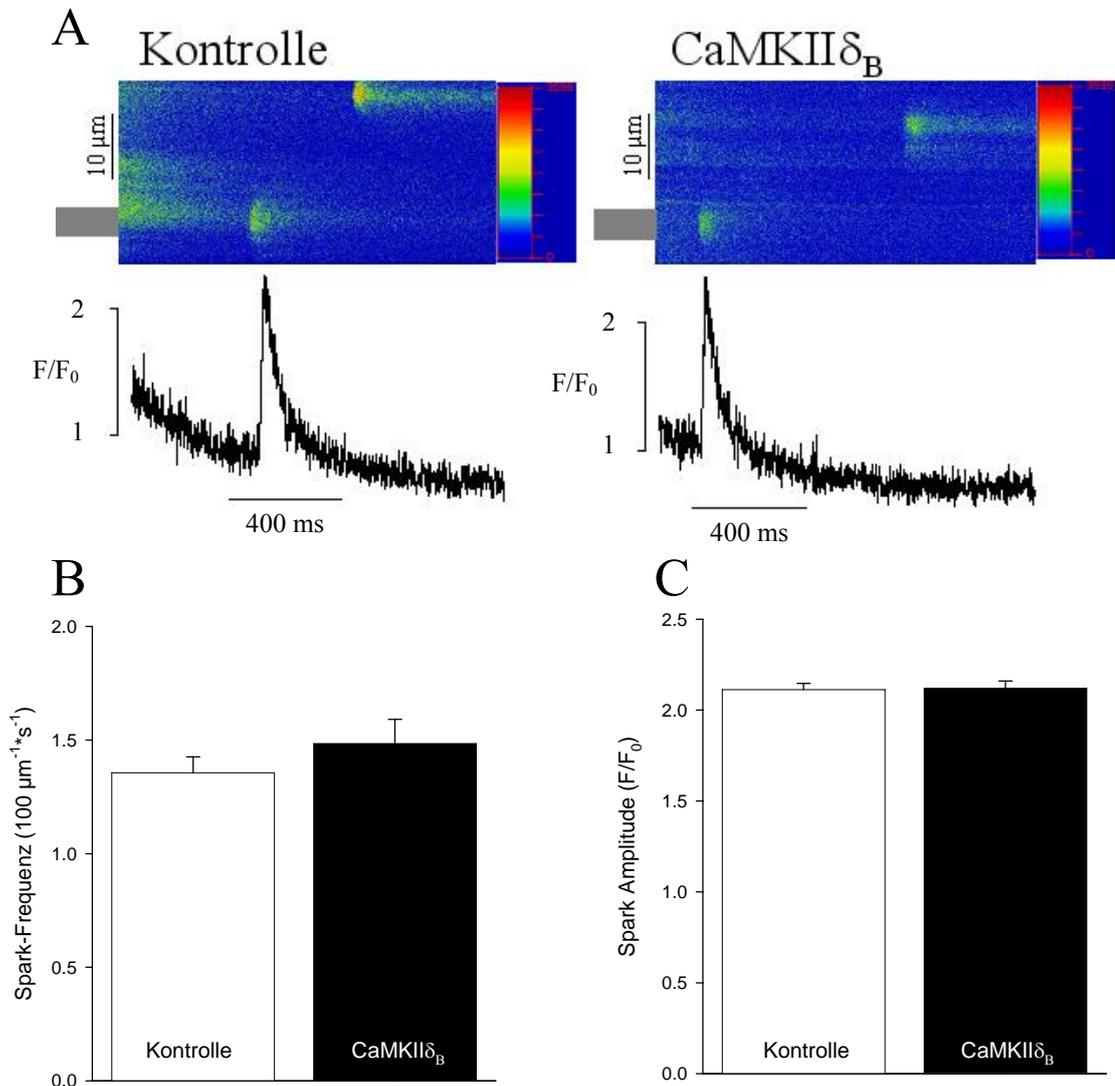


Abbildung 3.24: Ausschnitte aus den Original-Line-Scans und Mittelwerte der Ca^{2+} -Spark-Messungen

A: Dargestellt sind Ausschnitte aus Original-Line-Scans einer Myozyte aus der Kontrollgruppe und einer $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyte. Die grauen Balken vor den Line-Scans zeigen, aus welcher Region die Spark-Kurven (schwarz) heraus gemittelt wurden. Die Farbpalette rechts neben jedem Line-Scan übersetzt die Farbkodierung in die gemessenen Intensitäten des Fluoreszenzsignals. B: Mittelwerte der Spark-Frequenzen der Kontrollgruppe (n= 130) und von $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten (n= 106); C: Mittelwerte der Amplituden der gemessenen Ca^{2+} -Sparks der Kontrollgruppe (n= 221) bzw. von $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Myozyten (n= 200).

3.2.6 Biometrische Daten

Auch die Erhebung der Zellvolumina zeigte keine Unterschiede zwischen den kultivierten Kontrollmyozyten und transfizierten der $\text{CaMKII}\delta_B$ -überexprimierenden Gruppe (s. Abb. 3.25)

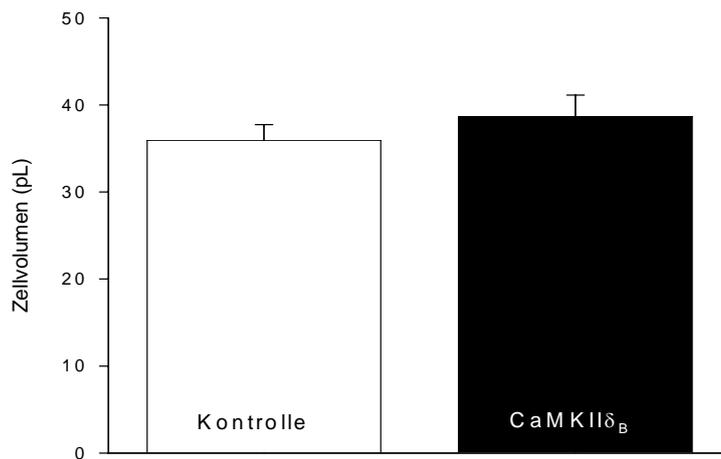


Abbildung 3.25: Zellvolumen der über 24 Stunden kultivierten und transfizierten Myozyten

Die Kontrollgruppe ist dieselbe wie in Abb. 3.14 mit $n = 154$ Myozyten, die CaMKII δ_B -überexprimierende Gruppe umfasst 92 Myozyten.

3.3 Chronische CaMKII δ_B -Überexpression in transgenen Mäusen

3.3.1 Bestimmung des Genotyps mittels PCR

Die Bestimmung des Genotyps mittels PCR und Agarosegelelektrophorese wurde anfänglich von mir in Zusammenarbeit mit Frau Astrid Steen (technische Assistentin) durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen für die vorliegende Arbeit hat Frau Steen PCR und Agarosegelelektrophorese allein weitergeführt. Alle hier gezeigten Daten entstanden in der Phase der Zusammenarbeit.

Zur Durchführung der PCR wurde Gewebe aus den Ohren der Mäuse gestanzt und die DNA aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt und mittels einer Agarosegelelektrophorese ausgewertet (s. Abschnitt 2.1.1 bis 2.1.3). Das Agarosegel enthält Ethidiumbromid, das sich in DNA einlagert und unter UV-Licht leuchtet, somit wird die DNA im Agarosegel unter UV-Licht sichtbar. Das Foto eines beispielhaften Agarosegels (s. Abb. 3.26) zeigt das Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR von Mäuseohrgewebe. In der ersten Geltasche befand sich der Marker (hier 250bp DNA Leiter), die vierte

Bande von oben stellt die 1 kb-Bande dar, in den Taschen zwei und zwölf befanden sich die Kontrollproben, negativ (2) bzw. positiv (12). In den Taschen drei bis elf befanden sich die Proben der zu untersuchenden Mäuse. Die Proben, die eine DNA-Bande auf der Höhe der 1 kb-Bande des Markers aufweisen, waren positiv getestete Tiere, die somit transgen sind (drei, fünf, sechs, sieben, acht, zehn und elf). Die Proben aus den Taschen vier und neun gehörten zu Wildtypen.

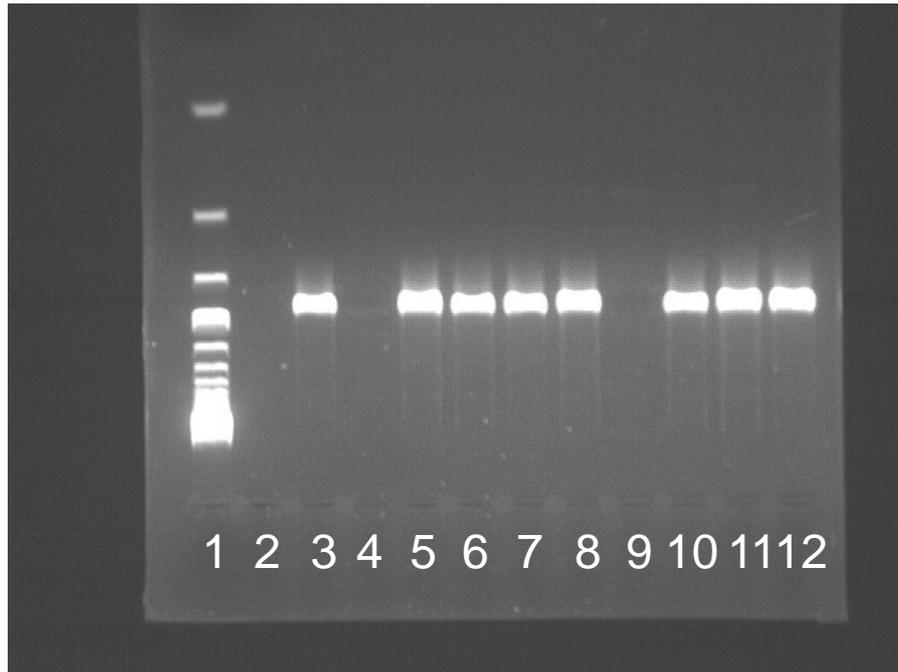


Abbildung 3.26: Beispiel für Agarosegel nach einer Genotypisierungs-PCR
1) 250bp DNA Leiter; 2) Negativ-Kontrolle; 3-11) Proben von Mäusen; 12) Positiv-Kontrolle. Die Proben 4) und 9) sind negativ und damit Wildtypmäuse, die anderen Proben sind positiv und somit transgene Tiere.

3.3.2 Die Kontraktions-Frequenz-Beziehung und die intrazellulären Ca^{2+} -Transienten

Auch an isolierten Mausmyozyten wurde eine Untersuchung zur Kontraktions-Frequenz-Beziehung durchgeführt. Es ist bekannt, dass bei Mausmyozyten eine negative Kontraktions-Frequenz-Beziehung existiert (Bers, 2001), was durch die vorliegenden Versuche bestätigt wurde.

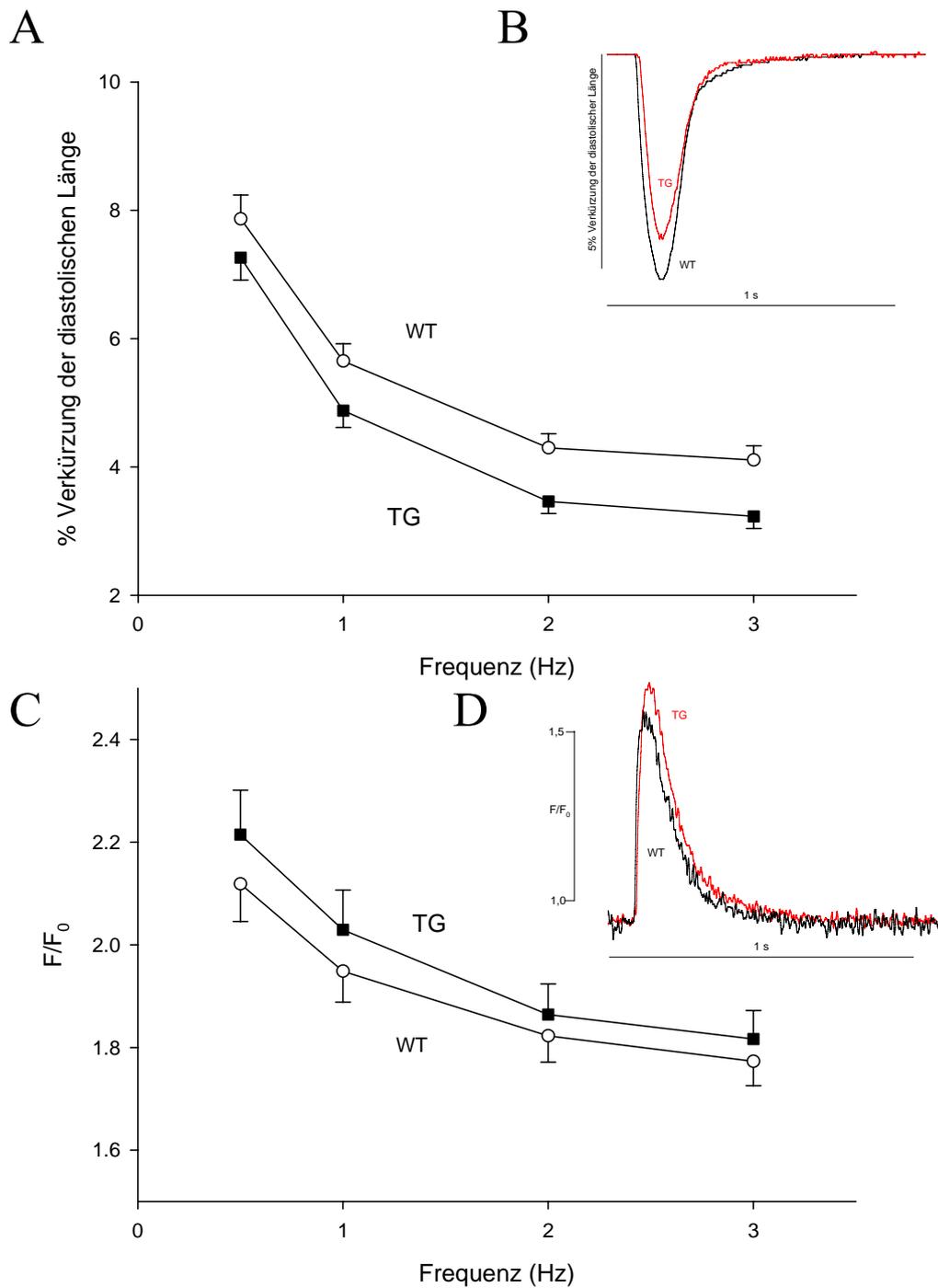


Abbildung 3.27: Frequenz abhängige Änderung der Kontraktilität und der Ca²⁺-Transients

A: Mittelwerte der Kontraktilitätsmessungen der WT-Tiere (n= 135 bei einem Hz) und der transgenen Tiere (n= 86 bei einem Hz); B: repräsentative Original-Kontraktionen einer Myozyte von einer WT-Maus (schwarz) und einem transgenen Tier (rot); C: Mittelwerte der intrazellulären Ca²⁺-Amplitudenmessung der WT-Tiere (n= 135 bei einem Hz) und der transgenen Tiere (n= 86 bei einem Hz); D: repräsentative Original-Ca²⁺-Transients einer Myozyte von einem WT-Tier (schwarz) und einem transgenen Tier (rot);

In Abb. 3.27 sind sowohl bei transgenen als auch bei WT-Mäusen eindeutig verminderte Kontraktionsamplituden bei zunehmender Stimulationsfrequenz zu erkennen. Es fiel auf, dass die transgenen Mäuse auf einem etwas niedrigeren Kontraktionsniveau starteten und stärker abfielen als die WT-Mäuse, nach einer statistischen Untersuchung mittels Zwei-Wege-ANOVA-Test waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Die Untersuchung der Ca^{2+} -Fluoreszenz zeigte ebenfalls, dass die Amplitude (F/F_0) der Ca^{2+} -Transienten bei steigender Frequenz abnahm, in diesem Fall wiesen jedoch die transgenen Mäuse eine etwas größere Amplitude auf als die WT-Mäuse. Eine statistische Auswertung dieser Daten mittels Zwei-Wege-ANOVA-Test zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Auch bei Mausmyozyten wurde der Relaxationsparameter RT50% als Indikator für SERCA-Aktivität bestimmt. Im Falle der Maus, wo das Verhältnis von externem zu internem Ca^{2+} bei ca. zehn zu 90% liegt, war die Relaxation von der Kontraktion bzw. der Rückgang des Ca^{2+} -Transienten in höherem Maß von der SERCA-Aktivität abhängig.

Im Falle des Relaxationsparameter RT50%, der prozentualen Verkürzung der diastolischen Länge zeigt ein Vergleich zwischen WT- und transgenen Mäusen eine Tendenz (s. Abb. 3.28), nach der RT50%-Werte der transgenen Mäuse geringer ausfielen als die der WT-Mäuse. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant, was durch eine statistische Untersuchung mittels Zwei-Wege-ANOVA-Test mit anschließendem Fischer LSD-Test bestätigt wurde. Diese Tendenz erreichte in den Relaxationszeiten (RT50%) der Ca^{2+} -Transienten eine signifikante Größe. Daher konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die SERCA eine leicht erhöhte Aktivität aufwies, die allerdings keine Änderungen des Kontraktionsverhaltens verursachte.

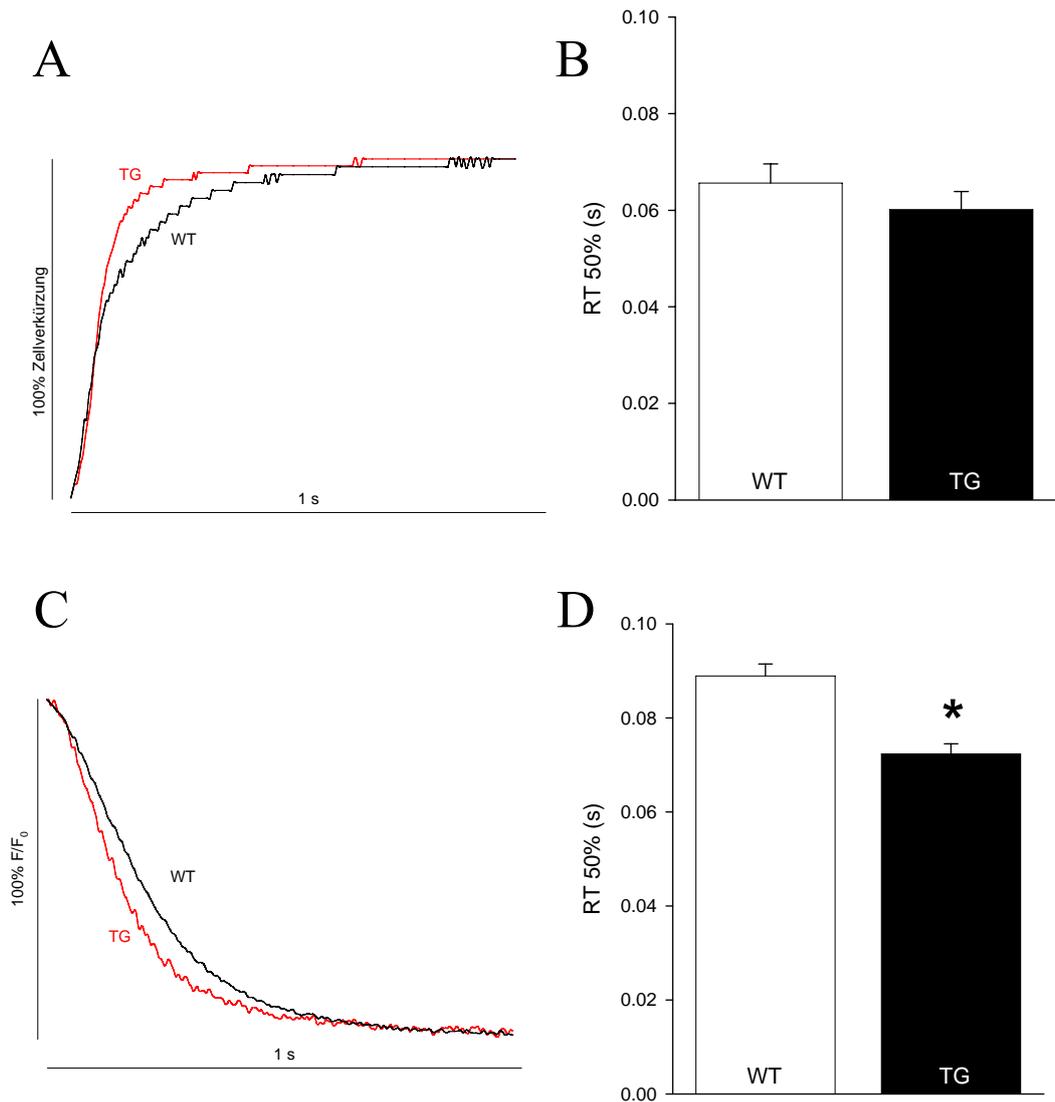


Abbildung 3.28: Relaxationsparameter RT50% der Kontraktilität und Ca^{2+} -Transienten bei einem Herz

A: Original-Relaxation normiert auf die minimale Zelllänge einer Myozyte der WT-Gruppe (schwarz) und von einer Myozyte der transgenen Tiere (rot); B: Mittelwerte der RT50%-Bestimmungen der Kontraktion bei einem Hz von WT- und transgenen Tieren; C: Original- Ca^{2+} -Rückgang normiert auf das Maximum des Ca^{2+} -Transients von einer Myozyte einer WT- (schwarz) bzw. transgenen Maus (rot); D: Mittelwerte der RT50%-Bestimmungen des Ca^{2+} -Rückgangs bei einem Hz von WT- und transgenen Tieren. * = $p < 0,05$ im Vergleich zu WT-Tieren, bestimmt mittels t-Test.

3.3.3 Die Post-Pausen-Beziehung

Auch für die Mäuse wurde die Post-Pausen-Beziehung als Maß für den SR Ca^{2+} -Gehalt bestimmt. In diesem Punkt verhielten sich die Mäuse ebenfalls unterschiedlich im Vergleich zu den Kaninchen, bei Mäusen war die erste

Zellverkürzung bzw. der Ca^{2+} -Transient nach der Pause von zehn Sekunden deutlich verstärkt.

Die Ergebnisse zeigen sowohl bei der WT- als auch bei der transgenen Maus eine signifikante Zunahme der prozentualen Verkürzung der diastolischen Länge nach der Pause, was die statistische Untersuchung mittels t-Test bestätigte (s. Abb. 3.29). Auffällig war der prozentual leicht stärkere Anstieg bei den transgenen im Vergleich zu den WT-Mäusen (TG $231,3 \pm 22,5\%$; WT $177,7 \pm 6,2$; $p < 0,05$).

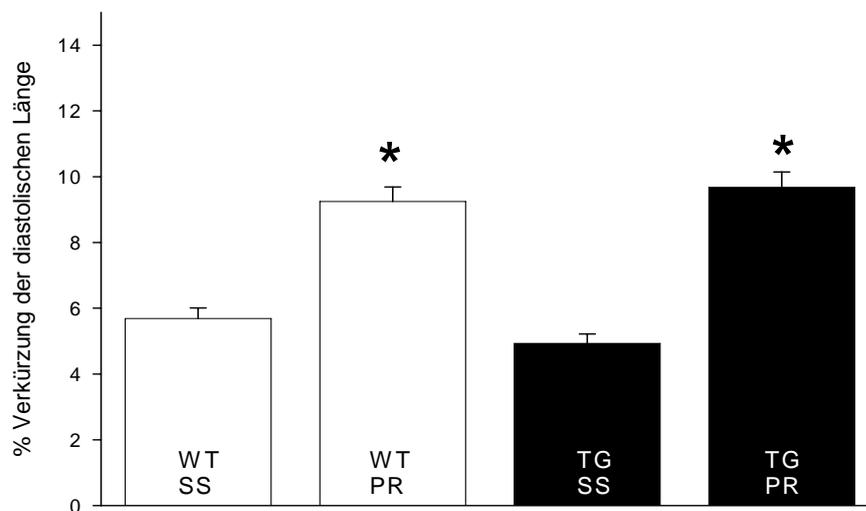


Abbildung 3.29: Die Post-Pausen-Beziehung bei zehn Sekunden Pausendauer. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kontraktilitätsmessung jeweils vor (SS) und nach der Pause (PR) von WT- ($n = 117$) und transgenen Tieren ($n = 80$). * = $p < 0,05$ jeweils im Vergleich von SS zu PR bestimmt mittels t-Test.

3.3.4 SR Ca^{2+} -Gehalt und NCX-Aktivität

Zur genaueren Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehaltes wurde auch bei den Mäusen die Amplitude der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten ermittelt, wie unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

Die Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten deuteten auf einen tendenziell erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalt hin (s. Abb. 3.30), was eine statistische Untersuchung mittels t-Test jedoch nicht bestätigen konnte.

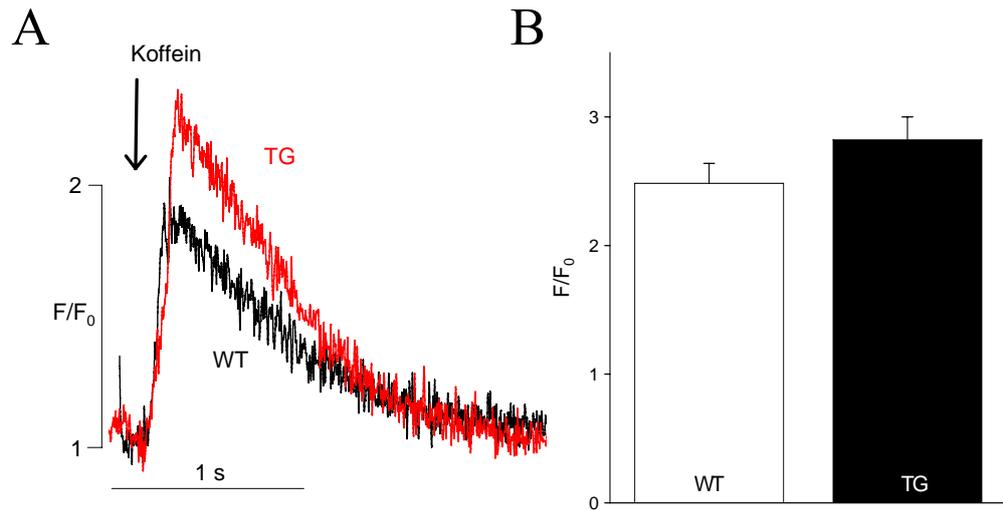


Abbildung 3.30: SR Ca^{2+} -Gehalt

A: Repräsentative Koffein-stimulierte Ca^{2+} -Transienten in je einer Myozyten von WT- (schwarz) und transgenen Mäusen (rot); B: Mittelwerte der Amplituden der Koffein-stimulierten Ca^{2+} -Transienten von WT- (n= 32) und transgenen Mäusen (n= 21).

Die Bestimmung des Relaxationsparameter RT50% nach einem Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten als Indikator für die NCX-Aktivität (s. Abb. 3.31), wies auf eine unveränderte NCX-Aktivität hin, was durch die statistische Untersuchung bestätigt wurde.

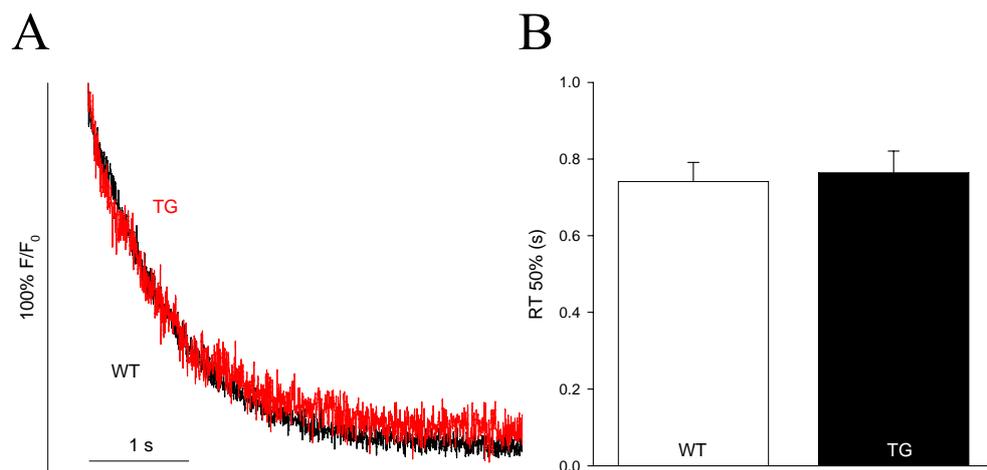


Abbildung 3.31: Relaxationsparameter RT50% als Indikator für die NCX-Aktivität

A: Original-Registrierung eines Ca^{2+} -Rückgangs nach einem Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten je einer Myozyte von WT- (schwarz) und transgenen Mäusen (rot); B: Mittelwerte der RT50% Bestimmung von WT- (n= 32) und transgenen Mäusen (n= 21).

3.3.5 L-Typ Ca^{2+} -Einstrom

Wie unter Abschnitt 3.1.4 näher beschrieben wurden auch an Mäusen Untersuchungen zum Ca^{2+} -Einstrom mittels Patch-Clamp-Technik durchgeführt.

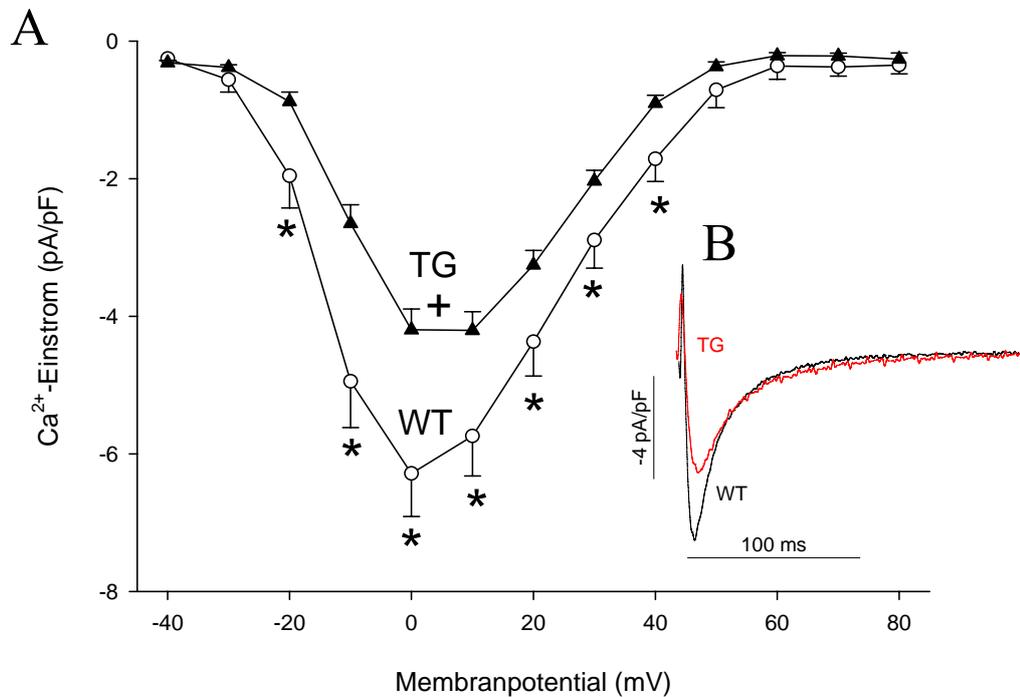


Abbildung 3.32: Strom-Spannungs(IV)-Verhältnis des L-Typ Ca^{2+} -Kanals

A: Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des Ca^{2+} -Einstroms über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal von WT-(n= zehn) und transgenen Mäusen (n= 13); B: Original-Registrierungen von Ca^{2+} -Einströmen über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal bei 0mV aus je einer Myozyte von einer WT- (schwarz) bzw. transgenen Maus (rot); Statistische Untersuchungen mittels Zwei-Wege-ANOVA-Test ergaben einen signifikanten Unterschied (+), ebenso zusätzliche Untersuchungen mittels t-Test (*).

Die Untersuchung des Strom-Spannungs-Verhältnisses des L-Typ Ca^{2+} -Kanals bei den transgenen (TG) CaMKII δ_B -überexprimierenden Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen WT- und transgenen Mäusen (s. Abb. 3.32). Wie sowohl in den Original-Registrierungen als auch im Vergleich der Mittelwerte zu erkennen ist, fiel die Amplitude des Ca^{2+} -Einstroms bei den transgenen signifikant geringer als bei den WT-Mäusen aus. Die statistische Untersuchung mittels Zwei-Wege-ANOVA-Test zeigte einen signifikant unterschiedlichen Verlauf der beiden Kurven. Zusätzlich wies der

ungepaarte t-Test für die Datenpunkte -20 bis 40 mV einen geringeren p-Wert als $0,05$ nach.

Die Untersuchung der Inaktivierungsparameter τ_1 und τ_2 des Ca^{2+} -Einstroms wies jedoch keine Unterschiede zwischen WT- und transgenen Mäusen auf (s. Abb. 3.33). Dieses ist sowohl den normalisierten Original-Registrierungen als auch den Mittelwerten zu entnehmen. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die statistischen Untersuchungen.

Aufgrund der signifikant verringerten Amplitude des Ca^{2+} -Einstroms und der unveränderten Inaktivierung lag die Schlussfolgerung nahe, dass der Ca^{2+} -Einstrom bei transgenen Mäusen geringer sein musste als bei den WT-Tieren.

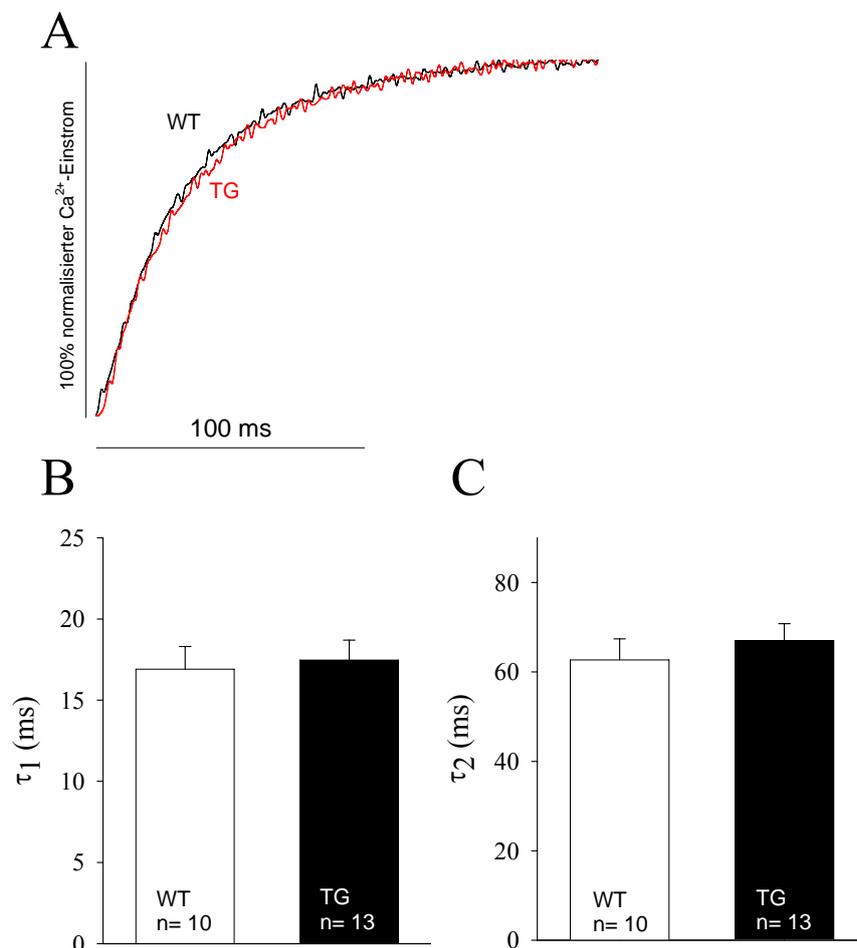


Abbildung 3.33: Inaktivierungsparameter τ_1 und τ_2 des L-Typ Ca^{2+} -Kanals

A: Vergleich von Original-Registrierungen, normiert auf den maximalen Ca^{2+} -Einstrom von je einer Myozyte aus einer WT- (schwarz) und transgenen Maus (rot); B: Mittelwerte der Bestimmung von τ_1 und C: Mittelwerte der Bestimmungen von τ_2 von WT- (n= zehn) und transgenen Mäusen (n= 13).

Das Ergebnis des Facilitations-Protokolls zeigte keine Unterschiede zwischen WT- und transgenen Mäusen (s. Abb. 3.34). Sowohl die Original-Registrierungen (A und B) als auch die normalisierten Mittelwerte (C) zeigten ein gleiches Verhalten des Ca^{2+} -Einstroms über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal in Abhängigkeit der Zeit bei den transgenen und den WT-Mäusen.

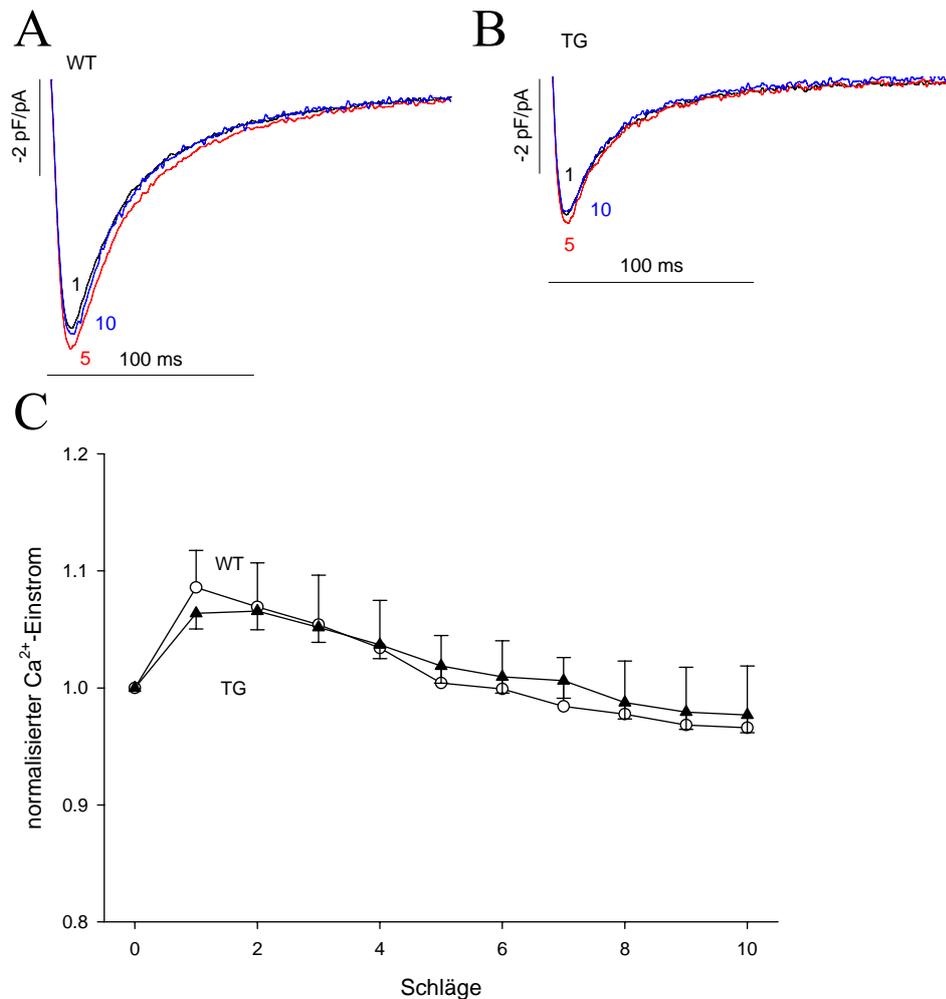


Abbildung 3.34: Facilitation des L-Typ Ca^{2+} -Kanals

A: Repräsentative Original-Registrierungen des ersten, fünften und zehnten Ca^{2+} -Einstroms über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal von einer Myozyte aus der WT-Gruppe; B: Repräsentative Original-Registrierung von einer Myozyte aus der transgenen Gruppe; C: Vergleich der Mittelwerte der normalisierten Ca^{2+} -Einströme von WT- (n= zwölf) und transgenen Mäusen (n= 16).

3.3.6 Die unstimulierten SR Ca^{2+} -Entladungen (Ca^{2+} -Sparks)

Auch an Mausmyozyten wurde die RyR-Funktion mittels konfokaler Laser-Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Allerdings zeigen Mausmyozyten bereits unter normalen Bedingungen (Messtyrode, ein mM Ca^{2+} , Raumtemperatur) Ca^{2+} -Sparks, so dass hier auf Isoprenalin verzichtet werden konnte. Ansonsten waren die

Versuchsdurchführungen identisch wie bei den Untersuchungen der Kaninchenmyozyten.

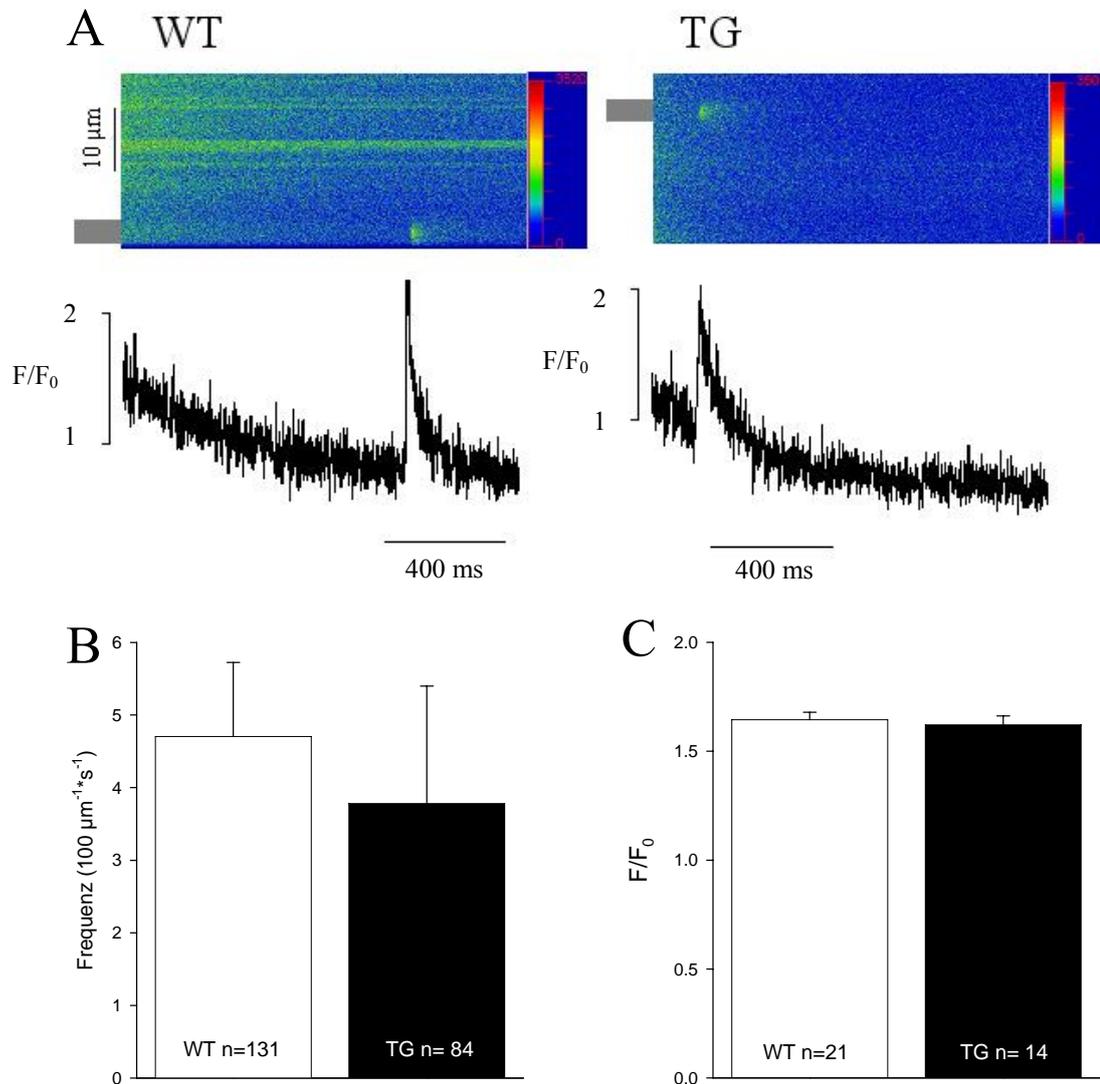


Abbildung 3.35: Ausschnitte aus den Original-Line-Scans und Mittelwerte der Ca^{2+} -Spark-Messungen

A: Dargestellt sind Ausschnitte aus Original-Line-Scans von je einer Myozyte aus der WT- und transgenen Gruppe. Die grauen Balken vor den Line-Scans zeigen, aus welcher Region die Spark-Verläufe (schwarz) heraus gemittelt wurden. Die Farbpalette rechts neben jedem Line-Scan übersetzt die Farbkodierung in die gemessenen Intensitäten des Fluoreszenzsignals; B: Mittelwerte der Ca^{2+} -Spark-Frequenzen von Myozyten aus WT- (n= 21) und transgenen Mäusen (n= 14); C: Mittelwerte der Amplituden der gemessenen Ca^{2+} -Sparks von WT- (n= 31) und transgenen Mäusen (n= 84).

Die Original-Line-Scans und die Mittelwerte zeigen keine Unterschiede bei der Ca^{2+} -Spark-Frequenz und der Amplitude zwischen den transgenen und den WT-

Mäusen (s. Abb. 3.35). Auch die statistische Untersuchung der Daten mittels t-Test wies keine signifikanten Unterschiede nach. Aus diesem Grund wurde ebenfalls auf weitere Untersuchungen mit CaMKII-Blockern und Tetracain verzichtet.

3.3.7 Biometrische Daten

Von den Mäusen wurden jeweils zum Zeitpunkt der Herzentnahme Alter, Körper- und Herzgewicht bestimmt. Ferner erfolgte eine Bestimmung des Verhältnisses von Herzgewicht zu Körpergewicht, was als Maß für eine mögliche Herz-Hypertrophie benutzt werden kann. Wie Abb. 3.36 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die Mäuse nicht im Alter und Körpergewicht. Im Gegensatz hierzu waren Herzgewicht und das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis transgener Tiere jedoch signifikant erhöht, was auf eine vorhandene Hypertrophie bei den transgenen Tieren hindeutete.

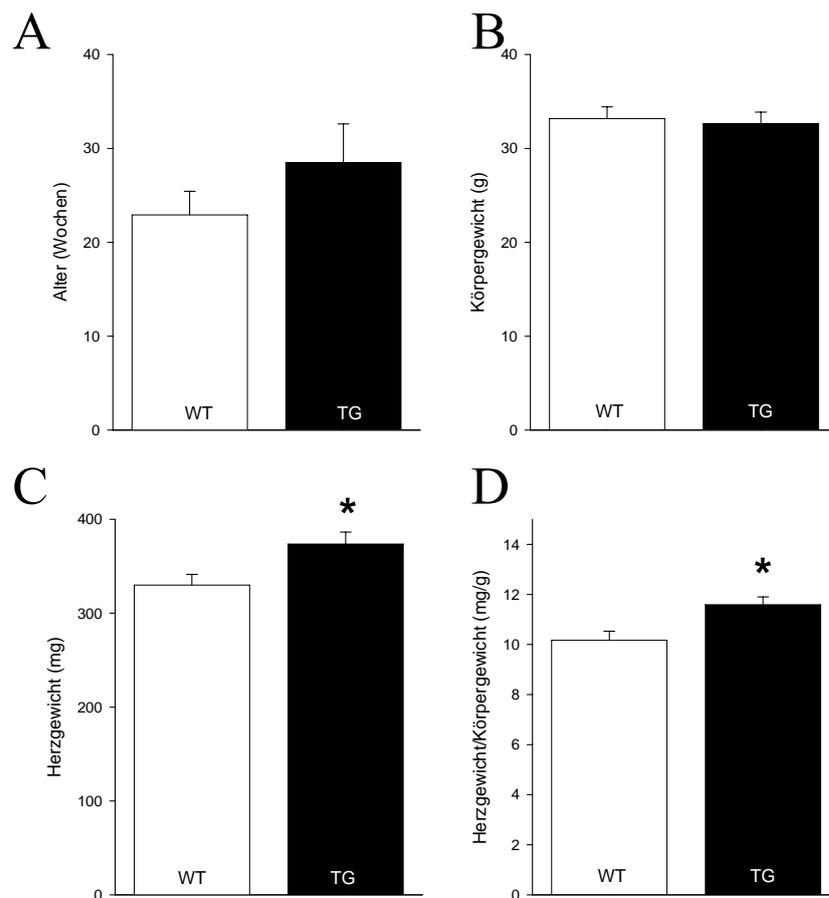


Abbildung 3.36: Biometrische Daten der Versuchsmäuse

In die Erhebung der biometrischen Daten gehen 32 WT- und 23 transgene Mäuse eine. A: Alter; B: Körpergewicht; C: Herzgewicht; D: Verhältnis aus Herzgewicht zu Körpergewicht als Indiz für Hypertrophie. * = $p < 0,05$ mittels t-Test.

4. Diskussion

4.1 Akute adenoviral vermittelte CaMKII δ_C -Überexpression in Kaninchenmyozyten

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals die akuten Einflüsse der CaMKII δ_C -Überexpression auf die elektromechanische Kopplung in über 24 Stunden kultivierten Kaninchenmyozyten gezeigt werden. Zusammengefasst kam es dabei zu mehreren Veränderungen im intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsel, nämlich einem deutlich gesteigerten diastolischen Ca²⁺-Verlust (aufgrund einer erhöhten Ca²⁺-Spark-Frequenz) über den RyR2 und somit zu einer Reduktion des SR Ca²⁺-Gehaltes. Außerdem war ein signifikant und verstärkter CaMKII δ_C -bedingter Ca²⁺-Einstrom über den L-Typ Ca²⁺-Kanal zu beobachten. Diese beiden entgegengesetzt wirkenden Effekte führten in der Addition dazu, dass die Ca²⁺-Transienten und damit die Kontraktilität weitgehend unverändert blieben, im Gegensatz zur chronischen Überexpression der CaMKII δ_C in transgenen Mäusen (Maier et al., 2003). Als mögliche Ursache hierfür kommt die zusätzlich reduzierte SERCA-Expression (und die erhöhte NCX-Expression) in transgenen Mäusen in Frage. Im Gegensatz dazu kam es bei akuter CaMKII δ_C -Überexpression in Kaninchenmyozyten nicht zur Änderung in der SERCA-Funktion bzw. NCX-Aktivität.

4.1.1 Überexpression der CaMKII δ_C und Hypertrophie

Bereits vor mehreren Jahren konnte gezeigt werden, dass die CaMKII bei Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz des Menschen eine Rolle spielt und sowohl vermehrt exprimiert wird als auch verstärkt aktiv zu sein scheint (HOCH et al., 1999; KIRCHHEFER et al., 1999). Über die Funktion auf den Ca²⁺-Stoffwechsel wurde allerdings nur spekuliert. Die CaMKII δ_C wurde daher im akuten Kaninchenmyozyten-Modell mittels adenoviraler Gentransfektion über 24 Stunden bei einer MOI von 100 ca. fünf- bis sechsfach überexprimiert (KOHLHAAS et al., 2006). Mittels immunhistochemischer Markierung der CaMKII und konfokaler Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die CaMKII δ_C ausschließlich im Zytosol, nicht jedoch im Zellkern exprimiert wird. Dieses Ergebnis fiel erwartungsgemäß aus, da der CaMKII δ_C die elf Aminosäuren lange

Kernlokalisationssequenz fehlt, über die die nukleär lokalisierte CaMKII δ_B verfügt (ZHANG et al., 2002; ZHANG & BROWN, 2004). Im Gegensatz zum chronischen CaMKII δ_C -überexprimierenden transgenen Mausmodell (ZHANG et al., 2003), bei dem eine klare Hypertrophie auf Herz- und Zellebene nachgewiesen wurde, zeigte sich bei den CaMKII δ_C -überexprimierenden Kaninchenmyozyten nach 24 Stunden keine signifikante Veränderung der Myozytengröße. Die Hypertrophie in den transgenen Mäusen wird möglicherweise durch die länger andauernde Überexpression der CaMKII δ_C oder/und deren Zusammenspiel mit der CaMKII δ_B über bislang unbekannte Hypertrophiemechanismen ausgelöst. Hierbei spielt möglicherweise die Regulation über die Phosphorylierung der nukleären HDAC eine Rolle (BARE et al., 2005; WU et al., 2006). Andererseits könnte auch ein sekundärer Effekt der CaMKII δ_C -Überexpression involviert sein. So wurde kürzlich die Proteinkinase D (PKD) als möglicher Hypertrophie-Induktor und Co-Faktor bei CaMKII-abhängiger Hypertrophieregulation beschrieben (HUYNH et al., 2006). Sowohl unter akuter als auch unter chronischer Überexpression verursachte jeweils die erhöhte diastolische Ca $^{2+}$ -Spark-Frequenz und der dadurch bedingte reduzierte SR Ca $^{2+}$ -Gehalt eine wichtige funktionelle Veränderung in der elektromechanischen Kopplung. Daher besteht die Möglichkeit, dass die verstärkte diastolische Ca $^{2+}$ -Spark-Frequenz langfristig Ca $^{2+}$ -abhängige Hypertrophie-Signalwege aktiviert. Die erhöhte intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration führt möglicherweise als positiver Feedback-Mechanismus zur verstärkten CaMKII-Proteinaktivität und initiiert somit auch nukleäre Hypertrophiesignalwege.

4.1.2 Einflüsse der CaMKII δ_C auf den L-Typ Ca $^{2+}$ -Einstrom

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen verursachte die CaMKII δ_C -Überexpression einen signifikant verstärkten Ca $^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanal. Dieser ist charakterisiert durch drei signifikant veränderte Parameter, nämlich eine verstärkte Ca $^{2+}$ -Stromamplitude, verlängerte Inaktivierungsparameter τ_1 und τ_2 und eine verstärkte Facilitation. Die Reaktivierbarkeit des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals bleibt von der CaMKII δ_C -Überexpression allerdings unbeeinflusst. Die verstärkte Amplitude, die gleichzeitig mit einer verlängerten Inaktivierung auftritt, beschrieben bereits XIAO et al. (1994) als direkten Einfluss der CaMKII auf den L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanal. Dies führt während eines Aktionspotentials zu einem deutlich vermehrten Ca $^{2+}$ -Einstrom in die

Myozyte. Ferner zeigten YUAN & BERS (1994) sowie DZHURA et al. (2000), dass die CaMKII die Facilitation verursacht. Dabei beschreibt der Prozess der Facilitation die Zunahme des Ca^{2+} -Einstroms nach wiederholten Depolarisationen und stellt somit einen weiteren CaMKII-abhängigen Mechanismus zur Steigerung des Ca^{2+} -Einstroms in die Myozyte dar. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten und der gerade erwähnten Vorarbeiten kann davon ausgegangen werden, dass die 31%ige Steigerung der Amplitude des Ca^{2+} -Einstroms über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal in der vorliegenden Arbeit ein direkter CaMKII-abhängiger Effekt ist. Dies wird durch die Beobachtungen bestätigt, dass bei CaMKII-Inhibition durch AIP oder KN93 sowohl die Amplitude als auch die Inaktivierung vollständig auf das Kontrollniveau zurückgeführt werden konnten. Ferner fand weder bei den CaMKII δ_C -überexprimierenden noch bei den Kontrollmyozyten unter CaMKII-Inhibition (durch KN93) eine Facilitation statt. Weil sowohl die verstärkte Amplitude als auch die verlangsamte Inaktivierung typische Folgen der CaMKII-abhängigen Facilitation sind (BERS, 2001; YUAN & BERS, 1994) und in den durchgeführten Versuchen unter CaMKII-Inhibition (in Übereinstimmung mit YUAN & BERS, 1994) keine Facilitation beobachtet werden konnte, kann der Schluss gezogen werden, dass CaMKII δ_C von essentieller Bedeutung für die Facilitation ist. Dieser CaMKII-abhängige Effekt auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal wird höchstwahrscheinlich durch die CaMKII-abhängige Phosphorylierung der β -Untereinheit vermittelt (GRUETER et al., 2006; YUAN & BERS, 1994; ANDERSON et al., 1994; XIAO et al., 1994). Auf Einzelkanalebene findet durch CaMKII-abhängige Aktivierung eine verlängerte Öffnungsphase des L-Typ Ca^{2+} -Kanals statt (DZHURA et al., 2000). Dieser Effekt eines verstärkten Ca^{2+} -Einstroms in Addition mit dem sensibilisierten bzw. hyperphosphorylierten RyR (KOHLHAAS et al., 2006) bewirkt interessanterweise, dass es trotz des deutlich reduzierten SR Ca^{2+} -Gehalts zu keiner signifikanten Reduktion der Ca^{2+} -Transienten und damit der Kontraktilität kommt.

4.1.3 Einflüsse der CaMKII δ_C auf den SR Ca^{2+} -Gehalt, den RyR, die SERCA und die Kontraktilität

Bei der akuten Überexpression der CaMKII δ_C wurde wie bereits erwähnt ein deutlich gesteigertes SR Ca^{2+} -Leck (durch erhöhte SR Ca^{2+} -Spark-Frequenz) und der daraus folgende massiv reduzierte SR Ca^{2+} -Gehalt nachgewiesen. Die

Kontraktilität, die Ca^{2+} -Transienten, die NCX- und die SERCA-Aktivität blieben dagegen unverändert. Die NCX-Funktion wurde aus dem zytosolischen Ca^{2+} -Rückgang nach einem Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten bestimmt. Die SERCA-Aktivität wurde jeweils aus dem zytosolischen Ca^{2+} -Rückgang und der Frequenz-stimulierten Ca^{2+} -Transienten unter Berücksichtigung der NCX-Funktion bestimmt. Als Parameter diente jeweils die Zeit bis zum Erreichen von 50% des maximalen Wertes (RT50%). Da bereits bekannt ist, dass die $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ die SERCA-Aktivität über die Phosphorylierung von PLB beschleunigen kann (MAIER & BERS, 2002; ZHANG & BROWN, 2004; BERS, 2001; BERS, 2002), fielen die diesbezüglichen Versuchsergebnisse, die eine unveränderte SERCA-Aktivität zeigten, zunächst unerwartet aus. Der Einfluss der akuten $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -Überexpression in der vorliegenden Arbeit, als auch der transgenen (MAIER et al., 2003) $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -Überexpression in Vorarbeiten auf die SERCA fiel minimal aus und war in den Versuchen bei einer Grundstimulationsfrequenz von einem Hz nicht nachweisbar, was möglicherweise auf den geringen absoluten Umfang der $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -abhängigen PLB-Phosphorylierung zurückzuführen ist (HUKE & BERS, 2005). Eine weitere Ursache besteht eventuell darin, dass die CaMKII -abhängige gesteigerte Phosphorylierung an PLB-Thr-17 durch eine reduzierte Phosphorylierung an PLB-Ser-16 (PKA-Stelle) antagonisiert wird (KOHLHAAS et al., 2006). Außerdem fällt in WT-Mäusen die CaMKII -bedingte Steigerung des SR Ca^{2+} -Gehaltes nach GUO et al. (2006) äußerst gering aus. Daher kann die CaMKII -abhängige PLB-Phosphorylierung und damit eine gesteigerte SERCA-Aktivität den Ca^{2+} -Verlust über die vermehrte Ca^{2+} -Spark-Frequenz in der vorliegenden Arbeit nicht antagonisieren. Im Versuchsmodell der vorliegenden Arbeit fiel der SERCA-Einfluss außerdem speziesbedingt geringer aus (als beispielsweise bei der Maus). Somit verringerte sich der $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -Einfluss auf den Ca^{2+} -Rückgang und die $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -abhängige Beschleunigung der SERCA-Aktivität blieb möglicherweise messtechnisch unauflösbar. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Effekte auf die SR Ca^{2+} -Rückaufnahme bei der Grundstimulationsfrequenz von einem Hz untergeordnet sind und erst bei zunehmender Stimulationsfrequenz (bis drei Hz oder noch höher) auftreten. Bei steigenden Stimulationsfrequenzen kommt es zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und damit zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und infolge dessen zur vermehrten CaMKII -Aktivität. Dies kann in der

sogenannten Frequenz-abhängigen beschleunigten Relaxation gesehen werden (DeSANTIAGO et al., 2002).

Bei der transgenen CaMKII δ_C -Überexpression in Mauserzen war der SR Ca²⁺-Gehalt ebenfalls signifikant reduziert, die genaue Ursache war zu diesem Zeitpunkt jedoch unklar. Mögliche Gründe waren das gesteigerte SR Ca²⁺-Leck, die reduzierte SERCA-Aktivität oder die gesteigerte NCX-Funktion bzw. eine Kombination aus diesen Mechanismen (MAIER et al., 2003). Es ist seit längerem bekannt, dass die gesteigerte NCX- und die reduzierte SERCA-Funktion typisch für die Herzinsuffizienz sind (HASENFUSS, 1998; POGWIZD et al., 2001; HOBAL & O'ROUKE, 2000; SHANNON et al., 2003).

Im Rahmen der Versuche für die vorliegende Arbeit zur akuten CaMKII δ_C -Überexpression konnte ebenfalls eine Reduktion des SR Ca²⁺-Gehaltes mittels Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten nachgewiesen werden. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Resultate der Post-Pausen-Experimente, sowie durch die signifikant geringeren Ca²⁺-Amplituden der SR Ca²⁺-Sparks. Die wahrscheinlichste Ursache stellt das signifikant gesteigerte SR Ca²⁺-Leck dar, da sowohl SERCA- und NCX-Funktion als auch deren Proteinexpression (KOHLHAAS et al., 2006) im Gegensatz zur Herzinsuffizienz unverändert blieben.

Vielmehr wird eine Reduktion des SR Ca²⁺-Gehaltes bei der Herzinsuffizienz genau wie der transgenen Überexpression der CaMKII δ_C , bei der es zur Herzinsuffizienz im Mausmodell kommt, neben dem gesteigerten SR Ca²⁺-Leck auch zusätzlich durch die gesteigerte NCX- und die reduzierte SERCA-Aktivität bedingt (HASENFUSS, 1998; POGWIZD et al., 2001; HOBAL & O'ROUKE, 2000; SHANNON et al., 2003). Dies führt zu einem Nettoverlust von Ca²⁺ nicht nur aus dem SR, sondern sogar aus der Herzmuskelzelle und somit zur massiven kontraktile Dysfunktion. Ein verminderter SR Ca²⁺-Gehalt ist gerade auch beim Menschen in der Herzinsuffizienz von ganz zentraler Bedeutung (PIESKE et al., 1999).

Die herausragende Bedeutung der CaMKII für das SR Ca²⁺-Leck konnte kürzlich auch von GUO et al. (2006) mit Hilfe von PLB-„knock out“ Mäusen, bei denen es nicht zur vermehrten CaMKII-abhängigen Phosphorylierung des Thr 17 an PLB und damit zu keiner vermehrten Ca²⁺-Beladung des SR kommt, gezeigt werden. Dabei war mittels CaMKII-Stimulation weiterhin eine vermehrte Ca²⁺-Spark-

Frequenz zu beobachten, interessanterweise jedoch nicht bei PKA-Stimulation, so dass die Effekte der vermehrten Ca^{2+} -Spark-Frequenz, die bisher in der Literatur bei PKA-Stimulation beschrieben wurden (MARX et al., 2000) wahrscheinlich sekundärer Natur sind, bedingt durch den vergrößerten SR Ca^{2+} -Gehalt (durch PKA-abhängige Ser16 Phosphorylierung von PLB und vermehrter SR Ca^{2+} -Beladung).

Mittels konfokaler Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie konnte in den gezeigten Experimenten eine signifikant gesteigerte SR Ca^{2+} -Spark-Frequenz in CaMKII δ_C -überexprimierenden Myozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Ca^{2+} -Sparks sind ein guter funktioneller Indikator auf Zellebene für die Aktivität des RyR, d.h., dass vermehrte spontane SR Ca^{2+} -Entladungen (Ca^{2+} -Sparks) durch gehäuft öffnende RyR auftreten. Durch Inhibition der CaMKII mittels KN93 oder AIP konnte die SR Ca^{2+} -Spark-Frequenz jeweils auf das Kontrollniveau zurückgeführt werden. Als Auslöser für die gesteigerte SR Ca^{2+} -Spark-Frequenz kann also die CaMKII δ_C angesehen werden, die zu einer vermehrten Phosphorylierung des RyR führt (KOHLHAAS et al., 2006).

In isolierten Einzelkanalmessungen des RyR konnte außerdem gezeigt werden, dass die CaMKII die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR deutlich erhöht (CURRIE et al., 2003; WITCHER et al., 1991). Ferner konnte gezeigt werden, dass die CaMKII δ_C mit dem RyR assoziiert ist (MAIER et al., 2003; CURRIE et al., 2003; WEHRENS et al., 2004) und diesen direkt zu phosphorylieren vermag (MAIER et al., 2003; CURRIE et al., 2003; WEHRENS et al., 2004; WITCHER et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 2003). Als mögliche Phosphorylierungsstellen der CaMKII δ_C am RyR sind Ser2809 und Ser2815 gefunden worden (WEHRENS et al., 2004; WITCHER et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 2003). RODRIGUEZ et al. (2003) vermuten, dass die CaMKII δ_C insgesamt vier Phosphorylierungsstellen am RyR besitzt. Strittige Untersuchungen von WEHRENS et al. (2004) hingegen zeigten, dass die Phosphorylierungsstelle Ser2809 nur von PKA nicht jedoch von CaMKII δ_C phosphoryliert wird. XIAO et al. (2006) hingegen beschrieben, dass bei Ratten Ser2808 (im Kaninchen Ser2809) auch trotz PKA-Inhibition phosphoryliert wird und wiesen Ser2030 als konservierte PKA-Phosphorylierungsstelle aus. WEHRENS et al. (2004) wiederum gelang der Nachweis, dass eine Phosphorylierung an Ser2809 (durch PKA) zum Ablösen von FKBP12.6 und somit zur vergrößerten Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR führt. Dagegen

bewirkt die Phosphorylierung durch CaMKII δ_C die Aktivierung des RyR, jedoch wahrscheinlich nicht das Ablösen von FKBP12.6 (WEHRENS et al., 2004; MARX et al., 2000). Die in Erweiterung dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen eine signifikant verstärkte CaMKII-bedingte Phosphorylierung sowohl an Ser2809 und Ser2815, jedoch kein Ablösen von FKBP12.6 (KOHLHAAS et al., 2006).

Das erhöhte SR Ca²⁺-Leck (die erhöhte SR Ca²⁺-Spark-Frequenz) und der infolge dessen reduzierte SR Ca²⁺-Gehalt im untersuchten Modell wird folglich durch die vermehrte RyR-Phosphorylierung durch CaMKII δ_C ausgelöst.

Interessante Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit stellen die unveränderte Kontraktilität und Ca²⁺-Transienten, die scheinbar unabhängig vom reduzierten SR Ca²⁺-Gehalt sind, dar. Als mögliche Erklärung dafür kann, wie bereits (s. Abschnitt 4.1.2) erwähnt, der CaMKII-abhängig gesteigerte L-Typ Ca²⁺-Einstrom herangezogen werden. Ein weiterer wichtiger Faktor ist eventuell die von TRAFFORD et al. (2000) beschriebene Art der Autoregulation des RyR: Unter geringen Koffeinkonzentrationen, die zu einem gesteigerten SR Ca²⁺-Leck führten und den RyR für Ca²⁺ sensibilisierten, kam es nur zu flüchtigen Veränderungen in den Ca²⁺-Transienten, jedoch zu substantiellen Veränderungen im SR Ca²⁺-Gehalt und zur Verlängerung der Öffnungsphase des RyR (der RyR ist Ca²⁺-sensibler). Der gleiche Effekt ist möglicherweise bei der Überexpression der CaMKII δ_C wirksam. Die CaMKII δ_C erhöht durch die Sensibilisierung des phosphorylierten RyR die aus dem SR ausgeschüttete Ca²⁺-Menge. Diese verursacht jedoch gleichzeitig einen Ca²⁺-Export über den NCX (oder die sarkolemale Ca²⁺-ATPase) und reduziert somit wiederum den SR Ca²⁺-Gehalt. Trotz geringerem SR Ca²⁺-Gehalt verursacht die durch die Phosphorylierung bedingte verlängerte Öffnung des RyR eine Ausschüttung der gleichen Ca²⁺-Menge aus dem SR, d.h., die Ca²⁺-Transienten und damit die Kontraktilität bleiben unverändert. Diese Hypothese wird durch ein mathematisches Modell von SHANNON et al. (2005) unterstützt, in dem berechnet wurde, dass eine verstärkte Ca²⁺-Sensibilität des RyR, die entweder durch Koffein oder Phosphorylierung hervorgerufen worden sein kann, zu einem gesteigerten SR Ca²⁺-Leck und reduziertem SR Ca²⁺-Gehalt führt. Gleichzeitig bleiben jedoch die Ca²⁺-Transienten unter Gleichgewichtsbedingungen bedingt durch die verlängerte Öffnungsphase des RyR unverändert. Insgesamt liefern die beschriebenen Thesen und die Modellrechnung eine hinreichende Erklärung zur vorliegenden Datenlage.

Folglich trägt die durch Phosphorylierung gesteigerte Ca^{2+} -Sensibilität des RyR, hervorgerufen durch die CaMKII δ_C -Überexpression, in hohem Maß zur diastolischen SR Ca^{2+} -Entladung bei, jedoch ohne merklichen negativen inotropen Effekt. Daraus folgt, dass das CaMKII-abhängige SR Ca^{2+} -Leck bei Herzinsuffizienz wahrscheinlich eine bedeutende Rolle spielt, da in den meisten Arbeiten (MAIER et al., 2003; POGWIZD et al., 20001; SHANNON et al., 2003) der L-Typ Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) nicht kompensatorisch verstärkt ist. Somit trägt das SR Ca^{2+} -Leck neben den zumeist festgestellten Veränderungen wie der verminderten SERCA-Expression und der erhöhten NCX-Expression zum Ca^{2+} -Verlust aus der Myozyte und damit erheblich zur kontraktile Dysfunktion bei Herzinsuffizienz bei.

4.2 Akute adenoviral vermittelte CaMKII δ_B -Überexpression in Kaninchenmyozyten im Vergleich zur chronischen Überexpression der CaMKII δ_B in transgenen Mäusen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals in Myozyten mit akuter als auch der chronischer CaMKII δ_B -Überexpression funktionelle Daten auf Zellebene erhoben. Die akute CaMKII δ_B -Überexpression erfolgte adenoviral vermittelt über 24 Stunden in isolierten Kaninchenmyozyten (MOI 100) und führte interessanterweise zu keinen weitreichenden Auswirkungen auf die elektro-mechanische Kopplung. Als einziger signifikanter Effekt der akuten CaMKII δ_B -Überexpression wurde ein Einfluss auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal gefunden, der zwar durch eine signifikant verstärkte Ca^{2+} -Amplitude aber unveränderte Inaktivierungsparameter τ_1 und τ_2 charakterisiert ist. Die verstärkte Ca^{2+} -Amplitude kann allerdings nicht durch CaMKII-Inhibition vermindert werden. Die Reaktivierbarkeit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals blieb von der CaMKII δ_B -Überexpression ähnlich wie bei der CaMKII δ_C -Überexpression unbeeinflusst. Ebenso unverändert blieben die Ca^{2+} -Transienten, die Kontraktilität, der SR Ca^{2+} -Gehalt, die SERCA-Aktivität, die NCX-Funktion, die SR Ca^{2+} -Spark-Frequenz, die Ca^{2+} -Sparkamplitude und damit wahrscheinlich auch die RyR-Öffnungswahrscheinlichkeit. Daraus folgt, dass die adenoviral vermittelte akute

CaMKII δ_B -Überexpression keine funktionellen Einflüsse auf die elektromechanische Kopplung ausübt.

Die chronische CaMKII δ_B -Überexpression erfolgte bisher lediglich in einem transgenen Mausmodell, in dem eine milde Hypertrophie beschrieben wurde (ZHANG et al., 2002). Es ließen sich jedoch auf Zellebene in der vorliegenden Arbeit keinerlei signifikante Auswirkungen der CaMKII δ_B -Überexpression auf die elektromechanische Kopplung feststellen. Dabei fällt allerdings auf, dass erneut ein signifikanter Einfluss beim L-Typ Ca²⁺-Einstrom beobachtet wurde, diesmal ist allerdings die Ca²⁺-Amplitude signifikant verringert im Gegensatz zur akuten CaMKII δ_B -Überexpression erneut ohne Veränderung der Inaktivierungsparameter τ_1 und τ_2 oder der Facilitation. Außerdem konnte eine leichte Beschleunigung der Relaxation der Ca²⁺-Transienten beobachtet werden. Die anderen Parameter wie die Amplitude der Ca²⁺-Transienten, die Kontraktilität, der SR Ca²⁺-Gehalt, die NCX-Funktion, die SR Ca²⁺-Spark-Frequenz, die SR Ca²⁺-Sparkamplitude und damit auch die RyR-Öffnungswahrscheinlichkeit blieben unverändert. Daraus folgt, dass die chronische CaMKII δ_B -Überexpression ähnlich der akuten CaMKII δ_B -Überexpression auf zellulärer Ebene keine funktionelle Einflüsse auf die elektromechanische Kopplung besitzt.

4.2.1 Überexpression der CaMKII δ_B und Hypertrophie

Die CaMKII δ_B wurde in der vorliegenden Arbeit über 24 Stunden in isolierten Kaninchenmyozyten adenoviral vermittelt ca. fünffach überexprimiert, ähnlich wie in Vorarbeiten gezeigt wurde (RAMIREZ et al., 1997). Mittels immunhistochemischer Markierung der CaMKII δ_B und konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die CaMKII δ_B erwartungsgemäß nur im Zellkern der Myozyten nachweisbar ist (ZHANG et al., in Revision), da die CaMKII δ_B eine Kernlokalisationssequenz besitzt (ZHANG et al., 2002; ZHANG & BROWN, 2004). Die Vermutung, dass die CaMKII δ_B bedingt durch die Überexpression möglicherweise auch im Zytosol der Zelle aktiv ist und somit ähnliche Effekte wie die zytosolisch vorkommende CaMKII δ_C hervorruft, konnte damit weitgehend ausgeschlossen werden. Ähnlich wie die chronische CaMKII δ_C -Überexpression in vivo verursacht zwar auch die transgene Überexpression der CaMKII δ_B eine Hypertrophie des Mäuseherzens, allerdings kommt es nicht zur Herzinsuffizienz

(s. Abschnitt 4.1.1 und ZHANG et al., 2002 & 2003). Bei der akuten CaMKII δ_B -Überexpression, analog zur akuten CaMKII δ_C -Überexpression, konnte noch keine Zunahme der Myozytengröße, im Sinne einer beginnenden Hypertrophie auf Zellebene, beobachtet werden.

Im chronischen CaMKII δ_B -Überexpressionsmodell der transgenen Maus findet eine rund zehnfache Überexpression der CaMKII δ_B statt, die mit einer vierfach höheren CaMKII δ_B -Aktivität verbunden ist (ZHANG et al., 2002). Ebenso wie bei ZHANG et al. (2002) konnte im Rahmen dieser Arbeit eine milde Hypertrophie nachgewiesen werden, wie das erhöhte Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht im Vergleich zu WT-Tieren zeigt. Die Hypertrophie wird vermutlich durch die von der CaMKII δ_B aktivierten Hypertrophie-Signalwege verursacht, z.B. die Phosphorylierung von HDAC im Zellkern, was dann zur Anschaltung des Hypertrophieprogramms der kardialen Genexpression führt.

4.2.2 Vergleich der Einflüsse von akuter bzw. chronischer CaMKII δ_B -Überexpression auf den SR Ca²⁺-Gehalt, den RyR, die SERCA-Aktivität und die Kontraktilität

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die akute Überexpression der CaMKII δ_B zu keinen signifikanten Veränderungen in der elektromechanischen Kopplung führt, obwohl die transgene CaMKII δ_B Maus eine deutliche kardiale Hypertrophie aufweist. Interessant ist allerdings, dass die Ca²⁺-Transienten und die Kontraktilität entgegengesetzte Tendenzen aufweisen. Die Ca²⁺-Transienten sind im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht, wohingegen die Kontraktilität dagegen etwas geringer ist, jeweils nicht im signifikanten Ausmaß. Die tendenziell verstärkten Ca²⁺-Transienten sind am ehesten durch den verstärkten L-Typ Ca²⁺-Einstrom erklärbar. Infolge dessen findet möglicherweise eine etwas vermehrte SR Ca²⁺-Ausschüttung über den RyR statt, im Sinne einer verstärkten Ca²⁺-induzierten Ca²⁺-Ausschüttung (BIRKELAND et al., 2005). Da jedoch wie im Fall der akuten Überexpression der CaMKII δ_C keine direkte CaMKII-abhängige Sensibilisierung des RyR für Ca²⁺ vorliegt und die NCX- und SERCA-Aktivität unverändert bleiben, erfolgt keine wie von TRAFFORD et al. (2000) beschriebene Auto-regulation des RyR (vergl. Abschnitt 4.1.3), d.h., der SR Ca²⁺-Gehalt bleibt unbeeinflusst. Die Frage der leicht verminderten Kontraktilität ist damit jedoch

nicht geklärt. Die Antwort liefert vermutlich das durch die CaMKII δ_B -Überexpression gleichzeitig veränderte Expressionsmuster. Nach RAMIREZ et al. (1997) kommt es zu einer Umstellung auf embryonale Gene, wie es für kardiale Hypertrophie typisch ist. Hierzu gehört u.a. die vermehrte Bildung von β -MHC (engl. **myosin heavy chain**) und die verminderte Bildung von α -MHC, was unabhängig vom Ca²⁺-Stoffwechsel zu einer langsameren bzw. verminderten Kraftentwicklung der Myozyte führt (s.u.). Vermutlich sind noch weitere kontraktile Proteine davon betroffen. Dieser Effekt wird jedoch durch die leicht verstärkten Ca²⁺-Transienten kompensiert. Da die SR Ca²⁺-Spark-Frequenz unverändert ist, kann gefolgert werden, dass auch der RyR keine veränderte Öffnungswahrscheinlichkeit aufweist. Somit sind letztendlich die tendenziell verstärkten Ca²⁺-Transienten nur durch den erhöhten L-Typ Ca²⁺-Einstrom zu erklären, einerseits weil mehr Ca²⁺ über den L-Typ Ca²⁺-Kanal in die Myozyte einströmt und das vermehrt einströmende Ca²⁺ andererseits eine höhere SR Ca²⁺-Freisetzung über den RyR initiiert (BIRKELAND et al., 2005). Bei unveränderter SERCA- und NCX-Funktion wäre bedingt durch den signifikant verstärkten L-Typ Ca²⁺-Einstrom ein erhöhter SR Ca²⁺-Gehalt zu erwarten, d.h., aufgrund des höheren Ca²⁺-Einstroms in die Myozyte bei unveränderter NCX-Funktion wird bei gleichbleibender SERCA-Aktivität mehr Ca²⁺ in das SR befördert. Eine Erklärung liefert der von BIRKELAND et al. (2005) beschriebene Zusammenhang zwischen einströmendem Ca²⁺ über den L-Typ Ca²⁺-Kanal und der SR Ca²⁺-Ausschüttung. Bei verstärkter Ca²⁺-Ausschüttung aus dem SR bleibt das Verhältnis von externem und internem Ca²⁺, das die Kontraktion bestimmt, konstant, eine Aufladung des SR mit Ca²⁺ bleibt aus. Der fehlende Einfluss der CaMKII δ_B -Überexpression sowohl auf die SERCA- als auch die NCX-Funktion, kann einerseits durch die Lokalisation der CaMKII δ_B im Zellkern begründet werden, andererseits bewirkt die CaMKII δ_B keinerlei Verstärkung der Aktivität von Enzymen, die SERCA- und NCX-Funktion beeinflussen können. Eine eventuelle Einflussnahme der Überexpression der CaMKII δ_B zu einem späteren Zeitpunkt (mehr als 24 Stunden) kann aufgrund der sich verschlechternden Zellqualität bei physiologischen Messungen nicht mehr erfasst werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die akute Überexpression der CaMKII δ_B nur lokale Veränderungen an der elektromechanischen Kopplung bewirkt, wie den signifikant verstärkten L-Typ Ca²⁺-Einstrom und die vorbeschriebene Veränderung in den kontraktile Proteinen

α -MHC und β -MHC. Da sich diese Faktoren teilweise gegenseitig in ihren Effekten aufheben, kommt es somit zu keinen funktionellen Veränderungen in der elektromechanischen Kopplung.

Ebenso wie bei der akuten kommt es bei der chronischen CaMKII δ_B -Überexpression mit Ausnahme des zytosolischen Ca²⁺-Rückgangs zu keinerlei Veränderungen in der elektromechanischen Kopplung. Interessant ist, dass dieser signifikant beschleunigte Ca²⁺-Rückgang lediglich eine nicht signifikante Beschleunigung der Relaxation der Kontraktilität verursacht. Dieses Phänomen und die Ursache für die im Vergleich zur Kontrollgruppe unveränderte Kontraktilität bei gleichzeitig tendenziell jedoch nicht signifikant erhöhtem Ca²⁺-Transienten ist am ehesten wiederum im Gen-Expressionsmuster zu sehen. ZHANG et al. (2002) wies in einer transgenen CaMKII δ_B -überexprimierenden Maus wie bereits oben erwähnt eine Veränderung der Gen-Expression der kontraktilen Proteine auf mRNA-Ebene nach. Die mRNA für die β -MHC und das α -skelettale Actin wurden vermehrt, die mRNA für α -MHC vermindert exprimiert. Die α - und β -Isoformen der MHC werden auch in eine schnelle (α) und eine langsame (β) MHC unterteilt, basierend auf der Geschwindigkeit der Myosin-ATPase und der Muskelfaser-Verkürzungsrate. Es gibt drei verschiedene Dimerkonformationen $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ und $\beta\beta$. In der Ratte, die einen hohen Verwandtschaftsgrad zur Maus aufweist, herrscht die $\alpha\alpha$ -Dimerform vor, im Menschen und im Kaninchen dagegen die $\beta\beta$ -Form. Bei der Ratte kommt es während der Hypertrophie zu einer adaptativen Verschiebung von der α -MHC hin zur β -Variante (BERS, 2001). Durch die vermehrte Expression von β -MHC und gleichzeitig verminderte Expression der α -Form erfolgt eine Verschiebung vom $\alpha\alpha$ - zum $\beta\beta$ -MHC-Dimer und somit vom schnellen zum langsamen Zustand. Dieser Umstand führt vermutlich zu einer Verschlechterung des kontraktilen Verhaltens unabhängig vom Ca²⁺-Stoffwechsel. Somit wären sowohl die tendenzielle Beschleunigung der Relaxation der Kontraktion im Gegensatz zur Steigerung des Ca²⁺-Rückgangs, als auch die schlechtere Kontraktilität bei höheren Ca²⁺-Transienten begründet. Unklar ist die Ursache der leicht erhöhten Ca²⁺-Transienten. BIRKELAND et al. (2005) zufolge wäre eine geringere SR Ca²⁺-Ausschüttung zu erwarten, da über den L-Typ Ca²⁺-Kanal weniger Ca²⁺ in die Myozyte gelangt. Die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR, die in der

vorliegenden Arbeit durch die gleich gebliebene SR Ca^{2+} -Spark-Frequenz gezeigt wurde, ist daher unverändert und liefert keine Erklärung für die vermehrte SR Ca^{2+} -Ausschüttung. Einerseits trägt möglicherweise der leicht vergrößerte SR Ca^{2+} -Gehalt zur höheren Ca^{2+} -Ausschüttung bei. Andererseits ist denkbar, dass ebenfalls ein verändertes Proteinexpressionsmuster zugrunde liegt. Bei der vermehrten Expression der $\text{CaMKII}\delta_B$ werden auch in höherem Maß skelettale Proteine, z.B. das α -skelettale Actin, exprimiert. Infolge dessen ist es möglich, dass statt der kardialen α_1C -Untereinheit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals die skelettale α_1 -Untereinheit bei Hypertrophie exprimiert wird. Dann könnte auch die so genannte Spannungs-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung auftreten. In diesem Fall fungiert der L-Typ Ca^{2+} -Kanal möglicherweise als Spannungssensor, der über eine mechanische Verbindung die RyR-Funktion bzw. Öffnung beeinflussen könnte (RIOS & PIZARRO, 1991). Es ist also denkbar, dass auch bei der chronischen $\text{CaMKII}\delta_B$ -Überexpression in den Herzmuskelzellen vermehrt die Spannungs-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (statt der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung) aus dem SR eine Rolle spielt und somit trotz eines geringeren L-Typ Ca^{2+} -Einstroms mehr Ca^{2+} aus dem SR ausgeschüttet wird. Es liegt nahe, dass der Grund, aus dem die Ca^{2+} -Transienten leicht verstärkt sind, eine Kombination aus beiden obengenannten Argumenten sein könnte. Der mittels Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten ermittelte SR Ca^{2+} -Gehalt ist nicht signifikant unterschiedlich (F/F0 WT 2,5 zu TG 2,8; $p=0,165$). Das Post-Pausen-Verhalten zeichnet ein ähnliches Bild. Der prozentuale Anstieg des Post-Pausen-Schlages (WT 178%; TG 231%; $p=0,008$) jeweils bezogen auf die Gleichgewichtswerte, sind hingegen signifikant stärker als bei der Kontrollgruppe. Dieses deutet doch auf einen möglicherweise erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalt hin. Da die absoluten Werte für die Kontraktionskraft allerdings nicht verändert waren, sind die Werte der prozentualen Veränderung des SR Ca^{2+} -Gehaltes allerdings kritisch zu sehen.

Der beschleunigte Ca^{2+} -Rückgang der Ca^{2+} -Transienten, der in den Versuchen zu dieser Arbeit erkennbar war, ist vermutlich die Folge einer verstärkten SERCA-Aktivität. Die NCX-Funktion, bestimmt durch den Ca^{2+} -Rückgang nach einem Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten, blieb dabei unverändert. Der NCX kann also nicht für den beschleunigten Ca^{2+} -Rückgang der Ca^{2+} -Transienten verantwortlich sein. Weder die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase noch der mitochondriale Ca^{2+} -Uniport üben üblicherweise Einflüsse auf die

elektromechanische Kopplung aus, da sie in zu geringem Maße an der Relaxation beteiligt sind und eine zu niedrige Transportrate besitzen, um bei CaMKII δ_B -vermittelter Überexpression eine signifikante Beschleunigung auszulösen. Ausgeschlossen werden kann jedoch nicht, dass diese beiden Transportsysteme deutlich verstärkt aktiv sind. Somit bleibt die SERCA-Aktivität der wichtigste Faktor für den beschleunigten Ca²⁺-Rückgang der Ca²⁺-Transienten. ZHANG et al. (2002) zufolge gibt es keine Veränderung im SERCA- bzw. PLB-Proteingehalt bei den transgenen Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach ZHANG et al. (2002) ist allerdings eine signifikant verminderte Phosphorylierung von PLB und eine signifikant geringere SERCA-Aktivität vorhanden, wie anhand eines SR Ca²⁺-Aufnahme Assays ermittelt wurde. Diese Faktoren deuten auf eine geringere SERCA-Aktivität hin, ebenso wie die hämodynamischen Messungen, in denen die Herzen von transgenen Tieren langsamer relaxierten als die der Kontrollgruppe. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten stehen daher im Gegensatz zu den Ergebnissen von ZHANG et al. (2002). An dieser Stelle muss allerdings erwähnt werden, dass die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit an isolierten Myozyten durchgeführt wurden, während ZHANG et al. (2002) in vivo bzw. mit ganzen Herzen gearbeitet hatten. Somit waren die Untersuchungsmethoden mit auxotonischen bzw. isometrischen Kontraktionen im Ganzherz im Vergleich zu isotonischen Verkürzungen in den Einzelzellexperimenten der vorliegenden Arbeit ohne jegliche Vordehnung deutlich verschieden, was die widersprüchlichen Ergebnisse erklären könnte. Daher kann vermutet werden, dass zumindest die beschleunigte Relaxation isolierter Myozyten der vorliegenden Arbeit durch eine verstärkte SERCA-Aktivität begründet werden kann.

4.2.3 Einflüsse der akuten bzw. chronischen CaMKII δ_B -Überexpression auf den L-Typ Ca²⁺-Einstrom

Der L-Typ Ca²⁺-Einstrom zeigt bei akuter Überexpression der CaMKII δ_B eine verstärkte Amplitude ohne veränderte Inaktivierung oder Facilitation. Dies deutet nicht auf einen direkten Effekt der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung hin, da die Verlängerung der Inaktivierung und die Facilitation bereits als markante Effekte der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung des L-Typ Ca²⁺-Kanals beschrieben worden sind (s. Abschnitt 4.1.2) (XIAO et al., 1994; YUAN & BERS,

1994; DZHURA et al., 2000; GRUETER et al., 2006). Ebenfalls spricht die Lokalisation der CaMKII δ_B im Zellkern gegen einen direkten CaMKII Effekt auf den zytosolisch gelegenen L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanal. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass es unter CaMKII-Inhibition durch AIP oder KN93 zu keiner Reduktion des L-Typ Ca $^{2+}$ -Einstroms kommt. Eine vermehrte Expression des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals ist eine mögliche Erklärung für die beobachtete verstärkte Ca $^{2+}$ -Amplitude bei unveränderter Inaktivierung. Eine vermehrte Expression des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals kann nicht ausgeschlossen werden. Eine andere denkbare Erklärung stellt eine Phosphorylierung durch eine andere Proteinkinase dar, die ausgelöst durch die Überexpression der CaMKII δ_B vermehrt exprimiert wird. In diesem Fall bliebe die Facilitation aus, weil der L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanal bedingt durch die nicht CaMKII-bedingte Phosphorylierung an einer anderen Stelle als der β -Untereinheit keine Facilitation zeigt. RAMIREZ et al. (1997) zeigten, dass eine Überexpression der CaMKII δ_B in neonatalen ventrikulären Myozyten zur erneuten Expression der embryonalen Gene, wie z.B. des ANF (Atrial Natriuretic Factor) führt. Es ist möglich, dass durch die CaMKII δ_B -Überexpression weitere Gene wie z.B. der L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanal oder andere Proteine, die den Ca $^{2+}$ -Kanal selbst regulieren, verändert exprimiert werden. WALSH & CHENG (2004) zeigten z. B., dass die PKA den L-Typ Ca $^{2+}$ -Einstrom unter Stimulation von Forskolin verstärken kann. Ebenso denkbar erscheint eine CaMKII δ_B -abhängige Veränderung der Untereinheiten des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals. MATTHES et al. (2006) konnten nachweisen, dass eine Überexpression der β -Untereinheit des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals eine signifikante Steigerung des L-Typ Ca $^{2+}$ -Einstromes zur Folge hat. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass eine akute Überexpression der CaMKII δ_B durch die Umstellung des Expressionsmusters in der Myozyte eine Verstärkung des L-Typ Ca $^{2+}$ -Einstroms induziert.

Im Gegensatz zur akuten führt eine chronische CaMKII δ_B -Überexpression zu einer signifikanten Verminderung des L-Typ Ca $^{2+}$ -Einstroms. Die Facilitation und die Inaktivierung bleiben erneut unverändert. Der verminderte L-Typ Ca $^{2+}$ -Einstrom, die unveränderte Inaktivierung und die bereits erwähnte Lokalisation der CaMKII δ_B im Zellkern schließen eine direkte Phosphorylierung des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals durch die CaMKII δ_B weitgehend aus. Denkbar ist jedoch eine verstärkte Dephosphorylierung des L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanals und somit dessen verminderte Aktivierung. Die Protein-Phosphatase 2A wies in der von ZHANG et al. (2002)

untersuchten transgenen CaMKII δ_B -überexprimierenden Maus eine verstärkte Aktivität auf. Infolge dessen könnte die basale Phosphorylierung des L-Typ Ca²⁺-Kanals bei CaMKII δ_B -Überexpression beispielsweise geringer sein als im WT, was eine geringere Aktivität und einen geringeren Ca²⁺-Einstrom zur Folge hätte. Ebenfalls denkbar ist eine Verminderung der Expression des L-Typ Ca²⁺-Kanals, durch die sich die geringere Ca²⁺-Amplitude, die unveränderte Inaktivierung und die vorhandene Facilitation erklären ließen. Ein Widerspruch zu den Ergebnissen der Untersuchungen zur akuten Überexpression besteht nur scheinbar, da sich eine Verminderung der Expression erst nach dem Ersetzen der bereits vorhandenen L-Typ Ca²⁺-Kanäle auswirkt, d.h. nach einem Zeitraum von mindestens 24 Stunden. Eine Veränderung der Expression der Untereinheiten des L-Typ Ca²⁺-Kanals hätte ebenfalls eine vermindernde Wirkung auf den L-Typ Ca²⁺-Einstrom. Diese Hypothese stünde allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen der Untersuchungen zur akuten CaMKII δ_B -Überexpression, da diese nicht gleichzeitig zur Expression einer verstärkenden und einer vermindernenden Untereinheit des L-Typ Ca²⁺-Kanals führen kann. Auszuschließen sind diese gegensätzlichen Regulationsmechanismen jedoch nicht. Daher erscheint die Annahme, dass die chronische Überexpression den L-Typ Ca²⁺-Kanal durch ein verändertes Expressionsmuster beeinflusst, am wahrscheinlichsten. ZHANG et al. (2002) zeigten, dass auch bei der transgenen CaMKII δ_B -überexprimierenden Maus eine vermehrte Expression embryonaler Proteine erfolgt. Daher kann auch hier analog zur akuten Überexpression die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die CaMKII δ_B -Überexpression zwar den verminderten L-Typ Ca²⁺-Einstrom induziert, diesen jedoch nicht direkt beeinflusst. Ebenso wie bei der akuten kann auch bei der chronischen CaMKII δ_B -Überexpression ein verändertes Expressionsmuster der Myozyte als Ursache für die Beeinflussung des L-Typ Ca²⁺-Einstromes angesehen werden. Die Ergebnisse werden auch durch Studien gestützt, in denen es bei Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz sekundär im Rahmen der Phänotypänderung zum verminderten Ca²⁺-Einstrom, aber auch zur verminderten Ca²⁺-Kanal-Expression kommt (PIOT et al., 1996; OUADID et al., 1995; TAKAHASHI et al., 1992).

Als Schlussfolgerung kann zusammengefasst werden, dass die CaMKII δ_B -Überexpression zu keinen funktionellen Änderungen in der elektromechanischen Kopplung in isolierten Myozyten führt .

5. Literaturverzeichnis

AIX, CURRAN JW, SHANNON TR, BERS DM & POGWIZD SM (2005)

Ca²⁺-Calmodulin-dependent Protein Kinase Modulates RyR2 Phosphorylation and SR Ca²⁺ Leak in a Rabbit Heart Failure
Circ Res 97:1314-1322

ALPERT NR & GORDON MS (1962)

Myofibrillar adenosine triphosphatase activity in congestive heart failure
Am J Physiol 202:940-946

ANDERSON ME, BRAUN AP, SCHULMAN H & PREMACK BA (1994)

Multifunctional Ca/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca-induced enhancement of the L-type Ca current in rabbit ventricular myocytes
Circ Res 75:854-861

ARMSTRONG CM, BENZANILLA FM & HOROWICZ P (1972)

Twitches in the presence of ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid
Biochim Biophys Acta 267:605-608

BARE DJ, KETTLUN CS, LIANG M, BERS DM & MIGNERY GA (2005)

Cardiac Type 2 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
J Biol Chem 280:15912-15920

BASSANI RA, MATTIAZZI A & BERS DM (1995)

CaMK-II is responsible for the activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes
Am J Physiol 268: H703-H712

BERS DM (1983)

Early transient depletion of extracellular [Ca] during individual cardiac muscle contractions.
Am J Physiol 244:H462-H468

BERS DM (2001)

Excitation-contraction coupling and cardiac contractil force. 2nd edition.
Kluwer Academic Publishers.

BERS DM (2002)

Cardiac excitation-contraction coupling
Nature 415:198-205

BEUCKELMANN DJ, NÄBAUER M & ERDMANN E (1992)

Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure
Circulation 85:1046-1055

BEZANILLA F (2002)

Voltage sensor movements.
J Gen Physiol 120:465-473

BIRKELAND JA, SEJERSTED OM, TARALDSEN T & SJAASTAD I (2005)

EC-Coupling in normal and failing hearts
Scand Cardiovasc J 39:13-23

BODI I, MIKALA G, KOCH SE, AKHTER SA & SCHWARTZ A (2005)

The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on
J Clin Invest 115:3306-3317

BÖHM M, LA ROSÉE K, SCHMIDT U, SCHULZ C, SCHINGER RGH & ERDMANN E (1992)

Force-frequency relationship and inotropic stimulation in the nonfailing and failing human myocardium: implications for the medical treatment of heart failure.
Clin Invest 70:421-425

BOWELS NE, ROSE ML, TAYLOR P, BANNER NR, MORGAN-CARPNER P, CUNNINGHAM L, ARCHARD LC & YACOUB MH (1989)

End-stage dilated cardiomyopathy: Persistence of enterovirus RNA in myocardium at cardiac transplantation and lack of immune response
Circulation 80:1128-1136

BRAUNWALD E, CHOBANIAN A, COLTON T, EYDAHL R, HARRINGTON J, KAZEMI H, MAYER R, MCINTOSH K, NATHAM D, RAISZ L, ROTHMAN K & RYAN T (1989)

Alcoholic myopathy and cardiomyopathy
N Engl J Med 320:458-459

BRODDE OE (1996)

Human myocardial β -adrenergic receptors: properties, function and changes in chronic heart failure

In : *Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Regulation*,

Edited by Endoh M, Morad M, Scholz H & Iijima T.

Springer-Verlag 393-408

CLARKE DM, LOO TW, INESI G & MACLENNAN DH (1989 B)

Location of high affinity Ca^{2+} -binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase
Nature 339:476-478

CLARKE DM, MAURYAMA K, LOO TW, LEBERER E, INESI G & MACLENNAN DH (1989 A)

Functional consequences of glutamate, aspartate, glutamine and asparagine mutations in the stalk sector of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum

J Biol Chem. 264:11246-11251

COBBOLD PH & RINK TJ (1987)

Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium

Biochem J 248:313-328

COLYER J & WANG JH (1991)

Dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump activity on the phosphorylation status of phospholamban

J Biol Chem 266:17486-17493

CURRIE S, LOUGHREY CM, CRAIG MA & SMITH GL (2003)

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart

Biochem J 377:357-366

DAVIDSON GA & VARHOL RJ (1995)

Kinetics of thapsigargin- Ca^{2+} -ATPase (sarcoplasmic reticulum) interaction reveals a two-step binding mechanism and picomolar inhibition

J Biol Chem 270:11731-11734

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

DOERING AE, NICOLL DA, LU YJ, LU LY, WEISS JN & PHILIPSON KD (1998)

Topology of a functionally important region of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger.

J Biol Chem 273:778-783

- DZHURA I, WU Y, COLBRAN RJ, BALSER JR & ANDERSON ME (2000)**
Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels.
Nat Cell Biol 2:173-177
- FLUCHER BE & FRANZINI-ARMSTRONG C(1996)**
Formation of junctions involved in excitation-contraction-coupling in skeletal and cardiac muscle
Proc Natl Acad Sci USA 93:8101-8106
- GOEGER DE, RILEY RT, DORNER JW & COLE RJ (1988)**
Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca²⁺-transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles
Biochem Pharmacol. 37:978-981
- GOLLNICK F, WANG SY & MEYER R (1992)**
Effect of experimental parameters on quantitative Fura-2 measurements
Pflügers Arch 420, Suppl. 1: R142
- GOODWIN JF & OAKLEY CM (1972)**
The cardiomyopathies
Br Heart J 34:545-552
- GRAHAM FL, SMILEY J, RUSSELL WC & NAIRN R (1977).**
Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.
J Gen Virol 36: 59-74
- GRUETER CE, ABIRIA SA, DZHURA I, WU Y, HAM A-JL, MOHLER PJ, ANDERSON ME & COLBRAN RJ (2006)**
L-Type Ca²⁺ Channel Facilitation Mediated by Phosphorylation of the β -Subunit by CaMKII
Molecular Cell 23:641–650
- 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, ZHANG T, MESTRIL R & BERS DM (2006)**
Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation of Ryanodine Receptor Does Affect Calcium Sparks in Mouse Ventricular Myocytes
Circ Res 99:398-406
- HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B & SIGWORTH FJ (1981)**
Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches
Pflügers Arch 391:85-100
- HASENFUSS G, MULIERI LA, LEAVITT BJ, ALLEN PD, HAEBERLE JR & ALPERT NR (1992)**
Alteration of contractile function and excitation coupling in dilated cardiomyopathy
Circ Res 70:1225-1232
- HASENFUSS G, REINECKE H; STUDER R, MEYER M, PIESKE B, HOLTZ J, HOLUBARSCH C, POSIVAL H, JUST H & DREXLER H (1994)**
Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in failing and nonfailing human myocardium
Circ Res 75:434-442
- HASENFUSS G (1998)**
Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure
Cardiovasc Res 37:279-289
- HESS P (1988)**
Elementary properties of cardiac calcium channels: A brief review
Can J Physiol Pharmacol 66:1218-1223

HIRZEL HO, TUCHSCHMID CR, SCHNEIDER J, KRAYENBUEHL HP & SCHAUB MC (1985)

Relationship between myosin isoenzyme composition, hemodynamics and myocardial structure in various forms of human cardiac hypertrophy
Circ Res 57:729-740

HOBAILA & O'ROURKE B (2000)

Enhanced Ca^{2+} -activated Na^+ - Ca^{2+} exchange activity in canine pacing-induced heart failure
Circ Res 87:690-698

HOCH B, MEYER R, HETZER R, KRAUSE EG & KARCEWSKI P (1999)

Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium
Circ Res 84:713-721

HOOK SS & MEANS AR (2001)

Ca^{2+} /CaM-dependent kinases: from activation to function
Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 471-505

HUDMAN A, PITT GS, TSIEN RW & SCHULMAN H (2002)

Molecular mechanism and regulation of the interaction between calcium-calmodulin dependent protein kinase II and the L-type calcium channel
Biophys J 82:172a

HUKE S & BERS DM (2005)

Frequency-dependent acceleration of relaxation (FDAR) does not require phospholamban phosphorylation by CaM-kinase II in rat cardiomyocytes
Biophys J 88:311a

HUXLEY HE (1969)

The mechanism of muscular contraction
Science 164:1356-1366

HUYNH QK & MCKINSEY TA (2006)

Protein kinase D directly phosphorylates histone deacetylase 5 via a random sequential kinetic mechanism
Arch Biochem Biophys 450:141-148

IMPERIALE M J, KAO H T, FELDMAN LT, NEVINS JR & STRICKLAND S (1984)

Common control of the heat shock gene and early adenovirus genes: evidence for a cellular E1A-like activity
Mol Cell Biol 4:867-74

INESI G (1985)

Mechanism of calcium transport
Ann Rev Physiol 47:573-601

INUI M, CHAMBERLAIN BK, SAITO A & FLEISCHER S (1986)

The nature of the modulation of Ca^{2+} transport as studied by reconstitution of cardiac sarcoplasmic reticulum
J Biol Chem 261:1794-1800

IWAMOTO T, NAKAMURA TY, PAN Y, UEHARA A, IMANAGA I & SHIGEKAWA M (1999)

Unique topology of the internal repeats in the cardiac Na^+ / Ca^{2+} exchanger
FEBS Lett 446:264-268

JACKSON AP, TIMMERMAN MP, BAGSHAW CR & ASHLEY CC (1987)

The kinetics of calcium binding to Fura-2 and Indo-1
FEBS Lett 216:35-39

JAMES P, INUI M, TADA M, CHIESI M & CARAFOLI E (1989)

Nature and site of phospholamban regulation of the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum
Nature 342:90-92

JAMES P, MAEDA M, FISCHER R, VERMA AK, KREBS J, PENNISTON JT & CARAFOLIE (1988)

Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes
J Biol Chem 263:2905-2910

KAO JPY & TSIEN RY (1988)

Ca²⁺ binding kinetics of Fura-2 and Azo-1 from temperature-jump relaxation measurements
Biophys J 53:635-639

KIM HW, STEENAART NA, FERGUSON DG & KRANIAS EG (1990)

Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles
J Biol Chem 265: 1702-1709

KIRCHBERGER MA, TADA M & KATZ AM (1974)

Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum
J Biol Chem 249: 6166-6173

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.

KOHLHAAS M, ZHANG T, SEIDLER T, ZIBROVA D, STEEN A, WAGNER S, CHEN L, BROWN JH, BERS DM & MAIER LS (2006)

Increased SR Ca leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes
Circ Res 98:235-244

KRANIAS EG & DI SALVO J (1986)

A phospholamban protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum
J Biol Chem 261:10029-10032

KRANIAS EG (1985)

Regulation of Ca²⁺ transport by cyclic 3',5'-AMP dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cardiac sarcoplasmic reticulum
Biochim Biophys Acta 844: 193-199

LE PEUCHCJ, HAIECH J & DEMAILLE JG (1979)

Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphorylation
Biochemistry 18: 5150-5157

LI ZP, MATSUOKA S, HRYSHKO LV, NICOLL DA, BERSOHN MM, BURKE EP, LIFTON RP & PHILIPSON KD (1994)

Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁺-Ca²⁺ exchanger.
J Biol Chem 269:17434-17439

LINCK B, QIU ZY, HE ZP, TONG QS, HILGEMANN DW & PHILIPSON KD (1998)

Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3).
Am J Physiol 274:C415-C423

MAIER LS & BERS DM (2002)

Calcium, calmodulin, and calcium/calmodulin kinase II- Heartbeat to heartbeat and beyond
J Mol Cell Cardiol 34: 919-939

MAIER LS (2005)

CaMKII δ overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling
Braz J Med Biol Res 38:1298-1302

MAIER LS, BERS DM & PIESKE B (2000 B)

Differences in Ca²⁺-handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-content in isolated rat and rabbit myocardium
J Mol Cell Cardiol 32:2249-2258

MAIER LS, BRAUNHÄLTER J, HORN W, WEICHERT S & PIESKE B (2002 A)

The role of SR Ca²⁺-content in blunted responsiveness of failing human myocardium
J Mol Cell Cardiol 34: 459-471

MAIER LS, SCHWAN C, SCHILLINGER W, MINAMI K, SCHÜTT U & PIESKE B (2000 A)

Gingerol, isoproterenol, and ouabain normalize impaired post-rest behavior but no force-frequency relation in human myocardium
Cardiovasc Res 45:913-924

MAIER LS, ZHANG T, CHENG L, DESANTIAGO J, BROWN JH & BERS DM (2003)

Transgenic CaMKII α C Overexpression Uniquely Alters Cardiac Myocyte Ca²⁺ Handling
Circ Res 92:904-911

MAIER LS, ZIOLO MT, PERSECHINI A, MESTRIL R & BERS DM (2002 B)

Ca-calmodulin sensing fluorescent protein expressed in adult cardiac myocytes by adenoviral infection
Biophys J 82: 596a

MAISCH B, DEEG P, LIEBAU G & KOCHSIEK K (1983)

Diagnostic relevance of humoral and cytotoxic immune reactions in primary and secondary dilated cardiomyopathy
Am J Cardiol 52:1072-1078

MARX SO, REIKEN S, HISAMATSU Y, JAYARAMAN T, BURKHOFF D, ROSEMBLIT N & MARKS AR (2000)

PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts
Cell 101:365-376

MATSUOKA S, NICOLL DA, REILLY RF, HILGEMANN DW & PHILIPSON KD (1993)

Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger
Proc Natl Acad Sci USA 90:3870-3874

MATTHES J, KHAN IFY, RUBIO M, BODI I, VON VIETINGHOFF S, BÜNEMANN M, HEIN L, SCHWARTZ A & HERZIG S (2006)

Herzinsuffizienz-abhängige Expression und Aktivität einzelner L-Typ Ca²⁺-Kanäle in Ventrikeln Cav1.2-überexprimierender Mäuse
72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie: V1487 (Abstract)

MCKINSEY TA, ZHANG CL, LU J & OLSON EN (2000)

Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation
Nature 408:106-111

MEYER M, SCHILLINGER W, PIESKE B, HOLUBARSCH C, HEILMANN C, POSIVAL H, KUWAJAMA G, MIKOSHIBA K, JUST H & HASENFUSS G (1995)

Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy
Circulation 92:778-784

MINSKY M. (1988)

Memoir on inventing the confocal scanning microscope
Scanning 10:128-138

NÄBAUER M, CALLEWART G, CLEEMANN L & MORAD M (1989)

Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes
Science 244:800-803

- NAKAMURA H, NAKASAKI Y, MATSUDA N & SHIGEKAWA M (1992)**
Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone
J Biochem 112:750-755
- NICOLL DA, LONGONI S & PHILIPSON KD (1990)**
Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger
Science 250:562-565
- NICOLL DA, QUEDNAU BD, QUI ZY, XIA YR, LUSIS AJ & PHILIPSON KD (1996)**
Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3
J Biol Chem 271:24914-24921
- NIGGLI V, ADUNYAH ES, PENNISTON JT & CARAFOLI E (1981)**
Purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of the erythrocyte membrane
J Biol Chem 256:395-401
- NOWYCKY MC, FOX AP & TSIEN RW (1985)**
Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity
Nature 316:440-443
- ODERMATT A, KURZDLOWSKI K & MACLENNAN DH (1996)**
The V_{max} of the Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by Ca²⁺/calmodulin dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban
J Biol Chem. 271: 14206-14213
- OTSU K, WILLARD HF, KHANA VJ, ZORZATO F, GREEN NM & MACLENNAN DH (1990)**
Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum
J Biol Chem 265:13713-13720
- OUADID H, ALBAT B, NARGEOT J (1995)**
Calcium currents in diseased human cardiac cells
J Cardiovasc Pharmacol 25:282-291
- PAWLEY JB (1995)**
Handbook of Biological Confocal Microscopy
Plenum Press
- PETERSON BZ, DEMARIA CD & YUE DT (1999)**
Calmodulin is the sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels
Neuron 22: 549-558
- PIESKE B, KRETSCHMANN B, MEYER M, HOLUBARSCH C, WEIRICH J, POSIVAL H, MINAMI K, JUST H & HASENFUSS G (1995)**
Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force frequency relation in human dilated cardiomyopathy
Circulation 92: 1169-1178
- PIESKE B, 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
- PIOT C, LEMAIRE S, ALBAT B, SEGUIN J, NARGEOT J, RICHARD S (1996)**
High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents
Circulation 93:120-128
- POGWIZD SM, SCHLOTTHAUER K, LI L, YUAN W & BERS DM (2001)**
Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness
Circ Res 88:1159-1167

- RAMIREZ MT, ZHAO XL, SCHULMAN H & BROWN JH (1997)**
The nuclear δ_B isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial factor gene expression in ventricular myocytes
J Biol Chem 272/49:31203-31208
- REBER WR & WEINGART R (1982)**
Ungulate cardiac purkinje fibres: the influence of intracellular pH on the electrical cell-to-cell coupling
J Physiol 328:87-104
- REDDY LG, JONES LR, CALA SE, O'BRIAN JJ, TATULIAN SA & STOKES DL (1995)**
Functional reconstitution of recombinant phospholamban with rabbit skeletal Ca^{2+} -ATPase
J Biol Chem 270:9390-9397
- REUTER H & SEITZ N (1968)**
The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition
J Physiol 195:45-70
- RINGER SA (1883)**
Further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart
J Physiol 4:29-42
- RODRIGUEZ P, BHOGAL MS & COLYER J (2003)**
Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A
J Biol Chem 278:38593-38600
- ROSSI AE & DIRKSEN RT (2006)**
Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle
Muscle Nerve 33: 715-731
- SCHATZMANN HJ (1989)**
The calcium pump of the surface membrane of the sarcoplasmic reticulum
Ann Rev Physiol 51:473-485
- SCHLEGEL HG (1992)**
Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage
Thieme Verlag ISBN 3 13 444607 3
- SCHMIDT RF & UNSICKER K (2003)**
Lehrbuch Vorklinik
Deutscher Ärzte-Verlag, Ausgabe 1
- SCHULTHEISS HP, SCHULZE K, SCHAUER R, WITZENBICHLER B & STAUBER BE (1995)**
Antibody-mediated imbalance of myocardial energy metabolism. A causal factor of cardiac failure?
Circ Res 76:64-72
- SHUMACHER A, RIVARD AF, BACHINGER HP & ADELMAN JP (2001)**
Structure of the gating domain of a Ca^{2+} -activated K^+ channel complexed with Ca^{2+} /calmodulin
Nature 410: 1120-1124
- SCHWINGER RHG, BÖHM M, MÜLLER-EHMSSEN J, UHLMANN R, SCHMIDT U, STÄBLEIN A, KREUZER ÜE, REICHARD B, EISSNER HJ & ERDMANN E (1993)**
Effect of inotropic stimulation of the negative force frequency relationship in the human heart
Circulation 88: 2267-2276

SHANNON TR, GINSBURG KS & BERS DM (2002)

Quantitative assessment of the SR-Ca²⁺-leak-load relationship
Circ Res 91:594-600

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

SHANNON TR, WANG F & BERS DM (2005)

Regulation of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ca Release by Luminal [Ca] and Altered Gating Assessed with a Mathematical Model
Biophys J 89:4096-4110

SIMMERMAN HK, COLLINS JH, THEIBERT JL, WEGENER AD & JONES LR (1986)

Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains
J Biol Chem 261: 13333-13341

SPERGEL JM, HSU W, AKIRA S, THIMMAPPAYA B, KISHIMOTO T & CHEN-KIANG S (1992)

NF-IL6, a member of the C/EBP family, regulates E1A-responsive promoters in the absence of E1A
J Virol 66: 1021-1030

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

TADA M & INUI M (1983)

Regulation of the calcium transport by the ATPase-phospholamban system
J Mol Cell Cardiol 15: 565-575

TADA M, KIRCHBERGER MA & KATZ AM (1975)

Phosphorylation of the 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase
J Biol Chem 250: 2640-2647

TADA M, YAMADA M, KADOMA M, INUI M & OHMORI F (1982)

Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban
Mol Cell Biochem 46:93-95

TAKAHASHI T, ALLEN PD, LACRO RV, MARKS AR, DENNIS AR, SCHOEN FJ, GROSSMAN W, MARSH JD, IZUMO S (1992)

Expression of dihydropyridine receptor (Ca²⁺ channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure
J Clin Invest 90:927-935

TAKESHIMA H, IINO M, TAKEKURA H, NISHI M, KUNO J, MINOWA O, TAKANO H & NODA T (1994)

Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene
Nature 369:556-559

TAKESHIMA H, IKEMOTO T, NISHI M, NISHIYAMA N, SHIMUTA M, SUGITANI Y, KUNO J, SAITO I, SAITO H, ENDO M, IINO M & NODA T (1996)

Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3
J Biol Chem 271:19649-19652

TAKESHIMA H, KOMAZAKI S, HIROSE K, NISHI M, NODA T & LINO M (1998)
Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2
EMBO J 17:3309-3316

THASTRUP O, CULLEN PJ, DROBAK BK, HANLEY MR & DAWSON AP (1990)
Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase
Proc Natl Acad Sci USA 87:2466-2470

TRAFFORD AW, DÍAZ ME, SIBBRING GC & EISNER DA (2000)
Modulation of CICR has no maintained effect on systolic Ca^{2+} : Simultaneous measurements of sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal Ca^{+} fluxes in rat ventricular myocytes
J Physiol 522:259-270

TSIEN RY (1980)
New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis and properties of prototype structure
Biochem 19:2396-2404

TSIEN RY, POZZAN T & RINK TJ (1982)
Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator
J Cell Biol 94:325-354

VERMA AK, FILOTEO A, STANFORD DR, WIEBEN ED, PENNISTON JT, STREHLER EE, FISCHER R, HEIM R, VOGEL G, MATHEWS S, STREHLER-PAGE MA, JAMES P, VORHERR T, KREBBS J & CARAFOLI E (1988)
Complete primary structure of a human plasma membrane Ca^{2+} pump
J Biol Chem 263:14152-14159

WAGNER S, SEIDLER T, PICTH E, MAIER LS, KAZANSKI V, TEUCHER N, SCHILLINGER W, PIESKE B, ISENBERG G, HASENFUSS G & KÖGLER H (2003)
 Na^{+} - Ca^{2+} exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury
Cardiovasc Res 60: 404-412

WALSH KB & CHENG QI (2004)
Intracellular Ca^{2+} regulates responsiveness of cardiac L-type Ca^{2+} current to protein kinase A: role of calmodulin
Am J Physiol Heart Circ Physiol 286: H186-H194

WANG K, WRIGHT LC, MADIAN CL, ALLEN BG, CONIGRAVE AD & ROUFOGALIS BD (1991)
Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes
J Biol Chem 266:9078-9085

WEHRENS XH, LEHNART SE, REIKEN SR & MARKS AR. (2004)
 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor
Circ Res 94:e61-e70

WEINGART R (1977)
The actions of ouabain on intracellular coupling and conduction velocity in mammalian ventricular muscle
J Physiol 264:341-364

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

WU X, ZHANG T, BOSSUYT J, LI X, MCKINSEY TM, DEDMAN JR, OLSON EN, CHEN J, BROWN JH & BERS DM (2006)

Local InsP₃-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling

J Clin Invest 116:675–682

WU Y, TEMPLE J, ZHANG R, DZHURA I, ZHANG W, TRIMBLE R, RODEN DM, PASSIER R, OLSON EN, COLBRAN RJ & ANDERSON ME (2002)

Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy

Circulation 106:1288-1293

XIAO B, ZHONG G, OBAYASHI M, YANG D, CHEN K, WALSH MP, SHIMONI Y, CHENG H, KEURS HT & CHEN SRW (2006)

Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon β -adrenergic stimulation in normal and failing hearts

Biochem J 396, 7–16

XIAO RP, CHENG H, LEDERER WJ, SUZUKI T & LAKATTA EG (1994)

Dual regulation of Ca/calmodulin kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx

Proc Natl Acad Sci USA 91:9659-9663

YUAN W & BERS DM (1994)

Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin dependent protein kinase

Am J Physiol 267:H982-H993

ZHANG T & BROWN JH (2004)

Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure.

Cardiovasc Res 63:476-486

ZHANG T, JOHNSON EN, GU Y, MORISSETTE MR, SAH VP, GIGENA MS, BELKE DD, DILLMANN WH, ROGERS TB, SCHULMAN H, ROSS J JR. & BROWN JH (2002)

The cardiac-specific nuclear α B isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2a activity

J Biol Chem 277:1261-1267

ZHANG T, KOHLHAAS M, BACKS J, PHILLIPS W, MISHRA S, DYBKOVA N, CHANG S, BERS DM, MAIER LS, OLSON EN & BROWN JH. (in Revision)

Cytoplasmic and nuclear isoforms of CaMKII differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional response.

J Biol Chem

ZHANG T, MAIER LS, DALTON ND, MIYAMOTO S, ROSS J JR, BERS DM & BROWN JH (2003)

The δ_C Isoform of CaMKII Is Activated in Cardiac Hypertrophy and Induces Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure

Circ Res 92:912-919

ZHU WZ, WANG SQ, CHAKIR K, YANG D, ZHANG T, BROWN JH, DEVIC E, KOBILKA BK, CHENG H & XIAO R-P (2003)

Linkage of β_1 -adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II

J Clin Invest 111: 617-625

6. Erklärungen

Hiermit erkläre ich, Michael Kohlhaas, an Eides Statt, die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Die Bedeutung der subzellulären CaMKII δ -Überexpression auf den intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsel in Herzmuskelzellen

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Göttingen, den 04.12.06

Michael Kohlhaas

Hiermit erkläre ich, Michael Kohlhaas, dass ich mich an keiner anderen Universität um den Doktorgrad beworben habe.

Göttingen, den 04.12.06

Michael Kohlhaas

Hiermit erkläre ich, Michael Kohlhaas, dass die vorliegende elektronische Fassung mit der von der Fakultät zur Drucklegung genehmigten Fassung der Dissertation übereinstimmt.

Göttingen, den 01.03.07

Michael Kohlhaas

7. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. R. Hardeland und Herrn Prof. Dr. D. Doenecke recht herzlich für die Übernahme des Referates bzw. des Korreferates danken.

Ein besonders herzlichen Dank gilt Herrn PD Dr. L. S. Maier für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, die hervorragende Betreuung und seinem Vertrauen in meine Arbeit.

Für die technische Unterstützung während meiner Arbeit möchte ich recht herzlich den technischen Assistentinnen bzw. Assistenten Frau A. Steen, Frau G. Müller, Frau S. Ott-Gebauer, Herrn M. Kothe und Herrn T. Schulte danken.

Mein weiterer Dank gilt den Mitgliedern des Labors von Herrn PD Dr. L. S. Maier für ihre Unterstützung, die wissenschaftlichen Diskussionen und die freundliche Atmosphäre. Namentlich möchte ich Frau N. Dybkova, Herrn C. M. Sag, Herrn A. Rokita, Herrn S. Neef, Herrn Dr. S. Wagner und Herrn S. T. Sosalla nennen.

Zum Schluss gilt mein besonders herzlicher Dank meiner Ehefrau Frau, Dipl. Geol. I. A. Krüger, die mich während meiner Doktorarbeit so tatkräftig unterstützt hat und auch zum Gelingen dieser maßgeblich beigetragen hat. Ebenso möchte ich meinen Töchtern, Sonja und Jenny, für ihr Verständnis danken, dass der Papa immer so viel arbeiten musste.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Kohlhaas
Geb.: 10.09.1974 in Bonn
Familienstand: verheiratet (seit 28.12.2001)
2 Kinder (Sonja, geb. am 1.3.2002,
Jennifer, geb. am 20.2.2005)

Schulbesuch

08/85 – 07/91 Realschule am Petersberg, Königswinter
Mittlere Reife

07/91 – 06/95 Privates Ernst-Kalkuhl-Gymnasium, Bonn-Oberkassel
Abitur

Dienst

07/95 – 06/96 3. Nachschubbataillon 310, Dietz bei Limburg an der Lahn
Rechnungsführergehilfe

Hochschulausbildung

10/96 – 09/97 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
Mathematik und Physik auf Lehramt

10/97 – 12/02 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
Biologie, Abschluss: Diplom
Diplomarbeit: Untersuchungen zur Methanoxidation im
Konzentrationsbereich unter 200 ppm in Biofiltern mittels
methanabbauenden Bakterien

Studienbegleitende Nebentätigkeiten

07/96 – 08/00 kaufmännischer Angestellter und Lagerarbeiter bei der Kaufhof
Warenhaus AG

11/00 – 12/00 Justizbote im Amtsgericht Königswinter

07/01 – 10/02 studentische Hilfskraft an der Universität Bonn

12/02 – 01/03 Bürokraft bei der CENDRIS Deutschland GmbH

Beruflicher Werdegang

Seit 04/03 wissenschaftlicher Mitarbeiter zur Promotion an der Georg-August-Universität Göttingen, Bereich Humanmedizin, Abteilung Kardiologie und Pneumologie

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

- 1 **Kohlhaas M**, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Heller Brown J, Bers DM, Maier LS.
Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes.
Circ Res. 98:235-244.2006.
mit Editorial von Litwin SE. "Ryanogate": Who Leaked the Calcium? Circ Res 98:165-168.2006.
- 2 Schillinger W, Teucher N, Christians C, **Kohlhaas M**, Sossalla S, Van Nguyen P, Schmidt AG, Schunck O, Nebendahl K, Maier LS, Zeitz O, Hasenfuss G.
High intracellular Na⁺ preserves myocardial function at low heart rates in isolated myocardium from failing hearts.
Eur J Heart Fail. 8:673-680.2006.
- 3 Kögler H, Schott P, Toischer K, Milting H, Nguyen Van P, **Kohlhaas M**, Grebe C, Kassner A, Domeier E, Teucher N, Seidler T, Knöll R, Maier LS, El-Banayosy A, Körfer R, Hasenfuss G.
Relevance of brain natriuretic peptide in preload-dependent regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase expression.
Circulation. 113:2724-2732.2006.
- 4 Zhang T, **Kohlhaas M**, Backs J, Phillips W, Mishra S, Dybkova N, Chang S, Bers DM, Maier LS, Olson EN, Heller Brown J.
Cytoplasmic and nuclear isoforms of CaMKII differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional response.
J Biol Chem. (in Revision).

Abstracts

- 1 Maier LS, Zhang T, Seidler T, **Kohlhaas M**, Ziolo MT, Zibrova D, Chen L, Heller Brown J, Bers DM.
Adenoviral overexpression of CaMKII δ_c alters calcium handling in isolated rabbit cardiac myocytes.
Circulation. 108 (Suppl IV):54.2003.

- 2 Schillinger W, Teucher N, Zeitz O, Christians C, **Kohlhaas M**, Van Nguyen P, Hensmann G, Schmidt AG, Maier LS, Hasenfuss G.
Frequenz-abhängige Änderungen des SR Ca^{2+} -Gehalts und der intrazellulären Na^+ -Konzentration und deren Einfluß auf die Kontraktilität bei Tachykardie-induzierter Herzinsuffizienz.
Z Kardiologie. 93 (Suppl 3):195-196.2004.
- 3 **Kohlhaas M**, Seidler T, Zhang T, Zibrova D, Steen A, Chen L, Heller Brown J, Bers DM, Maier LS.
Differences in the effects on intracellular calcium handling in isolated rabbit cardiac myocytes overexpressing cytoplasmic vs. nuclear CaMKII δ isoform.
Z Kardiologie. 93 (Suppl 3):196.2004.
- 4 **Kohlhaas M**, Seidler T, Zhang T, Zibrova D, Dybkova N, Heller Brown J, Bers DM, Maier LS.
Intracellular calcium handling in isolated rabbit cardiac myocytes overexpressing cytoplasmic vs. nuclear CaMKII δ isoform.
Europ Heart J. 25 (Suppl):178-179.2004.
- 5 Schillinger W, Teucher N, Zeitz O, Christians C, **Kohlhaas M**, Van Nguyen P, Maier LS, Hasenfuss G.
Contractility and intracellular sodium in pacing-induced heart failure.
Europ Heart J. 25 (Suppl):557.2004
- 6 Wagner S, Rasenack ECL, Jacobshagen C, **Kohlhaas M**, Heller Brown J, Bers DM, Maier LS.
Ca/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) reduces the availability of cardiac voltage-gated Na channels.
Circulation. 110 (Suppl III):61.2004.
- 7 Maier LS, **Kohlhaas M**.
Intracellular calcium handling in cardiac myocytes overexpressing nuclear CaMKII δ B isoform.
Pflügers Archiv: Europ J Physiol. 449 (Suppl 1):S45.2005.
- 8 Wagner S, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, **Kohlhaas M**, Maier LS.
Transgene Überexpression von CaMKII δ c führt zu Reizleitungsstörungen und verstärkter Ajmalin-Empfindlichkeit.
Z Kardiologie. 94 (Suppl 1):P1313.2005
- 9 **Kohlhaas M**, Maier LS.
Veränderte Kinetik des L-Typ Ca-Einstroms bei adenoviraler Überexpression von CaMKII δ C und δ B in Kaninchenmyozyten.
Z Kardiologie. 94 (Suppl 1):P1297.2005
- 10 **Kohlhaas M**, Bers DM, Maier LS.
Intracellular Calcium Handling in Cardiac Myocytes Overexpressing Nuclear CaMKII δ B Isoform.
Z Kardiologie. 94 (Suppl 1):V44.2005
- 11 **Kohlhaas M**, Dybkova N, Bers DM, Maier LS.
CaMKII-Inhibition vermindert das diastolische SR Ca Leck.
Z Kardiologie. 95 (Suppl 1):P963.2006.
- 12 **Kohlhaas M**, Schotola H, Kögler H, Maier LS.
Untersuchungen zum subzellulären Ca Stoffwechsel bei CaMKII δ B Überexpression und zur Kontraktilität.
Z Kardiologie. 95 (Suppl 1):V1605.2006.

Sprachkenntnisse

Englisch

IT-Kenntnisse

Microsoft-Office, Graphik (COREL DRAW), Präsentation (POWER POINT),
Internet-Recherche, wissenschaftliche Spezialsoftware (IonOptix; Clampfit
8.1; SigmaPlot 8.0; SigmaStat 2.01; Carl Zeiss AIM, PatchMaster 2.0)

Göttingen, den 04.12.06

Michael Kohlhaas