

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

**Funktionelle Charakterisierung
der Kalzium/Calmodulin-abhängigen
Proteinkinase-II- δ (CaMKII δ)-Knockout-Maus**

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von
Maria Daut geb. Raftopoulos
aus
Guxhagen

Göttingen 2013

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

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L. S. Maier

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungs- Tabellen-, Formel- und Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Struktur des Kardiomyozyten.....	1
1.2 Elektromechanische Kopplung	3
1.3 Kardiomyozytärer Kalziumstoffwechsel.....	5
1.3.1 L-Typ-Kalzium-Kanal	5
1.3.2 Sarkoplasmatisches Retikulum.....	5
1.3.3 Ryanodinrezeptor Typ 2	6
1.3.4 SR-Kalzium-ATPase und SR-Kalziumaufnahme.....	7
1.3.5 Natrium-Kalzium-Austauscher	8
1.3.6 Weitere Kalziumtransporter	8
1.4 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII).....	9
1.4.1 Allgemeines und Struktur der CaMKII	9
1.4.2 Aktivierung und Deaktivierung der CaMKII	10
1.4.3 CaMKII ist ein zentraler Regulator der elektromechanischen Kopplung.....	11
1.4.3.1 <i>CaMKII und L-Typ-Kalzium-Kanal.....</i>	<i>12</i>
1.4.3.2 <i>CaMKII und RyR2.....</i>	<i>12</i>
1.4.3.3 <i>CaMKII und SERCA2a/PLB.....</i>	<i>13</i>
1.4.4 Einfluss der CaMKII auf die Gentranskription	13
1.4.5 CaMKII und Herzinsuffizienz.....	14
1.5 CaMKIIδ-Inhibition und -Knockout.....	15
1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Isolation vereinzelter Kardiomyozyten	18
2.1.1 Aufbau der Messkammer und Plattieren der Zellen	19
2.2 Kalziumfluoreszenzfarbstoffe.....	20
2.2.1 Fluo-3-AM und Fluo-4-AM	20
2.2.2 Fura-2-AM	21
2.3 Aufbau und Prinzip der Messung an der Epifluoreszenzanlage.....	22
2.3.1 Messung der Myozytenverkürzung	22

2.3.2 Erfassung der intrazellulären Kalziumtransienten mittels Fluo-3-AM.....	23
2.3.3 Ratio-Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Fura-2-AM.....	24
2.4 Untersuchung von Kalziumtransienten und Zellverkürzung an der Epifluoreszenzanlage	24
2.4.1 Basisprotokoll unter Normaltyrode und Fluo-3-AM.....	25
2.4.1.1 <i>Post-Pausen-Potenzierung</i>	25
2.4.1.2 <i>Kraft-Frequenz-Beziehung</i>	26
2.4.1.3 <i>Koffein-induzierter Kalziumtransient</i>	26
2.4.2 Isoproterenol (Einwaschversuche und Kraft-Frequenz-Beziehung).....	27
2.4.3 Messprotokoll mit Fura-2-AM gefärbten Zellen	28
2.4.4 Messprotokoll mit Calyculin-A.....	28
2.5 Datenauswertung.....	29
2.5.1 Auswertung der Kalziumfluoreszenz.....	31
2.5.2 Auswertung der Myozytenverkürzung.....	32
2.6 Messung von Kalziumsparks am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.....	33
2.7 Ermittlung von Herz- und Körpergewicht.....	34
2.8 Messung der Kardiomyozyten-Dimensionen	34
2.9 Statistik.....	34
2.10 Verwendete Lösungen	35
2.10.1 Basistyrode	35
2.10.2 Messtyrode	35
2.10.3 Koffeintyrode (10 mM).....	36
2.10.4 Isoproterenol-Tyrode.....	37
2.10.5 Farbstoffe.....	37
2.10.6 Calyculin-A.....	39
2.11 Hersteller verwendeter Substanzen	40
3 Ergebnisse	41
3.1 Funktionelle Daten der CaMKIIδ-Knockout-Maus.....	41
3.1.1 Messung des Herz- und Körpergewichtes	42
3.1.2 Dimensionen der Kardiomyozyten	42
3.2 Zytoplasmatisches freies Kalzium und Myozytenkontraktion.....	43
3.2.1 Untersuchung der systolischen Funktion auf Einzelzellebene.....	43
3.2.1.1 <i>Kraft-Frequenz-Beziehung</i>	44
3.2.2 Untersuchung der diastolischen Funktion auf Einzelzellebene.....	47

3.2.2.1	<i>Kinetik der zytosolischen Kalziumelimination</i>	47
3.2.2.2	<i>Sarkomer-Relaxations-Kinetik</i>	50
3.2.2.3	<i>NCX-Funktion</i>	51
3.2.3	Post-Pausen-Potenzierung	52
3.2.4	SR-Kalziumgehalt	58
3.2.5	Diastolisches SR-Kalziumleck/ Kalziumsparks	59
3.2.6	Freies diastolisches Kalzium und diastolische Sarkomerlänge	62
3.3	Adrenerge Stimulation	65
3.3.1	Einwasch-Versuche mit 4 nM Isoproterenollösung	65
3.3.2	Kraft-Frequenz-Beziehung unter 4 nM Isoproterenollösung	67
3.4	Kalziumelimination unter Calyculin-A	70
4	Diskussion	73
4.1	Unveränderte Mortalität und biometrische Daten unter Basalbedingungen	74
4.2	Intakte systolische Funktion der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten	75
4.3	Veränderte diastolische Funktion der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten	76
4.3.1	Verminderte SERCA2a-Funktion	76
4.3.2	Intakte FDAR im CaMKII δ -Knockout	77
4.4	Vermindertes SR-Kalziumleck, aber nicht signifikant erhöhter SR-Kalziumgehalt im CaMKII δ -Knockout	79
4.5	Unbeeinträchtigt Post-Pausen-Verhalten im CaMKII δ -Knockout	81
4.6	Erhöhte diastolische Kalziumkonzentration und kürzere diastolische Sarkomerlänge im CaMKII δ -Knockout	81
4.7	Unvermindertes inotropes und lusitropes Ansprechen auf Isoproterenol im CaMKII δ -Knockout	82
4.8	Einbettung der Befunde hinsichtlich therapeutischer Anwendung	83
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle.	2
Abbildung 1.2: Die elektromechanische Kopplung am Herzen.....	3
Abbildung 1.3: Das Prinzip der Gleitfilamenttheorie:.....	4
Abbildung 1.4: Struktur und Aufbau der CaMKII.	10
Abbildung 1.5: Angriffspunkte der CaMKII	11
Abbildung 1.6: Die CaMKII und HDAC4.....	14
Abbildung 2.1: Schema einer Messkammer.	19
Abbildung 2.2: Fluo-3-AM.	21
Abbildung 2.3: Aufbau und Strahlengang für die Messungen mit Fluo-3-AM.	23
Abbildung 2.4 Originalregistrierung.....	26
Abbildung 2.5: Gemittelter Kalziumtransient bei 1 Hz	32
Abbildung 2.6: Gemittelte Sarkomerverkürzung.....	32
Abbildung 3.1: Fotos der Kardiomyozyten.	42
Abbildung 3.2: Originalregistrierungen der Kalziumamplitude.....	44
Abbildung 3.3: Frequenzabhängigkeit der Kalziumamplitude.....	45
Abbildung 3.4: Frequenzabhängige Kontraktilität.....	46
Abbildung 3.5: Frequenzabhängigkeit der Kalziumelimination (τ_{Ca}).	48
Abbildung 3.6: Frequenzabhängige Kalziumelimination ($EZ_{Ca50\%}$).	49
Abbildung 3.7: Originalregistrierung der Kalziumtransienten einer homozygoten CaMKII δ - Knockout-Zelle bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen übereinander gelagert.....	49
Abbildung 3.8: Frequenzabhängige Sarkomerrelaxation ($RZ_{Kontr.50\%}$).	51
Abbildung 3.9: Koffein (τ_{Ca}).....	52
Abbildung 3.10: F/F_0 prozentual nach Stimulationspause.....	55
Abbildung 3.11: Myozytenverkürzung prozentual nach Stimulationspause.....	56
Abbildung 3.12: Post-Pausen-Beziehung.	57
Abbildung 3.13: Koffein-induzierter Kalziumtransient.....	58
Abbildung 3.14: Koffein F/F_0	59
Abbildung 3.15: Anteil sparkender Zellen (in %) bezogen auf alle gemessenen Zellen.....	60
Abbildung 3.16: Spark-Frequenz	60
Abbildung 3.17: F/F_0 der Kalziumsparks.....	61
Abbildung 3.18: $EZ_{CaSp.50\%}$	61

Abbildung 3.19: „totales“ SR-Kalziumleck.....	62
Abbildung 3.20: Freies diastolisches Kalzium.....	63
Abbildung 3.21 diastolische Sarkomerlänge (μm).....	64
Abbildung 3.22: Einwaschen von 4 nM Isoproterenollösung F/F_0 und Kontraktion.....	65
Abbildung 3.23: Einwaschen von 4 nM Isoproterenollösung $EZ_{Ca50\%}$ und $RZ_{Kontr.50\%}$	66
Abbildung 3.24: Originalregistrierung unter Isoproterenol.....	67
Abbildung 3.25: Frequenzabhängigkeit der Kalziumamplitude bzw. Myozytenverkürzung unter 4 nM Isoproterenol.	68
Abbildung 3.26: $EZ_{Ca50\%}$ und $RZ_{Kontr.50\%}$ unter 4 nM Isoproterenol.....	70
Abbildung 3.27: Calyculin-A $EZ_{Ca80\%}$	71
Abbildung 3.28: Frequenzabhängige $EZ_{Ca80\%}$	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Basis-Messprotokoll.....	27
Tabelle 2.2: Isoproterenol-Messprotokoll.....	28
Tabelle 2.3: Messprotokoll für Fura-2-AM-Messungen.....	28
Tabelle 2.4: Calyculin-A-Messprotokoll.....	29
Tabelle 2.5: Auswertung Basisprotokoll.....	30
Tabelle 2.6: Auswertung Isoproterenol-Protokoll.....	30
Tabelle 2.7: Auswertung Calyculin-A-Protokoll.....	30
Tabelle 2.8: Auswertung der Fura-2-AM-Messungen.....	31
Tabelle 2.9: Inhaltsstoffe der Basistyrode.....	35
Tabelle 2.10: Inhaltsstoffe der Messtyrode.....	35
Tabelle 2.11: Inhaltsstoffe der Koffeintyrode.....	36
Tabelle 2.12: Inhaltsstoffe der ASC-Tyrode sowie der Isoproterenol-Stamm-I- und -II-Lösung und der Isoproterenol-Messtyrode.....	37
Tabelle 2.13: Inhaltsstoffe der Farbstoffstammlösung Fluo-3-AM und Fura-2-AM.....	37
Tabelle 2.14: Inhaltsstoffe von Pluronic 20%.....	38
Tabelle 2.15: Inhaltsstoffe von Fluo-3-AM/Fura-2-AM-Gebrauchslösung (10 μM).....	38
Tabelle 2.16 Inhaltsstoffe von Fluo-4-AM-Stammlösung.....	38
Tabelle 2.17: Inhaltsstoffe von Fluo-4-AM-Gebrauchslösung.....	39
Tabelle 2.18: Inhaltsstoffe der Calyculin-A-Stammlösung.....	39
Tabelle 2.19: Inhaltsstoffe der Calyculin-A-Tyrode.....	39
Tabelle 2.20: Inhaltsstoffe der doppelt konzentrierten Fluo-3-AM Gebrauchslösung (20 μM).....	39
Tabelle 2.21: Inhaltsstoffe der Calyculin-A–Fluo-3-AM-Mischung.....	40
Tabelle 2.22 Hersteller verwendeter Substanzen.....	40

Tabelle 3.1: Geburten-Verteilungsmuster der Genotypen nach Verpaarung heterozygoter CaMKII δ -Knockout-Mäuse.....	41
Tabelle 3.2: Übersicht über Alter der Mäuse sowie Herz- und Körpergewicht incl. des Herz/Körpergewicht-Verhältnisses.	42
Tabelle 3.3: Zelldimensionen.....	43
Tabelle 3.4: Frequenzabhängige Kontraktilität.....	46
Tabelle 3.5: RZ _{Kontr.50%}	50
Tabelle 3.6: Post-Pausen-Experimente.	54
Tabelle 3.7: EZ _{Ca50%} unter 4 nM Isoproterenol.	69
Tabelle 3.8: RZ _{Kontr.50%} unter 4 nM Isoproterenol.....	69
Tabelle 3.9: EZ _{Ca80%} mit und ohne Calyculin-A	71

Formelverzeichnis

Formel 2.1	31
Formel 2.2.....	32
Formel 2.3.....	34

Abkürzungsverzeichnis

AC3-I	Autocamide-3-Inhibitory-Peptide
AIP	Autocamide-2-related-inhibitory-peptide
AM	Azetoxymethylester
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMKII	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKII δ_B	nukleäre Splicevariante der CaMKII-Unterform δ
CaMKII δ_C	zytosolische Splicevariante der CaMKII-Unterform δ
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
diast.	diastolisch
EZ _{Ca 50%} , EZ _{Ca 80%}	Zeit bis zur 50%igen bzw. 80%igen Elimination des freien zytosolischen Kalziums
EZ _{Ca-Sp.50%}	Zeit bis zur 50%igen Elimination des freien zytosolischen Kalziums nach Kalziumspark

F	Peak-Fluoreszenz
F ₀	Fluoreszenz der Ruhe-Kalziumkonzentration
FDAR	<i>Frequency-dependent-acceleration of relaxation</i> (Frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation)
FKBP	FK-Bindungsprotein
HCl	Salzsäure
HDAC4	Histon-Deacetylase-4
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HZ	heterozygot CaMKII δ -Knockout
I _{Ca}	Sarkolemmaler L-Typ-Kalzium-Kanal vermittelter Kalziumeinstrom
Iso	Isoproterenol
KCl	Kaliumchlorid
KN-62	(S)-5-Isoquinolinesulfonic acid 4-[2-[(5-isoquinoliny)sulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl]phenyl ester
KN-93	N-[2-[N-(4-Chlorocinnamyl)-N-methylaminomethyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzenesulfonamide phosphate salt
KO	homozygot CaMKII δ -Knockout
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MEF2	Myozyten Enhancer Factor-2
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
n.s.	nicht signifikant
NT	Normaltyrode
PKA, PKC, PKD	Proteinkinase A, Proteinkinase C, Proteinkinase D
PLB	Phospholamban
PP1, 2a, 2c	Proteinphosphatase Typ 1, 2a oder 2c
RyR2	Ryanodinrezeptor(en) Typ 2

$RZ_{\text{Kontr.50\%}}$	Zeit bis zur 50%igen Relaxation der Myozytenverkürzung
SERCA2a	kardiale SR-Kalzium-ATPase
SL	Sarkomerlänge
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
sys.	systolisch
τ_{Ca}	Monoexponentielle Zeitabfallskonstante des Kalziumtransienten (τ)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Herzinsuffizienz wird definiert als das Unvermögen des Herzens, eine ausreichende Versorgung der Gewebe mit Blut und damit mit Sauerstoff sicherzustellen.

Mittlerweile ist allgemein anerkannt, dass es einen Zusammenhang zwischen pathophysiologischen Veränderungen im kardialen Kalziumhaushalt und der Entstehung der Herzinsuffizienz gibt (u. a. Hasenfuss 1998; Bers 2006). Eine wichtige Rolle spielt hierbei die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) (Maier et al. 2003; Zhang T et al. 2003).

Die Herzmuskelzelle - mit ihrer Ultrastruktur, ihrem Kalziumhaushalt und ihrer elektrischen Erregung, Kontraktion und Relaxation - ist zentrales Thema dieser Untersuchung. Daher werden diese für das Verständnis der Arbeit wichtigen, physiologischen Zusammenhänge zu Beginn der Einleitung beschrieben. Anschließend wird die CaMKII ausführlich vorgestellt und die Möglichkeiten von CaMKII-Inhibition bzw. -Knockout aufgeführt. Abschließend werden die grundlegenden Ziele und Fragen der Arbeit aufgezeigt und erläutert. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit werden die angewandten Mess-Methoden und die dafür eingesetzten Materialien erklärt sowie deren Auswertung erläutert. Im zentralen dritten Teil werden alle Messergebnisse präsentiert und graphisch dargestellt. Abschließend werden die eigenen Messergebnisse im vierten Teil diskutiert und in Bezug zur aktuellen Forschung gesetzt.

1.1 Struktur des Kardiomyozyten

Ein einzelner Kardiomyozyt ist ca. 100 µm lang und hat einen Durchmesser von 15-20 µm. Im Gegensatz zur Skelettmuskelzelle besitzt er meist nur einen zentral gelegenen Zellkern (selten zwei) und dominiert so als Einzelzelle und nicht als Synzytium. Umgeben sind die einzelnen Herzmuskelzellen von einer Zellmembran, dem so genannten Sarkolemm. Dieses stülpt sich in Form von zahlreichen kleinen transversalen Tubuli (T-Tubuli) in die Zelle ein. Das Sarkolemm besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, in die Cholesterin sowie zahlreiche integrale Proteine, z.B. Ionenpumpen und -kanäle, eingebaut sind. Diese steuern teils passiv über den osmotischen Gradienten, teils aktiv über energieverbrauchende Mechanismen den Ein- und Ausstrom von Ionen in bzw. aus den Kardiomyozyten. Das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) dient als Kalziumspeicher und ist ein zentrales Zellorganell des Kardiomyozyten.

Etwa die Hälfte des Volumens einer Herzmuskelzelle nehmen die Myofilamente Aktin und Myosin ein. Sie sind parallel ineinander geschichtet und bilden zusammen die sogenannten Sarkomere.

Der enorme Energiebedarf des Herzens wird durch eine sehr hohe Dichte an ATP-produzierenden Mitochondrien gedeckt.

Zudem enthält die Herzmuskelzelle auch weitere unerlässliche Zellorganellen, die der Aufrechterhaltung der Zellphysiologie dienen, wie den Golgi-Apparat, Lysosomen, Peroxisomen und das Zytoskelett (Bers 2001).

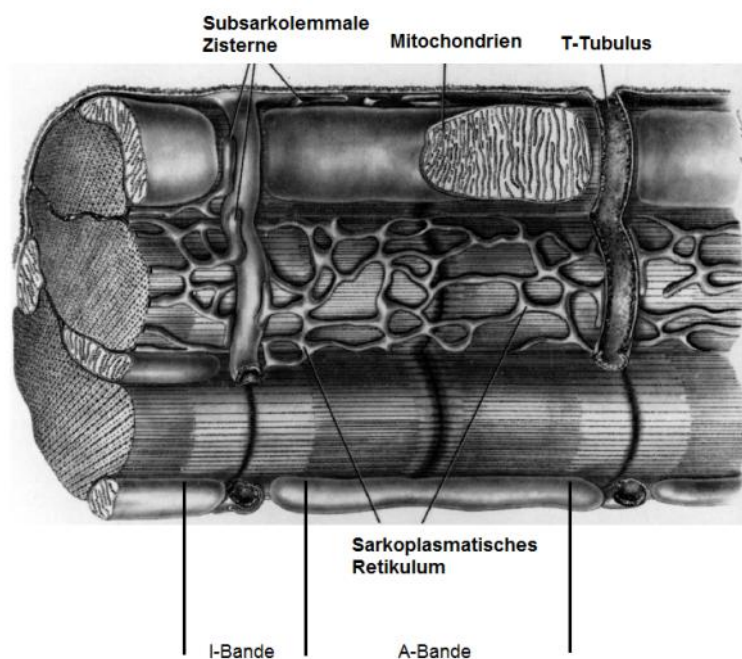


Abbildung 1.1: Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle.
(Modifiziert nach Bers 2001, Seite 3)

1.2 Elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung des Herzens umfasst den Prozess von der elektrischen Erregung der Herzmuskelzelle bis hin zur Kontraktion des Herzens.

Durch ein Aktionspotential kommt es zur Depolarisation der Zellmembran in der Systole. Diese führt zur Öffnung spannungsabhängiger L-Typ-Kalzium-Kanäle und somit zum Kalziueinstrom in die Zelle. Das einströmende Kalzium triggert die Öffnung der im SR lokalisierten Ryanodinrezeptoren Typ 2 (RyR2), durch welche im SR gespeichertes Kalzium in das Zytosol ausgeschüttet wird. Für diese, 1975 von Fabiato A und Fabiato F erstmals beschriebene, „Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung“ ist die räumliche Nachbarschaft der L-Typ-Kalzium-Kanäle mit den RyR2 des SR von großer Bedeutung.

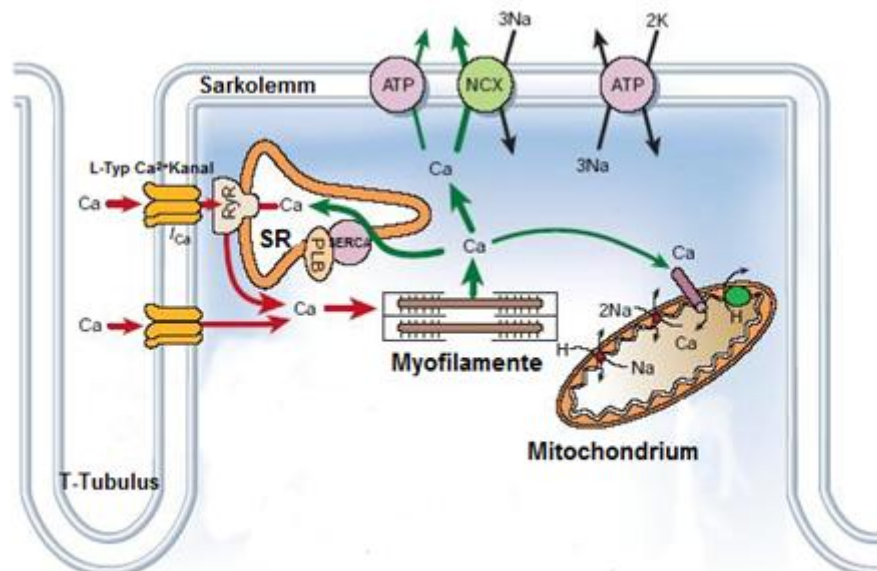


Abbildung 1.2: Die elektromechanische Kopplung am Herzen.

Wird eine Kardiomyozyte durch ein Aktionspotential erregt, kommt es zunächst zu einem Kalziueinstrom durch die L-Typ-Kalziumkanäle und daraus resultierend zur Kalzium-induzierten-Kalziumfreisetzung aus dem SR (rote Pfeile). Der Anstieg des intrazellulären Kalziums führt zur Aktivierung der Myofilamente. Im Rahmen der myokardialen Relaxation wird anschließend das Kalzium hauptsächlich über die kardiale SR-Kalzium-ATPase (SERCA2a) zurück in das SR bzw. über den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) zurück in den Extrazellulärraum transportiert (dicke grüne Pfeile). Zu geringen Teilen eliminieren auch die Kalzium-ATPase und der mitochondriale Kalzium-Uniporter Kalzium aus dem Intrazellulärraum (dünne grüne Pfeile).

(Modifiziert nach Bers 2002, S. 198.)

Die Kalziumfreisetzung aus dem SR ist der mengenmäßig dominante Mechanismus des systolischen Anstiegs der freien intrazellulären Kalziumkonzentration von diastolisch etwa 100 nM auf systolisch über 1 μ M, welcher zur Aktivierung der Myofilamente führt (Bers 2001). Diese setzen damit letztlich die elektrisch/chemische Botschaft in mechanische Kontraktion um.

Dafür bindet Kalzium an Troponin C, woraufhin einerseits die Interaktionsstelle von Aktin und Myosin freigegeben wird, und andererseits die Aktivitätssteigerung bestimmter ATPasen bewirkt wird. Diese hydrolysieren das am Myosinköpfchen befindliche ATP zu ADP, worauf eine Querbrückenbildung zwischen Myosin und Aktin möglich wird. Unter Abgabe des ADP kann Myosin nun gegenüber Aktin abkippen, welches wiederum ein Ineinandergleiten der Myofilamente zur Folge hat (Huxley 1969).

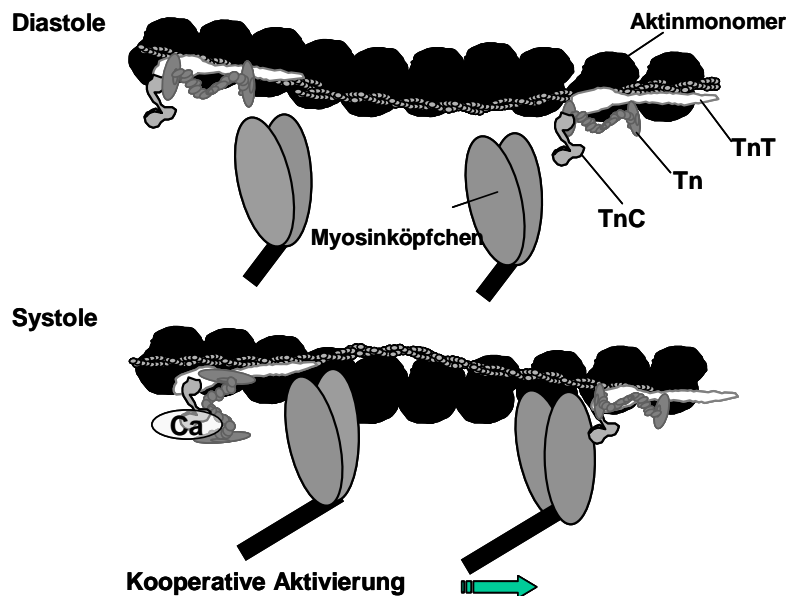


Abbildung 1.3: Das Prinzip der Gleitfilamenttheorie:

Kalzium bindet an Troponin C, woraufhin dieses die Myosinbindungsstelle am Aktin freigibt. Unter Energieverbrauch dreht sich das Myosinköpfchen und das Aktinfilament verschiebt sich gegenüber dem Myosinfilament. So kommt es zu einem Ineinandergleiten der Filamente.
(modifiziert nach Bers 2001, S. 25)

Damit die Zelle relaxieren kann, muss das Kalzium wieder aus dem Zytosol eliminiert werden. Dafür gibt es unterschiedliche Mechanismen:

Die Wiederaufnahme in das SR stellt dabei den quantitativ dominierenden Mechanismus (Maus 92%, Mensch 70%) der gesamten Kalziumelimination dar (Bers 2002) und geschieht als aktiver Transport über die kardiale SR-Kalzium-ATPase (SERCA2a). Die Aktivität der SERCA2a ist wiederum durch Phospholamban reguliert (vgl. 1.3.4, S. 7-8).

Über den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) gelangen bei der Maus 7% und beim Menschen 28% des gesamten Kalziums zurück in den Extrazellulärraum. Zu sehr geringen Teilen (Maus 1% und Mensch 2%) wird Kalzium auch durch die sarkolemmal gelegene Kalzium-ATPase und den mitochondrialen Kalzium-Uniport eliminiert (Bers 2002).

Durch diese Vorgänge sinkt die intrazelluläre Kalziumkonzentration wieder auf etwa 100 nM, es kommt zur ATP-Anlagerung an das Myosinköpfchen und die Querbrückenverbindung zum Aktin wird wieder gelöst - die Zelle relaxiert.

1.3 Kardiomyozytärer Kalziumstoffwechsel

Kalzium ist ein wichtiger Botenstoff im Kardiomyozyten. Es reguliert zum einen zahlreiche am Kalziumstoffwechsel beteiligte Enzyme und Kanäle und „übersetzt“ zum anderen das elektrische Signal in mechanische Kontraktion. Kalzium steht dabei nicht am Anfang der Signalkette, sondern agiert als sekundärer Botenstoff (*second messenger*).

Um den Kalziumstoffwechsel besser verstehen zu können, sollen nun die an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Kanäle und Organellen einzeln vorgestellt werden.

1.3.1 L-Typ-Kalzium-Kanal

Aufgrund seiner Sensitivität gegenüber 1,4-Dihydropyridin wird der L-Typ-Kalzium-Kanal auch als Dihydropyridinrezeptor bezeichnet. Aktiviert wird der Kalziumeinstrom über den L-Typ-Kalzium-Kanal durch die Membrandepolarisation, welche durch den schnellen Natriumeinstrom zu Beginn eines Aktionspotentials bedingt wird. Die Inaktivierung erfolgt zum einen durch lang anhaltende Depolarisation und zum anderen durch einen negativen Feedbackmechanismus, bedingt durch steigende intrazelluläre Kalziumkonzentrationen. Dies schützt die Zelle vor Kalziumüberladung. Beta-adrenerge Stimulation kann die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) zur Phosphorylierung des L-Typ-Kalzium-Kanals veranlassen. Dieser reagiert auf die Phosphorylierung mit einem verstärkten Kalziumeinstrom (Bers 2001). Auf den Einfluss der CaMKII auf den L-Typ-Kalzium-Kanal wird in Abschnitt 1.4.3.1, S. 12 genauer eingegangen.

1.3.2 Sarkoplasmatisches Retikulum

Das SR ist von einer Membran umgeben und bildet so gegenüber dem intrazellulären Raum ein eigenes Kompartiment. Aufgebaut ist es in Form von longitudinalen Tubuli (L-Tubuli) und terminalen Zisternen. Es hat drei zentrale Aufgaben im Kalziumstoffwechsel der Herzmuskelzelle: Die Kalziumspeicherung, die Kalziumfreisetzung und die Kalziumwiederaufnahme.

Die Kalziumspeicherung erfolgt im Inneren des SR, Kalzium wird dort an das Protein Calsequestrin gebunden. Für die Ausschüttung sind die RyR2 verantwortlich. Diese sind in der Membran der terminalen Zisternen des SR lokalisiert.

Die Wiederaufnahme des intrazellulären Kalziums in das SR ist essentiell für die Relaxation der Zelle. Sie erfolgt über die energieverbrauchenden SERCA2a, die sich in den L-Tubuli des SR befinden und in die Membran eingelagert sind.

Die Menge des im SR gespeicherten Kalziums korreliert positiv mit der Kraftentwicklung durch die Myofilamente, d.h. je mehr Kalzium im Speicher ist, desto stärker kontrahiert die Zelle (Bers 2001; Maier und Bers 2002). Bei jeder Kontraktion wird zwar nur ein Teil des im SR befindlichen Kalziums ausgeschüttet, trotzdem ist es von zentraler Bedeutung, den gesamten SR-Kalziumgehalt zu bestimmen.

Eine vermehrte Kalziumspeicherung im SR wird vor allem bei steigenden Frequenzen möglich (Maier et al. 2000b). Der Kalziumeinstrom über den L-Typ-Kalzium-Kanal wird u.a. durch beta-adrenerge Stimulation gesteigert (Bers 2001). Der daraus resultierende erhöhte intrazelluläre Kalziumgehalt führt zu einer vermehrten Einspeicherung des Kalziums in das SR. Durch den höheren Kalziumgehalt im SR wird nun eine verstärkte Kontraktion möglich (positive Kraft-Frequenz-Beziehung) (Bers 2001; Maier et al. 2002; Pieske et al. 1995).

Im insuffizienten Herzen ist diese positive Kraft-Frequenz-Beziehung aufgehoben (Mulieri et al. 1992; Pieske et al. 1999). Weiterhin finden sich je nach untersuchter Spezies Unterschiede. Kleine Säuger, wie beispielsweise Mäuse, weisen häufig eine eher negative Kraft-Frequenz-Beziehung auf. Dies ist hauptsächlich durch die unterschiedliche SR-Beladungsfähigkeit bedingt (Bers 2001; Maier et al. 2000a und 2000b).

1.3.3 Ryanodinrezeptor Typ 2

Die SR-Kalzium-Freisetzungskanäle werden aufgrund der hohen Affinität zum neutralen Pflanzenalkaloid Ryanodin als Ryanodinrezeptoren (RyR) bezeichnet. Es sind drei verschiedene Isoformen (Typ 1, Typ 2 und Typ 3) bekannt, welche in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Hier soll nur auf die im Herzen vorherrschende Isoform, den Ryanodinrezeptor Typ 2 (RYR2), eingegangen werden. Die RYR2 sind in den terminalen Zisternen des SR lokalisiert und in großen Gruppen organisiert (Bers 2002). Sie werden durch transsarcolemmal einströmendes Kalzium aktiviert. Dieser Mechanismus wird als „Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung“ (Fabiato A 1983; Fabiato A und Fabiato F 1975) bezeichnet. Etwa 25 L-Typ-Kalziumkanäle und 100 RYR2 bilden einen Knotenpunkt zwischen einströmendem Kalzium von extrazellulär und den RYR2. Diese lokalen SR-Freisetzungseinheiten werden als *junction* oder *couplon* bezeichnet (Bers und Guo 2005). Aus dem SR via RyR2 gelangt der Hauptanteil des für die Kontraktion benötigten Kalziums in den Intrazellulärraum, dies sind beim Menschen 60-70%, bei der Maus sogar 90% des für die Kontraktion zur Verfügung stehenden Kalziums (Bers 2001; Maier et al. 2000b). Das

übrige Kalzium gelangt aus dem Extrazellulärraum durch den L-Typ-Kalzium-Kanal in die Zelle. Diese Werte spiegeln jedoch lediglich das Verhältnis bei Gleichgewichtsbedingungen wider. Das genaue Verhältnis ist abhängig von der Stärke der Kontraktion und somit auch von Änderungen der Frequenz (positive bzw. negative Kraft-Frequenz-Beziehung) (Bers 2001). Die RyR2 unterliegen einer komplexen Regulation durch unterschiedliche Proteinkinasen und Phosphatasen. Von besonderer Relevanz sind hierbei die Phosphorylierung durch die c-AMP-abhängige PKA (Marx et al. 2000; Xiao B et al. 2006) und durch die CaMKII (Rodriguez et al. 2003; Wehrens et al. 2004; Wichter et al. 1991) zu nennen. Weiterhin haben auch Calmodulin (CaM) (Maier und Bers 2002), sowie das FK-Bindungsprotein (FKBP) und weitere endogene Effektoren und pharmakologische Substanzen Einfluss auf die Regulation der RYR2 (Zucchi und Ronca-Testoni 1997).

Koffein bindet reversibel an die RyR2 und bewirkt konzentrationsabhängig deren komplette Öffnung. Es wird eine vollständige Kalziumentleerung des SR und daraus folgend eine starke Kontraktur hervorgerufen. Die gezielte Koffein-Applikation wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um semiquantitativ den SR-Kalzium-Gehalt zu bestimmen.

Für die Deaktivierung der RYR2 werden drei verschiedene Mechanismen diskutiert: Zum einen die zufällige Abnahme der Öffnungswahrscheinlichkeit, zum anderen der Schluss der RyR2 aufgrund der lokalen Entleerung des SR und als drittes die RyR2-Adaptation bzw. RYR2-Inaktivierung im Sinne einer „Refraktärzeit“ (Bers 2002). Diese Mechanismen erfolgen kalziumabhängig über negative Feedbackmechanismen.

In der Diastole kommt es zu spontanen Kalzium-Freisetzungseignissen, den so genannten Kalziumsparks (Cheng et al. 1993). Diese entstehen durch eine Aktivierung von einigen wenigen (3-10) RYR2 in einem *couplon* (Mejía-Alvarez et al. 1999) und wurden für die vorliegende Arbeit mittels des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops untersucht.

1.3.4 SR-Kalzium-ATPase und SR-Kalziumaufnahme

Die kardiale SR-Kalzium-ATPase (SERCA2a) ist eine in den L-Tubuli des SR lokalisierte, energieverbrauchende Kalziumpumpe. Ihre Aufgabe ist es, die zytosolische Kalziumkonzentration nach der Kontraktion möglichst schnell wieder zu senken und somit maßgeblich zur Relaxation während der Diastole beizutragen (Inesi 1985; Schatzmann 1989). Die SERCA2a transportiert je zwei Kalziumionen, unter Verbrauch eines Moleküls ATP, aus dem Zytoplasma in das SR (Tada et al. 1982).

Die SERCA2a unterliegt einem Regulationsmechanismus durch Phospholamban (PLB) (Tada et al. 1975). In unphosphoryliertem Zustand liegt Phospholamban vorwiegend als Monomer vor und hemmt die SERCA2a. Wird es phosphoryliert, bildet sich ein PLB-

Pentamer, welches von der SERCA2a abdissoziiert und diese durch Wegfall der Hemmung aktiviert. Die starke Affinität der SERCA2a gegenüber Kalzium macht es möglich, dass sie auch bei sehr geringen Kalziumkonzentrationen im Zytosol aktiv bleibt.

Phospholamban unterliegt seinerseits selbst strengen Regulationsmechanismen. Es hat drei verschiedene Phosphorylierungsstellen die durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert und dephosphoryliert werden können.

Die PKA, welche nach beta-adrenerger Stimulation vermehrt im Zytosol vorliegt, phosphoryliert Phospholamban cAMP-abhängig an der Aminosäure Serin (Ser)-16 (Simmerman et al. 1986). Die zweite Phosphorylierungsstelle von Phospholamban ist Threonin (Thr)-17. Dort greift die CaMKII an (Le Peuch et al. 1979; Simmerman et al. 1986) (vgl. 1.4.3.3, S. 13). Durch die Kalzium/Phospholipid-abhängige Proteinkinase C (PKC) wird Phospholamban an Ser-10 phosphoryliert (Mattiuzzi et al. 2005).

Durch verstärkte Phosphorylierung von Phospholamban und die konsekutive Aktivierung (bzw. De-Inhibierung) der SERCA2a kommt es jeweils zu einer schnelleren und vermehrten SR-Kalziumbeladung. Da somit das zytosolische Kalzium schneller eliminiert wird und mehr Kalzium zur Ausschüttung und zur Kontraktion zur Verfügung steht, wird durch die Phosphorylierung sowohl ein lusitroper als auch ein inotroper Effekt induziert (Bers 2001).

Dephosphoryliert wird Phospholamban jeweils von SR-assoziierten Phosphatasen (Kranias und Di Salvo 1986).

1.3.5 Natrium-Kalzium-Austauscher

Der zweite wichtige Mechanismus zur Kalziumelimination während der Diastole ist der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX). Er ist ein hauptsächlich in den T-Tubuli und im Sarkolemm der Zelle eingelagerter, passiver Transporter, welcher entlang des elektrochemischen Gradienten arbeitet. Im Austausch mit drei Natriumionen befördert der NCX ein Kalziumion in den Extrazellulärraum.

Damit der NCX arbeiten kann, benötigt er deswegen einen weiteren Transporter: Die Natrium/Kalium-ATPase, welche den für den NCX notwendigen treibenden elektrochemischen Natriumgradienten aufrecht erhält (Reuter und Seitz 1968).

1.3.6 Weitere Kalziumtransporter

Es existieren noch zwei weitere, quantitativ aber sehr untergeordnete Mechanismen der Kalziumelimination: zum einen die sarkolemmale Kalzium-ATPase, welche Kalzium in den Extrazellulärraum pumpt, und zum anderen der mitochondriale Kalzium-Uniporter, welcher

eine Kalziumaufnahme in die Mitochondrien bewirkt. Da beide Transporter gemeinsam nur etwa 2% des gesamten intrazellulären Kalziums eliminieren (Bers 2001), wurden sie bei den folgenden Experimenten vernachlässigt.

1.4 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

Die Enzyme aus der Familie der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMK) sind Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen. Diese multifunktionellen Kinasen sind vor allem im Nervengewebe und im Herzen zu finden. Es sind drei Unterformen bekannt, die CaMKI, -II und -IV, wobei die CaMKII die dominante Isoform im Herzen darstellt (Jett et al. 1987) und maßgeblich an der Regulation der elektromechanischen Kopplung beteiligt ist. Dies wird im Folgenden genauer dargestellt.

1.4.1 Allgemeines und Struktur der CaMKII

Es sind vier verschiedene Gene bekannt, welche für die Isoformen der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) codieren. Je nach codierendem Gen unterteilt man die CaMKII daher in die Unterformen: α , β , γ und δ . Diese werden in verschiedenen Geweben exprimiert. Die CaMKII α und β kommen vor allem im Gehirn vor und sind an Lernprozessen sowie an der neuronalen Plastizität beteiligt (u. a. Lisman et al. 2002; Silva et al. 1992). Im Herzen kommen die γ - und δ -Unterformen der CaMKII vor (Tobimatsu und Fujisawa 1989). Die CaMKII δ herrscht quantitativ vor, wohingegen die CaMKII γ zu deutlich geringeren Anteilen exprimiert wird (Braun und Schulman 1995; Maier und Bers 2002). Die CaMKII δ wird wiederum in zwei verschiedene Splicevarianten eingeteilt: Im Zellkern existiert, durch ihre Kern-Lokalisations-Sequenz bedingt, ausschließlich die Splicevariante CaMKII δ_B . Im Zytosol der Kardiomyozyten findet sich die Splicevariante CaMKII δ_C .

Im Allgemeinen verbinden sich sechs bis zwölf CaMKII δ -Untereinheiten durch Oligomerisation und bilden radförmig angeordnet ein großes Holoenzym. Jede Untereinheit besteht aus drei Anteilen: Einer katalytischen, einer zentral regulatorischen und einer Verbindungsdomäne. Die regulatorische Domäne beinhaltet unter anderem die Autoinhibitionsregion und die Kalzium/Calmodulin-Bindungsstelle und ist für die Aktivierung bzw. Inaktivierung der CaMKII zuständig. Mit Hilfe der katalytischen Domäne werden Zielsubstrate phosphoryliert. Die Verbindungsdomäne hat vorwiegend die Aufgabe, die einzelnen CaMKII δ -Monomere durch Zusammenschluss von 6-12 dieser Untereinheiten zu

einem großen Holoenzym zu verbinden. Der Aufbau der CaMKII ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

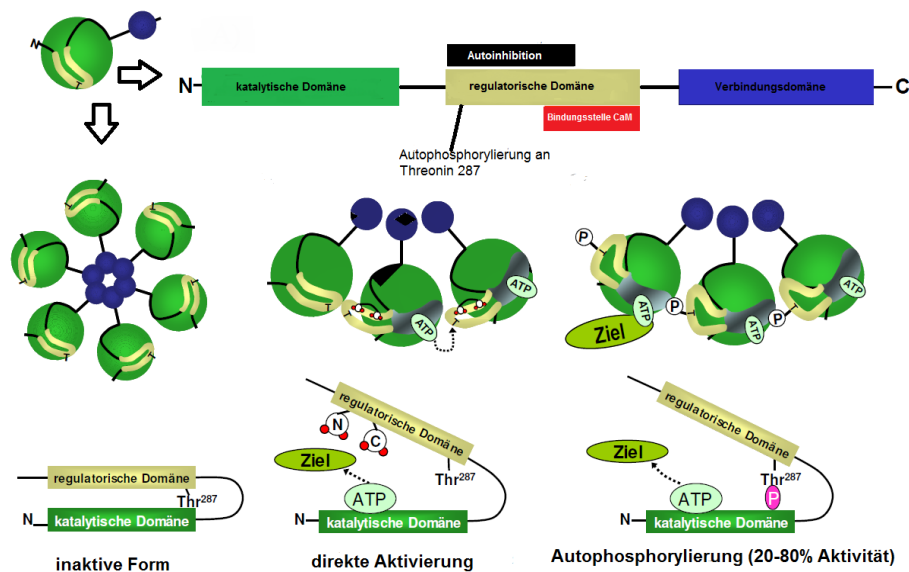


Abbildung 1.4: Struktur und Aufbau der CaMKII.

Die CaMKII δ besteht aus drei verschiedenen Domänen. Einer katalytischen, einer regulatorischen und einer Verbindungsdomäne. Die einzelnen CaMKII δ -Monomere lagern sich mit 6-12 weiteren CaMKII δ -Monomeren zu einem großen Holoenzym zusammen. Die Aktivierung erfolgt zum einen direkt durch Kalzium-Calmodulin und zum anderen durch Autophosphorylierung.

(Modifiziert nach Maier und Bers 2002, S. 924)

1.4.2 Aktivierung und Deaktivierung der CaMKII

Steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration bzw. Kalzium/Calmodulin-Konzentration, so wird die CaMKII zum einen direkt aktiviert, zum anderen kommt es durch Autophosphorylierung an der Aminosäure Thr-287 zu einer länger andauernden Aktivierung (Maier und Bers 2002). Besonders bemerkenswert ist auch eine Art molekulare Switch-Funktion der CaMKII bzw. des Calmodulins. Beide können bereits im inaktiven Zustand eine Bindung mit dem jeweiligen Zielsubstrat eingehen, um dann bei steigender Kalziumkonzentration und der damit verbundenen Aktivierung sofort agieren zu können.

Zunächst bildet sich, bedingt durch intrazellulären Kalziumanstieg, ein Kalzium/Calmodulin-Komplex, welcher aus Calmodulin und 4 Kalziumionen besteht. Dieser kann nun mit der spezifischen Bindungsstelle der regulatorischen CaMKII-Untereinheit interagieren. Eine darauf folgende Konformationsänderung verdrängt die autoinhibitorische Regulationsstelle und erlaubt es der katalytischen Domäne an ihrem Zielsubstrat aktiv zu werden. Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der durch Bindung von Kalzium/Calmodulin möglich wird, ist die Autophosphorylierung der CaMKII an der Aminosäure Thr-287. Dies bewirkt einerseits eine 700-fach erhöhte Affinität des CaM/Kinase-Komplexes und ermöglicht zum anderen, dass

auch nach intrazellulärem Kalziumabfall und darauffolgender Abdissoziation von Kalzium/Calmodulin eine 20-80%ige Aktivität der CaMKII verbleibt (Maier und Bers 2002).

Die Inaktivierung der CaMKII erfolgt durch spezielle Proteinphosphatasen. Maßgeblich beteiligt an der Dephosphorylierung der CaMKII sind die Proteinphosphatase 1 (PP1), die Proteinphosphatase 2A (PP2a) und die Proteinphosphatase 2C (PP2c) (Huke und Bers 2007; Zhang T und Brown 2004). Weiterhin werden zwei Proteinphosphatasen beschrieben, welche spezifisch die Gruppe der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen dephosphorylieren: Die CaMK-Phosphatase und die CaMK-Phosphatase-N (Ishida et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Proteinphosphatase-1- und -2a-Inhibitor Calyculin verwendet. Calyculin hemmt durch die Inhibition der PP-1 und -2a die schnelle Dephosphorylierung der CaMKII (Huke und Bers 2007)

1.4.3 CaMKII ist ein zentraler Regulator der elektromechanischen Kopplung

Die CaMKII hat einen entscheidenden Einfluss auf den Kalziumstoffwechsel der Kardiomyozyten und moduliert eine Vielzahl von Ereignissen im Rahmen der elektromechanischen Kopplung. So wird sowohl der Kalziumeinstrom durch den L-Typ-Kalzium-Kanal (Kohlhaas et al. 2006) als auch die SR-Kalzium-Ausschüttung via RyR2 (Maier et al. 2003; Neef et al. 2010) und die SR-Kalzium-Wiederaufnahme via SERCA2a/PLB (Sag et al. 2007) durch die CaMKII beeinflusst. Weiterhin wurde 2006 erstmals von Wagner et al. gezeigt, dass die CaMKII auch einen Einfluss auf Natriumströme im Herzen hat.

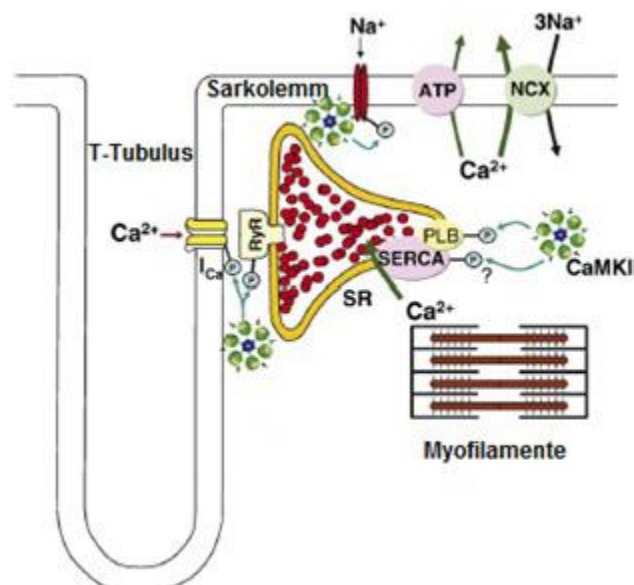


Abbildung 1.5: Angriffspunkte der CaMKII

Die CaMKII ist ein wichtiger Regulator der Kalziumhomöostase. Die Abbildung zeigt Phosphorylierungsstellen und somit Angriffspunkte der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung. (modifiziert nach Maier und Bers 2007, S.632)

1.4.3.1 CaMKII und L-Typ-Kalzium-Kanal

Die CaMKII erzielt durch Phosphorylierung des L-Typ-Kalzium-Kanals einen verstärkten Kalziumeinstrom und eine verlangsamte Inaktivierung. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass der verstärkte Kalziumeinstrom durch sogenannte Kalzium-abhängige *Facilitation*, also eine Bahnung, zustande kommt (Anderson et al. 1994; Xiao RP et al. 1994; Yuan und Bers 1994). Versuche von Maier et al. (2003) und Kohlhaas et al. (2006) mit CaMKII δ_c -überexprimierenden Mäusen bestätigten diese Ergebnisse. Durch das erhöhte Vorkommen der CaMKII δ_c kam es zu einem gesteigerten Kalziumeinstrom und zu einer verlangsamten Inaktivierung des L-Typ-Kalzium-Kanals. Dies ließ sich verifizieren, indem Versuche mit CaMKII-Inhibitoren durchgeführt wurden, welche die zuvor beschriebenen Effekte rückgängig machten.

1.4.3.2 CaMKII und RyR2

CaMKII kann den RyR2 an der Stelle Ser-2815 phosphorylieren, inwieweit auch eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung an Ser-2809 erfolgt, wird kontrovers diskutiert (Ai et al. 2005; Kohlhaas et al. 2006; Neef und Maier 2007; Wehrens et al. 2004;). Auch die Datenlage zu CaMKII-Effekten an den RyR2 ist zum Teil widersprüchlich: So fanden einige Studien eine verstärkte SR-Kalzium-Ausschüttung unter CaMKII-Einfluss (Hain et al. 1995; Witcher et al. 1991). Andere Autoren erhielten genau gegenteilige Ergebnisse mit einer erniedrigten SR-Kalzium-Entladung (Lokuta et al. 1995). Eindeutig scheint jedoch die Datenlage im Hinblick auf das spontane diastolische SR-Kalziumleck: Die RyR2 reagieren auf eine verstärkte CaMKII-Aktivität mit einer verstärkten spontanen diastolischen Entladung (Sparkfrequenz), welche zu einem vermindertem SR-Kalziumgehalt führt (Guo et al. 2006; Kohlhaas et al. 2006; Maier et al. 2003). Neef et al. fanden 2010, dass die verstärkte CaMKII-bedingte RYR2-Phosphorylierung zu einem verstärkten SR-Kalziumleck in menschlichem Vorhoffmyokard bei Vorhofflimmern führt.

CaMKII δ_c überexprimierende Mäuse zeigen kardiale Dilatation und erhebliche kontraktile Dysfunktion durch Störung der Kalziumhomöostase im Laufe der elektromechanischen Kopplung. Die Hyperphosphorylierung der RYR2 und das erhöhte diastolische SR-Kalziumleck werden ursächlich in Ergänzung der verminderten SERCA2A- bzw. vermehrten NCX-Expression diskutiert (Maier et al. 2003).

1.4.3.3 CaMKII und SERCA2a/PLB

Wie bereits beschrieben, ist zum einen bekannt, dass die CaMKII Phospholamban an der Aminosäure Thr-17 phosphoryliert und somit indirekt zu einer Regulation der SERCA2a beiträgt (vgl. 1.3.4, S. 7-8). Zum anderen wird von einigen Autoren vermutet, dass die CaMKII auch direkt die SERCA2a phosphoryliert (Bassani et al. 1995; Bers 2001) und es durch die CaMKII-bedingte Phosphorylierung zu einer beschleunigten SR-Kalziumaufnahme kommt (DeSantiago et al. 2002).

Die Elimination des intrazellulären Kalziums und damit auch die Relaxation auf Zellebene bzw. in Folge auch des ganzen Herzens beschleunigen sich mit zunehmender Herzfrequenz. Dieser fundamentale Mechanismus wird als *Frequency-dependent-acceleration of relaxation* (FDAR) bezeichnet. Die Rolle der CaMKII bei der FDAR wird z.T. widersprüchlich diskutiert und ist noch nicht abschließend geklärt (Bassani et al. 1995; DeSantiago et al. 2002; Hagemann et al. 2000; Huke und Bers 2007; Hussain et al. 1997; Li et al. 1998; Picht et al. 2006; Valverde et al. 2005), In der Diskussion der vorliegenden Arbeit wird nochmals auf diesen Aspekt eingegangen (vgl. 4.3.2, S. 77-79).

1.4.4 Einfluss der CaMKII auf die Gentranskription

Die CaMKII hat, neben den Effekten auf die elektromechanische Kopplung, insbesondere in Form der nukleär lokalisierten CaMKII δ_B auch Einfluss auf die Gentranskription (Zhang T et al. 2007). Die CaMKII phosphoryliert Klasse-II-Histon-Deacetylasen, wobei vor allem die Histon-Deacetylase 4 (HDAC4) hervorzuheben ist. Die HDAC4 wiederum hemmt in unphosphoryliertem Zustand den Transkriptionsfaktor Myozyten-Enhancer-Faktor-2 (MEF2). Diese Hemmung wird durch eine Phosphorylierung mittels CaMKII aufgehoben. Wird die CaMKII aktiviert bzw. ist sie im Übermaß vorhanden (z.B. genetisches überexprimierendes Mausmodell, biomechanischer Stress, etc.), phosphoryliert sie HDAC4 im Nukleus und im Zytoplasma. Im Zytoplasma wird durch die Phosphorylierung der Import der HDAC4 in den Zellkern gestoppt. Im Nukleus induziert die Phosphorylierung des HDAC4 an zwei Serinresten die Anlagerung von zwei Chaperon-Proteinen 14-3-3 und den Export des Komplexes in das Zytoplasma (Bacs et al. 2006). MEF2 und andere Transkriptionsfaktoren werden so nicht mehr durch HDAC4 gehemmt und können die Genexpression beeinflussen (u. a. durch Expression fetaler Genprogramme). Es wird angenommen, dass diese Mechanismen bzw. der damit verbundene kardiale Umbau (*Remodeling*) für die Entstehung von Herzinsuffizienz und kardialer Hypertrophie von großer Bedeutung sind. Die Einflüsse der CaMKII auf das pathologische *Remodeling* im Sinne einer Hypertrophie des Herzens wurden 2009 von Bacs et al. und 2010 von Toischer et al. eindrucksvoll beschrieben.

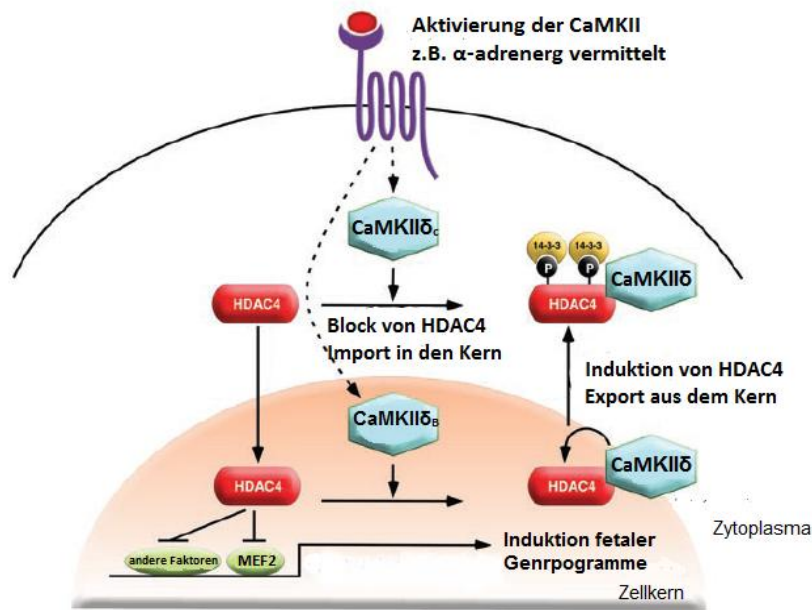


Abbildung 1.6: Die CaMKII und HDAC4.

Die CaMKII bewirkt durch Phosphorylierung von HDAC4 zum einen einen Stopp von HDAC4-Import in den Nukleus und zum anderen induziert sie den Export von nukleärem HDAC4 in das Zytoplasma. Daraus resultiert, dass das HDAC4 seine Hemmung auf verschiedene Transkriptionsfaktoren (insbesondere MEF2) nicht mehr ausüben kann und somit die Expression fetaler Genprogramme angeregt wird. (Abbildung modifiziert nach Backs et al. 2006, S. 1861)

1.4.5 CaMKII und Herzinsuffizienz

Bei Herzinsuffizienz kommt es zu einer verminderten Kontraktionskraft des Herzens. Diese ist mit einer Verminderung der Kalziumtransienten vergesellschaftet, welche wiederum mit einem verminderten SR-Kalziumgehalt bei Herzinsuffizienz assoziiert sind. Als Ursachen für diese Abnahme des SR-Kalziumgehalts bei Herzinsuffizienz werden zum einen eine verminderte Kalzium-Rückaufnahme in das SR durch Abnahme der SERCA2a-Expression und zum anderen eine Zunahme des spontanen diastolischen Kalziumlecks angenommen. Die Rolle der CaMKII bei der Entstehung der Herzinsuffizienz ist seit längerem zentraler Forschungsansatz zahlreicher Studien. In insuffizienten Herzen findet sich ein erhöhter Proteingehalt an CaMKII. 1999 wurden von Hoch et al. und Kirchhefer et al. Untersuchungen veröffentlicht, die eine positive Korrelation zwischen Expressionslevel der CaMKII und der Kontraktionskraft insuffizienter Herzen zeigten. Sie vermuteten, dass die CaMKII auf Grund der Herzinsuffizienz kompensatorisch erhöht wurde. Diesen Vermutungen entgegen stehen jedoch 2003 von Zhang T et al. bzw. Maier et al. durchgeführte Studien mit CaMKII δ_c -überexprimierenden-Mäusen, welche eine schwere Herzinsuffizienz entwickelten. In mehreren Untersuchungen in vivo und in vitro zeigten die Tiere eine ausgeprägte kardiale

Hypertrophie, Dilatation der Herzen und eine eingeschränkte Kontraktilität. Auf Zellebene führte die Überexpression der CaMKII δ_c zu einer Veränderung des Kalziumstoffwechsels der Kardiomyozyten: Maier et al. fanden 2003 in der CaMKII δ_c -transgenen Maus ein ausgeprägtes diastolisches Kalziumleck des SR, am ehesten infolge der CaMKII-abhängigen Hyperphosphorylierung der RyR2. Dieses SR-Kalziumleck führte konsekutiv zu einem erniedrigten SR-Kalziumgehalt, damit zu erniedrigten Kalziumtransienten und einer Abnahme der Kontraktilität. Weiterhin fanden Sag et al. 2009 eine erhebliche Steigerung des arrhythmogenen Potentials in diesen Mäusen. Umgekehrt konnte ein protektiver Effekt von CaMKII-Inhibition bzw. genetischer Deletion der CaMKII auf die Entwicklung von Herzinsuffizienz gezeigt werden (Backs et al. 2009; Zhang R et al. 2005).

1.5 CaMKII δ -Inhibition und -Knockout

Es gibt unterschiedliche Mechanismen, um die CaMKII in Kardiomyozyten auszuschalten. Zum einen ist es möglich, die CaMKII pharmakologisch mit CaMKII-Inhibitoren zu hemmen. Zu nennen sind hierbei KN-62 und KN-93, diese inhibieren jedoch nicht nur spezifisch die CaMKII, sondern auch die CaMKIV sowie spannungsabhängige Kalium- und Kalziumkanäle. Ein weiterer Nachteil der KN-Familie ist die Tatsache, dass sie kompetitiv die Aktivierung durch Calmodulin inhibiert und somit keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung der CaMKII hat (Vest et al. 2007). Folglich ist es bei der Inhibition der CaMKII durch Pharmaka der KN-Gruppe nicht auszuschließen, dass ermittelte Effekte unspezifische „Nebenwirkungen“ dieser Inhibitoren sind. Eine weitere Substanzklasse, welche wesentlich selektiver arbeitet als die KN-Gruppe, sind Peptid-Inhibitoren. Beispiele hierfür sind Autocamide-2-related-inhibitory-peptide (AIP) oder Autocamide-3-Inhibitory-Peptide (AC3-I) (Ishida et al. 1995). Die Spezifität dieser Peptid-Inhibitoren ist jedoch teilweise umstritten, so beschreiben Ishida et al. (1995) AIP als sehr CaMKII-spezifisch und fanden in ihren Untersuchungen keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die PKA, PKC oder CaMKIV. Vest et al. beschreiben jedoch in einer 2007 veröffentlichten Arbeit, dass AIP auch andere Calmodulin-abhängige Kinasen und die PKA inhibiere.

Transgene herzspezifische Expression von AC3-I zeigte einen protektiven Effekt einer solchen CaMKII-Inhibition hinsichtlich der Entwicklung von Herzinsuffizienz und Hypertrophie unter chronisch adrenergem Stress sowie nach Herzinfarkt (Zhang R et al. 2005). Allerdings inhibiert AC3-I neben der CaMKII auch die Proteinkinase D (Backs et al. 2009), welche neben der CaMKII unter anderem auch für den nukleären Export von HDAC4 verantwortlich ist und somit bei der Bewertung von gewonnenen Daten unter AC3-I-Inhibition beachtet werden muss.

Eine weitere Möglichkeit, CaMKII-Effekte zu unterdrücken bzw. aufzuheben, ist der genetische Knockout. Der Knockout der im Herzen dominanten CaMKII δ -Isoform (Bacs et al. 2009) zeigte im Gegensatz zur AC3-I-Maus keinen Einfluss auf die Proteinkinase D. Für zwei verschiedene Modelle eines solchen CaMKII δ -Knockouts konnte erneut ein protektiver Effekt der CaMKII-Suppression gezeigt werden. Beide Fälle wurden untersucht bei Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) (Bacs et al. 2009; Ling et al. 2009).

1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Zahlreiche Studien ergaben, dass CaMKII-vermittelte Effekte eine wichtige Rolle in der Entstehung der Herzhypertrophie (Bacs et al. 2009; Toischer et al. 2010), Herzinsuffizienz (Maier et al. 2003) und Arrhythmogenese (Sag et al. 2009) spielen. Weiterhin wurde kürzlich gezeigt, dass die CaMKII auch einen Zusammenhang zum Vorhofflimmern aufweist (Neef et al. 2010). Dementsprechend wird eine Inhibition der CaMKII zunehmend als neuartiges Therapieprinzip angesehen (Neef et al. 2010; Neef und Maier 2007; Sossalla et al. 2010; Yang et al. 2006). Bacs et al. (2009) sowie Ling et al. (2009) konnten bereits zeigen, dass bei Mäusen mit CaMKII δ -Knockout ein protektiver Phänotyp hinsichtlich Herzinsuffizienzentwicklung bei Druckbelastung (TAC) besteht.

CaMKII hat jedoch neben den oben beschriebenen Rollen in anderen Geweben (vgl. 1.4.1, S. 9-10) auch wichtige regulatorische Funktionen im Herzen auf die elektromechanische Kopplung (vgl. 1.4.3, S. 11). Eine spezifische Inhibition der CaMKII δ als dominanter CaMKII-Isoform im Herzen könnte das therapeutische Potential der CaMKII-Inhibition in Hinblick auf Herzinsuffizienz und Arrhythmien realisieren, ohne dass die regulatorische Funktion anderer Isoformen aufgehoben wird. Dabei könnte die verbliebene CaMKII γ -Aktivität ausreichend sein die physiologischen Funktionen der CaMKII im Herzen unter Basalbedingungen zu gewährleisten.

Da, wie bereits beschrieben, ein protektiver Effekt des CaMKII δ -Knockouts bei Druckbelastung (TAC) aufgezeigt werden konnte (Bacs et al. 2009), soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die elektromechanische Kopplung in CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen und unter adrenerger Stimulation beeinträchtigt ist.

Im Einzelnen wurden deswegen insbesondere folgende Fragestellungen untersucht:

Führt das Fehlen der CaMKII δ im Vergleich zum Wildtyp zu ...

- ...vermehrter Mortalität und/oder Veränderungen in den grundlegenden kardialen biometrischen Parametern?
- ...einer Beeinträchtigung der Kalziumtransienten-Amplituden und der Kontraktilität in isolierten Kardiomyozyten (systolische Funktion)?
- ...zu Veränderungen im Relaxationsverhalten und dem zugrunde liegenden diastolischen Abfall der Kalziumtransienten (SR-Kalzium-Wiederaufnahme über SERCA2a und Kalziumextrusion über NCX)?
- ...einer Beeinträchtigung der FDAR?
- ...Veränderungen im Post-Pausen-Verhalten?
- ...Veränderungen am diastolischen SR-Kalziumleck und SR-Kalziumgehalt?
- ...einem veränderten Ansprechen auf beta-adrenerge Stimulation?

2 Material und Methoden

2.1 Isolation einzelner Kardiomyozyten

In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Kardiomyozyten von CaMKII δ -Knockout-Mäusen verwendet. Generiert und zur weiteren Verpaarung und wissenschaftlichen Verwendung zur Verfügung gestellt wurde dieser genetische CaMKII δ -Knockout von Dr. Johannes Backs (Heidelberg). Die detaillierte Generierung des genetischen CaMKII δ -Knockout wurde von Backs et al. (2009) beschrieben: Kurz zusammengefasst wurde der CaMKII δ -Knockout durch das Cre-LoxP System erreicht, indem LoxP-Stellen in den CaMKII δ -Locus, die Exone 1 und 2 flankierend, eingesetzt wurden. Diese Exone kodieren einen Teil der katalytischen Domäne der CaMKII δ , inklusive des für die Kinase-Funktion essentiellen ATP-Bindungs-Motivs. Eine entsprechende Deletion erfolgte dann mittels Cre-Rekombinase.

Es wurden sowohl mit Kardiomyozyten von homozygoten als auch von heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Mäusen Versuche durchgeführt und mit Wildtyp-Kontroll-Kardiomyozyten verglichen. Für die Versuche wurden weibliche und männliche Versuchstiere mit einem durchschnittlichen Alter von 11 Wochen untersucht.

Alle an den Mäusen durchgeführten Maßnahmen wurden gemäß den Anforderungen der „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ durchgeführt und wurden von der örtlichen Ethikkommission genehmigt (Tierversuchsanzeige August 2006 für die „Tötungen von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß § 4 TierSchG, Aktenzeichen T 15.06, Bezirksregierung Braunschweig).

Die Tötung der Mäuse, die Kardioektomie und die Isolation vitaler Kardiomyozyten wurden von einem auf diesem Gebiet geschulten Biologisch-Technischen Assistenten durchgeführt. Die Maus wurde mit Isofluran narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde mittels Präparierschere der Thorax eröffnet, das Herz entnommen und die Aorta retrograd kanüliert und perfundiert. („Langendorff-Perfusion“, Langendorff 1895). Da für die Versuche Einzelzellen benötigt wurden, mussten diese aus dem Zellverband gelöst werden. Dafür wurden die Kardiomyozyten mit Hilfe von enzymatischem Verdau (mittels des Enzym-Gemischs Liberase Blendzyme 1 (Roche/Mannheim/Deutschland)) aus der, im Wesentlichen aus Kollagenen bestehenden, Extrazellulärmatrix isoliert.

Nach erfolgreicher Isolation der Kardiomyozyten durch den Biologisch-Technischen Assistenten wurden die Zellen in dem noch Verdauenzym enthaltenden Überstand in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und übergeben. Dieses wurde in einem Ständer aufrecht für 7-10 Minuten stehen gelassen, so dass sich durch Absedimentation der Zellen ein Zellpellet

am Boden des Röhrchens bildete. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgenommen und durch 0,1 mM Kalziumtyrode ersetzt. Schrittweise, von 0,1 mM über 0,2 mM, 0,4 mM auf 0,8 mM, wurden die Zellen an die im Versuch verwendete Kalziumkonzentration von 1 mM herangeführt. Zwischen den Schritten wurden die Zellen jeweils etwa 6-7 Minuten bei Raumtemperatur aufrecht im Falcon-Röhrchen stehen gelassen. Nach Absedimentation der Zellen wurde der Überstand vorsichtig durch frische, höher konzentrierte Kalziumtyrode ersetzt. In der Regel zeigten sich nach Isolation >70% vitale Kardiomyozyten, welche anschließend plattiert werden konnten.

2.1.1 Aufbau der Messkammer und Plattieren der Zellen

Die Messkammern bestanden aus Plastikrahmen, in die je ein Deckgläschen geklebt wurde. In einer Ecke des Rahmens befand sich eine Abflussöffnung, aus welcher unter der Messung überschüssige Tyrode abgesaugt werden konnte. Vor Benutzung wurden die Messkammern gut mit Wasser gereinigt und abgetrocknet. Um den Zellen eine bessere Adhäsionsmöglichkeit zu bieten, wurde der Glasboden der Kammer gleichmäßig mit einem Film aus 1,7 μ l Laminin bestrichen. Nachdem das Laminin mindestens 5 Minuten angetrocknet war, wurden je nach Zelldichte zwischen 200 μ l und 600 μ l der Zellsuspension auf die Messkammer gegeben. Nach einer Anheftungsphase von mindestens 15 Minuten konnten die Zellen in einem abgedunkelten Raum mit Fluoreszenzfarbstoff beladen und untersucht werden.

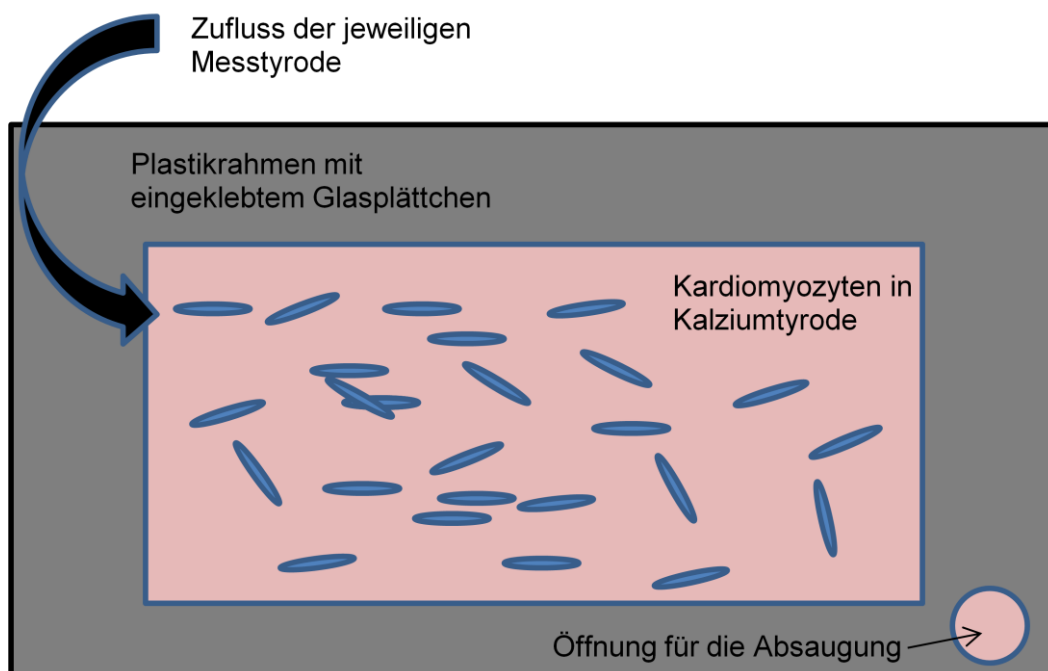


Abbildung 2.1: Schema einer Messkammer.

2.2 Kalziumfluoreszenzfarbstoffe

Um intrazelluläre Kalziumtransienten sichtbar zu machen, erfolgte eine Beladung der Kardiomyozyten mit Fluoreszenzfarbstoff.

Wenn der Übergang von einem elektronisch angeregten System in einen niedrigeren Energiezustand mit der spontanen Emission von Licht verbunden ist, spricht man von Fluoreszenz. Fluoreszenzfarbstoffe reagieren auf ein kurzwelliges Anregungslicht einer jeweils definierten Wellenlänge mit kurzzeitiger Fluoreszenz, also der Emission von langwelligem, weniger energiereichem Licht. Man unterscheidet zwischen ratiometrischen und nicht ratiometrischen Formen von Fluoreszenzfarbstoffen. Für diese Experimente wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-3-Azetomethylester (AM), Fura-2-AM und Fluo-4-AM der Firma Molecular Probes verwendet. Alle drei Farbstoffe wurden in dieser veresterten Form auf die Zellen gegeben und konnten daher, aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften, durch die Zellmembran in den Intrazellulärraum permeieren. Intrazellulär wurden sie von Esterasen in den reinen Farbstoff und einen Azetomethanolrest gespalten. Der nun freigesetzte Farbstoff verlor durch diese Spaltung seine lipophilen Eigenschaften, konnte somit die Zelle nicht mehr verlassen und ging Bindungen mit dem intrazellulär vorhandenen Kalzium ein.

2.2.1 Fluo-3-AM und Fluo-4-AM

Der nichtratiometrische, Kalzium-bindende Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3-AM hat die Eigenschaft seine im ungebundenen Zustand nicht messbare Fluoreszenz, durch Bindung mit Kalziumionen um mehr als das Hundertfache zu verstärken. Zur maximalen Emission benötigt der Fluo-3-Kalziumkomplex Anregungslicht der Wellenlänge 488 nm. Die Intensität der Emissionswellen ist abhängig von der Menge des gebundenen Kalziums. So können Änderungen des intrazellulären Kalziums, wie sie im Rahmen der Kontraktion und Relaxation der Zelle vorkommen, mittels Fluo-3-AM als Transienten sichtbar gemacht werden. Fluo-3-AM erlaubt keine quantitative Aussage über den Kalziumhaushalt, sondern lediglich eine semiquantitative Vergleichbarkeit der Kalziumwerte in den Kardiomyozyten.

Die hohe zeitliche Auflösung und das geringe Rauschverhältnis des gemessenen Signals ist ein Vorteil gegenüber den ratiometrischen Farbstoffen. Ein Großteil der Messprotokolle wurde mit Fluo-3-AM als Farbstoff durchgeführt. Als Ergänzung (zur Ermittlung diastolischer

Kalziumwerte) wurden aus jeder gemessenen Maus einige Zellen mit dem ratiometrischen Farbstoff Fura-2-AM gemessen.

Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM ist ein Analogon von Fluo-3-AM. Wie auch Fluo-3-AM ändert Fluo-4-AM seine optischen Eigenschaften durch die Bindung von Kalzium. Fluo-4-AM erreicht bei gleicher Anregungswellenlänge (wie Fluo-3-AM) von 488 nm wesentlich stärkere Fluoreszenzsignale (Gee et al. 2000). Dies macht ihn geeigneter für die Untersuchungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Allerdings kommt es hierbei auch zu einem schnelleren Ausbleichen des Farbstoffes im Vergleich zu Fluo-3-AM.

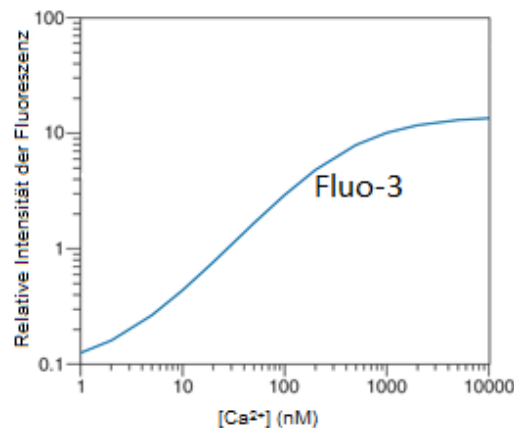


Abbildung 2.2: Fluo-3-AM.

Die relative Intensität der Fluoreszenz nimmt mit steigenden Kalziumkonzentrationen zu. (Modifiziert nach: "The Molecular Probes® Handbook", Chapter 19, Figure 19.23).

2.2.2 Fura-2-AM

Als ratiometrischer Kalziumfluoreszenzfarbstoff wurde im Rahmen dieser Arbeit Fura-2-AM verwendet. Ratiometrische Kalziumfluoreszenzfarbstoffe ermöglichen es, quantitative Aussagen über den Kalziumhaushalt der Kardiomyozyten zu machen. Im Gegensatz zu Fluo-3-AM besitzt Fura-2-AM auch ungebunden fluoreszierende Eigenschaften. Ungebunden erreicht Fura-2-AM eine Spitzenemission von 510 nm bei Anregung mit der Wellenlänge 380 nm. Bindet Fura-2-AM an Kalzium, so entsteht ein Kalzium-Fura-2-AM-Komplex, welcher für die maximale Emission von 510 nm eine Anregungswellenlänge von 340 nm benötigt. Die unterschiedlichen Absorptionsmaxima von freiem Fura-2-AM und dem Kalzium-Fura-2-AM-Komplex können genutzt werden, indem die mit Fura-2-AM beladene Zelle abwechselnd mit 380 nm und 340 nm angeregt wird.

Die jeweils von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängigen Emissionsintensitäten werden in ein Verhältnis (Ratio) gesetzt und ermöglichen so den quantitativen Vergleich unterschiedlicher Kalziumkonzentrationen. Mit dieser ratiometrischen Methode ist das Signal, im Gegensatz zu den nicht-ratiometrischen Farbstoffen (Fluo-3-AM und Fluo-4-AM), auch unabhängig von der Menge des beladenen Fura-2-AM-Farbstoffes.

2.3 Aufbau und Prinzip der Messung an der Epifluoreszenzanlage

Die Messungen wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, welcher ausschließlich mit einer kleinen Rotlichtlampe beleuchtet wurde. Auf einem schwingungsarmen Tisch befand sich ein inverses Mikroskop (Nikon Eclipse TE2000-U). Die Messkammer mit den farbstoffbeladenen Zellen wurde in die vorgesehene Halterung auf dem Objektisch eingelegt. Die Zellen wurden mit einem 40-fach vergrößernden Objektiv mittels Öl-Immersion eingestellt. Feldstimulations-Elektroden, welche mit einem Stimulationsgeber (Myopacer, Ion Optix) verbunden waren, wurden in das Zell-Bad eingetaucht und mit der vorgesehenen Halterung an der Kammer befestigt. Der Stimulationsgeber wurde so eingestellt, dass er die Zellen mit 25% über der Reizschwelle (in der Regel bei 20 mV) mit der jeweils eingestellten Frequenz stimulierte. Begonnen wurde mit einer 1 Hz-Stimulation. Die vorbereiteten Messlösungen wurden in Zulaufgefäße eingefüllt, das zuführende Schlauchsystem blasenfrei befüllt und der Tropfenregulator auf eine Geschwindigkeit von 80 ml/Stunde eingestellt. Die jeweils benötigte Messlösung wurde an einen Dreiwegehahn angeschlossen, welcher den zuführenden Schlauch mit einer Heizung verband. Diese war dem eigentlichen Zulauf in die Messkammer vorgeschaltet und sorgte dafür, dass die Messlösungen jeweils auf eine Temperatur von 35 °C erwärmt wurden. Die Flüssigkeit in der Messkammer wurde zusätzlich regelmäßig vor den Messungen mit einem externen Thermometer kontrolliert. Der Zulauf wurde verwirblungsarm unter der Flüssigkeitsoberfläche der Messkammer platziert. Ein Absaugungsschlauch, welcher mit einer Pumpe verbunden war, wurde in die vorgesehene Ablauföffnung der Messkammer eingebracht. Die Stärke der Absaugungs-Pumpe wurde so eingestellt, dass der Flüssigkeitsspiegel in der Messkammer möglichst konstant bei 1 ml lag.

2.3.1 Messung der Myozytenverkürzung

Die Durchlichtquelle des Mikroskops sorgte dafür, dass der eingestellte Kardiomyozyt auf die Myozytenkamera (Abb. 2.3 (10), S. 23) (MyoCamTM; ION OPTIX) projiziert wurde. Die verwendete Software (ION OPTIX) ermittelte über Frequenzanalyse des Videobildes zu jedem Zeitpunkt die Sarkomerlänge der jeweils eingestellten Zelle. Im Programm ION WIZARD wurde dies graphisch dargestellt. Weiterhin wurde das Video des kontinuierlich kontrahierenden Myozyten an den Computer geleitet.

2.3.2 Erfassung der intrazellulären Kalziumtransienten mittels Fluo-3-AM

Zur Anregung des Kalziumfluoreszenzfarbstoffes Fluo-3-AM wurde eine 75 W-Xenonlampe (Abb. 2.3 (1)) (Xenon short arc lamp; USHIO Japan) benutzt. Ein nachgeschalteter Anregungsfilter (Abb. 2.3 (2)) ließ nur die gewünschte Anregungswellenlänge von 480 ± 15 nm passieren. Ein dichroitischer Spiegel (Abb. 2.3 (3)) mit einer kritischen Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge der verwendeten Farbstoffe reflektierte das Anregungslicht zur Messkammer (Abb. 2.3 (5)) mit den farbstoffbeladenen Kardiomyozyten. Diese absorbierten das kurzwellige Anregungslicht und emittierten ein längerwelliges Fluoreszenzlicht. Dieses hatte eine Wellenlänge von 535 ± 15 nm und war somit in der Lage den dichroitischen Spiegel zu passieren. Über zwei einfache (Abb. 2.3 (4a, b)) und einen weiteren dichroitischen Spiegel (Abb. 2.3 (6)), welcher das Fluoreszenzlicht reflektierte, gelangte es zu einem Photomultiplier (Abb. 2.3 (9)) (IonOptix Corp, Milton, Mass.). Um Verfälschungen durch Streulicht zu vermeiden, wurde dem Photomultiplier ein optischer Filter (Abb. 2.3 (8)) vorgeschaltet, welcher nur Licht der Wellenlänge 535 ± 20 nm passieren ließ. Der Photomultiplier verstärkte das Signal und wandelte es in elektrische Spannung um. Durch das ION OPTICS Interface wurden diese Messwerte in computerlesbare Daten konvertiert und konnten auf dem Rechner mit dem Programm ION WIZARD als Kalziumfluoreszenzkurve im zeitlichen Verlauf zusammen mit der Sarkomerlänge dargestellt und aufgezeichnet werden.

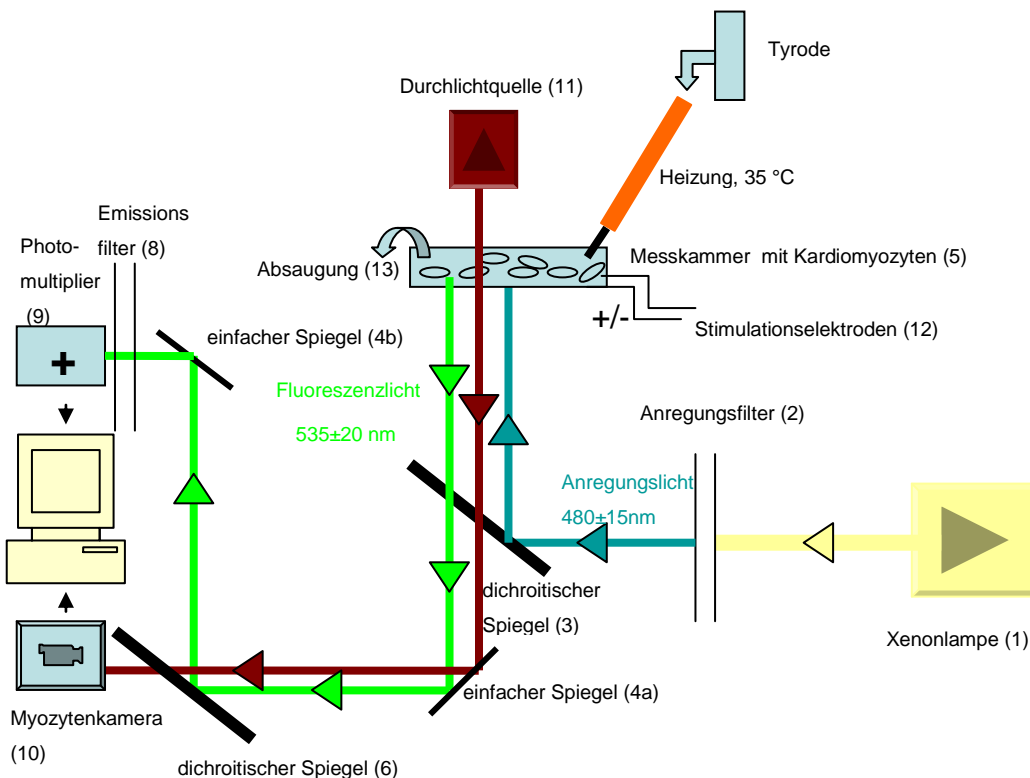


Abbildung 2.3: Aufbau und Strahlengang für die Messungen mit Fluo-3-AM.
Zahlen im Text erklärt

2.3.3 Ratio-Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Fura-2-AM

Für Messungen mit dem ratiometrischen Kalziumfluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM mussten an der oben beschriebenen Epifluoreszenzanlage einige Umstellungen vorgenommen werden. Wie unter Abschnitt 2.2.2, S. 21 beschrieben, wird beim Farbstoff Fura-2-AM die Verschiebung des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit von der Kalziumbindung genutzt. Dafür wurde das Licht der Xenonlampe mittels eines rotierenden Spiegels im schnellen Wechsel (240 Hz) durch zwei verschiedene Filter gelenkt. Einer der Filter ließ Licht der Wellenlänge 380 nm, der andere der Wellenlänge 340 nm passieren. Die mit Fura-2-AM beladenen Zellen wurden so im Wechsel mit 340 nm und 380 nm angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde analog des für Fluo-3-AM beschriebenen Strahlenganges durch einen Filter der Wellenlänge 510 ± 40 nm an den Photomultiplier weitergeleitet. Je nach aktueller intrazellulärer Kalziumkonzentration und somit Kalzium-Fura-2-AM-Komplexbildung konnten unterschiedliche Emissionsintensitäten gemessen werden. Diese wurden im Verhältnis zueinander im Computerprogramm ION WIZARD als Ratio-Kalziumfluoreszenzkurve dargestellt.

2.4 Untersuchung von Kalziumtransienten und Zellverkürzung an der Epifluoreszenzanlage

In einem abgedunkelten Raum wurde bei Rotlicht die Einfärbung der Zellen mit den jeweils benötigten, in Messtyrode gelösten, Fluoreszenzfarbstoffen vorgenommen. Dazu wurde zunächst der Überstand der Kalziumtyrode mit den darin enthaltenen, nicht angehefteten Kardiomyozyten mittels einer Pasteurpipette vorsichtig aus der Messkammer entfernt und 200 μ l der Farbstofflösung auf die am Glasboden angehefteten Zellen gegeben. Diese wurden nun dunkel abgedeckt und 20 Minuten (Fluo-3-AM) bzw. 15 Minuten (Fura-2-AM/Fluo-4-AM) inkubiert. Zum Auswaschen des Farbstoffes aus der Extrazellulär-Lösung, wurde jede frisch gefärbte Messkammer bereits 5 Minuten vor Beginn der Messung an die Superfusion angeschlossen. In dieser Zeit wurden die Zellen kontinuierlich mit 1 Hz stimuliert und mittels eines Mikroskops eine repräsentative Kardiomyozyte ausgewählt, welche nach Möglichkeit eine durchschnittliche Größe und Kontraktilität aufwies und keine morphologischen Aberrationen oder Arrhythmien zeigte. Die ausgewählte Zelle wurde dann mittels der Myozytenkamera so eingestellt, dass sie im Videobild mittig zu sehen war. Um Verfälschungen der Kalziumfluoreszenz zu verhindern, durfte keine weitere Zelle im Bild zu sehen sein. Mithilfe von regulierbaren Blenden wurde der Hintergrund entsprechend

abgedeckt. Nachdem der Farbstoff aus der Extrazellulär-Lösung ausgewaschen war und die Zellen sich im so genannten „Steady-State“ eingeschlagen hatten (gleichmäßige Kontraktionen und Kalziumtransienten), konnte die Aufzeichnung der Messung beginnen. Dafür wurde die Messung im Programm ION WIZARD gestartet, so dass alle nachfolgenden Kontraktionen und die Kalziumfluoreszenz graphisch aufgezeichnet werden konnten.

Um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern, wurde der Farbstoff nur in auswertungsrelevanten Messphasen angeregt. In nicht auswertungsrelevanten Phasen wurde der Farbstoff mit einer Blende vor dem Anregungslicht geschützt.

Um Verfälschungen durch Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, wurde nach jeder gemessenen Zelle eine reine Hintergrundmessung aufgezeichnet. Dafür wurde mit dem Mikroskop ein Bereich direkt neben der Zelle ausgewählt, in dem jedoch weder die Zelle selbst noch andere Zellen enthalten waren. Die Messung wurde dann mit exakt den gleichen Blendeneinstellungen gestartet und für ca. 10 Sekunden aufgezeichnet. Die Intensität dieses Hintergrundsignals wurde in der Auswertung der Daten von der gemessenen Fluoreszenz subtrahiert.

In jeder Kammer wurden je nach Qualität und Überleben der Zellen durchschnittlich 2-3 Zellen gemessen. Um Verfälschungen durch zeitlich bedingte Qualitätseinbußen zu minimieren, wurde pro Maus insgesamt eine Messspanne von 4 Stunden eingehalten,

2.4.1 Basisprotokoll unter Normaltyrode und Fluo-3-AM

2.4.1.1 Post-Pausen-Potenzierung

Die Post-Pausen-Potenzierung untersucht, in wieweit Kalzium während einer Pause in das SR zurück aufgenommen bzw. aus der Zelle heraus transportiert wird. Um das Verhalten der Kardiomyozyten nach Aussetzen der Stimulation aufzuzeichnen, wurde die Stimulation aus der Grundstimulation 1 Hz heraus pausiert und nach einem definierten Pausen-Intervall wieder begonnen. Es erfolgt ein Vergleich der Kontraktionen bzw. Kalziumtransienten vor der Pause mit der ersten Stimulation nach der Pause. Dieses Protokoll wurde für Pausen von 10-Sekunden-, 30-Sekunden- und 60-Sekunden-Dauer durchgeführt. Der Anteil der Zellen, welche die Pause ohne spontane Kontraktion überstanden, nahm mit zunehmender Pausenlänge deutlich ab, entsprechend waren für längere Pausendauern weniger Messungen möglich.

2.4.1.2 Kraft-Frequenz-Beziehung

Aus 1 Hz Steady-State-Bedingungen wurde die Stimulationsfrequenz auf 2 Hz, 4 Hz und abschließend auf 8 Hz erhöht. Bei jeder Frequenz wurde solange aufgezeichnet, bis ein neuer Steady-State-Zustand erreicht war und die Zelle gleichmäßig kontrahierte. Bei schnelleren Frequenzen sind der Kalziumabfall und die Relaxation noch nicht vollständig abgeschlossen bevor die nächste Stimulation ankommt, daher wurde zwischen den Frequenzwechseln eine 3-Sekunden-Pause eingebaut, um den Abfall des letzten Transienten exakter bestimmen zu können. Nach erfolgreicher Aufzeichnung der 8 Hz wurde die Stimulation wieder auf 1 Hz hinunter reguliert.

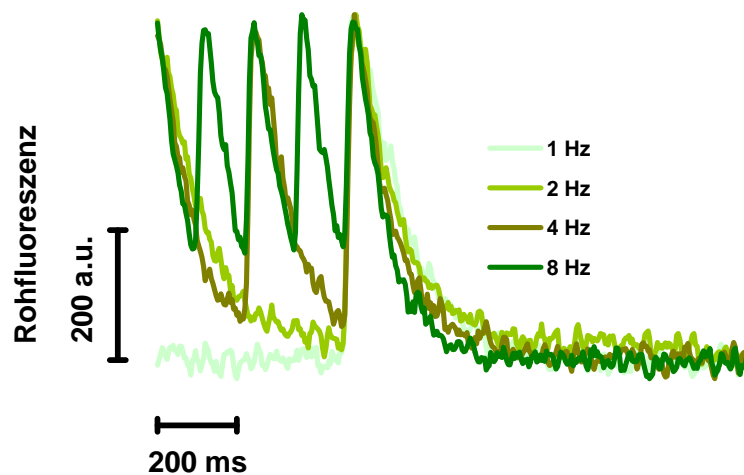


Abbildung 2.4 Originalregistrierung

Originalregistrierungen der verschiedenen Frequenzen übereinander gelagert. (zur Darstellung des Verhaltens des Kalzium-Abfalls bzw. Rückgangs in der Zelle).

2.4.1.3 Koffein-induzierter Kalziumtransient

Der SR-Kalziumgehalt der Zellen wurde semiquantitativ durch Koffein-induzierte Transienten untersucht. Dafür wurde exakt vor der Zelle eine feine Kanüle platziert, welche an ein Reservoir mit Kaffeintyrosid (10 mM) angeschlossen war. Der Zelle wurde nun ein kurzer Kaffeinstoß unter sofortigem Pausieren der Stimulation verabreicht. Koffein bindet reversibel an die RyR2 und bewirkt deren komplette Öffnung. Somit wird eine vollständige Kalziumentleerung des SR (siehe Abb. 3.13, S. 58) herbeigeführt. Der dadurch entstehende

Koffein-induzierte Kalziumtransient erlaubt es, den Kalziumgehalt des SR semiquantitativ zu bestimmen.

Der Abfall des Koffein-induzierten Kalziumtransienten bietet zudem die Möglichkeit, die Aktivität des NCX zu untersuchen: Da die SERCA2a-Funktion, bedingt durch die kontinuierliche Öffnung der RyR2, ohne funktionellen Effekt bleibt, muss der Abfall des Transienten durch andere Mechanismen der Kalziumelimination zustande kommen, von denen der NCX der mit Abstand dominierendste Mechanismus ist (Bers 2001).

Protokoll			Farbstoff	Tyrode	Temperatur
Basis					
Grundstimulation	1 Hz	Steady-State	Fluo 3 AM	Messtyrode	35 °C
Stimulationspausen	10, 30, 60 sek	Aus Steady-State			
Frequenzen	1, 2, 4,8 Hz	jeweils bis Steady-State; Frequenzwechsel durch 3 Sekunden Stimulationspause getrennt			
Koffein	bei 1 Hz	Aus Steady-State			

Tabelle 2.1: Basis-Messprotokoll

2.4.2 Isoproterenol (Einwaschversuche und Kraft-Frequenz-Beziehung)

Um das Ansprechen der isolierten Kardiomyozyten auf beta-adrenerge Stimulation zu analysieren, wurden mit einigen Messkammern pro gemessener Maus Experimente unter Isoproterenoleinsatz (4 nM) durchgeführt. Ausgangsbedingung war eine Stimulation mit 1 Hz und die kontinuierliche Durchspülung mit 35 °C warmer Messtyrode. Zu Beginn der Messaufzeichnung wurden zunächst mindestens 10 Kontraktionen und Kalziumtransienten unter Normaltyrode aufgezeichnet. Anschließend wurde der Zulauf umgeschaltet und die 4 nM Isoproterenoltyrode eingewaschen. Das Einwaschen der Isoproterenollösung wurde kontinuierlich verfolgt, bis das maximale Ansprechen der Zellen auf Isoproterenol deutlich wurde und sich somit ein neuer Steady-State der Kontraktionen und Transienten eingestellt

hatte. Nun wurden, wie unter Normaltyrode, Aufzeichnungen mit den Frequenzen 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz und 8 Hz angeschlossen. Anschließend wurden in derselben Kammer noch einige weitere Zellen mit den vier verschiedenen Frequenzen gemessen. Nach jeder Messung wurde für die jeweilige Zelle eine eigene Hintergrundmessung aufgezeichnet.

Protokoll			Farbstoff	Tyrode	Temperatur
Isoproterenol					
Einwaschen	bei 1 Hz	jeweils bis Steady-State	Fluo-3-AM	Mess-+ Isoprottere- noltyrode	35 °C
Frequenzen	1, 2, 4, 8 Hz				

Tabelle 2.2: Isoproterenol-Messprotokoll

2.4.3 Messprotokoll mit Fura-2-AM gefärbten Zellen

Aus jeder Maus wurden jeweils zwei Messkammern mit Fura-2-AM eingefärbt. Ausgangsposition der Messung war erneut die Stimulation bei 1 Hz. Um die Qualität der Zellen zu testen, wurde jeder Zelle zunächst für 10 Sekunden die Stimulation entzogen. Dies diente der Auslese von defekten Zellen. Nach Wiedereinstellung der 1-Hz-Steady-State-Bedingungen wurden Aufzeichnungen der Kalziumfluoreszenz-Ratio bei 1 Hz und 4 Hz angeschlossen. Abschließend wurde für jede Zelle die Hintergrundfluoreszenz gemessen.

Fura-2-AM					
Grundstimulation	1 Hz	Steady-State	Fura-2 AM	Messtyrode	35 °C
Stimulations- pause	10 sek	Aus Steady- State			
Frequenzen	1, 4 Hz	jeweils bis Steady-State			

Tabelle 2.3: Messprotokoll für Fura-2-AM-Messungen

2.4.4 Messprotokoll mit Calyculin-A

Für die Messung mit dem Phosphataseinhibitor Calyculin-A wurde bereits die Fluo-3-AM-Farbstofflösung mit 125 µM Calyculin-A versetzt und die Zellen 15 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Zur kontinuierlichen Perfusion der Messkammer unter der Messung wurde eine mit 125 µM Calyculin-A versetzte und auf 35 °C erwärmte Tyrode verwendet. Vor Beginn der

Messung und auch vor Beginn der Zellstimulation wurde 3 Minuten die Calyculin-A-Farbstoffmischung ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz stimuliert und ein repräsentativer Kardiomyozyt ausgewählt. Nachdem alle Einstellungen vorgenommen waren, wurde die Aufzeichnung gestartet und die Stimulation für 5 Minuten auf 2 Hz eingestellt. Die Blende für das Anregungslicht wurde zur Schonung des Farbstoffes nur alle 30 Sekunden für 5 Schläge geöffnet, um Kalziumtransienten aufzuzeichnen. Nach 5 Minuten 2 Hz-Stimulation erfolgte eine Untersuchung der Kraft-Frequenz-Beziehung mit den Frequenzen 0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz und 4 Hz jeweils für 1 Minute. Abschließend wurde die Hintergrundfluoreszenz aufgezeichnet. Als Kontrolle wurden jeweils die Hälfte der Kammern mit dem gleichen Protokoll, jedoch mit normaler Messtyrode und Farbstoff ohne Calyculin-A gemessen.

Protokoll			Farbstoff	Tyrode	Temperatur
Calyculin-A			Fluo-3-AM	Messtyrode/ Calyculin-A- Tyrode	35 °C
Grundstimulation	2 Hz	5 Minuten			
Frequenzen	0,5, 1, 2, 4 Hz	Je 1 Minute			

Tabelle 2.4: Calyculin-A-Messprotokoll

2.5 Datenauswertung

Die Auswertung der an der Epifluoreszenzanlage erhobenen Messdaten erfolgte mithilfe eines speziellen Computerprogrammes (IonWizard, Analysis Version 5 von ION OPTIX). Auswertungsrelevante Transienten bzw. Sarkomer-Abmessungen konnten ausgewählt werden und wurden von Ion Wizard gemittelt bzw. einzeln im Analysemodus graphisch dargestellt. Die Auswahl der Transienten bzw. Verkürzungskurven ist in Tab. 2.5- 2.8, S.30-31 aufgeführt. Im Analysemodus des Programmes Ion Wizard konnten die gewünschten Abmessungen und Berechnungen an den jeweiligen Kalziumtransienten und Verkürzungskurven durchgeführt werden. Die ermittelten Werte wurden dann in eine Excel-Datei übertragen und weiter analysiert (vgl. 2.9, S. 34).

Protokoll		Auswertungsrelevante Kalziumtransienten/Kontraktionen
<u>Basis</u>		
Grundstimulation	1 Hz	Jeweils 3 Kalziumtransienten direkt vor der jeweiligen Stimulationspause(gemittelt)
Stimulationspausen	10, 30, 60 sek	Jeweils Kalziumtransient direkt nach der Pause (einzeln)
Frequenzen	1, 2, 4, 8 Hz	Je 10 Kalziumtransienten + Kontraktionen aus Steady-State-Bedingungen (gemittelt) + letzter Transient vor Stimulationsfrequenzwechsel
Tau (τ)		letzter Transient vor Stimulationsfrequenzwechsel
Koffein	bei 1 Hz	3 Transienten direkt vor der Koffeinapplikation (gemittelt) + Koffeintransient (einzeln)

Tabelle 2.5: Auswertung Basisprotokoll

<u>Protokoll</u>		Auswertungsrelevante Kalziumtransienten/Kontraktionen
<u>Isoproterenol</u>		
Grundstimulation	1 Hz	Je 10 Kalziumtransienten + Kontraktionen aus Steady-State-Bedingungen vor und nach dem Einwaschen von Isoproterenol (jew. gemittelt)
Einwaschen		
Frequenzen	1, 2, 4, 8 Hz	Je 10 Kalziumtransienten + Kontraktionen aus Steady-State-Bedingungen (gemittelt)

Tabelle 2.6: Auswertung Isoproterenol-Protokoll

<u>Protokoll</u>		Auswertungsrelevante Kalziumtransienten/Kontraktionen
<u>Calyculin-A</u>		
Grundstimulation	2 Hz	Alle 60 sek 5 Kalziumtransienten + Kontraktionen (gemittelt)
5 Minuten		
Frequenzen	0,5, 1, 2, 4 Hz	Je 10 Kalziumtransienten + Kontraktionen aus Steady-State-Bedingungen (gemittelt)

Tabelle 2.7: Auswertung Calyculin-A-Protokoll

<u>Protokoll</u>		Auswertungsrelevante Kalziumtransienten/Kontraktionen
<u>Fura-2-AM</u>		
Grundstimulation	1 Hz	
Stimulationspause	10 sek	
Frequenzen	1, 4 Hz	Je 10 Kalziumtransienten aus Steady-State-Bedingungen (gemittelt)

Tabelle 2.8: Auswertung der Fura-2-AM-Messungen

2.5.1 Auswertung der Kalziumfluoreszenz

Zunächst wurde die Hintergrundfluoreszenz von der Fluoreszenz der Messung subtrahiert. Anschließend wurde von den auswertungsrelevanten Kalziumtransienten (jeweils 3 Transienten direkt vor den Stimulationspausen und vor der Koffeinapplikation und durchschnittlich 10 repräsentative Transienten jeder gemessenen Frequenz) ein gemittelter Kalziumtransient erstellt. Jeweils der erste Transient nach den Stimulationspausen, der Koffein-induzierte Kalziumtransient und der letzte Transient vor Frequenzwechsel wurden einzeln ausgewertet.

Je nach Einstellung wurden die Parameter der Transienten analysiert. Die auswertungsrelevanten Werte wurden kopiert und in einer Excel-Datei abgelegt.

Die Amplitude der Kalziumtransienten wurde jeweils als Quotient der maximal gemessenen *Peak*fluoreszenz (F) und der Fluoreszenz der *Baseline*fluoreszenz (F_0) angegeben.

Zur Berechnung wurde in Microsoft Excel folgende Formel verwendet:

$$\Delta \frac{F}{F_0} = \frac{\text{Peakfluoreszenz (F)}}{\text{Baselinefluoreszenz (F}_0\text{)}} - \frac{\text{Baselinefluoreszenz (F}_0\text{)}}{\text{Baselinefluoreszenz (F}_0\text{)}}$$

Formel 2.1

Die Kalzium-Abfall-Kinetik wurde ermittelt, indem eine monoexponentielle „Fit“ Kurve tau (τ) über die Kalzium-Abfall-Kurve gelegt wurde. Deren Parameter τ beschreibt nun die Geschwindigkeit des Abfalls des Transienten. Für die Auswertung des Parameters tau wurde jeweils der letzte Transient vor der 3-Sekunden-Pause zwischen den Frequenzwechseln

verwendet. Außerdem wurde die Zeit von maximaler Fluoreszenz bis zum 50%igen (bzw. unter Calyculin-A 80%igen Abfall) des Kalziumtransienten bestimmt ($EZ_{Ca50\%}$, $EZ_{Ca80\%}$). Diese Kalzium-Abfall-Zeiten wurden jeweils als Mittelwert aus zehn Transienten bestimmt.

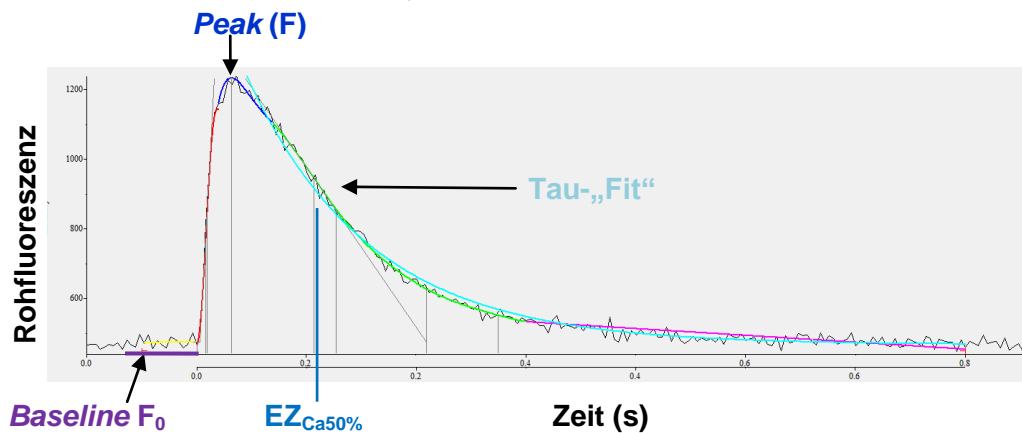


Abbildung 2.5: Gemittelter Kalziumtransient bei 1 Hz

2.5.2 Auswertung der Myozytenverkürzung

Für die Auswertung der Myozytenverkürzung wurde die prozentuale systolische Verkürzung als fraktionelle Myozytenverkürzung in % der Ruhezelllänge (RZL) bestimmt. Dies erfolgte nach folgender Formel, berechnet aus diastolischer und systolischer Sarkomerlänge (SL):

$$\text{syst. Myozytenverkürzung (in \% d. RZL)} = \frac{\text{diast. SL} - \text{syst. SL}}{\text{diast. SL}} \times 100$$

Formel 2.2

Weiterhin wurde entsprechend der Auswertung der Kalziumfluoreszenz der Parameter $RZ_{Kontr.50\%}$ bestimmt. Dies entspricht in diesem Fall der 50%igen Relaxation der Myozyten auf diastolische Ruhezelllänge.

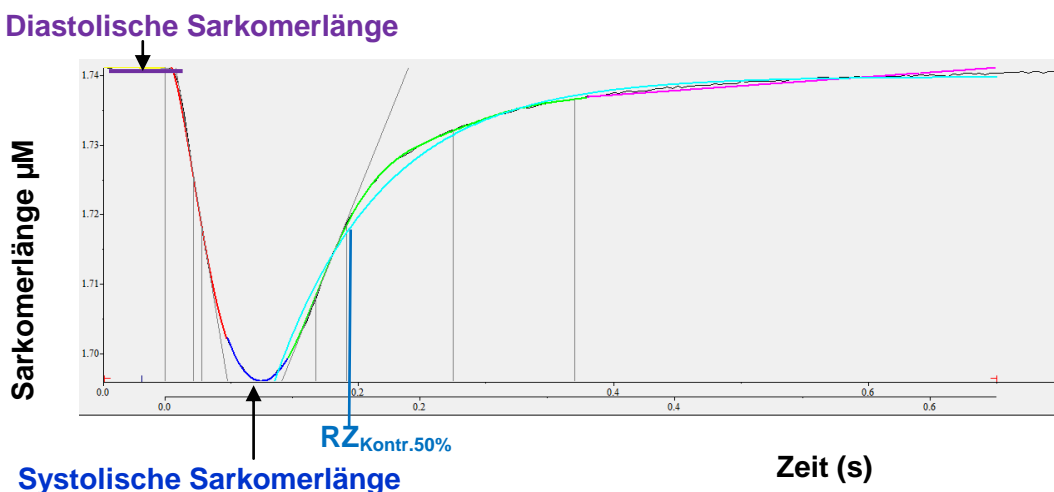


Abbildung 2.6: Gemittelte Sarkomerverkürzung

2.6 Messung von Kalziumsparks am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Zur Bestimmung des SR Kalziumlecks wurden spontane Kalziumentladungen der RyR2, so genannte Kalziumsparks, untersucht. Hierzu wurden Messungen an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 5 Pascal, Zeiss) durchgeführt.

Ein entscheidendes Charakteristikum der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie ist eine punktuelle Anregung und Emissionsmessung. Angeregt wird durch einen zielgerichteten Laserstrahl. Die jeweils erzeugte Fluoreszenz wird durch eine konfokale Lochblende (*Pinhole*) mit einem variabel einstellbaren Durchmesser geleitet. Dies gewährleistet, dass nur das Licht aus der jeweiligen Fokusebene vom nachgeschalteten Photomultiplier detektiert werden kann und Licht, welches nicht aus der Brennebene kommt, ausgeblendet wird. Durch Bewegung des Laserstrahls mit beweglichen Spiegeln (Minsky 1988) wird der eingestellte Bereich Punkt für Punkt bzw. Linie für Linie „abgerastert“.

Die verwendete Messtyrode wurde mit 3 mM Kalzium versetzt und bei Raumtemperatur zur kontinuierlichen Perfusion der Messkammer verwendet. Die Messkammern wurden, wie in Abschnitt 2.4, S. 24-25 beschrieben, eingefärbt und in Dunkelheit 15 Minuten inkubiert. Als Farbstoff kam Fluo-4-AM (10 μ M) zum Einsatz. Durch einen Filter wurde gewährleistet, dass nur das emittierte Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 515 nm detektiert wurde.

Die zu messende Zelle wurde im Mikroskop zunächst mittels eines 40-fach-vergrößernden Ölimmersionsobjektivs eingestellt. Gemessen wurde im *Line-Scan-Modus*, d.h. in zeitlich rasch wiederholter Abtastung einer gewählten Linie im Bildausschnitt. Es wurde dafür eine Linie entlang der langen Achse der Zelle gewählt. Die Einstellungen wurden dafür folgendermaßen gewählt: 512 Pixel pro Linie mit einer Scanbreite von 38,4 μ m bei Pixelzeit 0,64 μ s, Pixelgröße 0,07 μ m x 0,07 μ m x 0,1 μ m, Intensitätsauflösung 12 bit und einer „Pinhole“-Öffnung von 67 μ m. Es wurden jeweils 5000 Linien hintereinander ohne Verzögerung gemessen mit einer Aufzeichnungsdauer von insgesamt 3,84 Sekunden.

Die Auswertung erfolgte zunächst am Messcomputer mit dem Programm Zeiss (CSM Image Examiner Version 3.2.0.70) sowie anschließender weiterer Analyse der Fluoreszenzverläufe detektierter Sparks mit Microsoft Excel. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil sparkender Zellen, die Sparkfrequenz, die Fluoreszenzamplitude als F/F_0 nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz, die 50%ige Elimination des Kalziums nach Spark ($EZ_{CaSp50\%}$), sowie das SR-Kalziumleck. Dieses wurde als Produkt aus Amplitude (F/F_0), $EZ_{CaSp.50\%}$ (ms) und Spark-Frequenz (1/100 μ m/s) errechnet, entsprechend ist die Einheit des SR-Kalziumlecks $F/F_0 * s^1/(s*m) = F/F_0/m$.

2.7 Ermittlung von Herz- und Körpergewicht

Das Gewicht des isolierten Herzens wurde mit einer Feinwaage der Firma Sartorius ermittelt. Der Körper der Maus wurde ebenfalls gewogen, um durch Addition des Herzgewichtes das Körpergewicht der Maus zu errechnen.

Die Daten des Herz- sowie des Körpergewichtes wurden nun in ein Verhältnis gesetzt, um mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen zu detektieren.

$$\text{Verhältnis Herz zu Körpergewicht } \left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{\text{Herzgewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}}$$

Formel 2.3

2.8 Messung der Kardiomyozyten-Dimensionen

Von jedem gemessenen Kardiomyozyten wurde ein *Snapshot* des Videobildes gemacht. Dieser wurde jeweils in einer Stimulationspause aufgenommen, um alle Zellen in einem relaxierten Zustand zu erfassen. Mithilfe einer geeichten Messskala konnten nun aus den *Snapshots* die Abmessungen der Zellen errechnet werden.

2.9 Statistik

Die Daten wurden jeweils als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) aufgetragen.

Weiterhin wurden die Daten im dem Programm Microsoft Excel mittels T-Tests auf Signifikanzen verglichen. Der Fisher-Test und 2-Wege-ANOVA-Test für wiederholte Messungen wurde in SigmaStat (Systat Software GmbH/Erkrath) durchgeführt, letzterer mit Holm-Sidak Post-Hoc-Testung. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

2.10 Verwendete Lösungen

2.10.1 Basistyrode

Die Basistyrode war Grundbestandteil aller Messlösungen. Die Substanzen wurden mit einer Waage der Firma Sartorius analytic abgewogen und in einem Becherglas gesammelt. Anschließend wurde mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) auf knapp 1000 ml aufgefüllt und die Mischung auf einem erwärmbaren Magnetrührer (Typ M21/1 Framo-Gerätetechnik/Deutschland) vermischt und auf 35 °C erhitzt. Ein pH-Meter (Basic Meter PB-11 Sartorius/Göttingen) diente der Überprüfung des pH-Wertes, welcher mit NaOH auf 7,54 titriert wurde. Die Messtyrode wurde unter Beachtung des pH-Wertes mit doppelt destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und konnte bis zur Verwendung für maximal 2 Tage im Kühlschrank bei +4 °C gelagert werden.

Substanz	Konzentration (mM)	Masse bzw. Volumen	Gesamtvolumen (ml)
KCl	4	298,2 mg	1000
NaCl	140	8181,6 mg	
MgCl ₂	1	95,2 mg	
HEPES	5	1191,6 mg	
Glucose	10	1801,6 mg	
CaCl ₂	1	1 ml	
gelöst in ddH ₂ O (pH 7,54; 35 °C), Lagerung bei +4 °C			

Tabelle 2.9: Inhaltsstoffe der Basistyrode

2.10.2 Messtyrode

Vor Messbeginn wurde die gewünschte Menge Basistyrode mit 1 mM Kalzium versetzt.

Substanz	Konzentration (mM)	Masse bzw. Volumen	Gesamtvolumen (ml)
CaCl ₂	1	Je nach benötigter Menge	Je nach benötigter Menge
gelöst in Basistyrode (pH 7,54; 35 °C)			

Tabelle 2.10: Inhaltsstoffe der Messtyrode

2.10.3 Koffeintyrode (10 mM)

Für die Koffeinmessungen wurde die Basistyrode mit Koffein versetzt und konnte im Kühlschrank bei -4 °C für 2 Wochen aufbewahrt und je nach Bedarf entnommen und zur Messung zusätzlich mit 1 mM Kalzium versetzt werden.

Substanz	Konzentration (mM)	Masse bzw. Volumen	Gesamtvolumen (ml)
Koffein	10	1942 mg	1000
gelöst in Basistyrode (pH 7,54; 35 °C) Lagerung bei +4 °C			

Koffeintyrode zur Messung

CaCl ₂	1	Je nach benötigter Menge	Je nach benötigter Menge
gelöst in Koffeintyrode (pH 7,54; 35 °C)			

Tabelle 2.11: Inhaltsstoffe der Koffeintyrode

2.10.4 Isoproterenol-Tyrode

Um dem Isoproterenol einen Oxidationsschutz zu bieten, wurde zunächst Basistyrode mit Ascorbinsäure versetzt und lichtgeschützt aufbewahrt. Durch Zugabe von Isoproterenol und Kalzium konnte aus der Ascorbinsäuretyrode (ASC-Tyrode) 4 nM Isoproterenol-Messtyrode hergestellt werden. Diese wurde sowohl bei der Herstellung als auch bei der Messung kontinuierlich vor Licht geschützt.

ASC-Tyrode

Substanz	Masse bzw. Volumen	Gesamtvolumen (ml)
Ascorbinsäure	50 mg	1000
HCl (32%)	5 µl	
gelöst in Basistyrode, Lagerung lichtgeschützt bei +4 °C		

Isoproterenol Stamm I Lösung (10^{-2} M)

Isoproterenol	247,7 mg	100
gelöst in ASC-Tyrode		

Isoproterenol Stamm II Lösung (10^{-5} M)

<u>Isoproterenol Stamm I Lösung</u>	10 µl	10
gelöst in ASC-Tyrode		

Isoproterenol Messtyrode ($4 \cdot 10^{-9}$ M)

Isoproterenol Stamm II Lösung	40 µl	100
CaCl ₂ (1 mM)	100 µl	
gelöst in ASC-Tyrode		

Tabelle 2.12: Inhaltsstoffe der ASC-Tyrode sowie der Isoproterenol-Stamm-I- und -II-Lösung und der Isoproterenol-Messtyrode.

2.10.5 Farbstoffe

Die Farbstofflösungen wurden alle lichtgeschützt in einem abgedunkelten Raum angesetzt.

Fluo-3-AM/ Fura-2-AM-Farbstoffstammlösung(1 mM)

Substanz	Masse (mg)	Gelöst in DMSO (µl)	Endkonzentration
Fluo-3-AM	1	885	1 mM
bei -20 °C lichtgeschützt gelagert			
Fura-2-AM	1	998,1	1 mM
bei -20 °C lichtgeschützt gelagert			

Tabelle 2.13: Inhaltsstoffe der Farbstoffstammlösung Fluo-3-AM und Fura-2-AM.

Pluronic 20%

Substanz	Masse (mg)	Gelöst in DMSO (ml)	Endkonzentration (mg/ml)
Pluronic w/v	200	1	200
bei Raumtemperatur gelagert			

Tabelle 2.14: Inhaltsstoffe von Pluronic 20%.

Fluo-3-AM/ Fura-2-AM-Gebrauchslösung (10 µM)

Zunächst wurde die gewünschte Farbstoffstammlösung lichtgeschützt aufgetaut und das bei Raumtemperatur als fester Stoff vorliegende Pluronic 20% auf dem Magnetrührer (Typ M21/1 Framo-Gerätetechnik/Deutschland) bis zur Verflüssigung erwärmt. Von nun an wurde in einem abgedunkelten Raum mit Rotlichtquelle gearbeitet. Die Farbstoff-Stammlösung wurde mit einem Vortexer (Vortex, Genie 2™, Bender and Hobein AG/Zürich) gründlich gemischt und anschließend 100 µl mittels einer automatischen Pipette (Eppendorf/Hamburg) auf das flüssige Pluronic gegeben und mittels Auf-und-Ab-Pipettierens schaumig vermischt. Anschließend wurde Messtyrode dazugegeben und alles gründlich mit einem Vortexer vermengt. Der fertige Farbstoff wurde in lichtundurchlässigen 0,5 ml Tubes (Eppendorf/Hamburg) zu je 200 µl aliquotiert und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Substanz	Volumen	Gesamtvolumen (ml)
Pluronic 20% (erwärmt)	10 µl	10 ml
Fluo-3-AM-Stammlösung	100 µl	
gelöst in Messtyrode, 200-µl-Portionen lichtgeschützt bei -4 °C gelagert		
Pluronic 20% (erwärmt)	10 µl	10 ml
Fura-2-AM-Stammlösung	100 µl	
gelöst in Messtyrode, 200-µl-Portionen lichtgeschützt bei -4 °C gelagert		

Tabelle 2.15: Inhaltsstoffe von Fluo-3-AM/Fura-2-AM-Gebrauchslösung (10 µM)

Fluo 4-AM Stammlösung

Substanz	Masse	Gelöst in
Fluo-4-AM	500 µg	456 µl DMSO
lichtgeschützt, 46,5-µl-Portionen bei -20 °C gelagert bzw. sofort zu Gebrauchslösung verarbeitet		

Tabelle 2.16 Inhaltsstoffe von Fluo-4-AM-Stammlösung

Fluo 4-AM Gebrauchslösung (10 μM)

Substanz	Masse	Gelöst in
Pluronic 20% (erwärmt)	4,56 μl	4,56 ml Messtyrode mit 1 mM Ca^{2+}
Fluo-4 AM-Stammlösung	45,60 μl	
200-μl-Portionen lichtgeschützt bei -4 °C gelagert		

Tabelle 2.17: Inhaltsstoffe von Fluo-4-AM-Gebrauchslösung.

2.10.6 Calyculin-A

Vorbereitung und Messungen mit Calyculin-A wurden immer lichtgeschützt durchgeführt. Um eine gleichzeitige Inkubation des Farbstoffes mit 10 μM Fluo-3-AM und 125 μM Calyculin-A zu ermöglichen, wurden jeweils doppelt konzentrierte Fluo-3-AM-Gebrauchslösung und doppelt konzentrierte Calyculin-A-Tyrode hergestellt und direkt vor der Applikation auf die Zellen eins zu eins vermischt, so dass die gewünschte Konzentration resultierte.

Calyculin-A-Stammlösung

Substanz	Endkonzentration	Masse bzw. Volumen	Gelöst in
Calyculin-A	0,5 mM	10 μg	20 μl DMSO
bei -20 °C lichtgeschützt gelagert			

Tabelle 2.18: Inhaltsstoffe der Calyculin-A-Stammlösung.

Calyculin-A-Tyrode 250 nM

Substanz	Endkonzentration	Masse bzw. Volumen	Gelöst in
Calyculin-A-Stammlösung	250 nM	2 μg	4 ml Messtyrode
direkt weiterverarbeitet zu Calyculin-Fluo-3-AM Mischung			

Tabelle 2.19: Inhaltsstoffe der Calyculin-A-Tyrode.

Doppelt konzentrierte Fluo-3-AM Gebrauchslösung (20 μM)

Substanz	Endkonzentration	Masse bzw. Volumen	Gesamtvolumen (ml)
Pluronic 20% (erwärmt)		20 μl	10 ml
Fluo-3-AM-Stammlösung	20 μM	200 μl	
gelöst in Messtyrode, 200-μl-Portionen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert			

Tabelle 2.20: Inhaltsstoffe der doppelt konzentrierten Fluo-3-AM Gebrauchslösung (20 μM).

Calyculin-A –Fluo-3-AM-Mischung

Substanz	Masse bzw. Volumen	Endkonzentration
Calyculin-A-Tyrode 250 nM	200 µl	125 nM Calyculin-A + 10 µM Fluo-3-AM
20 µM Fluo-3-AM Gebrauchslösung	200 µl	
Je 200 µl der Mischung wurden zum Färben einer Kammer benutzt.		

Tabelle 2.21: Inhaltsstoffe der Calyculin-A–Fluo-3-AM-Mischung.

2.11 Hersteller verwendeter Substanzen

Substanz	Hersteller
Ascorbinsäure	SIGMA-ALDRICH/München/Deutschland
CaCl ₂	SIGMA-ALDRICH/München/Deutschland
Calyculin-A	Merck/Darmstadt/Deutschland
DMSO	Fluka/ SIGMA-ALDRICH/Buchs/Schweiz
Fluo-3-AM	Molucalar Probes/USA
Fluo-4AM	Molucalar Probes/USA
Fura-2-AM	SIGMA-ALDRICH/München/Deutschland
Glucose	Merck/Darmstadt/Deutschland
HCl 32%	Carl Roth GmbH/Karlsruhe/Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH/Karlsruhe/Deutschland
Isoproterenol	SIGMA-ALDRICH/München/Deutschland
KCl	Merck/Darmstadt/Deutschland
Koffein	SIGMA-ALDRICH/München/Deutschland
Laminin	SIGMA-ALDRICH/München/Deutschland
MgCl ₂	Merck/Darmstadt/Deutschland
NaCl	Fluka/ SIGMA-ALDRICH/Buchs/Schweiz
NaOH	Merck/Darmstadt/Deutschland
Pluronic	SIGMA-ALDRICH/München/Deutschland

Tabelle 2.22 Hersteller verwendeter Substanzen

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Daten der CaMKII δ -Knockout-Maus

Es wurden jeweils zwei nicht näher verwandte heterozygote CaMKII δ -Knockout-Mäuse verpaart. Die Nachkommen wurden entsprechend den Mendel'schen Verteilungsmustern (Wildtyp 25%, heterozygot KO 50%, homozygot KO 25%) geboren (siehe auch Tab. 3.1) und überlebten normal. Die Tiere waren alle vital, aktiv und zeigten keine offensichtlichen Veränderungen des Verhaltens durch den kardialen genetischen CaMKII δ -Knockout. Im Alter von durchschnittlich 11 Wochen wurden die Experimente durchgeführt.

Genotyp	Anzahl	Prozent
Wildtyp	83	26,6%
Heterozygot	147	47,1%
Knockout	82	26,3%

Tabelle 3.1: Geburten-Verteilungsmuster der Genotypen nach Verpaarung heterozygoter CaMKII δ -Knockout-Mäuse.

3.1.1 Messung des Herz- und Körpergewichtes

Von jeder untersuchten Maus wurden das Herzgewicht und das Körpergewicht ermittelt und ausgewertet. Wie Tab. 3.2 zeigt, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen.

	WT (n=18)	HZ (n=17)	KO (n=22)	T-Test		
				HZ vs. WT	KO vs. WT	KO vs. HZ
Herzgewicht (mg)	190,9±5,7	220,2±10,5	182,2±5,2	n.s	n.s	n.s
Körpergewicht (g)	24,5± 2,3	24,1±1,2	22,8±0,8	n.s	n.s	n.s
Herzgewicht/ Körpergewicht (mg/g)	7,9±1,1	8,4±0,3	8,1±0,2	n.s	n.s	n.s
Alter (Wochen)	11,1±0,5	11,2±0,4	11,2±0,2	n.s	n.s	n.s

Tabelle 3.2: Übersicht über Alter der Mäuse sowie Herz- und Körpergewicht incl. des Herz/Körpergewicht-Verhältnisses.

3.1.2 Dimensionen der Kardiomyozyten

Im Rahmen der Messungen wurden die einzelnen Kardiomyozyten fotografiert und anschließend deren Dimensionen ausgemessen bzw. berechnet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Länge, Breite oder Volumen zwischen den verschiedenen Genotypen (siehe Tab. 3.3, S. 43). Abb. 3.1 Zeigt exemplarisch jeweils einen Kardiomyozyten einer CaMKII δ -Knockout- und einer Wildtyp-Maus.

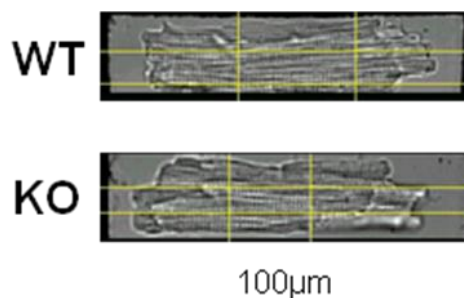


Abbildung 3.1: Fotos der Kardiomyozyten.

Exemplarisches Foto jeweils eines homozygoten CaMKII δ -Knockout- und eines Wildtyp-Kardiomyozyten.

	WT (n=122)	HZ (n=120)	KO (n=150)	T-Test		
				HZ vs. WT	KO vs. WT	KO vs. HZ
Länge (μM)	124,4 \pm 2	126,5 \pm 2,2	121,9 \pm 1,8	n.s	n.s	n.s
Breite (μM)	27,7 \pm 0,3	27,7 \pm 0,4	27,5 \pm 0,3	n.s	n.s	n.s
Volumen (pI)	38,7 \pm 1,04	39,6 \pm 1,2	37,5 \pm 0,9	n.s	n.s	n.s
Länge/Breite	4,6 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	n.s	n.s	n.s

Tabelle 3.3: Zelldimensionen

Das Volumen wurde berechnet durch Länge*Breite*Höhe, die Höhe ergab sich aus der Breite multipliziert mit dem Korrekturfaktor 0,4 (Bers 2001).

3.2 Zytoplasmatisches freies Kalzium und Myozytenkontraktion

Zum Abschätzen der Amplitude der Kalziumtransienten wurde der Parameter F/F_0 verwendet, weiterhin wurde die prozentuale Sarkomerverkürzung der Kardiomyozyten analysiert. Die Kalziumeliminationsgeschwindigkeit wurde anhand der Funktion tau (τ_{Ca}) erfasst. Ergänzend wurde jeweils für Kalziumelimination und Kontraktion die 50%ige Eliminations- bzw. Relaxationszeit ($\text{EZ}_{\text{Ca}50\%}$ bzw. $\text{RZ}_{\text{Kontr.}50\%}$) verwendet.

3.2.1 Untersuchung der systolischen Funktion auf Einzelzellebene

Die systolische Funktion der Kardiomyozyten wurde anhand der Amplitude der Kalziumausschüttung und der Kontraktionskraft der Kardiomyozyten untersucht.

Sowohl in den homozygoten als auch in den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen waren die gemessenen Parameter im Vergleich zu den Wildtyp-Kontroll-Zellen nicht beeinträchtigt. Abbildung 3.2, S.44 zeigt eine Originalregistrierung jeweils eines Kalziumtransienten einer homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zelle und einer Wildtyp-Kontroll-Zelle.

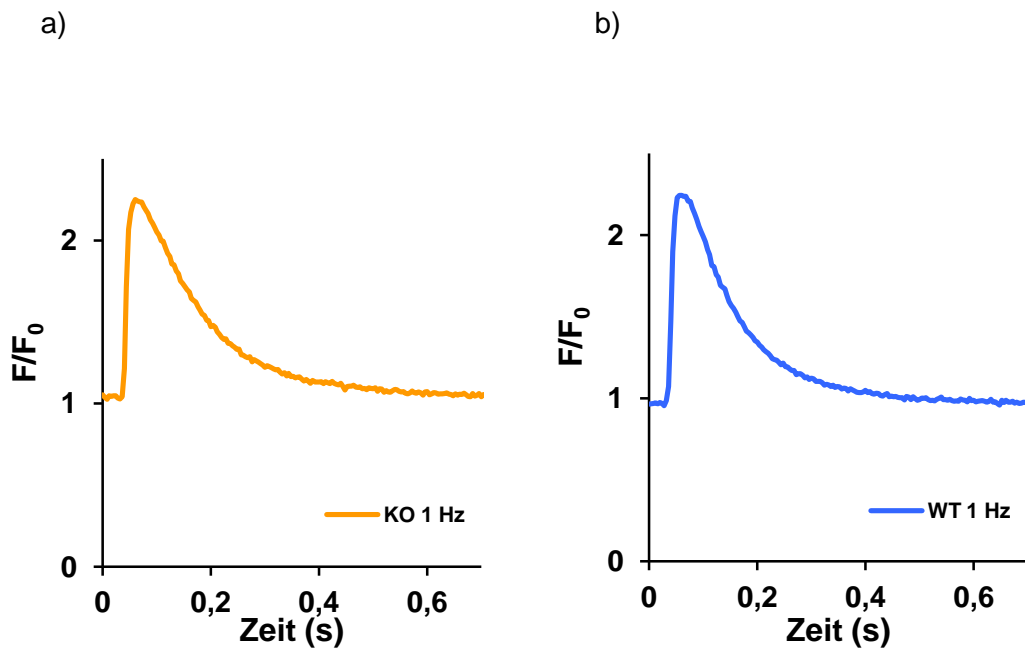


Abbildung 3.2: Originalregistrierungen der Kalziumamplitude.

a) homozygote CaMKII δ -Knockout-Zelle

b) Wildtyp-Kontrollzelle

Jeweils Kalziumamplitude aufgetragen als F/F_0

3.2.1.1 Kraft-Frequenz-Beziehung

Über alle untersuchten Stimulationsfrequenzen hinweg zeigte sich nach 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich der Amplitude der Kalziumausschüttung (F/F_0). In der Post-Hoc-Testung zeigte sich jedoch bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz bei den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontroll-Zellen das F/F_0 signifikant erhöht. Bei den schnelleren, für die Maus physiologischeren, Stimulationsfrequenzen offenbarten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen mehr. Auch im Vergleich zum heterozygoten CaMKII δ -Knockout zeigten sich insgesamt keine signifikanten Unterschiede. Das F/F_0 betrug beim Wildtyp bei 1 Hz im Mittel $2,2 \pm 0,1$ ($n=57$), beim heterozygoten CaMKII δ -Knockout $2,3 \pm 0,1$ ($n=69$) und beim homozygoten CaMKII δ -Knockout $2,3 \pm 0,1$ ($n=60$). Mit steigenden Stimulationsfrequenzen nahm die Amplitude der Kalziumtransienten in allen drei Gruppen ab und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mehr. Bei 2 Hz lag das F/F_0 bei den Wildtyp-Kontroll-Zellen im Mittel bei $2,1 \pm 0,1$ ($n=57$), bei den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen bei $2,2 \pm 0,1$ ($n=69$) und bei den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen bei $2,2 \pm 0,1$ ($n=60$). Unter 4 Hz-Stimulation zeigten die Wildtyp-Kontroll-Zellen ein F/F_0 von $2,0 \pm 0,1$ ($n=57$), die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen von $2,1 \pm 0,1$ ($n=67$) und die homozygote CaMKII δ -Knockout ebenfalls von $2,1 \pm 0,1$ ($n=59$). Die Amplituden der Kalziumtransienten (F/F_0) unter 8 Hz betrugen in den

Wildtyp-Kontroll-Zellen $1,80 \pm 0,04$ (n=43), $1,79 \pm 0,04$ (n=44) in den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und $1,77 \pm 0,05$ (n=39) in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen. Abbildung 3.3 zeigt den Verlauf des F/F_0 in den verschiedenen Genotypen unter Stimulationsfrequenzen von 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz und 8 Hz.

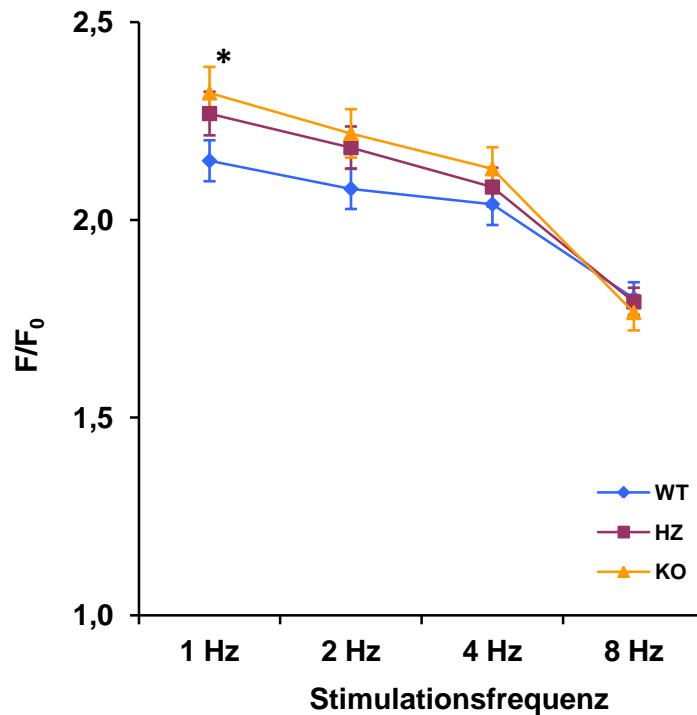


Abbildung 3.3: Frequenzabhängigkeit der Kalziumamplitude.

Mittelwerte der Kalziumtransienten (F/F_0) für die Frequenzen 1-8 Hz. Die 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Im Post-Hoc-Test war bei 1 Hz-Stimulation die Kalziumamplitude der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen signifikant gegenüber den Wildtyp-Kontroll-Zellen erhöht. * bezeichnet signifikante Unterschiede im Post-Hoc-Test zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

Auch die Auswertung der Myozytenkontraktion zeigte über alle untersuchten Stimulationsfrequenzen hinweg nach 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Sowohl die homozygoten als auch die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen kontrahierten bei den Stimulationsfrequenzen 1 Hz, 2 Hz und 4 Hz im Vergleich zu den Wildtyp-Kontroll-Zellen tendenziell stärker, es ergab sich jedoch auch nach Post-Hoc-Testung keine Signifikanz. Mit steigenden Frequenzen näherte sich, vergleichbar zur Kalziumamplitude, die Kontraktilität der Gruppen einander an, wobei die Wildtyp-Kontroll-Zellen bei 8 Hz sowohl die heterozygoten als auch die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen überholten. Die Unterschiede waren jedoch wieder nicht signifikant. Die Myozytenverkürzung wird im Folgenden als prozentuale Verkürzung ausgehend von der Ruhelänge angegeben. Die Werte sind Tab. 3.4, S. 46 zu entnehmen. Abbildung 3.4, S. 46 zeigt eine graphische Darstellung der Daten.

	WT	HZ	KO	Post-Hoc-Test		
				HZ vs. WT	KO vs. WT	KO vs. HZ
1 Hz	3,0±0,2% (n=57)	3,5±0,2% (n=69)	3,4±0,2% (n=60)	n.s.	n.s.	n.s.
2 Hz	2,9±0,2% (n=57)	3,4±0,2% (n=69)	3,2±0,2% (n=60)	n.s.	n.s.	n.s.
4 Hz	3,6±0,3% (n=57)	4,0±0,3% (n=67)	3,8±0,3% (n=59)	n.s.	n.s.	n.s.
8 Hz	4,1±0,4% (n=43)	4,0±0,3% (n=44)	3,9±0,4% (n=39)	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 3.4: Frequenzabhängige Kontraktilität.

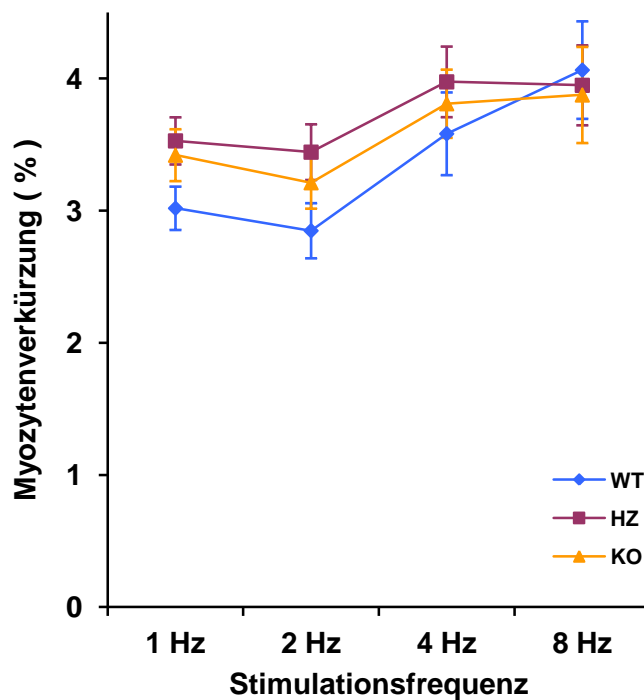


Abbildung 3.4: Frequenzabhängige Kontraktilität.

Die Myozytenverkürzung der drei Genotypen (bei verschiedenen Frequenzen gegeneinander aufgetragen). Die 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Im Post-Hoc-Test zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

3.2.2 Untersuchung der diastolischen Funktion auf Einzelzellebene

Die Diastolische Funktion der Zellen wurde anhand der zytosolischen Kalziumelimination und der Relaxationskinetik untersucht.

3.2.2.1 Kinetik der zytosolischen Kalziumelimination

Die Geschwindigkeit der Relaxation einer Herzmuskelzelle wird stark dadurch bestimmt, wie schnell und effizient das Kalzium aus dem Zytosol wieder in das SR oder nach extrazellulär transportiert wird. Dieses geschieht zum größten Teil durch die SERCA2a, zu kleineren Anteilen durch den NCX und andere Mechanismen (vgl. 1.3.4 bis 1.3.6, S. 7-9). Mit steigender Herz- bzw. Stimulationsfrequenz geht die Relaxation immer schneller vonstatten (FDAR) (vgl. 1.4.3.3, S. 13 und 4.3.2, S. 77-79).

Um den vollständigen Abfall des freien intrazellulären Kalziums auf Ruhe-Niveau auswerten zu können, wurde neben der Aufzeichnung der Steady-State-Stimulation nach jeder gemessenen Frequenz die Stimulation 3 Sekunden pausiert. Mit Hilfe der monoexponentiellen Konstanten tau (τ_{Ca}) konnte so die Geschwindigkeit der intrazellulären Kalziumelimination während der Diastole ermittelt werden. Eine weitere Möglichkeit, die Kinetik der Kalziumelimination und Relaxation der Zellen zu vergleichen, ist die Auswertung der 50%igen Eliminations- bzw. Relaxationszeit. Diese wurden jeweils für den diastolischen zytosolischen Kalziumkonzentrations-Abfall ($EZ_{Ca50\%}$) und für die Relaxation der Zelle von der Kontraktion ($RZ_{Kontr.50\%}$) bestimmt. Im Gegensatz zur Auswertung der Funktion tau, wurde die 50%ige Eliminations- bzw. Relaxationszeit als Mittelwert aus mehreren Transienten ohne kompletten Baselineabfall, d.h. unter fortlaufender Stimulation, ausgewertet.

Die 2-Wege-ANOVA-Testung für das τ_{Ca} und die $EZ_{Ca50\%}$ der Kalziumtransienten zeigte für die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen eine gegenüber den Wildtyp-Kontroll-Zellen signifikant verlangsamte diastolische Kalziumelimination. Die Post-Hoc-Testung wiederum zeigte, dass diese Unterschiede sich vor allem auf langsame Stimulationsfrequenzen beziehen, während sich mit zunehmender Stimulationsfrequenz die genannten Parameter in den Genotypen angleichen. Die FDAR ist also im Knockout nicht beeinträchtigt. Bei 1 Hz-Stimulation war in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen die Kalziumelimination mit einem τ_{Ca} von 123 ± 4 ms ($n=62$) und einer $EZ_{Ca50\%}$ von 95 ± 2 ms ($n=60$) signifikant langsamer als im Wildtyp mit einem τ_{Ca} von 112 ± 3 ms ($n=43$) und einer $EZ_{Ca50\%}$ von 88 ± 2 ms ($n=57$). Bei 2 Hz betrug das τ_{Ca} der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen 112 ± 3 ms ($n=60$) und die $EZ_{Ca50\%}$ 83 ± 2 ms ($n=60$). Somit waren beide Parameter ebenfalls signifikant langsamer als in den Wildtyp-Kontroll-Zellen mit einem τ_{Ca} von 101 ± 2 ms ($n=43$) und einer $EZ_{Ca50\%}$ von 78 ± 1 ms ($n=57$). Bei 4 Hz bestanden keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den

Gruppen. Die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen zeigten ein τ_{Ca} von 92 ± 3 ms ($n=60$) und eine $EZ_{Ca50\%}$ von 64 ± 1 ms ($n=59$), die Wildtyp-Kontroll-Zellen ein τ_{Ca} von 85 ± 2 ms ($n=43$) und eine $EZ_{Ca50\%}$ von 62 ± 1 ms ($n=57$). Bei 8 Hz glichen sich die Eliminationsgeschwindigkeiten weiter an. Die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen zeigten ein τ_{Ca} von 75 ± 3 ms ($n=37$) und eine $EZ_{Ca50\%}$ von 44 ± 1 ms gegenüber den Wildtyp-Kontroll-Zellen mit einem τ_{Ca} von 71 ± 3 ms ($n=31$) und einer $EZ_{Ca50\%}$ von 43 ± 0 ms ($n=43$).

Die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen zeigten für das τ der Kalziumtransienten keine signifikanten Unterschiede gegenüber Wildtyp-Kontrollzellen oder homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (1 Hz: τ_{Ca} 121 ± 4 ms ($n=62$), 2 Hz: τ_{Ca} 109 ± 3 ms ($n=59$), 4 Hz: τ_{Ca} 90 ± 2 ms ($n=60$), 8 Hz: τ_{Ca} 71 ± 2 ms ($n=39$)).

Für die 2-Wege-ANOVA-Testung der $EZ_{Ca50\%}$ (im Vergleich zur τ_{Ca} Messung ohne kompletten Baseline-Abfall) zeigten sich die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontroll-Zellen signifikant langsamer. In der Post-Hoc-Testung waren die Unterschiede bei 1 Hz und 2 Hz signifikant (1 Hz: $EZ_{Ca50\%}$ 96 ± 2 ms ($n=69$, $p<0,05$ HZ vs WT), 2 Hz: $EZ_{Ca50\%}$ 83 ± 2 ms ($n=69$, $p<0,05$ HZ vs WT), 4 Hz: $EZ_{Ca50\%}$ 64 ± 1 ms ($n=67$), 8 Hz: $EZ_{Ca50\%}$ 44 ± 1 ms ($n=44$)).

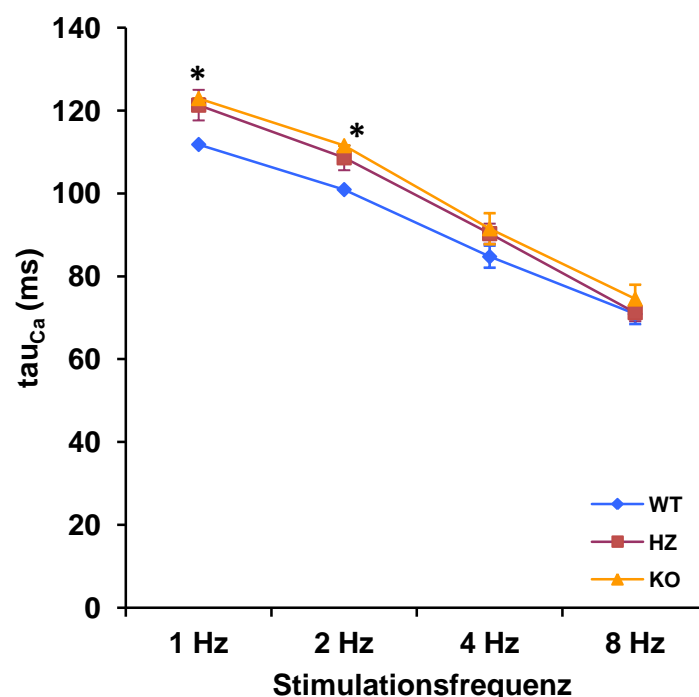


Abbildung 3.5: Frequenzabhängigkeit der Kalziumelimination (τ_{Ca}).

Es wurde jeweils der letzte Transient der jeweiligen Stimulationsfrequenz ausgewertet.

Die 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen zeigte eine signifikant langsamere Kalziumelimination in homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen. * bezeichnet signifikante Unterschiede im Post-Hoc-Test zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

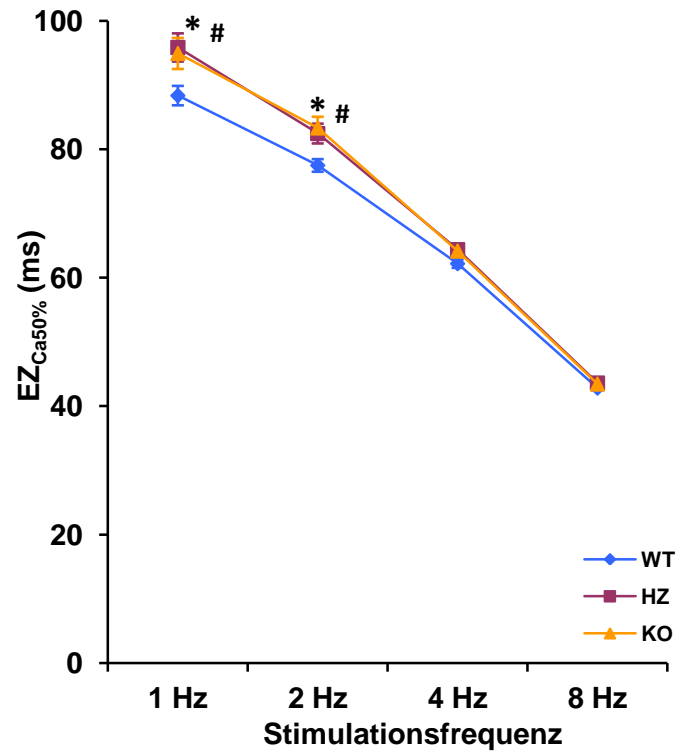


Abbildung 3.6: Frequenzabhängige Kalziumelimination ($EZ_{Ca50\%}$).

Signifikant höhere Werte (entsprechend langsamere Kalziumelimination) in homozygotem und heterozygotem CaMKII δ -Knockout im Vergleich zum Wildtyp (2-Wege-ANOVA-Testung). * signifikante Unterschiede im Post-Hoc-Test zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen, bzw. # signifikante Unterschiede zwischen heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

Eine Originalregistrierung der Kalziumtransienten-Verläufe in einer CaMKII δ -Knockout-Zelle (bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen) ist in Abb. 3.7 zu sehen. Dort wird deutlich, dass die FDAR auch ohne CaMKII δ intakt ist.

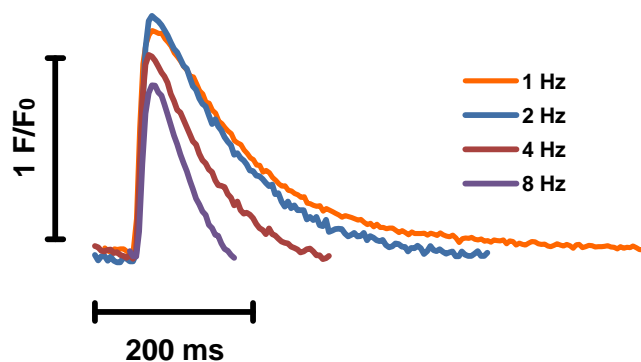


Abbildung 3.7: Originalregistrierung der Kalziumtransienten einer homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zelle bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen übereinander gelagert.

Schnellere Kalziumelimination mit zunehmender Stimulationsfrequenz zeigt eine intakte FDAR.

3.2.2.2 Sarkomer-Relaxations-Kinetik

Da die Relaxation der Myozytenkontraktion keine monoexponentielle Funktion darstellt, ist es nicht möglich den Parameter tau (τ) zu verwenden. Daher beschränkt sich die Auswertung der Relaxation auf die $RZ_{\text{Kontr.50\%}}$. Diese wurde, vergleichbar zur $EZ_{\text{Ca50\%}}$, gemittelt aus mehreren Transienten ohne kompletten Baseline-Abfall ermittelt.

In der 2-Wege-ANOVA-Testung für die $RZ_{\text{Kontr.50\%}}$ zeigten sich weder für die homozygoten noch für die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen signifikante Unterschiede gegenüber den Wildtyp-Kontroll-Zellen. Auch für die anschließende Post-Hoc-Testung der einzelnen Stimulationsfrequenzen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Trotzdem zeigte sich die in der Kalziumelimination deutlicher zu sehende Tendenz der Genotypen, sich bei schnelleren Stimulationsfrequenzen einander anzugleichen. Die einzelnen Werte der $RZ_{\text{Kontr.50\%}}$ sind Tab. 3.5 zu entnehmen. Des Weiteren zeigt Abb. 3.8, S. 51 die graphische Darstellung der Daten.

	WT	HZ	KO	Post-Hoc-Test		
				HZ vs. WT	KO vs. WT	KO vs. HZ
1 Hz	61±3 ms (n=57)	66±3 ms (n=69)	67±4 ms (n=60)	n.s.	n.s.	n.s.
2 Hz	55±3 ms (n=57)	61±3 ms (n=69)	60±4 ms (n=60)	n.s.	n.s.	n.s.
4 Hz	45±2 ms (n=57)	48±2 ms (n=69)	46±2 ms (n=59)	n.s.	n.s.	n.s.
8 Hz	31±1 ms (n=43)	32±1 ms (n=44)	32±2 ms (n=39)	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 3.5: $RZ_{\text{Kontr.50\%}}$

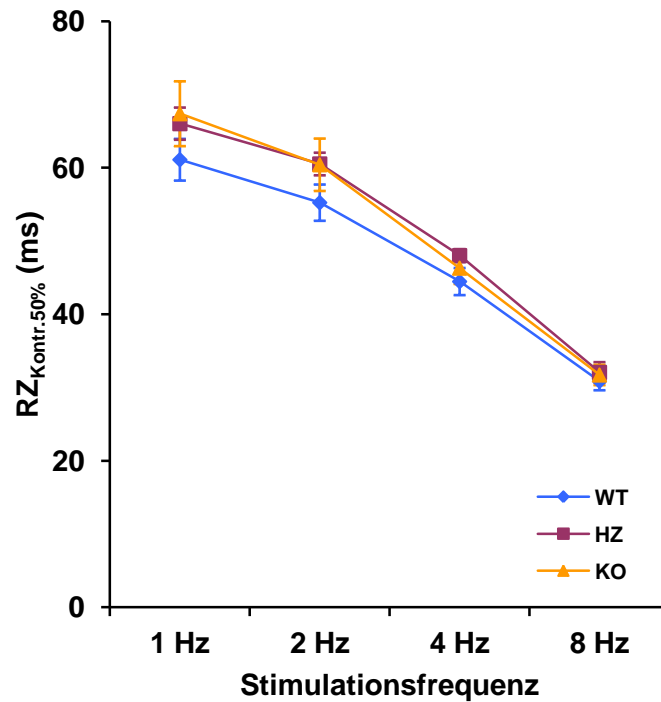


Abbildung 3.8: Frequenzabhängige Sarkomerrelaxation ($RZ_{\text{Kontr.50\%}}$).

Es zeigten sich weder in der 2-Wege-ANOVA-Testung noch in der Post-Hoc-Testung signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen.

3.2.2.3 NCX-Funktion

Die Abfall-Kinetik des Kalziumtransienten einer Zelle nach Koffeinstoß spiegelt die Funktion des Natrium-Kalzium-Austauschers wider. Diese konnte durch die monoexponentielle „Fit-Kurve“ (τ) des Koffein-induzierten Transienten abgeschätzt werden. Eine vergleichende Darstellung der drei Genotypen zeigt Abb. 3.9, S. 52. Hier offenbarte sich eine signifikant langsamere Kalziumelimination über den NCX in den homozygoten und heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontroll-Zellen: Bei den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen betrug das τ_{Ca} 889 ± 38 ms ($n=36$), bei den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen 969 ± 55 ms ($n=41$) und bei den Wildtyp-Kontroll-Zellen im Mittel 769 ± 35 ms ($n=33$),

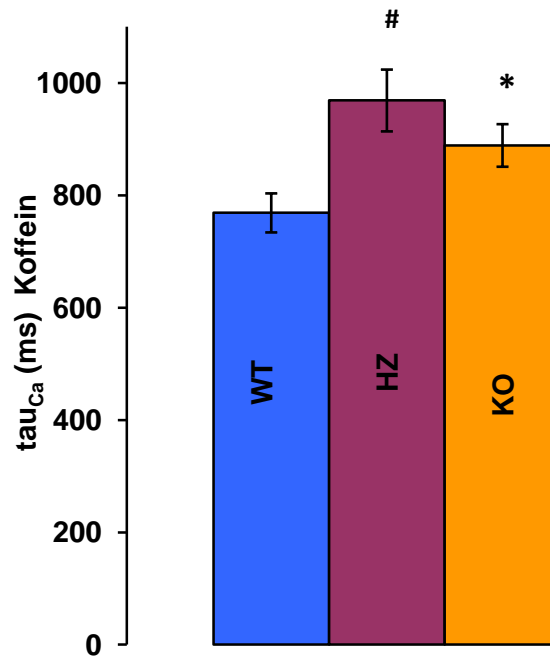


Abbildung 3.9: Koffein (τ_{Ca})

Die Funktion des NCX wird widergespiegelt in der Funktion tau der Kalziumelimination der Koffein-induzierten Kalziumtransienten. Es zeigte sich eine signifikant langsamere Relaxation von heterozygotem und homozygotem CaMKII δ -Knockout im Vergleich zum Wildtyp. * signifikante Unterschiede zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen. # signifikante Unterschiede zwischen heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

3.2.3 Post-Pausen-Potenzierung

Zur Untersuchung der Kalziumakkumulationsfähigkeit des SR wurde mittels unterschiedlich langer Stimulationspausen (10-Sekunden, 30-Sekunden und 60-Sekunden) die Post-Pausen-Potenzierung untersucht. Unabhängig von der Pausenlänge zeigte sich in allen drei Genotypen eine signifikante Zunahme der Kalziumtransienten und der Kontraktionsamplitude nach der Pause (siehe auch Abb. 3.12, S. 57).

In der homozygoten Knockout-Gruppe nahmen die Kalziumtransienten nach 10-Sekunden-Pause auf $115 \pm 2\%$ ($n=41$) der Amplitude unter 1 Hz Steady-State Kontraktion, in der heterozygoten Knockout-Gruppe auf $116 \pm 2\%$ ($n=50$) und in der Wildtyp-Gruppe auf $113 \pm 1\%$ ($n=57$) zu.

Während der 30-Sekunden-Pause kam es zu einer stärkeren Post-Pausen-Potenzierung als während der 10-Sekunden-Pause. Beim homozygoten CaMKII δ -Knockout nahm der Kalziumtransient nach der 30-Sekunden-Pause auf $125 \pm 3\%$ ($n=45$) im Vergleich zu Steady-State bei 1 Hz zu, beim heterozygoten CaMKII δ -Knockout auf $130 \pm 3\%$ ($n=44$) und beim Wildtyp auf $121 \pm 2\%$ ($n=50$). Somit war die prozentuale Steigerung der heterozygoten

CaMKII δ -Knockout-Zellen nach der 30-Sekunden-Stimulationspause signifikant höher als die der Wildtyp-Kontroll-Zellen.

Bei den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen erhöhten sich die Kalziumtransienten durch die 60-Sekunden-Pause auf $126\pm 4\%$ (n=12), bei den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen auf $133\pm 7\%$ (n=19) und bei den Wildtyp-Kontroll-Zellen ergab sich eine Steigerung auf $129\pm 3\%$ (n=28) im Vergleich zu Steady-State (vgl. Tab. 3.6 a-c, S. 53-54 und Abb. 3.10, S. 55 und Abb. 3.12, S. 57). Es zeigten sich damit für die 60-Sekunden-Pause keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

a) 10-Sekunden-Pause

		F/F₀ (vor der Pause)	F/F₀ (nach der Pause)	F/F₀ Erhöhung (%)
WT (n=57)		2,2 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	113,2 \pm 1
HZ (n=50)		2,4 \pm 0,1	2,7 \pm 0,1	116,1 \pm 2
KO (n=41)		2,4 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	115 \pm 2
<u>T-Test</u>	HZ vs. WT	n.s.	n.s.	n.s.
	KO vs. WT	n.s.	n.s.	n.s.
	KO vs. HZ	n.s.	n.s.	n.s.

b) 30-Sekunden-Pause

		F/F ₀ (vor der Pause)	F/F ₀ (nach der Pause)	F/F ₀ Erhöhung (%)
WT (n=50)		2,2±0,1	2,7±0,1	121,4±2,2
HZ (n=44)		2,3±0,1	3,0±0,1	129,9±2,9
KO (n=45)		2,3±0,1	2,9±0,1	124,8±2,9
T-Test	HZ vs. WT	n.s.	p<0,05	p<0,05
	KO vs. WT	n.s.	n.s.	n.s.
	KO vs. HZ	n.s.	n.s.	n.s.

c) 60-Sekunden-Pause

		F/F ₀ (vor der Pause)	F/F ₀ (nach der Pause)	F/F ₀ Erhöhung (%)
WT (n=28)		2,2±0,1	2,8±0,1	129,2±3,2
HZ (n=19)		2,3±0,1	3,1±0,2	133,1±7,3
KO (n=12)		2,3±0,1	2,9±0,2	125,6±4,3
T-Test	HZ vs. WT	n.s.	n.s.	n.s.
	KO vs. WT	n.s.	n.s.	n.s.
	KO vs. HZ	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 3.6: Post-Pausen-Experimente.

- a) 10-Sekunden-Pause
- b) 30-Sekunden-Pause
- c) 60-Sekunden-Pause

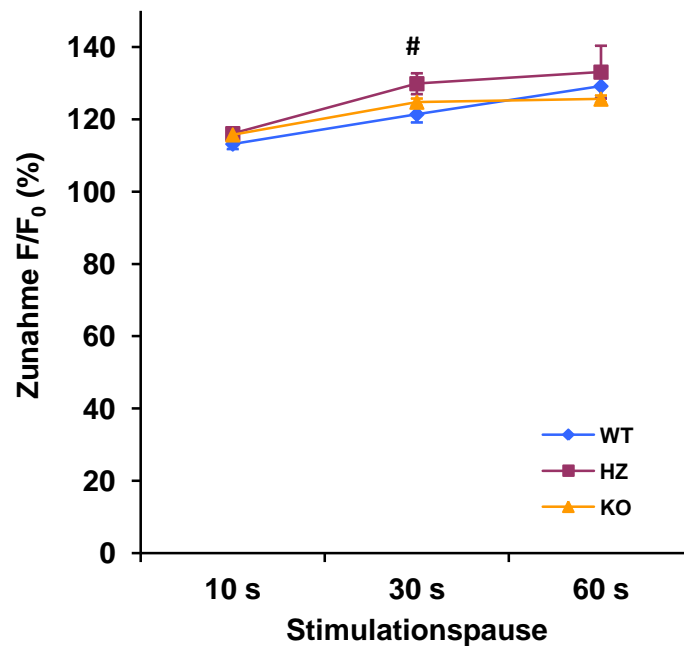


Abbildung 3.10: F/F₀ prozentual nach Stimulationspause.

Prozentuale Steigerung der Kalziumamplitude (F/F₀) nach 10-, 30- und 60-Sekunden-Stimulationspause.

signifikante Unterschiede zwischen heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

Auch die Kontraktion der Zellen verstärkte sich nach den jeweiligen Pausen. Durch die 10 Sekundenpause stieg die prozentuale Verkürzung bezogen auf die Ruhelänge in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=41) von $3,9\pm 0,3\%$ auf $7,4\pm 0,7\%$, bei den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=50) von $4,0\pm 0,3\%$ auf $7,0\pm 0,5\%$. Bei den Wildtyp-Kontroll-Zellen (n=57) stieg die prozentuale Verkürzung von $4,2\pm 0,2\%$ auf $6,4\pm 0,4\%$. Dies entspricht bei den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen einer prozentualen Erhöhung auf $196,2\pm 17,0\%$, bei den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen einer Steigerung auf $186,1\pm 14,3\%$ und bei den Wildtyp-Kontroll-Zellen auf $155,1\pm 5,9\%$. Sowohl in der heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Gruppe als auch in der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Gruppe war damit eine signifikant höhere Steigerung der Verkürzung im Vergleich zur Wildtyp-Kontroll-Gruppe zu verzeichnen.

Die Auswertung der 30-Sekunden-Pause ergab bei den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=43) eine Erhöhung der prozentualen Verkürzung von $3,9\pm 0,3\%$ (n=44) auf $8,1\pm 0,7\%$, dies entspricht einer Steigerung auf $228,8\pm 23,4\%$. Die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=44) stiegen von einer Verkürzung von $4,0\pm 0,3\%$ auf $9,2\pm 0,6\%$, dementsprechend steigerte sich die Kontraktion auf $258,0\pm 21,3\%$. Bei den Wildtyp-Kontroll-Zellen (n=49) konnte vor der Pause eine Verkürzung der Myozyten um $3,9\pm 0,2\%$ und nach der Pause um $7,8\pm 0,5\%$ gemessen werden, dies ergab eine Steigerung auf $208,3\pm 14,3\%$. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht.

Vor der 60-Sekunden-Pause kontrahierten die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=12) um $4,1\pm 0,4\%$ und nach der Pause um $7,1\pm 0,7\%$, die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=19) verkürzten sich vor der Pause um $4,3\pm 0,3\%$ und nach der Pause um $9,4\pm 1,0\%$. Die Wildtyp-Kontroll-Zellen (n=29) zeigten im Mittel eine Verkürzung um $3,7\pm 0,2\%$ und steigerten sich nach der Pause auf $8,2\pm 0,6\%$. Dementsprechend steigerte sich die homozygote CaMKII δ -Knockout-Gruppe auf $182,5\pm 18,5\%$, die heterozygote CaMKII δ -Knockout-Gruppe auf $251,6\pm 38,4\%$ und die Wildtyp-Gruppe auf $230,0\pm 20,3\%$. Bei der Kontraktionsverstärkung nach der 30- und 60-Sekunden-Pause zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Diese Zusammenhänge sind in Abb. 3.11, S. 56 und Abb. 3.12, S. 57 dargestellt.

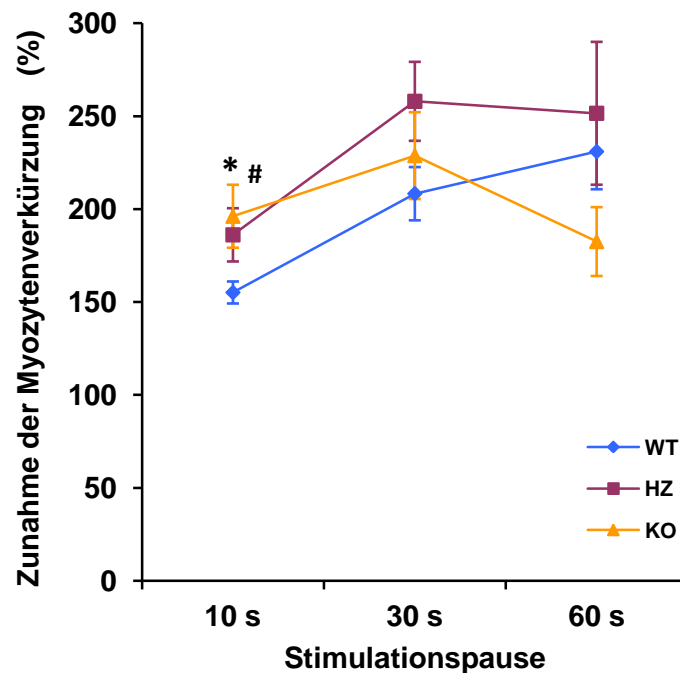


Abbildung 3.11: Myozytenverkürzung prozentual nach Stimulationspause.

Steigerung der Myozytenverkürzung nach 10-, 30- und 60-Sekunden Stimulationspause prozentual aufgetragen.

* signifikante Unterschiede zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen. #

signifikante Unterschiede zwischen heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

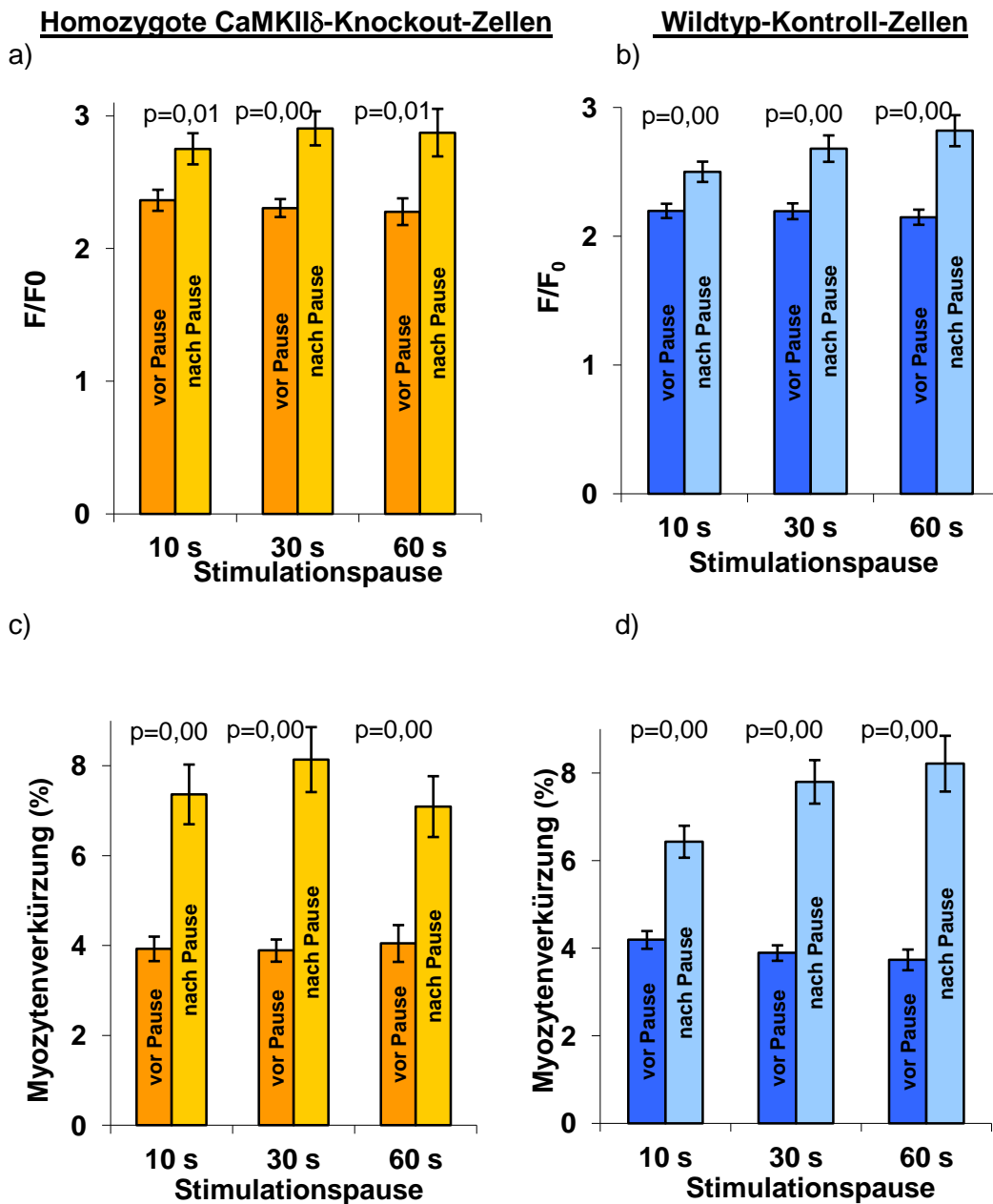


Abbildung 3.12: Post-Pausen-Beziehung.

a) und b) Kalziumamplitude von homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen, jeweils vor und nach 10-, 30- und 60-Sekunden Stimulationspause

c) und d) prozentuale Myozytenverkürzung von homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen, jeweils vor und nach 10-, 30- und 60-Sekunden Stimulationspause

Vergleicht man das F/F_0 bzw. die Myozytenverkürzung vor und nach den jeweiligen Pausen, so zeigen sich sowohl beim Wildtyp als auch beim Knockout signifikante Unterschiede in allen drei Pausenlängen.

3.2.4 SR-Kalziumgehalt

Für die Bestimmung des im SR gespeicherten Kalziums der einzelnen gemessenen Kardiomyozyten wurde durch Koffein eine komplette Ausschüttung des im SR gespeicherten Kalziums bewirkt. Abb. 3.13 zeigt jeweils einen repräsentativen Koffein-induzierten Kalziumtransienten für die homozygote CaMKII δ -Knockout- und die Wildtyp-Kontroll-Gruppe.

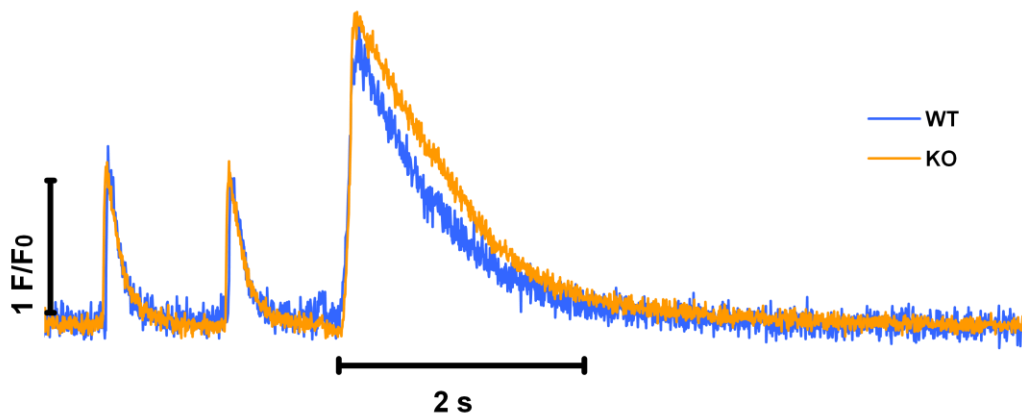


Abbildung 3.13: Koffein-induzierter Kalziumtransient

Originalabbildung je eines Koffein-induzierten Kalziumtransienten einer homozygoten CaMKII δ -Knockout- und einer Wildtyp-Kontroll-Zelle übereinander gelagert.

Hinsichtlich des SR-Kalziumgehaltes zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Lediglich tendenziell lässt sich bei den CaMKII δ -Knockout-Zellen ein etwas höherer SR-Kalziumgehalt feststellen. Das F/F_0 der Koffein-induzierten Kalziumtransienten der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen lag im Mittel bei $3,6 \pm 0,1$ ($n=40$), bei den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen betrug das F/F_0 $3,6 \pm 0,2$ ($n=42$) und bei den Wildtyp-Kontroll-Zellen $3,4 \pm 0,1$ ($n=35$). Dieses Ergebnis ist in Abb. 3.14, S. 59 dargestellt.

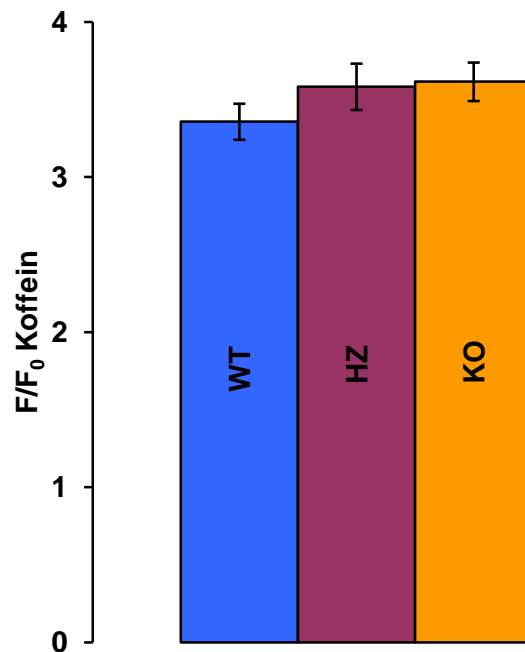


Abbildung 3.14: Koffein F/F₀

Gesamtmenge des im SR gespeicherten Kalziums ausgedrückt als F/F₀ der Koffein-induzierten Kalziumtransienten.

3.2.5 Diastolisches SR-Kalziumleck/ Kalziumsparks

Um zu untersuchen, ob in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten das SR-Kalziumleck via RyR2 verändert ist, wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente bezüglich der Kalziumspark-Frequenz und Spark-Kinetik am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt. Es wurden homozygote CaMKII δ -Knockout-Zellen gegen Wildtyp-Kontroll-Zellen getestet. 55 von 319 untersuchten homozygoten Zellen zeigten Kalziumsparks, das sind 17% der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten. Im Vergleich dazu sparkten bei der Wildtyp-Kontroll-Gruppe 28% aller gemessenen Wildtypzellen, nämlich 148 von 524 untersuchten Zellen. Somit zeigten in der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Gruppe signifikant weniger Zellen Kalziumsparks als in der Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$ Fisher-Test).

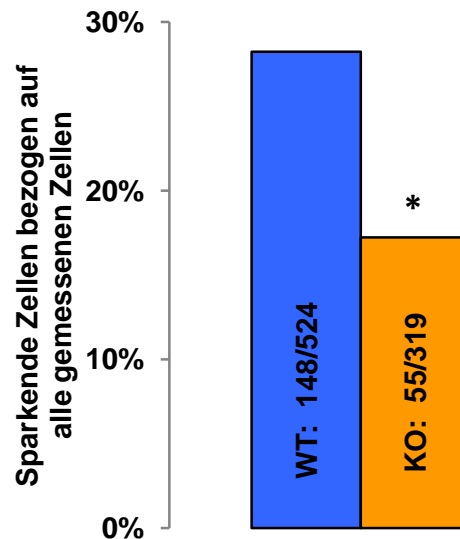


Abbildung 3.15: Anteil sparkender Zellen (in %) bezogen auf alle gemessenen Zellen.

* signifikante Unterschiede im Fisher-Test ($p < 0,05$) zwischen CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

Bezogen auf alle sparkenden Zellen war die Spark-Frequenz in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen ($n=55$) mit $1,5 \pm 0,1$ Sparks pro $100 \mu\text{m/s}$ geringer als in den Wildtyp-Kontroll-Zellen ($n=148$) mit einer Spark-Frequenz von $1,7 \pm 0,1$ Sparks pro $100 \mu\text{m/s}$. Es ergab sich jedoch keine Signifikanz. Abb. 3.16 zeigt die Spark-Frequenz der beiden Gruppen gegeneinander aufgetragen.

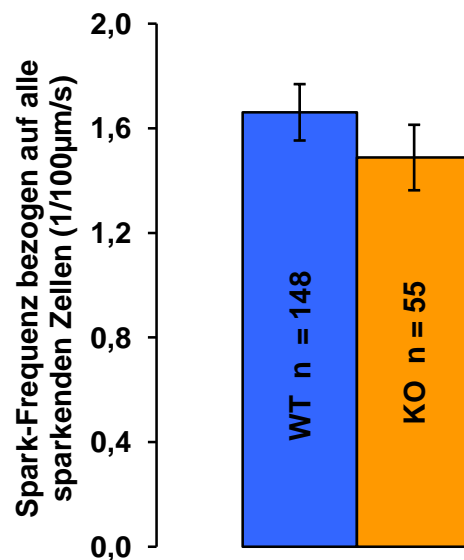


Abbildung 3.16: Spark-Frequenz

Spark-Frequenz der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und der Wildtyp-Kontroll-Zellen, bezogen auf alle sparkenden Zellen, als Maß für das SR-Kalziumleck. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die mittlere Amplitude der spontanen SR-Kalzium-Freisetzungseignisse wird in Abb. 3.17, S. 61 in Form des F/F_0 dargestellt. Die homozygote CaMKII δ -Knockout-Gruppe

zeigte ein F/F_0 von $1,51 \pm 0,02$ ($n=98$), welches im Vergleich zur Wildtyp-Kontroll-Gruppe mit einem F/F_0 von $1,52 \pm 0,02$ ($n=128$) unverändert war.

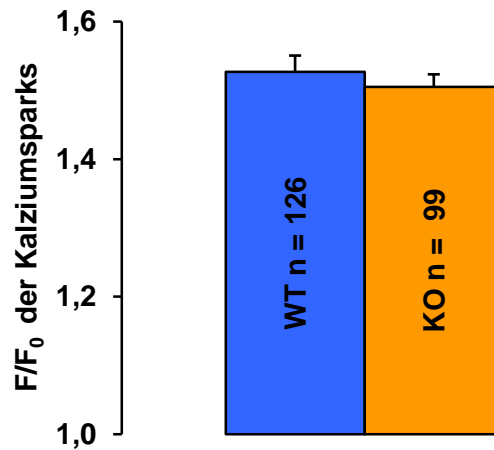


Abbildung 3.17: F/F_0 der Kalziumsparks

F/F_0 der Kalziumsparks in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und den Wildtyp-Kontroll-Zellen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede

Die Zeit bis zum 50%igem Kalziumabfall der einzelnen Sparks war in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten ($n=96$) mit einer $EZ_{CaSp.50\%}$ von 23 ± 1 ms im Vergleich zur Wildtyp-Kontroll-Gruppe ($n=126$) mit einer $EZ_{CaSp.50\%}$ von 22 ± 1 ms nicht signifikant verändert.

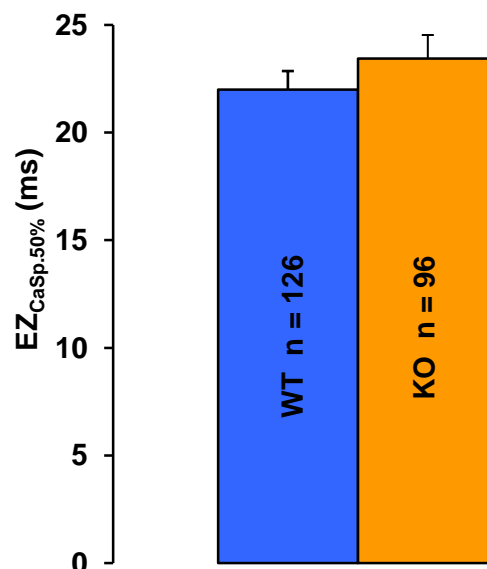


Abbildung 3.18: $EZ_{CaSp.50\%}$

Die $EZ_{CaSp.50\%}$ der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen war leicht jedoch nicht signifikant länger als in der Wildtyp-Kontroll-Gruppe.

Das SR-Kalziumleck wurde als Produkt aus Amplitude (F/F_0), $EZ_{CaSp.50\%}$ (ms) und Spark-Frequenz ($1/100\mu\text{m/s}$) errechnet, entsprechend ist die Einheit des SR-Kalziumlecks $F/F_0 \cdot \text{s} \cdot 1/(\text{s} \cdot \text{m}) = F/F_0/\text{m}$.

Berechnet man das SR-Kalziumleck lediglich aus den Zellen, welche Sparkaktivität aufwiesen, so ergeben sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($532 \pm 27 F/F_0/\text{m}$ in der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Gruppe im Vergleich $555 \pm 23 F/F_0/\text{m}$ in der Wildtyp-Kontroll-Gruppe).

Berechnet man jedoch das „totale“ SR-Kalziumleck bezogen auf alle gemessenen Kardiomyozyten (d.h. inklusive derer ohne detektierte Spark-Aktivität), so ist dieses in der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Gruppe mit $92 \pm 5 F/F_0/\text{m}$ signifikant geringer als das der Wildtyp-Kontroll-Gruppe mit $157 \pm 7 F/F_0/\text{m}$.

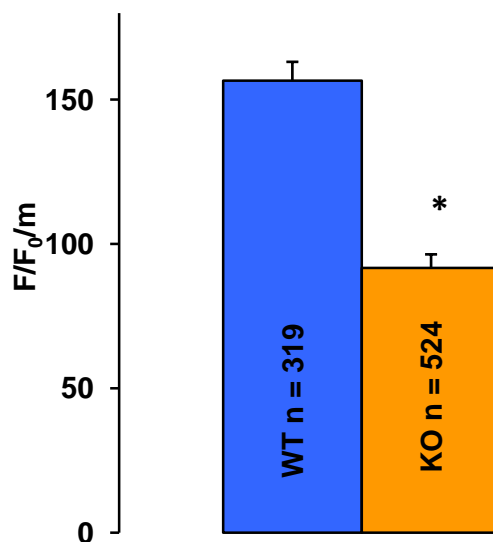


Abbildung 3.19: „totales“ SR-Kalziumleck

Berechnet als Produkt aus Amplitude, $EZ_{CaSp.50\%}$ und Spark-Frequenz bezogen auf *alle* gemessenen Kardiomyozyten. * signifikante Unterschiede zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

3.2.6 Freies diastolisches Kalzium und diastolische Sarkomerlänge

In den Experimenten für die vorliegende Arbeit wurde mittels des ratiometrischen Farbstoffes Fura-2-AM das freie diastolische Kalzium der Kardiomyozyten am Epifluoreszenzmikroskop untersucht.

Das Ergebnis wird als Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen angegeben, der „Ratio“ (vgl. 2.2.2, S. 21 und 2.3.3, S. 24). Die Zellen wurden unter den Stimulationsfrequenzen 1 Hz und 4 Hz untersucht.

Über die beiden untersuchten Stimulationsfrequenzen hinweg zeigten sich nach 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen signifikante Unterschiede zwischen homozygoten CaMKII δ -Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen. In der Post-Hoc-Testung zeigte

sich dementsprechend auch, dass bei den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=29) das diastolische Kalzium mit einer Ratio von $0,82\pm 0,03$ bei 1 Hz signifikant höher lag als bei den Wildtyp-Kontroll-Zellen mit einer Ratio von $0,73\pm 0,03$ (n=23). Die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen zeigten mit einer Fura-2-Ratio von $0,74\pm 0,04$ (n=9) keine signifikanten Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen. Bei 4 Hz stieg das diastolische Kalzium in allen drei Genotypen an. Die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen lagen auch bei 4 Hz mit einer Ratio von $0,96\pm 0,03$ (n=29) signifikant über dem Niveau der Wildtyp-Kontroll-Zellen mit einer Ratio von $0,83\pm 0,03$ (n=23). Die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen lagen mit einer mit einer Ratio von $0,87\pm 0,04$ (n=9) zwischen homozygotem CaMKII δ -Knockout und Wildtyp. Signifikante Unterschiede ergaben sich für die heterozygoten Zellen erneut nicht.

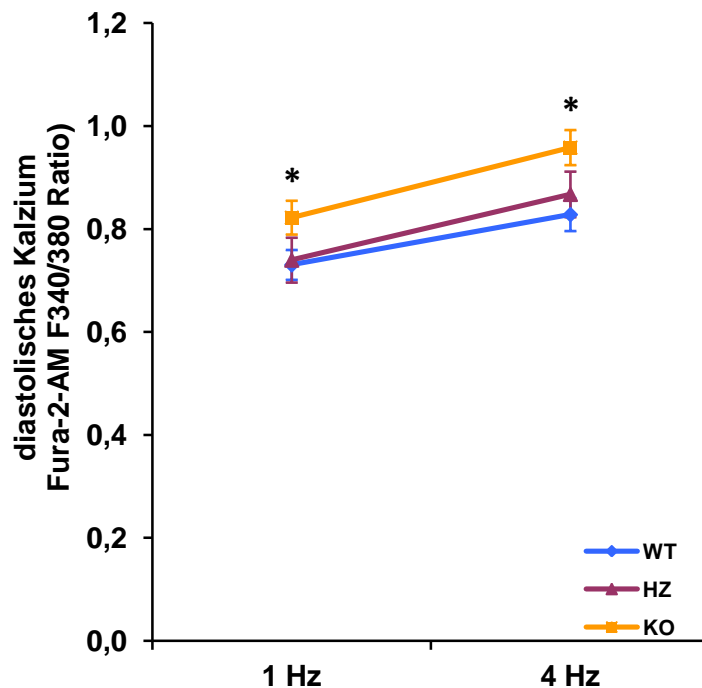


Abbildung 3.20: Freies diastolisches Kalzium.

Die 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen zeigte signifikante Unterschiede zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen. Im Post-Hoc-Test zeigten sich ebenfalls sowohl unter 1 Hz- als auch unter 4 Hz-Stimulation signifikante Unterschiede zwischen den oben genannten Gruppen. * bezeichnet signifikante Unterschiede im Post-Hoc-Test zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

Die diastolische Sarkomerlänge (SL) zeigte sich sowohl in den homozygoten als auch heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen in der 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen kürzer als in den Wildtyp-Kontroll-Zellen. In der anschließenden Post-Hoc-Testung bestätigten sich diese Signifikanzen. Bei 1 Hz betrug die diastolische SL in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen $1,76\pm 0,01$ μm (n=60) und in den heterozygoten

CaMKII δ -Knockout-Zellen $1,76\pm 0,01\ \mu\text{m}$ ($n=69$). Dies war signifikant kürzer als in den Wildtyp-Kontroll-Zellen mit einer diastolischen SL von $1,78\pm 0,00\ \mu\text{m}$ ($n=57$).

Bei 2 Hz-Stimulation war die diastolische SL in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen mit $1,76\pm 0,01\ \mu\text{m}$ ($n=60$) und in den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen $1,76\pm 0,01\ \mu\text{m}$ ($n=69$) signifikant kürzer als in den Wildtyp-Kontroll-Zellen mit einer diastolischen SL von $1,77\pm 0,00\ \mu\text{m}$ ($n=57$).

Auch unter 4 Hz-Stimulation blieb die diastolische SL in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen mit $1,75\pm 0,01\ \mu\text{m}$ ($n=59$) und den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen mit $1,74\pm 0,01\ \mu\text{m}$ ($n=67$) jeweils signifikant kürzer als in den Wildtyp-Kontroll-Zellen mit einer diastolischen SL von $1,77\pm 0,00\ \mu\text{m}$ ($n=57$) (Siehe hierzu auch Abb. 3.21).

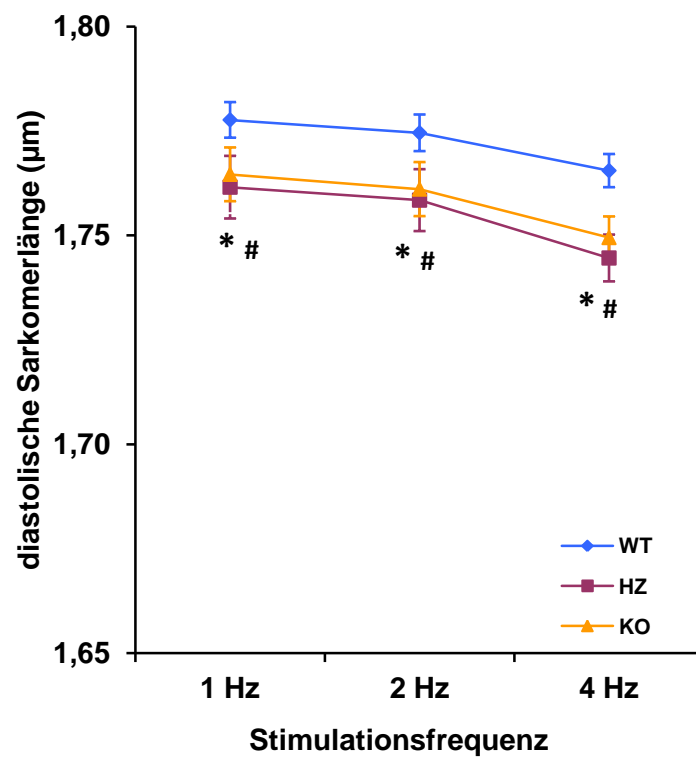


Abbildung 3.21 diastolische Sarkomerlänge (μm)

Die 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen zeigte signifikante Unterschiede sowohl der homozygoten als auch der heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen gegenüber den Wildtyp-Kontroll-Zellen. Im Post-Hoc-Test bestätigten sich diese Signifikanzen. * bezeichnet signifikante Unterschiede im Post-Hoc-Test zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen. # bezeichnet signifikante Unterschiede im Post-Hoc-Test zwischen heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

3.3 Adrenerge Stimulation

Um das Ansprechen der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten auf adrenerge Stimulation zu untersuchen, wurden Einwasch-Experimente mit Isoproterenol in einer Konzentration von 4 nM durchgeführt. Anschließend wurden Zellen mit den Frequenzen 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz und 8 Hz stimuliert.

3.3.1 Einwasch-Versuche mit 4 nM Isoproterenollösung

Das Einwaschen der Isoproterenollösung führte in allen drei Genotypen zu einem ausgeprägten inotropen Effekt. Sowohl die Kalziumtransienten als auch die Kontraktilität nahmen signifikant zu.

Die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=17) steigerten in den Einwasch-Versuchen die Amplitude ihrer Kalziumtransienten von einem F/F_0 von $2,1 \pm 0,1$ auf $3,7 \pm 0,2$ und ihre Zellverkürzung von $3,5 \pm 0,4\%$ auf $8,2 \pm 0,5\%$. Die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=10) zeigten vor der Isoproterenolstimulation ein F/F_0 von $1,9 \pm 0,1$, welches unter Isoproterenol auf $3,4 \pm 0,2$ anstieg. Die prozentuale Verkürzung stieg von $3,4 \pm 0,3\%$ auf $8,0 \pm 0,7\%$. Die Wildtyp-Kontroll-Zellen (n=11) starteten mit einem F/F_0 von $2,0 \pm 0,1$ und einer prozentualen Verkürzung von $4,0 \pm 0,4\%$ und stiegen durch adrenerge Stimulation auf ein F/F_0 von $3,8 \pm 0,2$ und eine Kontraktilität von $9,2 \pm 0,6\%$ an.

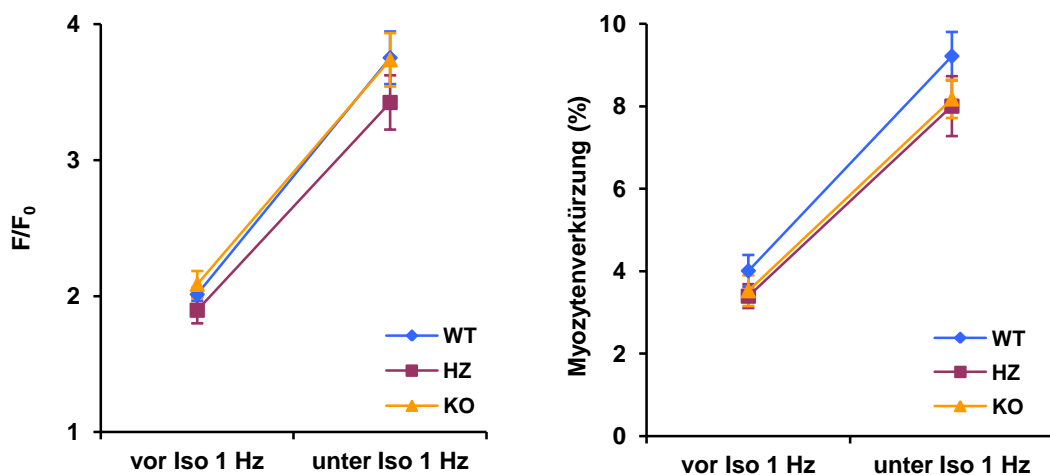


Abbildung 3.22: Einwaschen von 4 nM Isoproterenollösung F/F_0 und Kontraktion.

a) Kalziumtransienten

b) prozentuale Verkürzung

Jeweils vor und während adrenerger Stimulation mit 4 nM Isoproterenol.

Es zeigte sich starker inotroper Effekt durch Isoproterenol in allen drei Gruppen.

Die Kalziumelimination der Zellen sowie die Relaxation wurde anhand der $EZ_{Ca50\%}$ und $RZ_{Kontr.50\%}$ untersucht. In Abb. 3.23 ist zu sehen, dass 4 nM Isoproterenol in allen drei Gruppen einen starken lusitropen Effekt auslöste. Die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=17) wiesen vor dem Einwaschen von Isoproterenol eine $EZ_{Ca50\%}$ von 90 ± 3 ms und eine $RZ_{Kontr.50\%}$ von 76 ± 6 ms auf. Nach der adrenergen Stimulation verkürzte sich die $EZ_{Ca50\%}$ auf 65 ± 1 ms (n=46) und die $RZ_{Kontr.50\%}$ auf 30 ± 1 ms (n=46). Die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=10) zeigten vor dem Einwaschen von Isoproterenol eine $EZ_{Ca50\%}$ von 81 ± 5 ms und eine $RZ_{Kontr.50\%}$ von 71 ± 12 ms. Nach der adrenergen Stimulation verkürzte sich die $EZ_{Ca50\%}$ auf 65 ± 2 ms (n=29) und die $RZ_{Kontr.50\%}$ auf 28 ± 1 ms (n=29). Die Wildtyp-Kontroll-Zellen relaxierten unter Normalbedingungen (n=11) mit einer $EZ_{Ca50\%}$ von 80 ± 3 ms und einer $RZ_{Kontr.50\%}$ 67 ± 8 ms und unter Isoproterenol (n=36) mit einer $EZ_{Ca50\%}$ von 56 ± 1 ms und einer $RZ_{Kontr.50\%}$ von 23 ± 1 ms. Die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen eliminierten ihr Kalzium bereits vor der adrenergen Stimulation schon signifikant langsamer als die Wildtyp-Kontroll-Zellen. Auch unter Isoproterenol blieb diese Diskrepanz zu den Wildtyp-Kontroll-Zellen signifikant bestehen. Die $EZ_{Ca50\%}$ der heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen lag vor dem Einwaschen des Isoproterenols etwa auf Wildtyp-Niveau, zeigte sich unter Isoproterenol jedoch signifikant langsamer als in den Wildtyp-Kontroll-Zellen und in etwa auf dem Niveau der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen.

Für die $RZ_{Kontr.50\%}$ unter Isoproterenol ergab sich sowohl eine signifikant langsamere Relaxation der homozygoten als auch der heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontroll-Zellen.

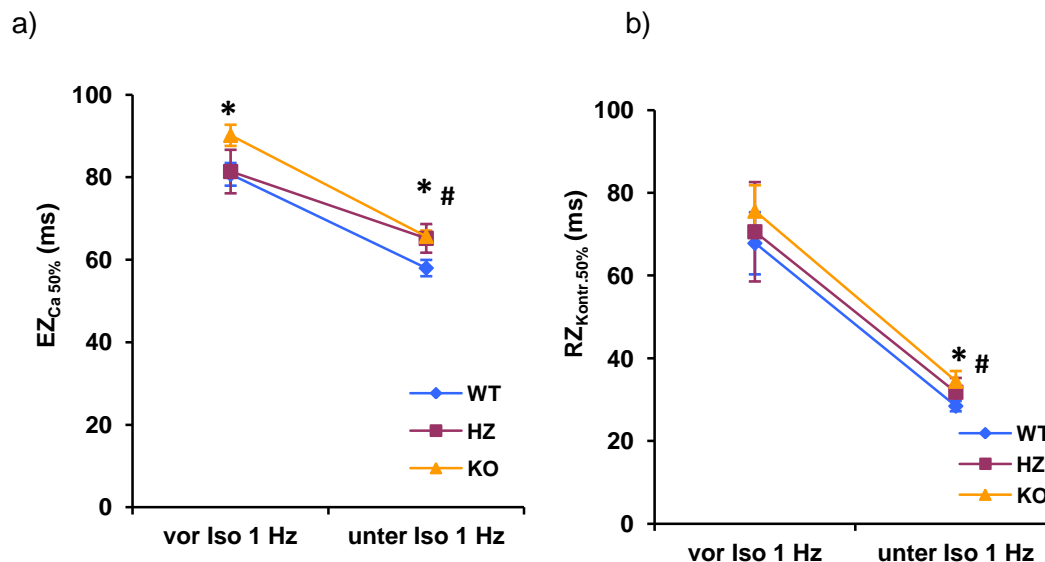


Abbildung 3.23: Einwaschen von 4 nM Isoproterenollösung $EZ_{Ca50\%}$ und $RZ_{Kontr.50\%}$

a) $EZ_{Ca50\%}$

b) $RZ_{Kontr.50\%}$

Jeweils vor und unter adrenerger Stimulation mit 4 nM Isoproterenol. Es ist ein starker lusitroper Effekt in allen drei Gruppen zu sehen. * signifikante Unterschiede zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen. # signifikante Unterschiede zwischen heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

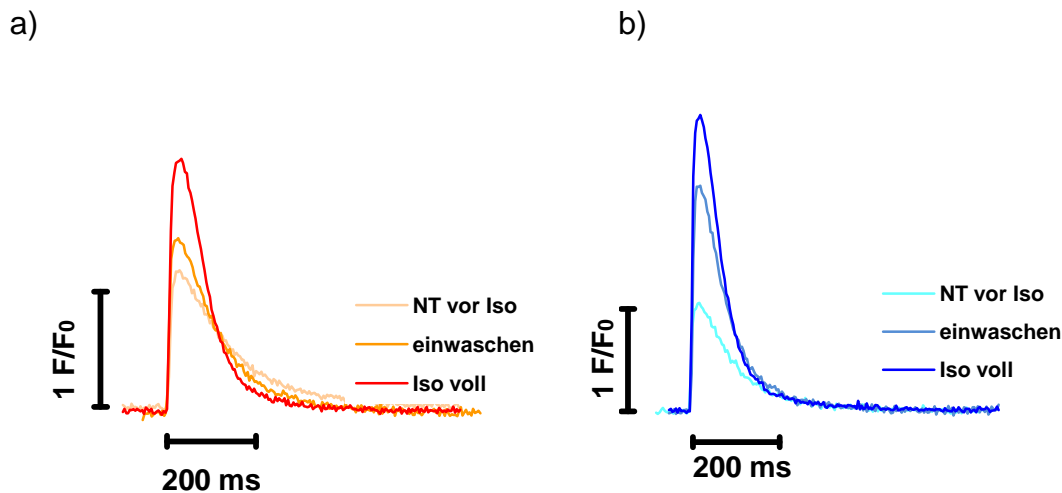


Abbildung 3.24: Originalregistrierung unter Isoproterenol

a) CaMKII δ -Knockout

b) Wildtyp

Jeweils bei 1 Hz vor Isoproterenol, während des Einwaschens und unter voller Isoproterenolwirkung übereinander gelagert.

3.3.2 Kraft-Frequenz-Beziehung unter 4 nM Isoproterenollösung

Die Stimulation der Kardiomyozyten mit Frequenzen von 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz und 8 Hz unter 4 nM Isoproterenol brachte in der 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Kalziumamplitude und Myozytenverkürzung. In Abb. 3.25 a und b, S.68 ist zu sehen, dass sich die verschiedenen Gruppen im Verlauf der Stimulationswechsel relativ ähnlich verhielten. Auch in der Post-Hoc-Testung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Stimulationsfrequenzen. Die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen hatten unter einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz (n=46) ein F/F_0 von $3,7 \pm 0,2$ und eine Myozytenverkürzung von $8,2 \pm 0,5\%$, unter 2 Hz (n=46) betrug das F/F_0 $3,6 \pm 0,2$ und die Myozytenverkürzung $8,7 \pm 0,5\%$, unter 4 Hz-Stimulation (n=46), betrug das F/F_0 $3,4 \pm 0,1$ und die Myozytenverkürzung $10,5 \pm 0,6\%$ und unter einer Stimulationsfrequenz von 8 Hz zeigten die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=41) schließlich ein F/F_0 von $2,7 \pm 0,1$ und eine Myozytenverkürzung von $10,5 \pm 0,5\%$.

Die heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen zeigten unter 1 Hz-Stimulation (n=29) ein F/F_0 von $3,4 \pm 0,2$ und eine Myozytenverkürzung von $8,0 \pm 0,7\%$. Unter 2 Hz-Stimulation (n=26) betrug das F/F_0 $3,3 \pm 0,2$ und die Myozytenverkürzung $8,2 \pm 0,8\%$. Unter 4 Hz-Stimulation (n=26) zeigte sich ein F/F_0 von $3,2 \pm 0,2$ und eine Myozytenverkürzung von $9,8 \pm 0,9\%$. Unter 8 Hz-Stimulation (n=23) zeigte sich schließlich bei den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen ein F/F_0 von $2,6 \pm 0,1$ und eine Myozytenverkürzung von $9,8 \pm 0,8\%$.

Das F/F_0 der Wildtyp-Kontroll-Zellen verhielt sich relativ parallel zum F/F_0 der homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen. Unter 1 Hz (n=36) betrug das F/F_0 der Wildtyp-Kontroll-Zellen $3,7\pm 0,2$, die Myozytenverkürzung lag bei $9,2\pm 0,6\%$. Unter 2 Hz-Stimulation (n=36) lag die Kalziumamplitude bei einem F/F_0 von $3,6\pm 0,2$ und die Myozytenverkürzung bei $9,4\pm 0,6\%$. Unter einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz (n=36) betrug das F/F_0 $3,4\pm 0,2$ und die Myozytenverkürzung lag bei $11,1\pm 0,6\%$. Unter 8 Hz zeigten die Wildtyp-Kontroll-Zellen ein F/F_0 von $2,9\pm 0,1$, die Myozytenverkürzung lag bei $11,4\pm 0,5\%$.

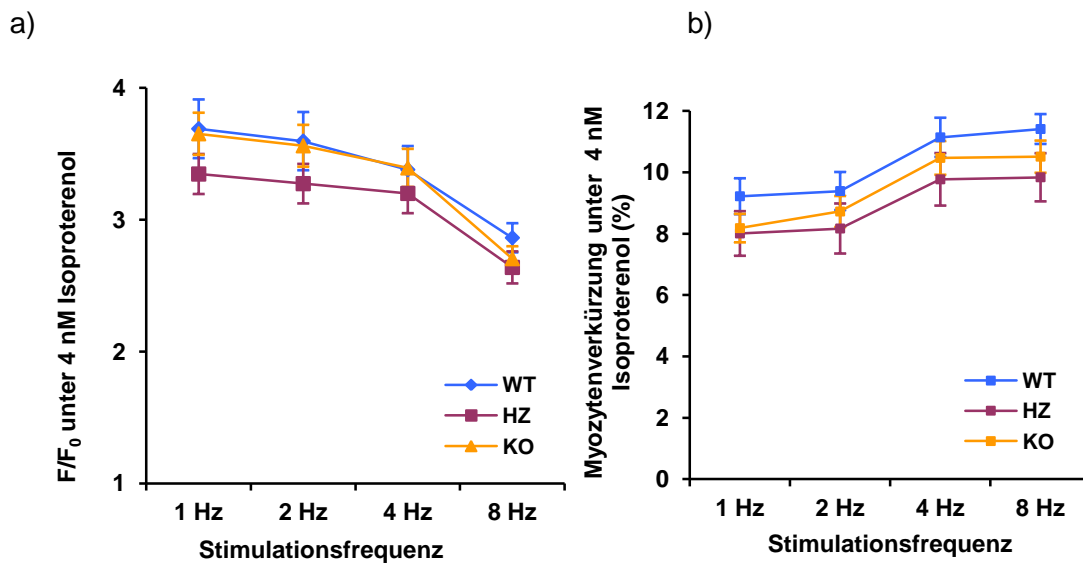


Abbildung 3.25: Frequenzabhängigkeit der Kalziumamplitude bzw. Myozytenverkürzung unter 4 nM Isoproterenol.

a) F/F_0

b) Myozytenverkürzung (%)

Jeweils unter 4 nM Isoproterenol und steigenden Stimulationsfrequenzen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Auch unter der adrenergen Stimulation eliminierten sowohl die heterozygoten als auch die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen nach 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen ihr freies zytosolisches Kalzium signifikant langsamer als die Wildtyp-Kontroll-Zellen und relaxierten ebenso signifikant langsamer. Mit steigenden Stimulationsfrequenzen nähern sie sich immer mehr dem Wildtyp-Niveau an, wobei die Unterschiede der $EZ_{Ca50\%}$ sowohl für heterozygot als auch für homozygot CaMKII δ -Knockout gegenüber dem Wildtyp nach Post-Hoc-Testung bis zu einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz signifikant blieben. Die Post-Hoc-Testung der $RZ_{Kontr.50\%}$ ergab für den homozygoten CaMKII δ -Knockout gegenüber dem Wildtyp signifikante Unterschiede in allen gemessenen Stimulationsfrequenzen, für den heterozygoten CaMKII δ -Knockout gegenüber dem Wildtyp ergaben sich signifikante Unterschiede für die 1 Hz- und 2 Hz-Stimulation. Die Tab. 3.7 S. 69 und Tab. 3.8, S. 69 zeigen übersichtlich die genauen Werte der $EZ_{Ca50\%}$ sowie der $RZ_{Kontr.50\%}$ unter 4 nM

Isoproterenol, weiterhin sind die Zusammenhänge in Abb. 3.26 a und b, S. 70 graphisch dargestellt.

	WT	HZ	KO	Post-Hoc-Test		
				HZ vs. WT	KO vs. WT	KO vs. HZ
1 Hz	56±1 ms (n=36)	65±2 ms (n=29)	65±1 ms (n=46)	p<0,05	p<0,05	n.s.
2 Hz	52±1 ms (n=36)	59±2 ms (n=26)	59±1 ms (n=46)	p<0,05	p<0,05	n.s.
4 Hz	45±1 ms (n=36)	49±1 ms (n=26)	50±1 ms (n=46)	p<0,05	p<0,05	n.s.
8 Hz	38±1 ms (n=35)	39±1 ms (n=23)	39±1 ms (n=41)	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 3.7: $EZ_{Ca50\%}$ unter 4 nM Isoproterenol.

	WT	HZ	KO	Post-Hoc-Test		
				HZ vs. WT	KO vs. WT	KO vs. HZ
1 Hz	24±1 ms (n=36)	29±1 ms (n=29)	30±1 ms (n=46)	p<0,05	p<0,05	n.s.
2 Hz	22±1 ms (n=36)	26±1 ms (n=26)	27±1 ms (n=46)	p<0,05	p<0,05	n.s.
4 Hz	20±1 ms (n=36)	22±1 ms (n=26)	23±1 ms (n=46)	n.s.	p<0,05	n.s.
8 Hz	18±1 ms (n=34)	19±1 ms (n=23)	20±1 ms (n=41)	n.s.	p<0,05	n.s.

Tabelle 3.8: $RZ_{Kontr.50\%}$ unter 4 nM Isoproterenol.

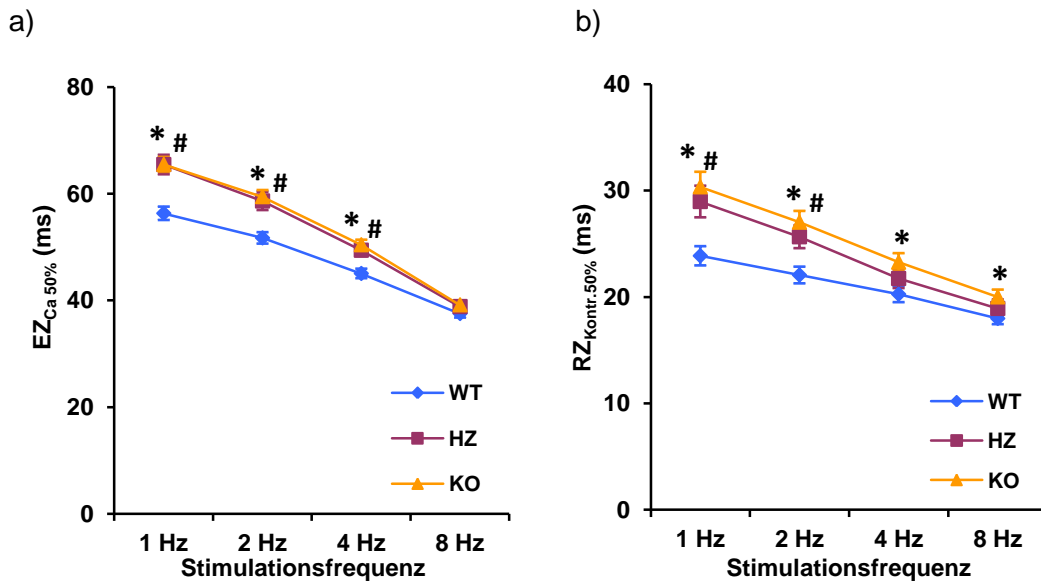


Abbildung 3.26: EZ_{Ca50%} und RZ_{Kontr.50%} unter 4 nM Isoproterenol.

a) EZ_{Ca50%}

b) RZ_{Kontr.50%}

Jeweils unter 4 nM Isoproterenol. Die 2-Wege-ANOVA-Testung für wiederholte Messungen zeigte jeweils signifikante Unterschiede sowohl der homozygoten als auch der heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen gegenüber den Wildtyp-Kontroll-Zellen. * bezeichnet signifikante Unterschiede im Post-Hoc-Test zwischen homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen. # bezeichnet signifikante Unterschiede im Post-Hoc-Test zwischen heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen.

3.4 Kalziumelimination unter Calyculin-A

Da Ergebnisse von Huke und Bers (2007) ergeben haben, dass die CaMKII-Autophosphorylierung durch Phosphatasen (insbesondere der Protein-Phosphatase-1) abgebaut wird, wurden in der vorliegenden Arbeit einige Experimente mit dem spezifischen Protein-Phosphatase-1- und 2a-Inhibitor Calyculin-A durchgeführt, um die CaMKII-Dephosphorylierung zu unterdrücken und so durch verstärkte CaMKII-Aktivierung mögliche Unterschiede zwischen den Genotypen besser herausarbeiten zu können. Es wurden dabei nur homozygote CaMKII δ -Knockout-Zellen mit Wildtyp-Kontroll-Zellen verglichen. Die Zellen wurden gemäß Calyculin-A-Protokoll (vgl. 2.4.4, S. 28-29) vorbereitet, dann bei 2 Hz für 5 Minuten stimuliert und anschließend einer Kraft-Frequenz-Untersuchung unterzogen.

Während der fünfminütigen Stimulation wurde jede Minute einmal 10 Kontraktionen aufgezeichnet und ausgewertet.

Insgesamt konnte eine signifikante Beschleunigung der Kalziumelimination durch Calyculin-A-Behandlung sowohl in den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen als auch in den Wildtyp-Kontroll-Zellen festgestellt werden.

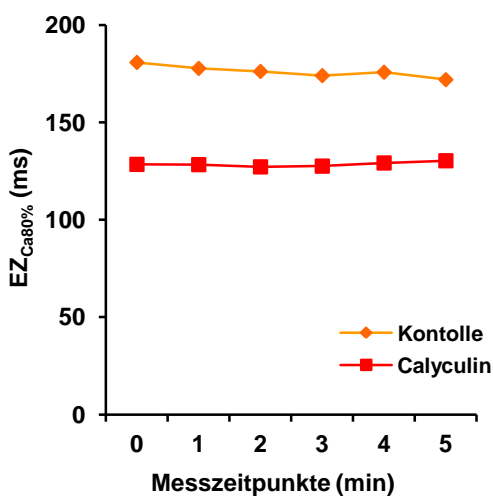
Die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (n=21) relaxierten jedoch auch unter Calyculin-A insgesamt langsamer als die Wildtyp-Kontroll-Zellen (n=17), jedoch ohne dass sich eine Verstärkung dieses Effektes im Vergleich zu den Messungen unter Normaltyrode zeigte.

Diese Unterschiede, welche anhand der $EZ_{Ca80\%}$ ausgewertet wurden, waren jedoch nicht signifikant.

	KO (Calyculin-A) (n=21)	KO (Kontrolle) (n=21)	T-Test Calyculin- A vs. Kontrolle	WT (Calyculin-A) (n=17)	WT (Kontrolle) (n=19)	T-Test Calyculin- A vs. Kontrolle
$EZ_{Ca80\%}$ Zeitpunkt: 0	128±5 ms	181±6 ms	p<0,05	122±2 ms	177±6 ms	p<0,05
$EZ_{Ca80\%}$ Zeitpunkt: 1	128±4 ms	178±5 ms	p<0,05	120±2 ms	176±5 ms	p<0,05
$EZ_{Ca80\%}$ Zeitpunkt: 2	127±4 ms	176±5 ms	p<0,05	120±2 ms	180±7 ms	p<0,05
$EZ_{Ca80\%}$ Zeitpunkt: 3	128±5 ms	174±6 ms	p<0,05	121±2 ms	175±5 ms	p<0,05
$EZ_{Ca80\%}$ Zeitpunkt: 4	129±5 ms	176±5 ms	p<0,05	122±2 ms	181±5 ms	p<0,05
$EZ_{Ca80\%}$ Zeitpunkt: 5	128±5 ms	181±4 ms	p<0,05	124±2 ms	180±5 ms	p<0,05

Tabelle 3.9: $EZ_{Ca80\%}$ mit und ohne Calyculin-A

Homozygote CaMKIIδ-Knockout-Zellen



Wildtyp-Kontroll-Zellen

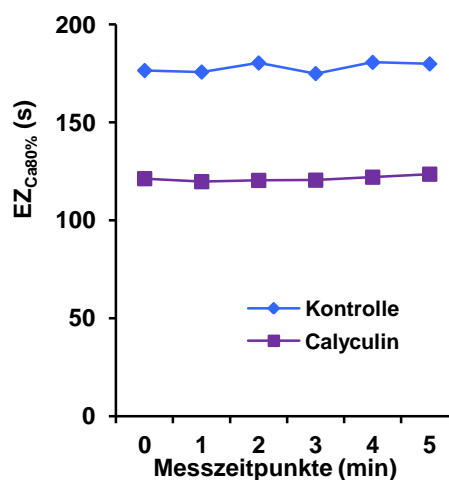


Abbildung 3.27: Calyculin-A $EZ_{Ca80\%}$ -

- a) 80%ige Kalziumelimination von homozygoten CaMKIIδ-Knockout-Zellen unter 2 Hz-Stimulation mit und ohne Calyculin-A.
- b) 80%ige Kalziumelimination von Wildtyp-Kontroll-Zellen unter 2 Hz-Stimulation mit und ohne Calyculin-A.

Es wurden unter Calyculin-A die Frequenzen 0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz und 4 Hz gemessen. Die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen eliminierten ihr Kalzium auch unter Calyculin-A bei langsamen Frequenzen tendenziell, jedoch nicht signifikant langsamer (0,5 Hz: $EZ_{Ca80\%}$ 152 ± 11 ms (n=11); 1 Hz: $EZ_{Ca80\%}$ 147 ± 10 ms (n=12)) als die Wildtyp-Kontroll-Zellen (0,5 Hz: $EZ_{Ca80\%}$ 144 ± 4 ms (n=11); 1 Hz: $EZ_{Ca80\%}$ 142 ± 4 ms (n=12)). Mit steigenden Frequenzen näherten sich, wie bereits in Normaltyrode, die homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen (2 Hz: $EZ_{Ca80\%}$ 131 ± 7 ms (n=12); 4 Hz: $EZ_{Ca80\%}$ 101 ± 4 ms (n=12)) und die Wildtyp-Kontroll-Zellen (2 Hz: $EZ_{Ca80\%}$ 130 ± 4 ms (n=12); 4 Hz: $EZ_{Ca80\%}$ 100 ± 2 ms (n=12)) einander an.

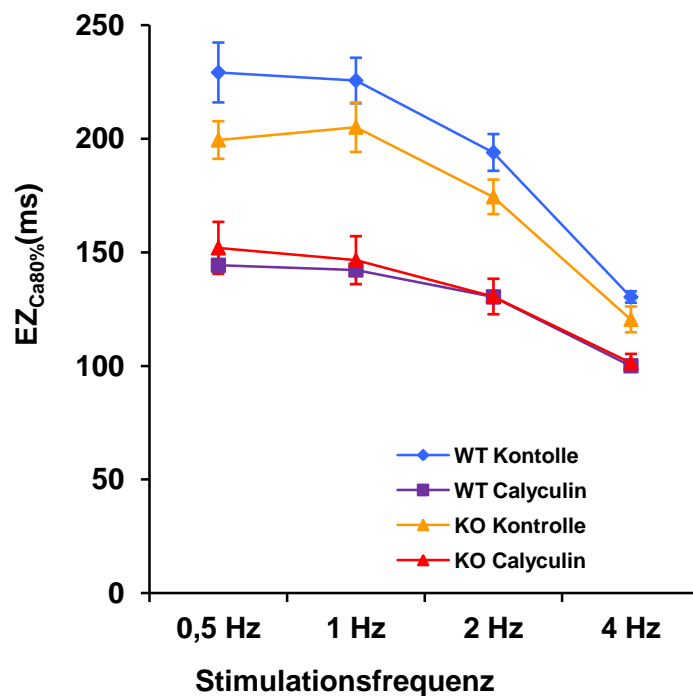


Abbildung 3.28: Frequenzabhängige $EZ_{Ca80\%}$.

80%ige Kalziumelimination unter 0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz und 4 Hz jeweils homozygote CaMKII δ -Knockout-Zellen und Wildtyp-Kontroll-Zellen. Jeweils mit und ohne Calyculin-A.

4 Diskussion

Kalzium und Kalziumhaushalt spielen eine fundamentale Rolle bei der elektromechanischen Kopplung der Kardiomyozyten und somit bei der Kontraktion des Herzens.

In zahlreichen Arbeiten konnte die CaMKII als zentraler Regulator der elektromechanischen Kopplung identifiziert werden. Unter anderem reguliert sie die Funktion des L-Typ-Kalzium-Kanals (Kohlhaas et al. 2006; Xiao RP 1994; Yuan und Bers 1994), des RyR2 (Hain et al. 1995; Maier et al. 2003; Neef et al. 2010; Witcher et al. 1991) sowie die SERCA2a-Funktion über Phosphorylierung von Phospholamban (Davis et al. 1983; Koss und Kranias 1996; Sag et al. 2007). Wagner et al. zeigten 2006 erstmals einen Einfluss der CaMKII auf Natriumströme im Herzen. Die Rolle der CaMKII für Genexpression und nukleäre Prozesse wurden ebenfalls mehrfach beschrieben (u. a. Bacs et al. 2009; Zhang T und Brown 2004) und damit die pathophysiologisch relevante Rolle der CaMKII unterstrichen.

Zudem scheint die CaMKII eine wichtige Rolle bei der Herzinsuffizienz zu spielen: Es kommt zu einer Zunahme der CaMKII-Expression (Hoch et al. 1999; Kirchhefer et al. 1999). Genetische Mausmodelle mit einer Überexpression der CaMKII δ_c führen zu erheblicher kardialer Hypertrophie und Dilatation, zur Entstehung einer schweren Herzinsuffizienz, hoher Mortalität und vermehrter Arrhythmieneigung (Maier et al. 2003; Sag et al. 2009; Zhang T et al. 2002; Zhang T et al. 2003). Ein wichtiger Mechanismus hierfür scheint ein CaMKII-bedingtes, diastolisches Kalziumleck durch Hyperphosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser-2815 zu sein, welches zu einem verminderten SR-Kalziumgehalt und konsekutiv zu verminderten Kalziumtransienten führt. Dies wird mit der verminderten Kontraktilität bei Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht. Weiterhin bewirkt die CaMKII δ bei Druckbelastung eine Aktivierung hypertropher Genprogramme (Bacs et al. 2006).

Eine genetische Inhibition der CaMKII führte in der AC3-I-Maus zur Protektion vor Herzinsuffizienz und Hypertrophie im Kontext von chronisch adrenergem Stress und Myokardinfarkt (Zhang R et al. 2005). Tatsächlich konnte durch eine akute Inhibition der CaMKII in isolierten Muskelstreifen aus insuffizientem humanem Myokard eine Funktionsverbesserung erreicht werden (Sossalla et al. 2010).

Somit wird eine Inhibition der CaMKII als ein vielversprechender Therapieansatz bei der Behandlung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien diskutiert (Neef und Maier 2007; Sossalla et al. 2010; Yang et al. 2006). Jedoch spielen neben den im Herzen vorkommenden Isoformen CaMKII δ und CaMKII γ verschiedene CaMKII-Isoformen auch in anderen Geweben wichtige Rollen. So sind beispielsweise im zentralen Nervensystem die Isoformen

CaMKII α und CaMKII β von großer Bedeutung für die Lernfunktion und die Neuroplastizität des Gehirns (u. a. Lisman et al. 2002; Silva et al. 1992). Eine globale Inhibition der CaMKII würde auch diese Isoformen betreffen. Zudem wird die CaMKII auch mit wichtigen regulatorischen Funktionen im Herzen sowie mit der Erholungsfähigkeit (*Recovery*) bei Azidose in Verbindung gebracht (Komukai et al. 2001; Mattiazzi et al. 2007; Sag et al. 2007), wie im Folgenden diskutiert werden wird.

Ein gezieltes Ausschalten der im Herzen dominierenden Isoform CaMKII δ könnte die erhofften therapeutischen Effekte erzielen, ohne die Funktion anderer CaMKII-Isoformen zu beeinflussen. Das therapeutische Potential dieses Ansatzes wurde von Backs et al. 2009 sowie von Ling et al. 2009 an CaMKII δ -Knockout-Mäusen hinsichtlich eines Schutzes vor Herzinsuffizienz bei kardialer Druckbelastung durch transversale Aortenkonstriktion belegt. Xu et al. (2010) zeigten in der von Backs et al. (2009) und auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten CaMKII δ -Knockout-Mauslinie, dass die verbliebene CaMKII γ 38% der ursprünglichen Gesamt-CaMKII-Aktivität aufrechterhalten konnte.

Die vorliegende Arbeit untersucht nunmehr erstmalig, in wie fern die physiologische Funktion der Kardiomyozyten nach CaMKII δ -Knockout beeinflusst wird.

4.1 Unveränderte Mortalität und biometrische Daten unter Basalbedingungen

Die genetischen CaMKII δ -Knockout-Mäuse zeigten unter Basalbedingungen keine erhöhte Mortalität und wurden nach den zu erwartenden Mendel'schen Verhältnissen geboren. Dies spricht dafür, dass keine pränatale Selektion stattgefunden hat und deutet darauf hin, dass das Fehlen der CaMKII δ unter Basalbedingungen keinen Überlebensnachteil für die Mäuse darstellt. Unter Normalbedingungen scheint demnach der CaMKII δ -Knockout keine merkliche Beeinträchtigung für die Maus darzustellen.

Es ist bekannt, dass die CaMKII (Hoch et al. 1999; Kirchhefer et al. 1999) bzw. CaMKII δ (Backs et al. 2009; Ling et al. 2009) in die Hypertrophieentwicklung unter pathophysiologischen Bedingungen involviert ist. Der spezifische Knockout der CaMKII δ scheint möglicherweise einen protektiven Einfluss vor maladaptiver Hypertrophieentwicklung zu haben, ohne dass die physiologische Entwicklung des Herzmuskels reduziert ist (keine Hypotrophie). Auch hinsichtlich des Körpergewichtes konnten in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede zwischen Knockout und Wildtyp festgestellt werden. Kürzlich konnte eine Studie publiziert werden, welche auch die Daten der vorliegenden Dissertation enthält (Neef et al. 2013). Auch die darin erhobenen echokardiographischen Daten zeigen keine Hypertrophie des Herzens oder anderweitige Veränderungen der Herzdimensionen in den CaMKII δ -Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen.

4.2 Intakte systolische Funktion der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten

Die systolische Funktion wurde *in vitro* anhand der Kalziumamplituden und Kontraktionsstärke der isolierten Kardiomyozyten untersucht. Die Kalziumamplituden und die Kontraktionskraft zeigten sich in den CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt. Vielmehr waren die Kalziumamplituden und die Kontraktion sogar in den beiden Knockout-Gruppen tendenziell stärker als in der Wildtyp-Kontroll-Gruppe.

Bei langsamerer Stimulationsfrequenz zeigte sich sogar eine signifikant bessere systolische Funktion der CaMKII δ -Knockout-Zellen. So hatte die homozygote Mauslinie, im Vergleich zu den Wildtyp-Kontroll-Zellen, bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz signifikant höhere Kalziumamplituden. Mit steigenden Stimulationsfrequenzen bis 8 Hz näherten sich die Gruppen jedoch immer mehr an (vgl. Abb. 3.3, S. 45), so dass sich bei höheren Stimulationsfrequenzen nunmehr keinerlei Unterschiede zeigten. Auch insgesamt über alle Stimulationsfrequenzen hinweg (2-Wege-ANOVA-Testung) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Kontraktionskraft war vergleichbar zu den Kalziumtransienten bei Frequenzen von 1 Hz bis 4 Hz sowohl in den homozygoten als auch in den heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen tendenziell, jedoch nicht signifikant, stärker als in den Wildtyp-Kontroll-Zellen (vgl. Abb. 3.4, S. 46).

Steigende Herzfrequenzen führen im gesunden humanen Myokard sowie im Myokard der meisten Säugetieren zu einer Steigerung der Kontraktionskraft. Diese positive Kraft-Frequenz-Beziehung wurde erstmals von Bowditch (1871) beschrieben und wird auch als Bowditch-Effekt bezeichnet. Im Gegensatz zu den meisten Säugetieren zeigt das Myokard von Mäusen und Ratten eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung (Bers 2001). So ist auch in der vorliegenden Studie bei allen drei Genotypen in den Einzelzellmessungen ein negatives „Treppenphänomen“ zu verzeichnen.

Insgesamt ist festzuhalten, dass sich in den CaMKII δ -Knockout-Zellen keine signifikant negativen Auswirkungen auf die Kalziumtransienten oder die Kontraktionskraft zeigten. Auch *in vivo* (Echokardiographie) zeigte sich bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten CaMKII δ -Knockout-Mäusen keine Veränderung der kardialen Kontraktilität (Neef et al. 2013) Diese Daten sind jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

Einschränkend muss für die Einzelzellmessungen *in vitro* angemerkt werden, dass physiologische Herzfrequenzen einer Maus (ca. 10 Hz; 600/Min) nicht erreicht wurden. Xu et al. (2010) kamen bei Untersuchungen in der gleichen CaMKII δ -Knockout-Mauslinie zu anderen Ergebnissen: Bei 1 Hz beschrieben Xu et al. zunächst vergleichbare Ergebnisse

und fanden, wie auch Backs et al. (2009) keine Unterschiede der Kalziumtransienten zwischen CaMKII δ -Knockout und Wildtyp. Unter 3 Hz-Stimulation beschreiben Xu et al. jedoch signifikant geringere Kalziumtransienten und auch Kontraktionsmessungen in den CaMKII δ -Knockout-Zellen gegenüber den Wildtyp-Kontroll-Zellen. Diese Ergebnisse wurden jedoch an einer deutlich geringeren Anzahl an gemessenen Zellen (3 Hz-Stimulation: n=13 KO und n= 15 WT) erhoben als in der vorliegenden Arbeit (4 Hz-Stimulation: n= 59 KO und n=57 WT).

Je langsamer die Frequenz, desto mehr Zeit steht den Kardiomyozyten für die Relaxation und Speicherung des Kalziums im SR zur Verfügung. Der SR-Kalziumgehalt wiederum korreliert sehr stark mit der Kontraktionskraft der Herzzellen (Bers 2001; Maier und Bers 2002). Eine mögliche Erklärung für die signifikant höhere Kalziumamplitude der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten gegenüber den Wildtyp-Kontroll-Kardiomyozyten (bei 1 Hz) könnte ein höherer SR-Kalziumgehalt sein. Dieser wurde durch Koffeinapplikation gemessen und ergab keine signifikanten Unterschiede. Es war jedoch ein leichter Trend der CaMKII δ -Knockout-Zellen zu einem etwas höheren SR-Kalziumgehalt festzustellen, welcher wiederum zu den höheren Kalziumamplituden geführt haben könnte. Auch hier zeigten sich Differenzen zur Arbeit von Xu et al. (2010). Diese fanden in den CaMKII δ -Knockout-Tieren einen signifikant niedrigeren SR-Kalziumgehalt.

4.3 Veränderte diastolische Funktion der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten

4.3.1 Verminderte SERCA2a-Funktion

Die diastolische Funktion der CaMKII δ -Knockout-Zellen scheint insofern beeinträchtigt zu sein, dass zumindest die Kalziumelimination bei niedrigen Frequenzen signifikant langsamer vonstattengeht als in den Wildtyp-Kontroll-Zellen. Dies zeigte sich sowohl unter Normalbedingungen (vgl. Abb. 3.5, S. 48 und 3.6, S. 49) als auch unter Isoproterenol-Stimulation (vgl. Abb. 3.26a, S. 70). Backs et al. (2009) fanden in den CaMKII δ -Knockout-Mäusen eine erniedrigte Thr-17-Phosphorylierung an Phospholamban. Da nicht-phosphoryliertes Phospholamban die SERCA2a inhibiert, erklärt dieses die etwas langsamere Relaxation auf Einzelzellebene im Knockout.

Keine Beeinträchtigung der Relaxation fanden Ling et al. (2009) in einem anderen CaMKII δ -Knockout-Modell. Bei diesen Versuchen handelte es sich jedoch um hämodynamische Messungen in vivo. Eine Erklärung für diese abweichenden Ergebnisse könnte zum einen sein, dass die Herzfrequenz der Mäuse in vivo die in der vorliegenden Studie verwendeten Stimulationsfrequenzen in vitro deutlich übersteigt. Die langsamere Relaxation der Knockout-

Tiere auf Einzelzellebene lag vor allem bei langsameren Stimulationsfrequenzen vor. Des Weiteren beeinflussen in vivo noch andere Faktoren (z.B. die Vorlast des Herzens) die Geschwindigkeit der Relaxation. Diese physiologischen Regelkreisläufe sind in den in-vitro-Experimenten mit Einzelzellen nicht vorhanden. Zusammengenommen könnten so die auf den ersten Blick diskrepanten Ergebnisse erklärt werden. Weiterhin wird durch die ungleichen Ergebnisse deutlich, dass eine langsamere Relaxation auf Einzelzellebene in vitro nicht zwangsläufig zu einer hämodynamisch relevanten Störung in vivo führen muss.

4.3.2 Intakte FDAR im CaMKII δ -Knockout

Die Elimination des intrazellulären Kalziums bzw. die Relaxation des Herzens, und somit auch die Relaxation auf Zellebene, beschleunigen sich mit zunehmender Herzfrequenz. Dieser fundamentale Mechanismus wird als „Frequency-dependent-acceleration of relaxation“ (FDAR) bezeichnet. Die FDAR ist notwendig, um die frequenzbedingte Verkürzung der Diastolendauer effizient zu nutzen. Somit ist die FDAR essentiell, um einen regelkonformen Ablauf der elektromechanischen Kopplung bei hohen Frequenzen zu gewährleisten.

Die Zusammenhänge zwischen Phospholamban, SERCA2a und die Abhängigkeit der FDAR von der CaMKII sind Inhalt zahlreicher Forschungen, werden aber nach wie vor kontrovers diskutiert und sind noch nicht abschließend geklärt. Mehrere Arbeitsgruppen publizierten, dass CaMKII-Inhibition zu einer Unterdrückung der FDAR führe und schlussfolgerten daher einen kausalen Zusammenhang zwischen der CaMKII und der FDAR (u. a. Bassani et al. 1995; DeSantiago et al. 2002; Li et al. 1998). Andere Arbeitsgruppen wiederum konnten durch Inhibition der CaMKII keinen Einfluss auf die FDAR feststellen (u. a. Hussain et al. 1997; Valverde et al. 2005).

Hagemann et al. veröffentlichten 2000 eine Studie, in welcher sie PLB, bzw. die CaMKII-bedingte Phosphorylierung von PLB, als primären Mechanismus für das Zustandekommen der FDAR vermuteten. Diese Annahmen wurden jedoch durch Studien mit einer PLB-Knockout-Maus widerlegt, da diese Mäuse trotz vollständiger PLB-Defizienz eine beschleunigte Relaxation unter steigenden Frequenzen, also eine intakte FDAR, aufwiesen (DeSantiago et al. 2002; Li et al. 1998). So wäre es immer noch möglich, dass die FDAR PLB-unabhängig, jedoch CaMKII-abhängig ist. Der Mechanismus dafür kann dann jedoch nicht die CaMKII-abhängige Phosphorylierung von PLB sein. Picht et al. (2006) fanden eine abgeschwächte FDAR in SR-AIP-Mäusen, in welchen die CaMKII gezielt am SR inhibiert ist. Huke und Bers konnten andererseits 2007 eindrücklich zeigen, dass der zeitliche Verlauf der FDAR weder mit der CaMKII-bedingten PLB-Phosphorylierung noch der CaMKII-bedingten RYR2-Phosphorylierung korreliert und dass die FDAR bei Frequenzerhöhung bereits eintritt,

bevor die vermehrte Aktivierung der CaMKII abgeschlossen ist. Weiterhin konnten sie zeigen, dass die CaMKII durch Stimulation zwar aktiviert, jedoch sofort durch Phosphatasen abgebaut wird. Eine Inhibition von CaMKII-spezifischen Phosphatasen führte zwar zu einer verstärkten Phosphorylierung der CaMKII-Substrate PLB und RYR2, sowie der CaMKII-Autophosphorylierung, der zeitliche Zusammenhang zwischen der FDAR (innerhalb weniger Sekunden komplett) und dem verzögerten Aufbau der Phosphorylierungen passte jedoch auch unter CaMKII-spezifischer Phosphatasen-Inhibition nicht zusammen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten CaMKII δ -Knockout-Mäuse zeigten ein intaktes FDAR-Phänomen, tendenziell sogar eine leicht verstärkte FDAR, da sich die CaMKII δ -Knockout-Zellen von signifikant langsameren Relaxationszeiten bei langsamen Frequenzen dem Wildtyp-Niveau bei schnelleren Stimulationsfrequenzen immer weiter annäherten. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die schnellere SR-Kalziumaufnahme bei höheren Frequenzen durch einen CaMKII δ -unabhängigen Mechanismus erfolgt. Vermutungen in dieser Richtung wurden auch schon von Huke und Bers (2007) formuliert. Andererseits veröffentlichten Backs et al. (2009) in einer Studie mit der CaMKII δ -Knockout-Maus-Linie, welche auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, dass die Phosphorylierung von PLB an Thr-17, also der CaMKII spezifischen Phosphorylierungsstelle, im Knockout lediglich leicht vermindert war. Xu et al. (2010) konnten im gleichen Maus-Modell zeigen, dass es nach CaMKII δ -Knockout zu einer Verminderung der gesamten CaMKII-Aktivität um 62% bzw. einer verbleibenden Rest-CaMKII-Aktivität von immerhin 38% kommt. Erklärbar ist dies am ehesten durch die Aktivität der verbliebenen CaMKII γ -Isoform.

Backs et al. (2009) hatten eine unbeeinflusste CaMKII γ gesehen, welche sich nicht kompensatorisch erhöht gezeigt hatte. So kann angenommen werden, dass die CaMKII γ für die verbliebene PLB-Phosphorylierung nach CaMKII δ -Knockout verantwortlich ist. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass CaMKII δ offensichtlich für die FDAR nicht zwingend notwendig ist. Ob die FDAR ein komplett CaMKII-unabhängiger Mechanismus ist, lässt sich jedoch aus der vorliegenden Untersuchung aufgrund der verbliebenen CaMKII γ -Aktivität nicht schließen. Diese Fragestellung ließe sich erst in einem kompletten kardialen CaMKII-Knockout untersuchen.

Eine Erklärung für die langsamere Relaxation, vor allem bei langsameren Frequenzen, könnte eine verminderte NCX-Funktion sein. Bei niedrigeren Stimulationsfrequenzen hat die Kalziumelimination durch den NCX mehr Relevanz als bei schnelleren Frequenzen. Durch schnellere Stimulation wird die SERCA2a-Aktivität verstärkt (Bers 2001) und bekommt im Vergleich zu langsameren Stimulationsfrequenzen einen höheren Stellenwert. Dementsprechend verliert der NCX an Relevanz für die Kalziumelimination und die Unterschiede gleichen sich bei schnelleren Frequenzen an.

Tatsächlich zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine signifikant erniedrigte NCX-Funktion im CaMKII δ -Knockout im Sinne eines langsameren Abfalls der Koffein-induzierten Transienten (vgl. Abb. 3.9, S. 52). Dies passt auch zu den Ergebnissen von Maier et al., die besagen, dass die NCX-Funktion in CaMKII δ_c -überexprimierenden Tieren um 30% verstärkt aktiviert wird (Maier et al. 2003).

4.4 Vermindertes SR-Kalziumleck, aber nicht signifikant erhöhter SR-Kalziumgehalt im CaMKII δ -Knockout

Ein erhöhtes diastolisches SR-Kalziumleck steht im Verdacht sowohl ein verstärktes arrhythmogenes Potential aufzuweisen (Sag et al. 2009) als auch zu einem geringeren SR-Kalziumgehalt (Maier et al. 2003) und somit zu verminderter Kontraktilität zu führen (Neef und Maier 2007). Zunehmend setzt sich die Einschätzung durch, dass CaMKII wesentlich für das spontane diastolische SR-Kalziumleck und die damit verbundene Verminderung des SR-Kalziumgehaltes verantwortlich ist, welche bei Herzinsuffizienz letztendlich zur verminderten Kontraktilität beiträgt.

Zunächst publizierten Witcher et al. (1991) sowie Hain et al. (1995) Daten, in denen die CaMKII-Phosphorylierung am RYR2 aktivierende Effekte zeigte. Passend zu diesen Daten sind auch die Ergebnisse, welche duBell et al. (1996) an CaMKII-dephosphorylierenden-überexprimierenden Ratten durchführten, welche eine geringere SR-Kalziumausschüttung via RyR2 aufwiesen. Ergebnisse von Maier et al. (2003) in transgenen CaMKII δ_c -überexprimierenden Mäusen ergaben weiterhin ein signifikant höheres spontanes diastolisches Kalziumleck via RyR2 aus dem SR. Auch Currie et al. (2004) fanden bei AIP behandelten Kaninchenmyozyten, im Vergleich zu nicht behandelten, eine verringerte RyR2-Aktivität sowie verringerte Spark-Frequenzen. Ferrero et al. zeigten 2007 an Ratten eine durch β -adrenerge Stimulation verursachte Phosphorylierung der RyR2 durch die CaMKII. Curran et al. (2007) fanden heraus, dass das beta-adrenerg erhöhte diastolische Kalziumleck CaMKII-vermittelt ist.

Auch bei Herzinsuffizienz (u. a. Ai et al. 2005; Sossalla et al. 2010) und bei humanem Vorhofflimmern (Neef et al. 2010) konnte ein CaMKII-abhängiges SR-Kalziumleck festgestellt werden, assoziiert mit Hyperphosphorylierung des RyR2 an der CaMKII-abhängigen Stelle Ser-2815.

Demgegenüber stehen einige Arbeiten, die eine entgegengesetzte Wirkung der CaMKII am RyR2 fanden. Lokuta et al. (1995) fanden eine inhibierende Wirkung der CaMKII auf den RyR2 in Kaninchen und Schweinen. Passend zu diesen Ergebnissen fanden Wu et al. (2001) eine erhöhte SR-Kalziumausschüttung via RyR2 in Kaninchenkardiomyozyten, welche mit AC3-I behandelt worden waren.

Insgesamt scheint die Rolle der CaMKII am RyR2 noch nicht abschließend geklärt, denkbar sind möglicherweise sowohl aktivierende als auch deaktivierende Effekte der CaMKII δ am RyR2.

Bezogen auf alle sparkenden Zellen zeigte sich im Knockout zwar bereits ein Trend zur selteneren Spark-Entladung als im Wildtyp, diese Daten erlangten jedoch keine Signifikanz. Dadurch, dass zudem der Anteil an Zellen, welche überhaupt ein messbares SR-Kalziumleck in Form von Sparks aufwiesen, im Knockout deutlich geringer war als im Wildtyp, ergibt sich jedoch für den Knockout ein nunmehr signifikant niedrigeres „totales“ SR-Kalziumleck.

Diese Reduktion des SR-Kalziumlecks könnte ein wichtiger Mechanismus für den in der Knockout-Maus von anderen beobachteten protektiven Phänotyp bei Druckbelastung der Tiere mittels transversaler Aortenkonstriktion (Bacs et al. 2009) sein.

Ein vermindertes SR-Kalziumleck kann zum einen durch eine Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 durch verminderte CaMKII-abhängige Phosphorylierung, oder aber durch einen verminderten Kalziumgehalt des SR zustande kommen. Tatsächlich stellte sich in der vorliegenden Arbeit der SR-Kalziumgehalt im CaMKII δ -Knockout aber sogar tendenziell vermehrt dar, wie auch im folgenden Abschnitt noch einmal diskutiert wird, so dass am ehesten ein Einfluss auf den RyR2 als Ursache für das reduzierte „totale“ SR-Kalziumleck anzunehmen ist.

Der SR-Kalziumgehalt wurde mit Hilfe von Koffein-induzierten Transienten untersucht. Hier zeigte sich ein leichter Trend sowohl bei den heterozygoten als auch bei den homozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen zu einem höheren SR-Kalziumgehalt. Diese Resultate erreichten jedoch im T-Test keine Signifikanz (vgl. Abb. 3.13, S. 58 und 3.14, S. 59).

Die Tendenz zur vermehrten SR-Beladungsfähigkeit der Knockout-Tiere ist nicht vollständig unerwartet, da Maier und Kollegen in CaMKII δ_c -überexprimierenden Tieren zuvor eine signifikant geringere SR-Beladung fanden (Maier et al. 2003). Als Ursache für die geringere SR-Kalziumbeladung der transgenen CaMKII δ_c -überexprimierenden Mäuse wurde ein signifikant erhöhtes SR-Kalziumleck angenommen (Maier et al. 2003).

Eine mögliche Erklärung für den tendenziell erhöhten SR-Kalziumgehalt trotz signifikant geringerem „totalem“ diastolischen Kalziumleck könnte sein, dass die Wiederaufnahme des Kalziums in das SR durch die SERCA2a im Knockout (zumindest bei der 1 Hz-Stimulation, bei welcher sowohl Koffein als auch Spark-Experimente durchgeführt wurden) leicht vermindert war (langsamere SR-Kalzium-Rückaufnahme).

Interessanterweise sahen auch Ling et al. (2009) in einem anderen CaMKII δ -Knockout-Mausmodell im Kontext transversaler Aortenkonstriktion verminderte Kalziumsparks, der SR-Kalziumgehalt zeigte sich jedoch vergleichbar zu den vorliegenden Daten auch hier nicht wesentlich verändert.

4.5 Unbeeinträchtigt Post-Pausen-Verhalten im CaMKII δ -Knockout

Um die Kalzium-Akkumulationsfähigkeit des SR zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Post-Pausen-Experimente mit verschiedenen langen Stimulationspausen durchgeführt. Diese Post-Pausen-Potenzierung ist insofern ein integratives Maß für die Kalzium-Akkumulationsfähigkeit des SR als verschiedene Einflussgrößen wie SR-Kalziumleck (Kalzium-Verlust) und SERCA2a-Funktion (Kalzium-Rückaufnahme in das SR) mit eingehen. Als Indikator für die Fähigkeit des SR, während der Stimulationspause Kalzium einzuspeichern, dient dabei die Zunahme der Kontraktionskraft und des Kalziumtransienten nach der Pause. Normalerweise zeigt sich bei nicht insuffizienten humanen Herzen eine typische positive Post-Pausen-Potenzierung mit zunehmender Pausendauer bis 240 Sekunden (Maier et al. 2000c; Pieske et al. 1996).

Die prozentuale Steigerung der Kalziumamplitude zeigte einen stärkeren Anstieg der Kalziumakkumulation nach der 30-Sekunden-Pause im Vergleich zur 10-Sekunden-Pause in allen drei Gruppen. Das heißt alle drei Genotypen konnten die Pause nutzen, um vermehrt Kalzium zu akkumulieren. Der heterozygote Knockout steigerte seine Kalziumakkumulation während der 30-Sekunden-Pause sogar signifikant stärker als der Wildtyp (vgl. Abb. 3.10, S. 55). Insgesamt scheint die Post-Pausen-Potenzierung damit durch Knockout der CaMKII δ nicht beeinträchtigt zu sein. Dass es trotz verminderten SR-Kalziumlecks zu keiner vermehrten Post-Pausen-Potenzierung im CaMKII δ -Knockout kommt, ist am ehesten auf eine weniger ausgeprägte SR-Kalzium-Rückaufnahme im Knockout (weniger SERCA2a-Funktion) zurückzuführen.

4.6 Erhöhte diastolische Kalziumkonzentration und kürzere diastolische Sarkomerlänge im CaMKII δ -Knockout

In den CaMKII δ -Knockout-Zellen zeigte sich ein signifikant erhöhtes diastolisches Kalzium mit passend dazu signifikant verkürzter diastolischer Sarkomerlänge in den isolierten Kardiomyozyten. Interessanterweise sahen bereits Maier et al. (2003) in CaMKII δ_c -überexprimierenden Mäusen das entsprechende Gegenteil, nämlich erniedrigte diastolische Kalziumkonzentrationen. Dies war vergesellschaftet mit niedrigerem SR-Kalziumgehalt, erhöhtem diastolischem SR-Kalziumleck und vermehrter NCX-Expression (Maier et al. 2003). Ein vermehrtes SR-Kalziumleck kann eine typische Ursache erhöhten diastolischen Kalziums sein (Neef et al. 2010). Das SR-Kalziumleck zeigte sich aber, wie bereits diskutiert, in den untersuchten CaMKII δ -Knockout-Zellen sogar vermindert (vgl. Abb. 3.19, S. 62), so dass dieses nicht die Ursache für das erhöhte diastolische Kalzium sein kann. Eine weitere

mögliche Ursache für höheres diastolisches Kalzium ist eine reduzierte NCX-Aktivität und damit eine verminderte Kalziumextrusion aus der Zelle. Tatsächlich zeigte sich in den CaMKII δ -Knockout-Zellen die NCX-Funktion bei den Koffein-Messungen signifikant vermindert. Die dritte Erklärung könnte ein vermehrter Kalziumeinstrom in die Zelle über den L-Typ-Kalzium-Kanal sein. Dieser Umstand wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Xu et al. (2010) fanden jedoch bei der CaMKII δ -Knockout-Mauslinie, welche auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, in eigenen Experimenten einen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhten L-Typ-Kalziumstrom.

Zusammengenommen könnte die Kombination aus vermehrtem Kalziumeinstrom in die Zellen und verminderter Kalziumextrusion aus den Zellen die Ursache für das erhöhte diastolische Kalzium sein. Ein weiterer additiver Faktor könnte zudem die langsamere SR-Kalzium-Rückaufnahme des Knockouts bei langsameren Stimulationsfrequenzen sein.

Hohe diastolische Kalziumkonzentrationen stehen im Verdacht zu einer Beeinträchtigung der Relaxation und klinisch zu einer diastolischen Dysfunktion zu führen (Grossman et al. 1985). Des Weiteren kann ein erhöhtes diastolisches Kalzium ein Trigger für Arrhythmien sein (Bers 2002; Ter Keurs und Boyden 2007).

Tatsächlich zeigten Studien mit CaMKII-Inhibitoren jedoch, dass eine Inhibition der CaMKII zu einer signifikanten Verminderung der Arrhythmieneigung führt (u. a. Sag et al. 2009; Wu et al. 2002), so dass trotz erhöhtem diastolischem Kalzium und auch angesichts der Reduktion des pro-arrhythmogenen SR-Kalziumlecks in der CaMKII δ -Knockout-Maus am ehesten ein antiarrhythmischer Effekt durch die Reduktion der CaMKII-Aktivität (nur noch verbleibende restliche CaMKII γ -Funktion) zu erwarten wäre.

4.7 Unvermindertes inotropes und lusitropes Ansprechen auf Isoproterenol im CaMKII δ -Knockout

Wichtige physiologische Reaktionen des Herzens auf Stress-Situationen und konsekutive adrenerge Stimulation sind zum einen die Steigerung der Kontraktionskraft (positiv inotroper Effekt) und zum anderen die beschleunigte Relaxation (positiv lusitroper Effekt). Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass die CaMKII beta-adrenerg vermitteltte Effekte aufweist. So publizierten Baltas et al. bereits 1997, dass beta-adrenerge Stimulation zu einer Aktivierung der CaMKII führen kann und Curran et al. fanden 2007 einen Zusammenhang zwischen CaMKII und dem beta-adrenerg bedingt gesteigerten SR-Kalziumleck.

Um eine adrenerge Stresssituation zu simulieren, wurden an den isolierten Kardiomyozyten Untersuchungen mit 4 nM Isoproterenol-Lösung vorgenommen.

Isoproterenol führte in allen drei Gruppen zu einem ausgeprägten positiv inotropen Effekt. Dies zeigte sich durch höhere Kalziumtransienten und eine vermehrte Kontraktilität der Kardiomyozyten, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Ebenso beschleunigten sich unter Isoproterenol-Einfluss der Abfall der Kalziumtransienten (entsprechend vermehrter SERCA2a-Funktion) und die Geschwindigkeit der Relaxation der Zellen in homo- und heterozygoten CaMKII δ -Knockout-Zellen, ebenso wie im Wildtyp. Sowohl das inotrope als auch das lusitrope Ansprechen auf adrenerge Stimulation sind damit im CaMKII δ -Knockout nicht beeinträchtigt. Auch Zhang R et al. publizierten 2005 vergleichbare Ergebnisse aus der endogen CaMKII-inhibierenden AC3-I-Maus und schlussfolgerten, dass eine chronische CaMKII δ -Inhibition keinen negativen Einfluss auf den physiologischen katecholineren Effekt im Herzen habe.

Von Sag et al. wurden 2009 Untersuchungen zur Rolle der CaMKII δ in Bezug auf die Arrhythmogenese bei Herzinsuffizienz veröffentlicht. Sie untersuchten dabei sowohl CaMKII δ_c -überexprimierende Mäuse als auch CaMKII-inhibierte und CaMKII δ -Knockout-Mäuse ohne und mit Isoproterenol-Exposition hinsichtlich ihres arrhythmogenen Verhaltens. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass CaMKII-Inhibition die Arrhythmieneigung sowohl in vivo als auch in vitro verringert und dass auch durch Isoproterenol getriggerte Arrhythmien durch CaMKII-Inhibition oder genetischen Knockout deutlich verringert werden können.

Insgesamt scheinen also die gewünschten positiven Effekte adrenerger Stimulation (positive Inotropie und Lusitropie) im CaMKII δ -Knockout erhalten zu sein, während die arrhythmogenen Effekte adrenergen Stresses reduziert sein könnten.

4.8 Einbettung der Befunde hinsichtlich therapeutischer Anwendung

Inhibition der CaMKII wird zunehmend als neues Therapieprinzip bei Herzinsuffizienz und Arrhythmien in Erwägung gezogen (vgl. 1.6, S. 16-17). Berücksichtigt werden muss hierbei jedoch, dass die CaMKII in verschiedenen extrakardialen Geweben und auch im Herzen selbst, wichtige regulatorische Rollen innehat. Die dominante kardiale Isoform der CaMKII ist die CaMKII δ . Transgene Überexpression der CaMKII δ_c in Mäusen führt zu schwerer Herzinsuffizienz und erhöhter Anfälligkeit für Arrhythmien. Eine gezielte Inhibition der CaMKII δ könnte therapeutisch effektiv sein, ohne CaMKII-Funktionen in anderen Geweben zu beeinträchtigen. Zudem könnte im Herzen die verbliebene CaMKII γ ausreichen, regulatorische CaMKII-Funktionen im Herzen zu erhalten, während die CaMKII δ -Suppression protektiv sein könnte. Tatsächlich konnte ein protektiver Phänotyp für den in der vorliegenden Arbeit untersuchten CaMKII δ -Knockout (Bucks et al. 2009) und ein anderes CaMKII δ -Knockout-Maus-Modell (Ling et al. 2009) hinsichtlich der Entwicklung einer

Herzinsuffizienz infolge chronischer Druckbelastung (transversale Aortenkonstriktion) aufgezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass die systolische Funktion der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten sowie das Ansprechen auf beta-adrenerge Stimulation (inotroper und lusitroper Effekt) *in vitro* vollständig erhalten sind. Die diastolische Funktion zeigte sich jedoch bei langsamen Stimulationsfrequenzen, im Sinne geringfügig langsamerer Elimination des zytosolischen Kalziums, leicht eingeschränkt. Zudem zeigten sich erhöhte diastolische Kalziumlevel im Knockout. Die FDAR war jedoch nicht beeinträchtigt. Weiterhin zeigte sich ein leicht vermindertes diastolisches SR-Kalziumleck unter Basalbedingungen, welches die zuvor beschriebenen protektiven Effekte des Knockout erklären könnte. Der SR-Kalziumgehalt war jedoch nicht signifikant erhöht, was an der leicht langsameren bzw. verminderten SR-Kalzium-Rückaufnahme liegen könnte. Inotropes und lusitropes Ansprechen in den Kardiomyozyten waren unter Isoproterenol nicht beeinträchtigt.

Insgesamt zeigte sich die physiologische kardiale Funktion im CaMKII δ -Knockout damit unter Basalbedingungen nicht relevant beeinträchtigt und auch das wichtige adrenerge Ansprechen zeigte sich intakt. Damit könnte eine gezielte Inhibition der CaMKII δ tatsächlich einen unter Basalbedingungen sicheren therapeutischen Ansatz darstellen, wobei auch der therapeutische Benefit eines CaMKII δ -Knockouts im pathophysiologischen Kontext einer Druckbelastung des Herzens, wie erwähnt, bereits demonstriert wurde. Für eine weitere Ursache von Herzinsuffizienz, myokardiale Ischämie, liegen noch keine Untersuchungen an einem CaMKII δ -Knockout-Modell vor. Für ein global CaMKII-inhibitorisches Mausmodell, die AC3-I-Maus, wurde jedoch ein Benefit auch in diesem Kontext gezeigt (wobei einschränkend in der AC3-I-Maus auch die PKD verändert ist).

Eine weitere wichtige physiologische Funktion der CaMKII ist die kontraktile Erholung von Azidose (*Recovery*). Hierbei kommt es im Zuge der Azidose zu einer vermehrten Aktivierung der CaMKII, welche über Phosphorylierung von PLB (an Thr-17) zu einer Verstärkung der bei Azidose verminderten SERCA2a-Aktivität und damit zu einer Verbesserung der SR-Kalzium-Beladung führt. Einer Abnahme des SR-Kalziumgehalts und einem Einbrechen der Kontraktilität kann so teilweise entgegengewirkt werden (Komukai et al. 2001; Mattiazzi et al. 2007; Sag et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit hat sich unter Basalbedingungen und Isoproterenol-Stimulation im CaMKII δ -Knockout eine verminderte SERCA2a-Funktion im Sinne eines langsameren Abfalls der Kalziumtransienten gezeigt. Angesichts der oben skizzierten angenommenen Rolle der CaMKII für das *Recovery* von Azidose und der gefundenen verminderten SERCA2a-Funktion im CaMKII δ -Knockout wurde vermutet, dass das *Recovery* von Azidose bei verminderter CaMKII-Funktion eingeschränkt sein könnte. Und tatsächlich zeigen entsprechende Untersuchungen (Neef et al. 2013) an den in der vorliegenden Arbeit

untersuchten CaMKII δ -Knockout Mäusen eine stark beeinträchtigte Erholungsfähigkeit von Azidose durch unzureichende SR-Kalzium-Rückaufnahme. Auch durch vollständige Inhibition der CaMKII mit dem globalen CaMKII-Inhibitor KN-93 konnte in diesen Untersuchungen in Wildtyp-Kontrollzellen das *Recovery* unterdrückt werden (Neef et al. 2013). Demnach ist anzunehmen, dass die CaMKII unter Azidosebedingungen essentiell für die Erholungsfähigkeit der Kardiomyozyten ist. Dieses könnte in bestimmten klinischen Situationen, z.B. bei Schock mit Azidose, den therapeutischen Einsatz von CaMKII-Inhibition limitieren.

Zusammengenommen scheint somit die Inhibition der CaMKII unter Basalbedingungen als therapeutisches Konzept durchaus möglich, wohingegen bestimmte pathophysiologische Situationen (wie z.B. Azidose) bestehen könnten, in denen eine Inhibition der CaMKII sogar schädlich sein könnte. Diese Situationen müssen vor dem therapeutischen Einsatz von CaMKII-Inhibition klar definiert werden.

5 Zusammenfassung

Die CaMKII ist ein zentraler Regulator des Kalziumhaushalts und der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten. Die dominante Isoform im Herzen ist die CaMKII δ . Eine gesteigerte CaMKII-Aktivität wird mit der Entstehung von Herzhypertrophie, Herzinsuffizienz und gesteigerter Arrhythmogenese in Verbindung gebracht. Eine Inhibition der CaMKII wird deswegen als vielversprechender therapeutischer Ansatz angesehen. Jedoch hat die CaMKII auch wichtige regulatorische Funktionen im Herzen (u. a. adrenerges Ansprechen) und verschiedene CaMKII-Isoformen spielen wichtige Rollen in anderen Geweben. Gezielte Inhibition der CaMKII δ könnte das therapeutische Potential für das Herz realisieren, ohne andere wichtige CaMKII-Funktionen zu beeinträchtigen.

Die vorliegende Arbeit untersucht deswegen den Einfluss eines CaMKII δ -Knockouts auf die elektromechanische Kopplung (Kalziumhaushalt und Kontraktilität) und das SR-Kalziumleck in Kardiomyozyten unter Basalbedingungen sowie unter adrenergem Stress.

CaMKII δ -Knockout-Mäuse wurden in den zu erwartenden Mendel'schen Verhältnissen geboren. Hinsichtlich Herz- und Körpergewicht sowie der Dimensionen der Zellen zeigten sich keine Unterschiede. Hinsichtlich der systolischen Funktion der Kardiomyozyten zeigte sich der Knockout nicht beeinträchtigt, die Zellen zeigten weder eine Einschränkung der Kalziumamplitude noch der Kontraktionskraft. Hinsichtlich der diastolischen Funktion zeigte sich im Knockout jedoch in vitro eine verlangsamte Relaxation und Kalziumelimination im Sinne einer verminderten SERCA2a-Funktion. Dabei glichen sich die Relaxationsparameter der CaMKII δ -Knockout-Kardiomyozyten mit steigenden Stimulationsfrequenzen immer mehr dem Wildtyp-Niveau an. Die frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation ist also völlig intakt. Das diastolische zytosolische Kalzium war im Knockout zudem erhöht, wobei mögliche Ursachen hierfür eine leichte Verminderung der NCX-Funktion wie auch ein vermehrter L-Typ-Kalziumeinstrom sein könnten. Trotz eines unter Basalbedingungen verminderten SR-Kalziumlecks im CaMKII δ -Knockout war der SR-Kalziumgehalt jedoch nicht vermehrt. Mögliche Ursache hierfür könnte eine verminderte SR-Kalzium-Rückaufnahme sein. Das Ansprechen auf beta-adrenerge Stimulation war im Knockout intakt, die Kardiomyozyten zeigten einen starken inotropen und lusitropen Effekt. Insgesamt zeigte der CaMKII δ -Knockout damit unter Basalbedingungen keine wesentliche Beeinträchtigung der Funktion der Kardiomyozyten. Zudem konnte eine Reduktion des SR-Kalziumlecks gezeigt werden, welche die im CaMKII δ -Knockout in Vorbefunden beschriebenen protektiven Effekte z.B. bei chronischer Druck-Überlastung erklären könnte. Damit könnte eine gezielte Inhibition der CaMKII δ einen unter Basalbedingungen sicheren therapeutischen Ansatz darstellen.

6 Literaturverzeichnis

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

Anderson ME, Braun AP, Schulmann H, Bers DM, Premack BA (1994): Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca(2+)-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes . *Circ Res* 75, 854-861

Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN (2006): CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 116, 1853–1864.

Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, Grueter CE, Qi X, Richardson JA, Hill JA (2009): The δ isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 2342-2347

Baltas LG, Karczewski P, Bartel S, Krause EG (1997): The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase is activated in response to β -adrenergic stimulation and becomes Ca²⁺-independent in intact beating hearts. *FEBS Lett* 409, 131-136

Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM (1995): CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268, H703-H712

Bers DM: Excitation-contraction coupling and cardiac contractil force. 2. Auflage; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001

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

Bers DM (2006): Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation In Heart Failure. *Physiology (Bethesda)* 21, 380-387

Bers DM, Guo T (2005): Calcium Signaling in Cardiac Ventricular Myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1047: 86-98

Bowditch HP (1871): Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Berichte der Königlich-Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften, Mathematisch-physische Classe* 23, 652-689

Braun AP, Schulman H (1995): The Multifunctional Calcium/Calmodulin dependent Protein Kinase: From Form to Function. *Annu Rev Physiol* 57, 417-445

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB (1993): Calcium Sparks Elementary Events Underlying Excitation-Contraction Coupling in Heart Muscle. *Science* 262, 740-744

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

Currie S, Loughrey CN, Craig MA, Smith GL (2004): 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

Davis BA, Schwartz A, Samaha FJ, Kranias EG (1983): Regulation of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Transport by Calcium-Calmodulin-dependent Phosphorylation. *J Biol Chem* 258, 13587–13591.

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

DuBell WH, Lederer WJ, Rogers TB (1996): Dynamic modulation of excitation-contraction coupling by protein phosphatases in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 493, 793-800

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

Fabiato A, Fabiato F (1975): Contractions induced by a Calcium-Triggered Release of Calcium from the Sarcoplasmic Reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249, 469-495

Ferrero P, Said M, Sánchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P, Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C. (2007): Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 43, 281-291

Gee KR, Brown KA, Chen WNU, Bishop-Stewart L, Gray D Johnson I (2000): Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 97-106

Grossman W, Paulus W, Lorell BH (1985): Haemodynamic evaluation of diastolic abnormalities in hypertrophic cardiomyopathy. *Postgrad Med J* 61, 1113-1116

Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM (2006): Ca/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res.* 99, 398-406

Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP (2000): Frequency-encoding Thr¹⁷ Phospholamban Phosphorylation Is Independent of Ser¹⁶ Phosphorylation in Cardiac Myocytes. *J Biol Chem* 275, 22532–22536

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

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

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

Huke S, Bers DM (2007): Temporal Dissociation of Frequency-Dependent-Acceleration of Relaxation and Protein Phosphorylation by CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 42, 590–599.

Hussain M, Drago GA, Colyer J, Orchard CH (1997): Rate-dependent abbreviation of Ca²⁺ transient in rat heart is independent of phospholamban phosphorylation. *Am J Physiol* 273, H695-H706

Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1366

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

Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H (1995): A Novel Highly Specific and Potent Inhibitor of Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 806-812

Ishida A, Sueyoshi N, Shigeri Y, Kameshita I (2008): Negative regulation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: physiological and pharmacological significance of protein phosphatases. *Br J Pharmacol* 154, 729–740

Jett MF, Schworer CM, Soderling TR (1987): Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Arch Biochem Biophys* 266, 354-360

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, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM (2006): Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 98, 235-244

Komukai K, Pascarel C, Orchard CH (2001): Compensatory role of CaMKII on I_{Ca} and SR function during acidosis in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 442, 353-361

Koss KL, Kranias EG (1996): Phospholamban: A Prominent Regulator of Myocardial Contractility. *Circ Res* 79, 1059-1063

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

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

Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG (1979): Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylations. Biochemistry 18, 5150-5157

Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM (1998): Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. Am J Physiol Heart Circ Physiol 274, H1335-H1347

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

Lisman J, Schulman H, Cline H. (2002): The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. Nat Rev Neurosci 3, 175-190

Lokuta AJ, Rogers TB, Lederer WJ, Valdivia HH (1995): Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. J Physiol 487.3, 609-622

Maier LS, Bers DM (2002): Calcium Cycling Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. J Mol Cell Cardiol 34, 919-939

Maier LS, Bers DM (2007): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. Cardiovasc Res 73: 631-40

Maier LS, Barckhausen P, Weisser J, Aleksic I, Baryalei M, Pieske B (2000a): Ca²⁺ handling in isolated human atrial myocardium. Am J Physiol 279, H952-H958

Maier LS, Bers DM, Pieske B (2000b): Differences in Ca²⁺-Handling and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-Content in Isolated Rat and Rabbit Myocardium. J Mol Cell Cardiol 32, 2249–2258

Maier LS, Schwan C, Schillinger W, Minami K, Schütt U, Pieske B (2000c): Gingerol, isoproterenol and ouabain normalize impaired post-rest behavior but not force–frequency relation in failing human myocardium. *Cardiovasc Res* 45, 913-924

Maier LS, Braunhalter J, Horn W, Weichert S, Pieske B (2002): The Role of SR Ca²⁺-Content in Blunted Inotropic Responsiveness of Failing Human Myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 34, 455-467

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII δ_C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res* 92, 904-11

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Roseblit N, Marks AR (2000): PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts. *Cell* 101, 365-376

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

Mattiazzi A, Vittone L, Mundina-Weilenmann C (2007): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis. *Cardiovasc Res* 73, 648–56

Meja-Alvarez R, Kettlun C, Ros E, Stern M, Fill M (1999): Unitary Ca Current through Cardiac Ryanodine Receptor Channels under Quasi-Physiological Ionic Conditions. *J Gen Physiol* 113, 177-186

Minsky M (1988): Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10, 128-138

The Molecular probes handbook, 11th Edition

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html> (abgerufen am 16.12.2011)

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

Neef S und Maier LS (2007): Remodeling of Excitation-contraction Coupling in the Heart: Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak as a Novel Therapeutic Approach. *Curr Heart Fail Rep* 4, 11–17

Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010): CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 106, 1134-1144

Neef S, Sag CM, Daut M, Bäumer H, Grefe C, El-Armouche A, DeSantiago J, Pereira L, Bers DM, Backs J, Maier LS (2013): While systolic cardiomyocyte function is preserved, diastolic myocyte function and recovery from acidosis are impaired in CaMKII δ -KO mice. *J Mol Cell Cardiol* 59, S. 107-116

Picht E, DeSantiago J, Huke S, Kaetzel MA, Dedman JR, Bers DM (2006): CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits frequency-dependent acceleration of relaxation and Ca²⁺ current facilitation. *J Mol Cell Cardiol* 42, 196-205

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 relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 1169-1178

Pieske B, Sütterlin M, Schmidt-Schweda S, Minami K, Meyer M, Olschewski M, Holubarsch C, Just H, Hasenfuss G (1996): Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 98, 764–776

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

Reuter H, Seitz N (1968): The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 195, 451-470

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

Sag CM, Dybkova N, Neef S, Maier LS (2007): Effects on recovery during acidosis in cardiac

myocytes overexpressing CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 43, 696-709

Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH (2009): Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Contributes to Cardiac Arrhythmogenesis in Heart Failure. *Circ Heart Fail* 2, 664-675

Schatzmann HJ (1989): The Calcium Pump of the Surface Membrane and of the Sarcoplasmic Reticulum. *Annu Rev Physiol* 51, 473-485

Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. (1992): Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 206-211

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

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

Tada M, Kirchberger MA, Katz AM (1975): Phosphorylation of a 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 and Ohmori F (1982): Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of Phospholamban. *Mol Cell Biochem* 46, 73-95

Ter Keurs HEDJ, Boyden PA. Calcium and Arrhythmogenesis (2007): *Physiol Rev* 87, 457-506

Tobimatsu T und Fujisawa H (1989): Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem* 264, 17907-17912

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

Valverde CA, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Vittone L, Salas M, Palomeque J, Petroff MV, Mattiazzi A (2005): Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian

heart: a property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation. *J Physiol* 562, 801-813.

Vest RS, Davies KD, O'Leary H, Port JD, Bayer KU (2007): Dual Mechanism of a Natural CaMKII Inhibitor. *Mol Biol Cell* 18, 5024-5033

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

Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circ Res* 94, e61-e70

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 Y, Colbran RJ, Anderson ME (2001): Calmodulin kinase is a molecular switch for cardiac excitation–contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2877-2881

Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ (2002): Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106, 1288-1293

Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh PM, 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 Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9659-9663

Xu L, Lai D, Cheng J, Lim HJ, Keskanokwong T, Backs J, Olson EN, Wang Y (2010): Alterations of L-type calcium current and cardiac function in CaMKII $\{\delta\}$ knockout mice. *Circ Res* 107, 398-407

Yang Y, Zhu WZ, Joiner ML, Zhang R, Oddis CV, Hou Y, Yang J, Price EE, Gleaves L, Eren M (2006): Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (6), H3065-3075

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

Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H (2002): The cardiac-specific nuclear δ_B isoform of Ca/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, Brown JH (2004): Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 15, 476–486.

Zhang T, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, Chang S, Ling H, Bers DM, Maier LS (2007): CaMKII δ isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J Biol Chem* 282 (48), 35078-35087

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

Zucchi R, Ronca-Testoni S (1997): The Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Channel/Ryanodine Receptor: Modulation by Endogenous Effectors, Drugs and Disease States. *Pharmacol Rev* 49, 1-51