

Aus dem Institut für Pharmakologie

(Prof. Dr. med. W. – H. Zimmermann)

Im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie

Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

Kardiale Phänotypisierung einer transgenen Mauslinie mit herzspezifischer Calcium-Calmodulin-Kinase II δ_c - Überexpression auf einem Phosphatase-Inhibitor-1- Knockout-Hintergrund

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August- Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christina Brammen

aus

Wiesbaden

Göttingen 2015

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

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. El-Armouche

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Physiologie der Herzaktivität.....	4
1.2 Die elektromechanische Kopplung.....	4
1.3 Modulation der Herzaktion durch die β -adrenerge Signalkaskade.....	5
1.3.1 Der SR- Ca^{2+} -Freisetzungskanal RyR2	8
1.4 Herzinsuffizienz.....	10
1.4.1 Klinik der Herzinsuffizienz	10
1.4.2 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.....	11
1.4.3 Die Rolle der CaMKII δ_c in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz ..	12
1.4.4 Serin-/Threonin-Phosphatasen als entscheidende Modulatoren der Phosphoproteine	14
1.4.5 Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1)	15
1.5 Zielsetzung.....	18
2 Methoden	20
2.1 Kreuzungsstrategie zur Generierung der transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Linie .	20
2.2 Genotypisierung	21
2.2.1 Isolierung genomischer DNA.....	21
2.2.2 Genotypisierung mittels PCR	22
2.2.3 Gelelektrophorese	22
2.2.4 Genotypisierung der F2-Generation	23
2.3 Überlebensstudie	23
2.4 Organentnahme	24
2.5 Isolierung von Kardiomyozyten aus Mäuseherzen.....	24
2.6 Physiologische Methoden	25
2.6.1 Messungen der intrazellulären Ca^{2+} - Transienten am Epifluoreszenzmikroskop.....	25
2.6.2 Messungen des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks am Konfokalmikroskop	28
2.6.3 Echokardiographie.....	29
2.7 Statistische Auswertung.....	31
2.8 Verwendete Materialien	32
2.8.1 PCR-Primer und Bedingungen	32
2.8.2 Substanzen	35
2.8.3 Hilfsmittel und Geräte	36
3 Ergebnisse.....	39

3.1	Charakterisierung des Ca^{2+} -Haushalts und des SR- Ca^{2+} -Lecks der I-1 KO-Mauslinie.....	39
3.1.1	Morphologische und funktionelle Charakterisierung der I-1 KO-Mäuse.....	39
3.1.2	Analyse des intrazellulären Ca^{2+} -Haushalts der I-1 KO-Kardiomyozyten	40
3.1.3	Effekte einer I-1-Ablation auf den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt	40
3.1.4	Effekte einer I-1-Ablation auf das SR- Ca^{2+} -Leck	43
3.1.5	Untersuchung des antiarrhythmischen Phänotyps auf zellulärer Ebene	44
3.2	Kardiale Phänotypisierung der dC x I-1 KO-Mauslinie	46
3.2.1	Einfluss auf die Überlebenszeit	46
3.2.2	Morphologische Charakterisierung der CaMKII δ_c -I-1 KO-Mauslinie	47
3.2.3	Funktionelle Charakterisierung der CaMKII δ_c -I-1 KO-Mauslinie mittels Echokardiographie.....	49
3.2.4	Effekte einer I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -Mäusen auf den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt.....	52
3.2.5	Analyse des SR- Ca^{2+} -Lecks in dC x I-1 KO-Mäusen.....	56
4	Diskussion	58
4.1	Wissenschaftlicher Hintergrund und Fragestellung	58
4.2	Das transgene Mausmodell als Krankheitsmodell der Herzinsuffizienz – Vorteile und Limitationen.....	59
4.3	I-1-Ablation führt nicht zu einer kontraktile Dysfunktion	61
4.4	I-1-Ablation reduziert das SR- Ca^{2+} -Leck in murinen Kardiomyozyten und vermindert das diastolische Ca^{2+} -Level.....	61
4.5	I-1-Ablation im Herzinsuffizienzmodell einer transgenen CaMKII δ_c Maus.....	62
4.6	I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse verbessert nicht das Überleben	63
4.7	I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse führt zu kardialer Hypertrophie	64
4.8	Transgene CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse zeigen vermehrte kontraktile Dysfunktion in der Echokardiographie	64
4.9	I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäusen führt nicht zu einer Reversion der Veränderungen der elektromechanischen Kopplung	66
4.10	I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäusen führt nicht zu einem verminderten SR- Ca^{2+} -Leck	67
4.11	Vergleich zu anderen transgenen Modellen mit einer CaMKII-Inhibition.....	68
4.12	Ausblick	70

5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	73
	6.1 Internetquellen	83
7	Anhang.....	87
	7.1 Abkürzungsverzeichnis	87
	7.2 Abbildungsverzeichnis	91
	7.3 Tabellenverzeichnis	92
	7.4 Ergebnistabellen	93

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Herzaktivität

Das Herz hält das Blut in ständiger Zirkulation, um alle Organe mit lebensnotwendigem Sauerstoff zu versorgen. Um dieser Aufgabe nachzukommen, muss sich das Herz als muskuläres Hohlorgan regelmäßig und geordnet kontrahieren, um so das Blut in den Körper zu pumpen. Dies geschieht weitestgehend autonom. Als Taktgeber dient der Sinusknoten, der aus spontan aktiven Schrittmacherzellen besteht, die kein Ruhemembranpotenzial aufweisen. Die Aktionspotenziale (AP) gelangen über die Atrien zum AV-Knoten, zum His-Bündel und über die Tawaraschenkel zum rechten und linken Ventrikel. Vom Erregungsleitungssystem aus werden die APs über *Gap Junctions* an das Arbeitsmyokard weitergeleitet. Diese Art von Zell-Zell-Kontakt ermöglicht die Entstehung eines funktionellen Synzytiums.

Unter physiologischen Bedingungen schlägt das Herz mit einer Frequenz von 60 bis 80 Schlägen pro Minute. Um eine Anpassung der Frequenz und der Kontraktionskraft, beispielsweise an körperliche Belastungen, zu gewährleisten, ist das Herz unter anderem über das vegetative Nervensystem modulierbar.

1.2 Die elektromechanische Kopplung

Mit der elektromechanischen Kopplung wird ein Signalmechanismus beschrieben, der vom AP ausgehend zu einer mechanischen Kontraktion der Herzmuskelzelle führt. Dabei ist das Ca^{2+} -Ion der zentrale Signalstoff (Bers 2002). Erste Hinweise dafür sammelte Sydney Ringer bereits im 19. Jahrhundert (Ringer 1883). Intrazellulär existiert ein Ca^{2+} -Speicher: das sarkoplasmatische Retikulum (SR). Dort erfolgt die Ca^{2+} -Bindung insbesondere durch Calsequestrin (CSQ).

Anatomisch betrachtet reichen die sogenannten T-Tubuli, Einstülpungen des Sarkolemms, in die Kardiomyozyten hinein. Erreicht ein AP das Sarkolemm, kommt es zum schnellen Einstrom von Na^+ -Ionen und somit zur Depolarisation der

Zellmembran. Dies führt zur Öffnung von spannungsgesteuerten L-Typ Ca^{2+} -Kanälen (LTCC). Durch Bindung der Ca^{2+} -Ionen am Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2), der am SR lokalisiert ist, induzieren die Ca^{2+} -Ionen dessen Öffnung (*Trigger- Ca^{2+}*). Es kommt zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg von 10^{-7} M diastolisch zu 10^{-5} M systolisch. Daraufhin kommt es zur Bindung von Ca^{2+} an das myofibrile Troponin C. Diese Bindung leitet den Kontraktionszyklus quergestreifter Muskulatur ein.

Für die nun folgende Relaxation der Herzmuskelzelle muss das Ca^{2+} entgegen seinem Gradienten wieder zurück in den Extrazellulärraum und in das SR gepumpt werden. Das SR besitzt an seiner Membran eine Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), die das Ca^{2+} wieder zurück in den intrazellulären Speicher pumpt. Im Gegensatz zum Menschen wird in der Maus auf diesem Weg ~92% des Ca^{2+} aus dem Zytosol eliminiert (Mensch: ~70%). Im Austausch mit 3Na^+ (NCX) wird Ca^{2+} zurück in den Extrazellulärraum gepumpt (Maus: ~7%; Mensch: ~28%). 1% des zytosolischen Ca^{2+} wird über eine sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und einen mitochondrialen Uniporter aus dem Zytosol eliminiert (Mensch und Maus; Bers 2002). Das daraus resultierende Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt eine abnehmende Bindung von Ca^{2+} am myofibrilen Troponin C und damit die Beendigung der Kontraktion.

1.3 Modulation der Herzaktion durch die β -adrenerge Signalkaskade

Bei körperlicher Belastung steigt der Sauerstoffbedarf des Körpers, insbesondere der Skelettmuskulatur, an. Um sich diesem Bedürfnis anpassen zu können, muss es zu einer schnellen Steigerung des Herzzeitvolumens (HZV), dem Produkt der Herzfrequenz (HF) und des Schlagvolumens (SV), kommen. Dies erfolgt durch das sympathische Nervensystem. Die Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin führen zu einer Stimulation der β -Adrenozeptoren. Dies führt über intrazelluläre Signalkaskaden zu einer Steigerung der Herzfrequenz (positive Chronotropie), der Kontraktionskraft (positive Inotropie), der Erregungsüberleitung (positive Dromotropie) und der Relaxation (positive Lusitropie). Im Herzen konnten drei Isoformen der β -Adrenozeptoren nachgewiesen werden: zu 70-80% der Subtyp β_1 , zu 20% der Subtyp β_2 und zu einem sehr geringen Anteil auch der Subtyp β_3 , dessen funktionelle Bedeutung bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt ist (Gauthier et al. 1998).

Bei einer Aktivierung des β -Adrenozeptors kommt es über GTP-bindende Proteine (G-Proteine) zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase (AC). Diese katalysiert die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). Eine Konzentrationserhöhung des sekundären Botenstoffs cAMP führt zu einer allosterischen Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die PKA phosphoryliert entscheidende Schlüsselproteine der elektromechanischen Kopplung, die gemeinsam zu einer Steigerung der kardialen Funktion beitragen (Bers 2002; Lohse et al. 2003; El-Armouche und Eschenhagen 2009).

Durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung des LTCC kommt es zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum und daraus resultierend auch zu einer gesteigerten Ca^{2+} -getriggerten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Zusätzlich dazu wird auch der RyR2 selbst PKA-abhängig phosphoryliert (siehe Kapitel 1.3.1), was eine weitere Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Folge hat (Bers 2002; Lohse et al. 2003; Lehnart et al. 2009). Beide Faktoren tragen zum positiv inotropen Effekt bei.

Bezüglich der positiv lusitropen Effekte im Sinne einer beschleunigten Relaxation sind folgende Ca^{2+} -regulierenden Proteine von Bedeutung: Phospholamban (PLB), Troponin I (TnI) und das Myosin-bindende Protein C (C-Prot). Zu einer Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente und somit zu einer schnelleren Relaxation führt eine PKA-abhängige Phosphorylierung des TnIs (Serin 23/24) und des C-Prot (Serin 282). Eine zentrale Rolle der Ca^{2+} -regulierenden Proteine nimmt das PLB ein. Es ist ein reversibel phosphorylierbares, transmembranäres Protein mit Lokalisation am SR. Eine Phosphorylierung dieses Proteins an der PKA-Stelle Serin 16 bewirkt eine Modulation der SERCA2a-Aktivität. Unter β -adrenerger Stimulation kommt es PKA-abhängig zu einer verminderten Hemmung der SERCA2a und damit zu einer beschleunigten Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR bzw. zu einer schnelleren Relaxation. Darüber hinaus führt die gesteigerte Aktivität der SERCA2a auch zu einer stärkeren Füllung des SRs und trägt so über eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung in der Systole wesentlich zur positiv inotropen Wirkung bei (Bers 2001). Die Dephosphorylierung erfolgt vorwiegend über die Protein-Phosphatase-1 (PP1), aber zusätzlich auch durch die Protein-Phosphatase-2A (PP2A; MacDougall et al. 1991).

Auch die HF wird durch einen intrazellulären Konzentrationsanstieg von cAMP gesteigert. Dabei verschiebt sich die Aktivierungsschwelle der HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels*) in den Schrittmacherzellen in Anwesenheit von cAMP hin zu positiveren Membranpotenzialen, was mit einer leichteren Erregbarkeit einhergeht. Somit kommt es zum positiv chronotropen Effekt. Darüber hinaus werden in den Sinusknotenzellen auch die LTCC verstärkt PKA-abhängig phosphoryliert, was über eine Erhöhung der Anstiegssteilheit der APs zur Steigerung der HF beiträgt (DiFrancesco und Tortora 1991; Shaw and Colecraft 2013)

Um den cAMP/PKA-Signalweg im Gleichgewicht zu halten, erfolgt eine Aktivitätskontrolle unter anderem durch zwei Komponenten: cAMP-abbauende Phosphodiesterasen (PDE) und Protein-Phosphatasen. Diese besitzen neben einer katalytischen Untereinheit verschiedene regulatorische Untereinheiten, wie beispielsweise den in dieser Arbeit untersuchten im Herzen dominierenden Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1). Dieser selbst ist jedoch auch ein PKA-abhängiges Phosphoprotein (siehe Kapitel 1.4.5).

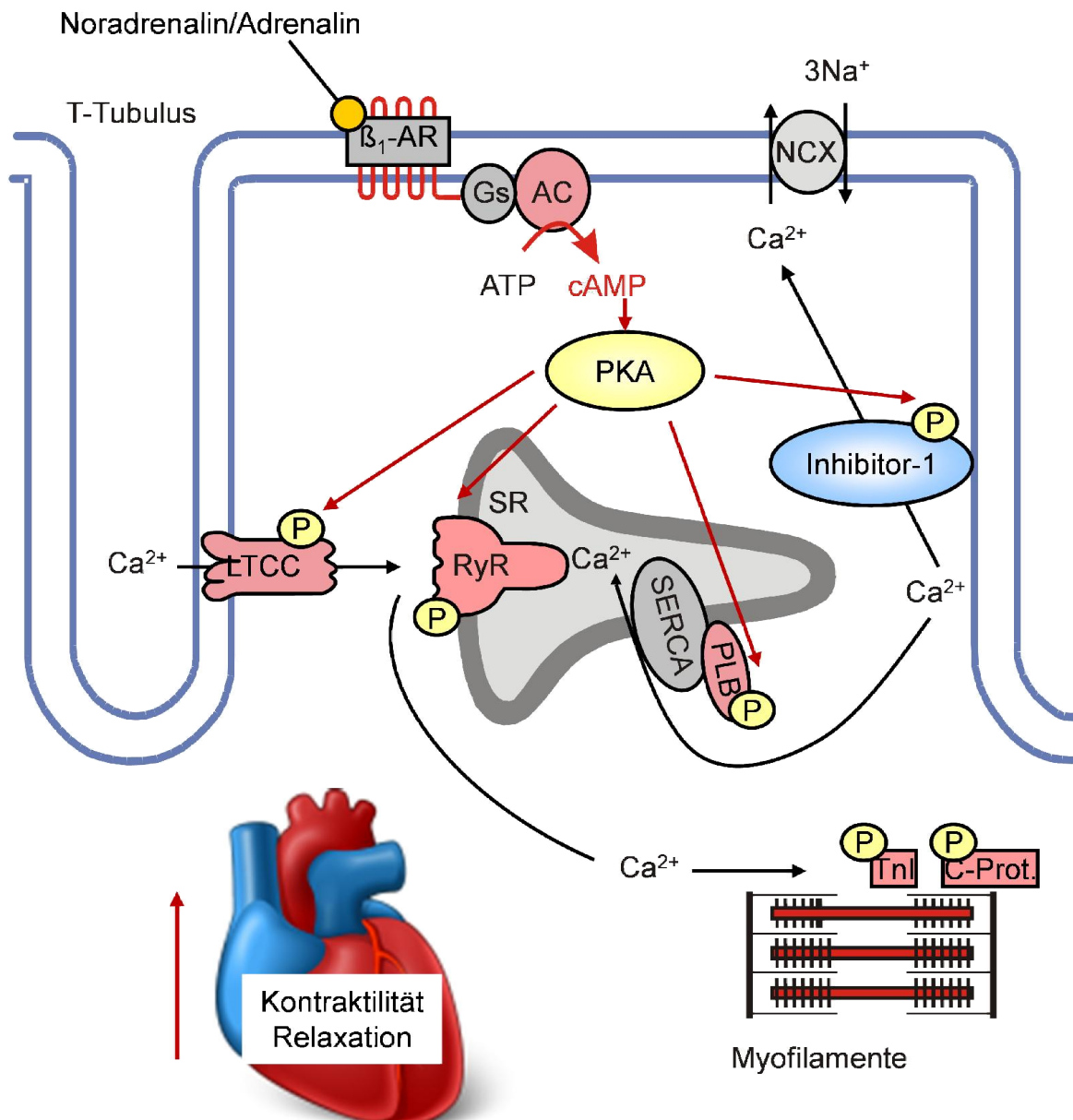


Abb. 1.1: Übersicht der β -Adrenozeptor-Signalkaskade in ventrikulären Kardiomyozyten. Die Bindung von Noradrenalin oder Adrenalin führt zu einer Stimulation des β -Adrenozeptors. Intrazellulär führt dies über einen cAMP-Konzentrationsanstieg zur Aktivierung der PKA. Als Kinase phosphoryliert sie entscheidende Regulatorproteine der elektro-mechanischen Kopplung: RyR2, LTCC, PLB, Tnl, C-Prot und den I-1. Im Zusammenspiel führt dies letztendlich zu einer Steigerung der Kontraktilität und Beschleunigung der Relaxation (Modifiziert nach Bers 2001, Wittköpper 2009).

1.3.1 Der SR- Ca^{2+} -Freisetzungskanal RyR2

In Säugetieren konnten drei verschiedene Isoformen des RyR nachgewiesen werden: RyR1, vorwiegend in der Skelettmuskulatur, und RyR3 in verschiedenen Geweben. Die kardial vorherrschende Isoform ist der RyR2 (Nakai et al. 1990). RyR-

Monomere, die jeweils ein molekulares Gewicht von 565 kDa aufweisen, formieren sich zu funktionellen Einheiten als Homotetramere (Otsu et al. 1990). Im Folgenden wird nur auf die spezifische Isoform des Herzens, RyR2, eingegangen.

Marx et al. (2000) konnten zeigen, dass der RyR2 Teil eines Megakomplexes aus dem FK-Bindeprotein 12.6. (FKBP12.6), zwei Phosphatasen, PP1 und PP2A und einem PKA-Ankerprotein (mAKAP) ist.

Die Regulierung des RyR2 erfolgt über verschiedene Angriffspunkte: (i) physiologisch über Ca^{2+} , Mg^{2+} und ATP, (ii) nicht-physiologisch über Koffein (reversibel) und das Pflanzenalkaloid Ryanodin (irreversibel), die zu einer Öffnung und spontanen Entleerung des SR- Ca^{2+} über den RyR2 führen und (iii) über den Phosphorylierungszustand.

Es sind bereits mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen bekannt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt weiß man von zwei verschiedenen Kinasen, die den RyR2 phosphorylieren: (i) die PKA (Takasago et al. 1989; Marx et al. 2000; Xiao et al. 2005) und (ii) die Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase II (CaMKII; Takasago et al. 1991; Witcher et al. 1991; Wehrens et al. 2004a).

Die zuerst beschriebene PKA-abhängige Phosphorylierung erfolgt an Serin 2808 (murin 2809; Marx et al. 2000). In Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass auch Serin 2030 PKA-abhängig phosphoryliert wird (Xiao et al. 2005). Interessanterweise blieb Serin 2808 unter PKA-Inhibition weiterhin phosphoryliert, Serin 2030 jedoch nicht. Dies bedeutet, dass Serin 2030 und nicht Serin 2808 die hauptsächliche PKA-Phosphorylierungsstelle des RyR2 sein könnte (Xiao et al. 2006).

Die CaMKII phosphoryliert ebenfalls an Serin 2808 (Witcher et al. 1991; Rodriguez et al. 2003). Wehrens et al. (2004a) beschreiben eine zusätzliche Phosphorylierungsstelle der CaMKII an Serin 2814 (murin 2815). Es wird beschrieben, dass eine *In-vivo*- bzw. *In-Vitro*-Überexpression der CaMKII in Mäusen (Maier et al. 2003; Kohlhaas et al. 2006) zu einer gesteigerten RyR2-Phosphorylierung an Serin 2815 (Wehrens et al. 2004a; Ai et al. 2005; Guo et al. 2006; Curran et al. 2007) und dadurch zu einer erhöhten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR führt.

1.4 Herzinsuffizienz

In der Bundesrepublik Deutschland stehen die Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems mit 349.217 Todesfällen im Jahr 2012 auf Platz eins der Liste der Todesursachen (Statistisches Bundesamt 2014). Davon entfällt der größte Anteil auf ischämische Myokarderkrankungen oder auf die Herzinsuffizienz. Die Prognose der Herzinsuffizienz ist schlecht: 50% der Patienten versterben innerhalb von vier Jahren (McMurray und Stewart 2000). Alarmierend ist des Weiteren, dass die Rate der Neuerkrankungen in den Industriestaaten weiter ansteigt.

1.4.1 Klinik der Herzinsuffizienz

Ist das Herz nicht mehr in der Lage, den Körper ausreichend mit Blut und somit mit Sauerstoff zu versorgen, liegt eine Herzinsuffizienz vor. Klinisch zeigen die betroffenen Patienten eine progrediente Dyspnoe, Belastungsintoleranz und eine Flüssigkeitsretention. Als Ursache kommen eine Vielzahl von unterschiedlichen Herzerkrankungen in Frage, die alle zu einer gemeinsamen Endstrecke führen: der Herzinsuffizienz. Beispielfhaft zu nennen sind die koronare Herzerkrankung, die primäre und sekundäre Kardiomyopathie, der arterielle Hypertonus oder die verschiedenen Herzklappenvitien (Ho et al. 1993a; Ho et al. 1993b). Die aus der Herzmuskelschwäche resultierende Minderversorgung der Gewebe mit Sauerstoff führt zu einer Aktivierung des neurohumoralen Systems. Es kommt zur Neurotransmitterausschüttung von Noradrenalin und Adrenalin und zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Dies führt kurzzeitig zu einer peripheren Vasokonstriktion und temporären Stabilisierung des kardialen Auswurfs (Eschenhagen 2008). Langfristig kommt es jedoch zu einer Desensitivierung des β -adrenergen Systems. Es folgen eine Myokardhypertrophie und schließlich ein fibrotischer Umbau des Herzmuskelgewebes, der die Kontraktionskraft im Sinne eines *Circulus vitiosus* stetig verschlechtert (siehe Abb. 1.2; El-Armouche and Eschenhagen 2009).

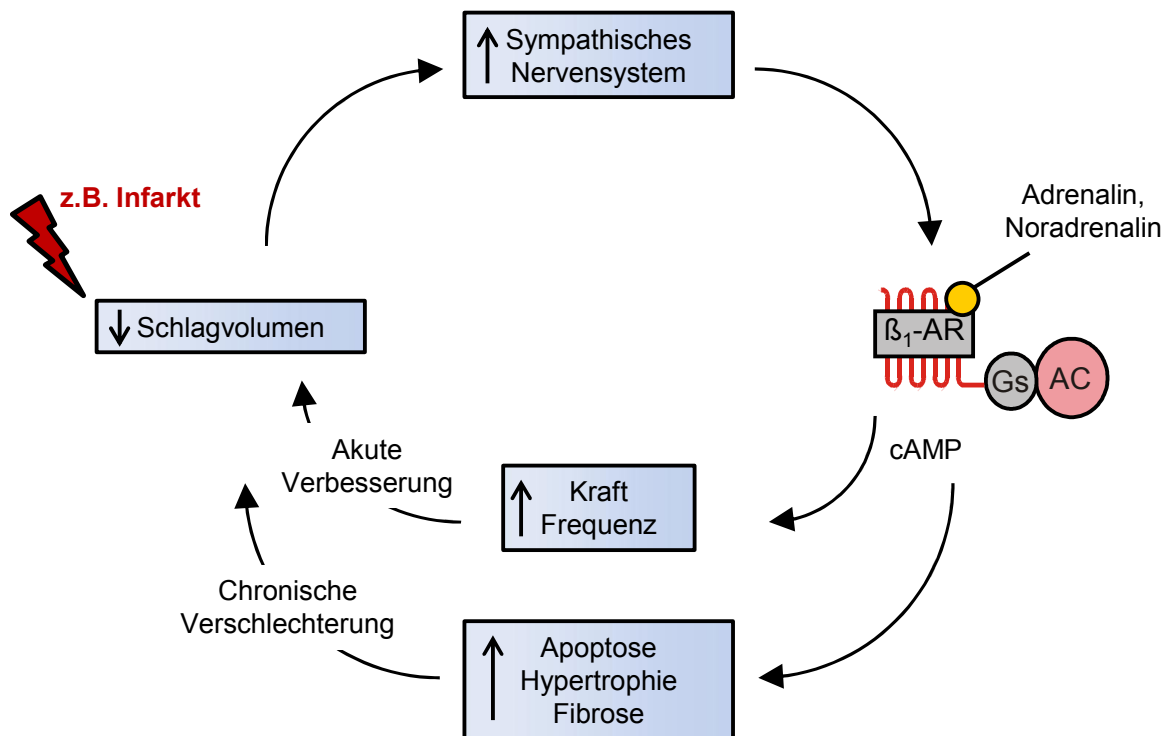


Abb. 1.2: Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz. (Modifiziert nach El-Armouche und Eschenhagen 2009).

Abhängig von der Leistungsfähigkeit des Patienten lässt sich die Herzinsuffizienz klinisch in die Stadien I bis IV nach der Klassifikation der *New York Heart Association* (NYHA) einteilen.

Eine definitive Heilung in der Herzinsuffizienztherapie gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung nicht, abgesehen von einer Herztransplantation. Um den Progress der Erkrankung zu verlangsamen, erfolgt eine Medikamententherapie mit ACE-Inhibitoren bzw. Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten (Sartane), β -Adrenozeptor-Antagonisten, Diuretika und Aldosteron-Antagonisten ("Nationale Versorgungsleitlinie "Chronische Herzinsuffizienz" 7/2013). Alle aufgezählten Medikamente wirken hinsichtlich einer Durchbrechung der neurohumoralen Aktivierung des *Circulus vitiosus* und führen zu einer Prognoseverbesserung.

1.4.2 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Eine wesentliche Ursache der Herzinsuffizienz ist die schon beschriebene β -adrenerge Desensitivierung (siehe Kapitel 1.4.1). Die verminderte Ansprechbarkeit auf eine Katecholamin-Stimulation gründet sich auf verschiedene Mechanismen: (i)

eine Herunterregulation der β_1 -Adrenozeptoren mit erheblich vermindertem mRNA-Gehalt, korrelierend zur Schwere der Erkrankung (Engelhardt et al. 1996), (ii) eine Entkopplung der β_1 -Adrenozeptoren und der stimulierenden G-Proteine (G_s) durch desensitivierende β -Adrenozeptorkinasen (Ungerer et al. 1993) und (iii) eine gesteigerte Expression inhibitorischer G-Proteine (G_i ; Neumann et al. 1988). Die Bedeutung dieser Mechanismen ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt, was die Suche nach dem richtigen therapeutischen Ansatz erschwert.

Biochemisch sind insbesondere Veränderungen der Phosphorylierungszustände regulatorischer Phosphoproteine der Ca^{2+} -Homöostase von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Im Zusammenhang mit der cAMP/PKA-Signalkaskade kommt es infolge der β -adrenergen Desensitivierung zu einer verminderten Phosphorylierung von TnI, Troponin C und PLB (Lohse et al. 1996; Dash et al. 2001; El-Armouche et al. 2007b; Solaro et al. 2008). Letztgenanntes könnte insbesondere für ein Relaxationsdefizit verantwortlich sein (Bartel et al. 1996; El-Armouche et al. 2007a). Die bestehende Hypophosphorylierung im Zusammenhang mit einer verminderten Expression der SERCA2a könnte für eine Senkung der diastolischen Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR verantwortlich sein (Hasenfuss 1998). Dem steht eine gesteigerte Phosphorylierung des LTCC (Schröder et al. 1998) und des RyR2 (Marx et al. 2000) gegenüber. Durch den damit entstehenden zytosolischen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration entsteht ein gesteigertes Risiko für Arrhythmien. Mechanistisch lässt sich dies folgendermaßen erklären: Durch die oben beschriebene verminderte Aktivität der SERCA2a wird vermehrt Ca^{2+} über den NCX aus der Zelle transportiert (Hasenfuss 1998). Im Gegenzug werden für jedes Ca^{2+} -Ion drei Na^+ -Ionen in die Zelle transportiert. Dadurch kann es zu Membrandepolarisationen kommen verbunden mit einem erhöhten Risiko für ventrikuläre Arrhythmien.

1.4.3 Die Rolle der CaMKII δ_c in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Neben dem cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg spielt die CaMKII eine entscheidende Rolle für die zellulären Veränderungen in der Herzinsuffizienz. Die Gruppe der Ca^{2+} /Calmodulin-Kinasen besteht aus der CaMKI, II und IV. Daneben bestehen verschiedene gewebsspezifische Isoformen. Die kardial vorherrschende Isoform ist die CaMKII δ , von der wiederum zwei verschiedene Slicevarianten

existieren: δ_b und δ_c . Sie unterscheiden sich durch die 11 Aminosäuren lange Kernlokalisationssequenz der δ_b Splicevariante (Zhang et al. 2002; Hudmon und Schulman 2002). Die CaMKII δ_c ist im Zytosol lokalisiert. Aufgebaut ist die CaMKII aus einer katalytischen Domäne, einer zentralen Regulationsdomäne und einer Verbindungsdomäne. Letztgenannte ist verantwortlich für die Oligomerisierung. Die CaMKII ist ein Holoenzym, bestehend aus einem Homo- oder Heteromultimer aus 6 bis 12 Untereinheiten, die sich zu einer ringförmigen Struktur formieren.

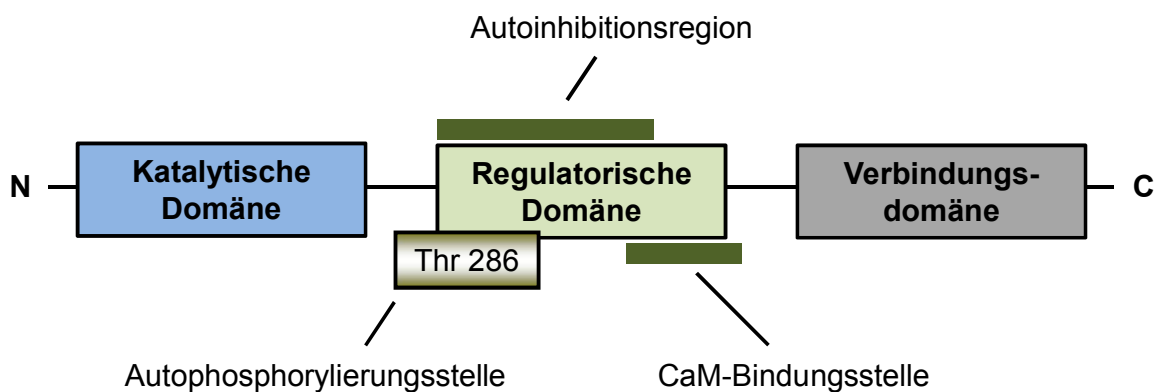


Abb. 1.3: Aufbau der CaMK. (Modifiziert nach Maier und Bers, 2002).

Bei einem zytosolischen Konzentrationsanstieg des Ca^{2+} kommt es zur Aktivierung der CaMKII durch Calmodulin (CaM). Dies führt zu einer Konformationsänderung, die die katalytische Domäne für Zielsubstrate zugänglich macht. Eine Autophosphorylierung ist nicht zwingend notwendig für eine Aktivierung der CaMKII, jedoch steigert sich dadurch die Affinität von CaMKII für Calmodulin, was zu einer massiven Aktivitätssteigerung führt. Gleichzeitig kommt es zu einer Deaktivierung der Autoinhibitionsregion (Maier 2005). Eine endgültige Deaktivierung erfolgt ausschließlich über eine Dephosphorylierung durch PP1, PP2A oder PP2C.

Als Substrate der CaMKII δ_c konnten unter anderem LTCC, RyR2, PLB und SERCA2A identifiziert werden (Maier und Bers, 2002). Somit ist die CaMKII δ_c maßgeblich an der Regulation der elektromechanischen Kopplung beteiligt. Zusätzlich beeinflusst die CaMKII δ_c auch die Gentranskription im Sinne einer Myokardhypertrophie. Durch ansteigende Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytosol, wie es bei einer Herzinsuffizienz gegeben ist, transloziert CaM in den Zellkern und steigert seine eigene Expression (Maier und Bers 2002). Da CaM wiederum die CaMKII δ_c

aktiviert, kommt es letztlich zu einer vermehrten Aktivierung der CaMKII δ_c . Als Folge lässt sich eine vermehrte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding protein*) beobachten, die letztlich zu einer Hypertrophie-Induktion beiträgt (Hook und Means 2001; Wu et al. 2006).

Eine transgene Mauslinie, die die CaMKII δ_c herzsprezifisch dreifach überexprimiert, zeigte im Vergleich zum WT ein doppelt so hohes Herz/Körpergewicht-Verhältnis bei drei Monate alten Mäusen (Zhang et al. 2003). Eine schwere Herzinsuffizienz präsentierte sich im Sinne einer Dilatation, die echokardiographisch festgestellt wurde. Auf molekularer Ebene zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung des PLB an Threonin 17, nicht jedoch an der PKA-assoziierten Phosphorylierungsstelle Serin 16. Trotz eines erniedrigten SR-Ca²⁺-Gehalts wurde eine erhöhte Ca²⁺-Spark-Frequenz gemessen. Dies lässt sich am ehesten auf die gesteigerte Phosphorylierung am RyR2 zurückführen. Mittels Co-Immunopräzipitation gelangen Zhang et al. 2003 der erste Nachweis einer direkten Assoziation von CaMKII δ_c und RyR2. Als RyR2-Phosphorylierungsstelle der CaMKII δ_c konnte Serin 2815 festgestellt werden (Zhang et al. 2003; Maier et al. 2003)

1.4.4 Serin-/Threonin-Phosphatasen als entscheidende Modulatoren der Phosphoproteine

Der Phosphorylierungszustand eines Phosphoproteins spiegelt die Aktivität der Proteinkinasen und -phosphatasen wider. Somit können die Phosphatasen, ebenso wie die Kinasen, entscheidend in die Regulation der Phosphoproteine eingreifen.

Zur Familie der Serin-/Threonin-Phosphatasen gehören vier Hauptgruppen: PP1, PP2A, PP2B und PP2C (Cohen und Cohen 1989). Kardial dominierend sind die PP1 und die PP2A, die auch als Calcineurin bezeichnet wird (Lüss et al. 2000). Es existieren sowohl katalytische als auch regulatorische Untereinheiten. Die hoch konservierten katalytischen Untereinheiten der PP1 gliedern sich in vier verschiedene Isoformen: 1 α , 1 β , 1 γ_1 und 1 γ_2 (Sasaki et al. 1990). Zu den zahlreichen regulatorischen Untereinheiten gehören unter anderem die inhibitorischen Untereinheiten. Die PP1 wird insbesondere durch den I-1 und den Protein-Phosphatase-Inhibitor-2 (I-2) gehemmt (Cohen 2002).

Sowohl in der menschlichen Herzinsuffizienz, als auch im Großtiermodell konnte eine gesteigerte PP1-Aktivität nachgewiesen werden (Neumann et al. 1997; Yamada et al. 2006). Boknik et al. (2000) konnten zeigen, dass chronisch Isoprenalin stimulierte Ratten eine vermehrte Hypertrophie und eine gesteigerte PP1-Aktivität aufweisen, die höchstwahrscheinlich auf eine β -adrenerge Überstimulation zurückzuführen ist.

1.4.5 Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1)

1976 wurde I-1 zum ersten Mal in Kaninchen-Skelettmuskulatur nachgewiesen und war der erste bekannte endogene Inhibitor der PP1 (Huang und Glinsmann, 1976).

I-1 ist ein säure- und hitzestabiles Protein mit einem Molekulargewicht von ~19 kDa. Insbesondere im Zytosol der folgenden Gewebe wurde eine starke I-1 Expression festgestellt: Gehirn, Skelettmuskulatur, Niere und Fettgewebe (MacDougall et al. 1989). Neumann et al. (1991) schenken erstmals auch der kardialen Expression des I-1 Bedeutung.

I-1 besitzt eine spezieübergreifende, hoch konservierte Primärstruktur mit einer Strukturhomologie der Gesamtsequenz von ca. 80% (Maus, Ratte, Kaninchen und Mensch; Elbrecht et al. 1990; El-Armouche et al. 2003). Strukturell befindet sich das PP1-Bindungsmotiv (9 KIQF 13) am N-Terminus. Des Weiteren befindet sich dort die cAMP-/PKA-assoziierte Phosphorylierungsstelle an Threonin 35 (Goldberg 2003; Egloff et al. 1997). Ausschließlich im phosphorylierten Zustand hemmt der I-1 sehr potent und spezifisch die PP1 (Aitken and Cohen 1982). Neben der PKA ist der I-1 auch ein Substrat der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase Ca (PKC α), jedoch mit funktionell gegensinnigem Effekt. Die PKC α -abhängige Phosphorylierung an Serin 67 (Braz et al. 2004) und Threonin 75 (Rodriguez et al. 2006) führt zu einer verminderten I-1 Aktivität (Rodriguez et al. 2007). Unterstützt wird diese Feststellung durch Braz et al. (2004). Sie zeigten, dass PKC α -KO Mäuse eine verminderte PP1-Aktivität aufweisen, was sich mechanistisch mit einer gesteigerten I-1 Aktivität vereinbaren lässt. Kardial wird der I-1 durch die PP2A und PP2B dephosphoryliert und damit inaktiviert (El-Armouche et al. 2006), wobei *in vivo* die PP2B zu dominieren scheint.

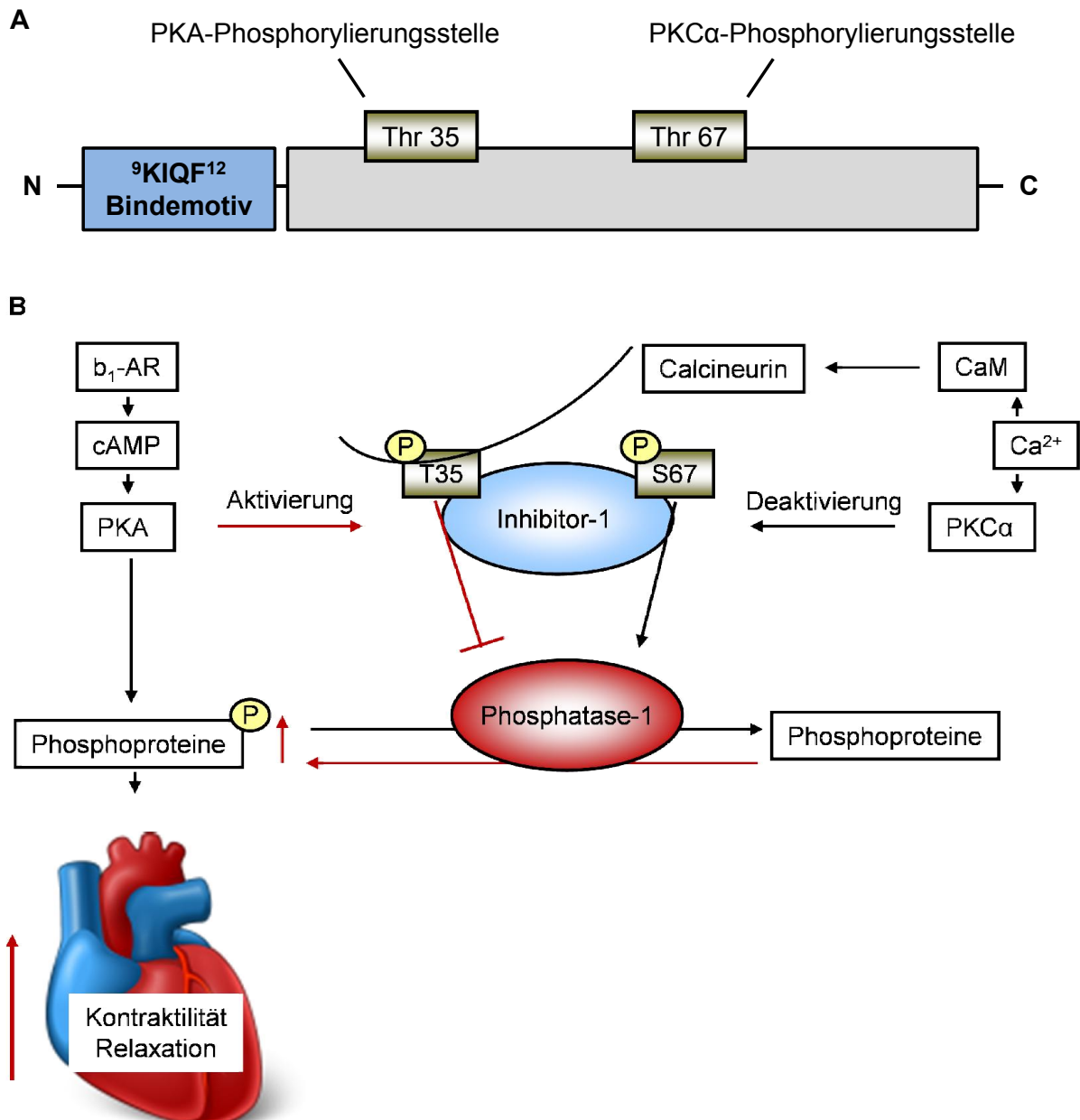


Abb. 1.4: Verbindungselement zwischen PKA und PP1: der Inhibitor-1. (A) Struktur des I-1. (B) Über eine β -adrenerge Stimulation kommt es über die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA unter anderem zur Phosphorylierung des I-1. Antagonistisch dazu wirkt die PP1, indem sie die Phosphoproteine dephosphoryliert. Im PKA-abhängigen phosphorylierten Zustand steigert der I-1 die Phosphorylierung der Phosphoproteine durch Hemmung der PP1. Eine Hemmung des I-1 erfolgt über die Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierung durch die PKC α . Ebenfalls Ca^{2+} -abhängig wird Calcineurin (PP2A) aktiviert. Dies führt zur Dephosphorylierung des I-1 und somit zu dessen Deaktivierung (Modifiziert nach Wittköpper 2009 und Wittköpper et al. 2011).

In der Herzinsuffizienz kommt es zur Desensitivierung des β -adrenergen Systems. Die dabei beobachtete erhöhte PP1-Aktivität (Bokník et al. 2000) wirft die Frage auf, ob eine Dysregulation des I-1 mit der β -adrenergen Desensitivierung in Verbindung

steht. Die Annahme unterstützend, wurde in humanem herzinsuffizientem Myokard eine verminderte Proteinmenge (ca. 57%) und eine verringerte PKA-Phosphorylierung (ca. 72%) des I-1 gefunden (El-Armouche et al. 2003; El-Armouche et al. 2004). Des Weiteren konnte im Katecholamin-induzierten Herzinsuffizienzmodell eine verminderte I-1 mRNA- und Proteinkonzentration festgestellt werden (El-Armouche et al. 2007b). Somit ist die verminderte Phosphorylierung des I-1 vermutlich Folge (i) der β -adrenergen Desensitivierung, die mit erniedrigtem cAMP-Spiegel und verminderter PKA-Aktivierung einhergeht, und (ii) der gesteigerten PP2B-Aktivität, insbesondere bei erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen. Dies bietet einen Ansatz, die gesteigerte PP1-Aktivität mechanistisch zu erklären. Anschließende Untersuchungen am Herzinsuffizienzmodell, einschließlich Großtiermodellen, bestätigten die Herunterregulation und verminderte Phosphorylierung des I-1 (Gupta et al. 2003; Gupta et al. 2005; El-Armouche et al. 2007b).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der kardialen Bedeutung des I-1. El-Armouche et al. (2003) zeigten, dass eine I-1-Überexpression in Rattenkardiomyozyten durch adenoviralen Gentransfer zu einer Supersensitivität gegenüber Katecholaminen und zu einer vermehrten Phosphorylierung von PLB führt. Diese Ergebnisse werden gestützt von der Erkenntnis, dass es in herzinsuffizienten humanen Kardiomyozyten mit adenoviraler Überexpression von konstitutiv-aktivem I-1 zu einer Resensitivierung gegenüber Katecholaminen kommt (Carr et al. 2002). Diese Ergebnisse zeigen *in vitro* die Funktion des I-1 als Verstärkerelement der β -adrenergen Signalkaskade.

Herzen von I-1 *Knockout* (KO) Mäusen zeigten *in vitro* unter Langendorff-Perfusion eine verminderte basale Kontraktilität. Unter β -adrenerger Stimulation konnte zudem eine erniedrigte maximale kontraktile Reserve festgestellt werden (Carr et al. 2002). El-Armouche et al. (2008) hingegen stellten eine normale basale Kontraktilität fest. Die Ursache für diese Diskrepanz bleibt bis jetzt unklar. Jedoch konnte gezeigt werden, dass weder die Dichte der β -Adrenozeptoren noch die PP1-Aktivität gegenüber dem WT verändert waren, was gegen eine Kompensation in den I-1 KO-Herzen spricht (Carr et al. 2002; El-Armouche et al. 2008). Des Weiteren zeigen Mäuse mit einer I-1-Ablation keine veränderte Lebenserwartung (Carr et al. 2002; El-Armouche et al. 2008). Interessanterweise zeigte sich unter β -adrenerger Stimulation

mittels implantierter Isoprenalin-Minipumpen in den I-1 KO-Mäusen ein langfristiger Schutz vor Hypertrophie, Dilatation und Fibrose; akut schützte die I-1-Ablation vor Katecholamin-induzierten Arrhythmien (El-Armouche et al. 2008). Der I-1 KO hat zudem Einfluss auf wichtige Phosphoproteine der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase. Carr et al. (2002) stellten mittels eines immunologischen Nachweises eine Hypophosphorylierung des PLB an Serin 16 und Threonin 17 fest. Am RyR2 kommt es zu einer verminderten Phosphorylierung an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Serin 2815, nicht jedoch an der PKA-Phosphorylierungsstelle Serin 2809 (El-Armouche et al. 2008). Dies wirft die Frage auf, ob die CaMKII-Phosphorylierung I-1 abhängig reguliert wird. In Neuronen scheint der I-1 in wechselseitiger Beziehung zwischen PKA und CaMK durch Hemmung der PP1-assoziierten Dephosphorylierung der CaMKII an Threonin 2807 zu stehen (Blitzer et al. 1998). In Kardiomyozyten ist dies bis zum heutigen Zeitpunkt unklar.

1.5 Zielsetzung

In der Herzinsuffizienz kommt es zu einer kardialen Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_c$. Dies trägt zur Progression der Herzinsuffizienz, kardialen Hypertrophie und einem vermehrtem Auftreten von Arrhythmien bei. Als ein Mechanismus für die Entwicklung der Herzinsuffizienz konnte auf molekularer Ebene in Mäusen eine gesteigerte Phosphorylierung des RyR2 identifiziert werden. Interessanterweise wiesen $\text{CaMKII}\delta_c$ überexprimierende Mäuse ein damit verbundenes vermehrtes SR- Ca^{2+} -Leck bereits vor Entwicklung der Herzinsuffizienz auf.

Der I-1 hingegen ist in der Herzinsuffizienz vermindert exprimiert und vermindert phosphoryliert. Im I-1 KO-Mausmodell konnte *in vivo* ein Schutz vor Arrhythmien bereits gezeigt werden. Außerdem wurde festgestellt, dass I-1 KO-Mäuse eine verminderte Phosphorylierung an der $\text{CaMKII}\delta_c$ -Phosphorylierungsstelle des RyR2 – nicht jedoch an der PKA-Phosphorylierungsstelle – aufweisen. Dies legt die Vermutung nahe, dass das damit im engen Zusammenhang stehende SR- Ca^{2+} -Leck vermindert sein könnte. Dies und der zellulärer Ca^{2+} -Haushalt wurden jedoch bislang noch nicht im I-1 KO-Mausmodell untersucht.

Weiter lässt sich die Hypothese ableiten, dass durch ein I-1 KO bedingtes vermindertes Ca^{2+} -Leck von Geburt an der Progress des schweren $\text{CaMKII}\delta_c$ -assoziierten Phänotyps verbessert wird. Deswegen sollen im Rahmen dieser Arbeit I-1 KO-Mäuse mit transgenen $\text{CaMKII}\delta_c$ -überexprimierenden Mäusen gekreuzt werden, um den Effekt der I-1-Ablation im Herzinsuffizienzmodell zu analysieren. Folgende Aspekte sollen ausführlich untersucht werden:

- a) Analyse der I-1 KO-Kardiomyozyten bezüglich des intrazellulären Ca^{2+} -Haushalts und des SR- Ca^{2+} -Lecks.
- b) Kardiale morphologische und funktionelle Phänotypisierung der transgenen $\text{CaMKII}\delta_c$ -I-1 KO-Mauslinie.

2 Methoden

Die Mäuse aller hier aufgeführten Tierexperimente wurden in der zentralen Tierzucht für Experimentelle Medizin der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet und versorgt. Alle Experimente und Untersuchungen wurden nach den Richtlinien des Europäischen Parlaments durchgeführt (2010/63/EU); Tierversuchsantragsaktenzeichen: 33.14-42502-04-11/0579.

2.1 Kreuzungsstrategie zur Generierung der transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Linie

Um den Effekt einer I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -Mäusen von Geburt an zu untersuchen, wurden I-1 KO-Mäuse mit transgenen CaMKII δ_c -überexprimierenden Mäusen gekreuzt (siehe Abb. 2.1). Für die basale Charakterisierung folgten aus der Kreuzungsstrategie vier verschiedene Genotypen, die alle Geschwister sind: transgene CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse (dC x I-1 KO), transgene CaMKII δ_c -Mäuse (dC), die I-1 KO-Mäuse (I-1 KO) und die Wildtyp-Mäuse (WT) als Kontrollgruppe.

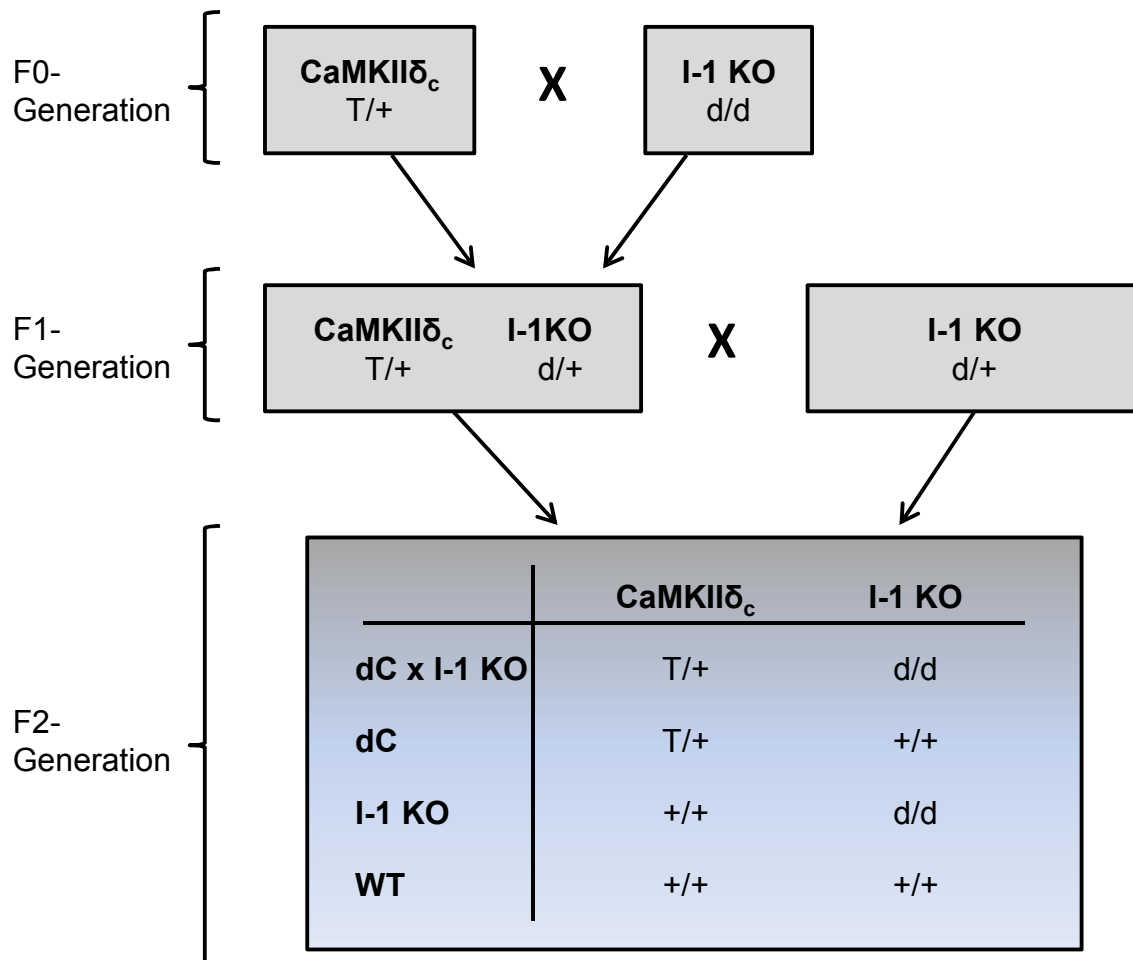


Abb. 2.1: Kreuzungsstrategie zur Generierung der $\text{CaMKII}\delta_c$ -I-1 KO-Linie. $\text{CaMKII}\delta_c$ -Mäuse wurden mit I-1 KO-Mäusen gekreuzt (F0-Generation). Anschließend wurden heterozygote Mäuse der I-1-Ablation und der $\text{CaMKII}\delta_c$ miteinander verpaart (F1-Generation). Die Nachkommen aus dieser Verpaarung wurden für die weiteren Experimente verwendet (F2-Generation). Transgen (T), Wildtyp (+) und *Knockout* (d).

2.2 Genotypisierung

2.2.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Genotypisierung wurden Schwanzbiopsien 5 Tage alter Mäuse verwendet. Zur Isolierung der genomischen DNA wurden die Schwanzbiopsien bei 55°C über Nacht in 500 µl Digestionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM EDTA, pH 8, 0,5% SDS) und 400 µg/ml Proteinase-K verdaut. Danach wurden 500 µl *DNA-Isolation Reagent for Genomic DNA Kit* (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

hinzugegeben. Das DNA-Pellet wurde mit absolutem Ethanol ausgefällt. Der Ansatz wurde anschließend bei 11.000 rcf für 10 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes mit einer Glaspipette wurde das DNA-Pellet zweimal mit 95%igem Ethanol gewaschen und dabei nach jedem Waschvorgang für 2 min bei 1500 rcf erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet für 1h an der Luft getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (1 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, pH 7,4) aufgenommen. Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37°C auf dem Thermomixer geschüttelt. Die gelöste isolierte genomische DNA wurde anschließend bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

2.2.2 Genotypisierung mittels PCR

Die Genotypisierung aller experimentell verwendeten Mäuse erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion. Die verwendeten Primer, der PCR-Ansatz und die PCR-Bedingungen sind in Kapitel 2.8.1 aufgelistet. Dazu wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz die *DreamTaqTM Green DNA Polymerase* (Fermentas, Vilnius, Litauen) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA erfolgte durch ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1%-1,2%) (siehe Kapitel 2.2.3).

2.2.3 Gelelektrophorese

Die jeweilige DNA wurde in einer Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt. In Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße wurden 1-1,2%ige Gele verwendet. Durch Aufkochen wurde die Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 2 mM Natriumedetat, pH 8,5) gelöst und anschließend mit 0,2-0,5 µg/µl Ethidiumbromid versetzt. Die *DreamTaqTM Green DNA Polymerase* (Fermentas, Vilnius, Litauen) erforderte keinen separaten Ladepuffer. Als Referenz wurde, je nach erwarteter Größe, ein Molekulargewichtsmarker (*GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder* oder *GeneRulerTM 1kb Plus DNA Ladder*, Fermentas, Vilnius, Litauen) mitgeladen.

In Abhängigkeit von der Gelgröße erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 80-100 V. Unter UV-Licht wurde nach 30-60 min eine Auftrennung der DNA-Banden aufgrund des in der DNA interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar. Mit

einer Kamera wurden die DNA-Banden fotografiert und gespeichert (*Gel DocTM XR*, BioRad, Hercules, USA).

2.2.4 Genotypisierung der F2-Generation

Zur Überprüfung der in Kapitel 2.1 beschriebenen Kreuzungsstrategie erfolgte die Genotypisierung im Alter von 5 Tagen wie oben beschrieben. Die für Experimente verwendeten Tiere wurden ein zweites Mal zur Kontrolle re-genotypisiert.

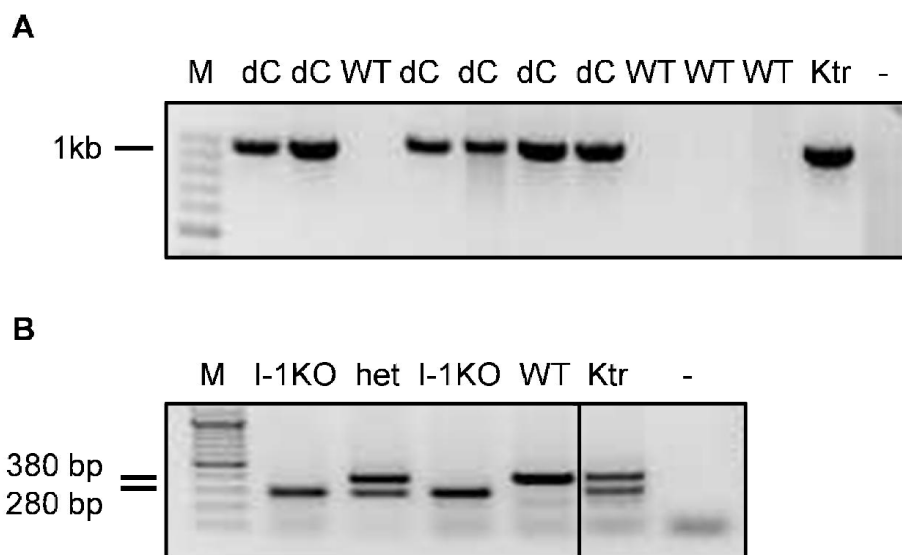


Abb. 2.2: Genotypisierung der CaMKII δ_c -I-1 KO-Mauslinie mittels PCR. Es handelt sich um PCR-Produkte der F2-Generation. (A) Exemplarische gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten zur Genotypisierung der CaMKII δ_c (dC). (B) Exemplarische gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten zur Genotypisierung des I-1 KO. Heterozygot (het), Wildtyp (WT), H₂O-Negativkontrolle (-). Positivkontrolle (Ktr). Auf jedem Gel lief zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (M).

2.3 Überlebensstudie

Die Überlebensstudie wurde mit einer Kaplan-Meier-Analyse ausgewertet, welche mit der *Graph Pad Prism 5 Software* (GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt wurde. Bei der Kaplan-Meier-Analyse handelt es sich um einen nicht parametrischen Test der Überlebensfunktion im Rahmen der Ereigniszeitanalyse. Es wurde eine Anzahl von Mäusen aller Genotypen bestimmt, die ohne experimentelle

Interventionen beobachtet wurden. Das Zeitintervall zur Beobachtung umfasste 25 Wochen.

2.4 Organentnahme

Die Mäuse wurden nach vorheriger Isofluran-Narkose in einer Inkubationskammer durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde ihr Körpergewicht bestimmt und sowohl der Thorax als auch das Abdomen eröffnet. Es wurden das Herz, die Lunge und die Leber entnommen. Die Organe wurden mit 0,9% NaCl-Lösung gespült, abgetupft und gewogen. Nach Bestimmung des Herz-Gesamtgewichtes wurden die Atrien von den Ventrikeln getrennt und die jeweiligen Gewichte separat bestimmt. Das Herzgewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Vor der weiteren Verwendung ist das Gewebe - unter permanenter Kühlung durch flüssigen Stickstoff - mit einem Stahlmörtel pulverisiert worden.

2.5 Isolierung von Kardiomyozyten aus Mäuseherzen

Für die Isolation von ventrikulären Kardiomyozyten wurde die Maus mit Isofluran in einer luftdichten Inkubationskammer betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und das Herz mit einem Stück der *Aorta ascendens* entnommen. Unter einem Binokular wurde das Herz über die *Aorta ascendens* kanüliert und für 4 min mit 37°C warmer Ca^{2+} -freier Isolationstyrode (113 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,6 mM KH_2PO_4 , 0,6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 12 mM NaHCO_3 , 10 mM KHCO_3 , 10 mM HEPES, 30 mM Taurin, 5,5 mM Glucose, 32 μM Phenolrot, pH 7,5 bei 37°C) an einer Langendorff-Perfusions-Anlage retrograd perfundiert. Für den enzymatischen Verdau des Herzgewebes wurden der Tyrodelösung anschließend 7,5 mg/ml Liberase 1, 0,6% Trypsin und 125 μM CaCl_2 hinzugefügt und das Herz für weitere 3 min perfundiert. Danach wurden die Atrien entfernt und die verdauten Ventrikel in der eben genannten Tyrode unter Zusatz von 5% BSA zerkleinert und anschließend gefiltert (Porendurchmesser 200 μm). Da nach Ca^{2+} -Entzug die Kardiomyozyten zunächst noch Ca^{2+} -intolerant sind („ Ca^{2+} -Paradoxon“, Hülsmann 2000) musste

zunächst ein stufenweise Ca^{2+} -Reintroduktion („ Ca^{2+} -Aufbau“) erfolgen. Dafür wurde der flüssige Überstand vom Sediment der Kardiomyozyten mit einer Pipette abgesaugt und der Ca^{2+} -Aufbau mit Isolationstyrode mit 0,1 mM Ca^{2+} begonnen. Dieser Schritt wurde mit 0,2 mM, 0,4 mM, 0,7 mM, 1,3 mM und 1,7 mM Ca^{2+} wiederholt. Im Anschluss konnten die Kardiomyozyten für weitere Versuche verwendet werden.

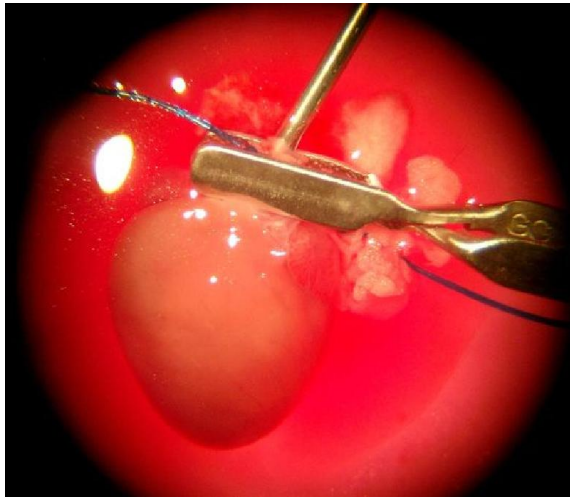


Abb. 2.3: Kanülierung eines Mäuseherzens. Das Herz wird über die *Aorta ascendens* mit Hilfe eines Knotens und einer *Bulldog*-Klemme kanüliert (Foto mit freundlicher Genehmigung von J. Vogt).

2.6 Physiologische Methoden

2.6.1 Messungen der intrazellulären Ca^{2+} - Transienten am Epifluoreszenzmikroskop

Die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop durfte ich freundlicherweise im Labor von Herrn Prof. Dr. med. Lars S. Maier (Abteilung für Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchführen.

2.6.1.1 Theoretische Grundlage der Messungen

Mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops (IonOptix, Milton, USA) ist es möglich, freie Ionen innerhalb einer Zelle zu detektieren. Für die Messung der intrazellulären Ca^{2+} - Transienten wurde der ratiometrische Farbstoff *Fura-2 AM* (Anaspec, Fremont, USA) verwendet. Bei Bindung dieses Farbstoffes an freie Ca^{2+} -Ionen kommt es zu

Veränderungen des Fluoreszenzverhaltens des Farbstoffs. Die Intensität der Emmission nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm korreliert mit der Ca^{2+} -Konzentration. Bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 380 nm sinkt die Emmissionsintensität mit steigender Ca^{2+} -Konzentration. Dies ist in Abb. 2.4 veranschaulicht. Die Bildung dieser Fluoreszenz-Ratio von Fura-2 AM bei schnell alternierender Exzitationswellenlänge (in den vorliegenden Messungen Wechsel mit 240 Hz) ermöglicht damit eine (semi-)quantitative Aussage über die Ca^{2+} -Ionenkonzentration unabhängig vom Ausmaß der Farbstoff-Beladung der Zelle, im Gegensatz zu den nicht-ratiometrischen Farbstoffen.

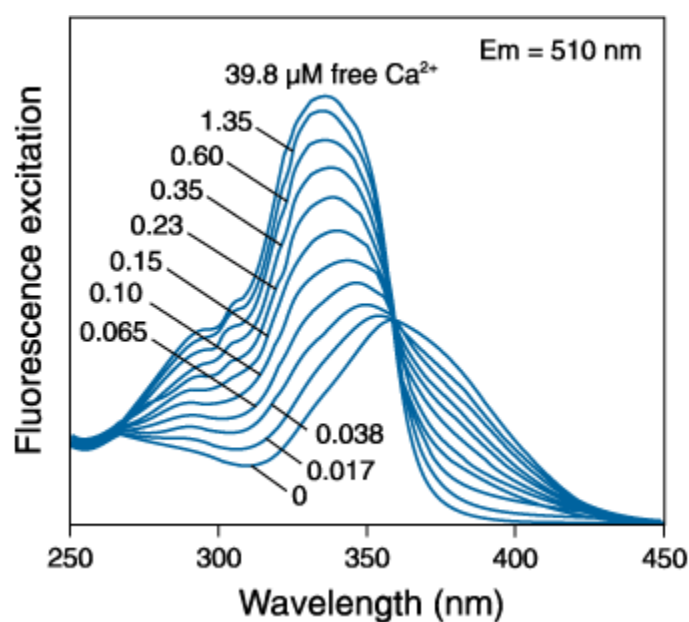


Abb. 2.4: Anregungsspektrum von Fura-2 AM für verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen. Darstellung der Fluoreszenzintensität, gemessen bei 510 nm für Anregungswellenlängen zwischen 250 nm und 450 nm (Life Technologies – Invitrogen 2014).

2.6.1.2 Durchführung der Messungen

Nach der Isolierung der Kardiomyozyten (siehe Kapitel 2.5) wurden diese auf den mit Laminin beschichteten Glasboden der Messkammer ausplattiert und für 20 min bei RT ruhen gelassen. Dies gewährleistete eine Haftung am Messkammerboden. Für die anschließende Messung wurden intakte Kardiomyozyten mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Fura-2 AM beladen und 15 min bei RT und Dunkelheit inkubiert. In dieser veresterten Form (als Fura-2 AM (Acetoxymethyl-Ester)) ist der Farbstoff unpolar und kann somit die Zellmembran penetrieren. Hier erfolgt durch unspezifische Esterasen die

Esterhydrolyse. Nach dieser liegt der Farbstoff nun intrazellulär in seiner aktiven, polaren Form vor und kann in dieser die Zellmembran nicht erneut nach extrazellulär permeieren. Um überschüssigen extrazellulären Farbstoff zu entfernen, wurde die Messkammer mit Messtyrode (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgSO₄ x 7H₂O, 5 mM HEPES, 10 mM Glucose, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) mindestens 5 min lang ausgewaschen. In dieser Zeit konnte zudem die vollständige Esterhydrolyse des in den Zellen aufgenommenen Fluoreszenzfarbstoffs erfolgen. Die Messungen der Ca²⁺-Transienten erfolgte bei RT unter kontinuierlicher Superfusion mit Messtyroden-Superfusion mit einer Flussrate von 80 ml/h und einer Feldstimulation mit 20 V bei einer Frequenz mit 1 Hz mit dem *Myopacer* (IonOptix). Mittels des *Hyperswitch* (IonOptix) des Fluoreszenz-Setups erfolgte die alternierende Exzitation mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm, die jeweilige Emissionsintensität wurde mit Hilfe eines Photomultipliers bei 510 nm gemessen und in dem Programm *IONWizard Acquire Version 4.4* (IonOptix) aufgezeichnet. Zur Messung der Kontraktionen der Zellen wurde ein Videobild der Kardiomyozyten kontinuierlich mit einer Kamera (*MyoCam*) aufgenommen. Hieraus wurde gleichzeitig mittels Bildanalyse in dem Programm *IONWizard Acquire Version 4.4* (IonOptix) die Sarkomerlänge bestimmt und diese parallel zum Fluoreszenzsignal aufgezeichnet.

Für die Bestimmung der Kraft/Frequenz-Beziehung wurden die Kardiomyozyten mit aufsteigenden Frequenzen von 1 Hz, 2 Hz und 4 Hz stimuliert, wobei vor jedem Frequenzwechsel ein *Steady State*, d.h. ein gleichförmiges Kontraktionsmuster, abgewartet wurde.

Während einer 20 sec Stimulationspause wurde die Post-Pausen-Beziehung (d.h. die Zunahme von Ca²⁺-Transient und Kontraktion bei der ersten Stimulation nach der Pause im Verhältnis zum *Steady State* davor) untersucht. Gleichzeitig wurde hierbei das Auftreten spontaner arrhythmischer Ereignisse (NSE – nicht-stimuliertes-Ereignis) gezählt (Sag et al. 2009).

Der Ca²⁺-Gehalt des SRs konnte mittels eines Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten bestimmt werden. Die schnell infundierte 10 mM Koffein-Tyrode bewirkte eine reversible Öffnung des RyR2-Rezeptors, die zu einer kompletten Entleerung des SRs führte. Die Stärke der Kontraktion bzw. die Höhe des Ca²⁺-Transienten unter Koffein ist dabei ein Maß der gesamten SR-Ca²⁺-Beladung. Die Geschwindigkeit der

Elimination des intrazellulären freien Ca^{2+} erlaubte eine Beurteilung der NCX-Funktion: Da die SERCA2a zwar Ca^{2+} -Ionen zurück in das SR pumpt, diese jedoch durch den geöffneten RyR2 sofort wieder in das Zytosol entlassen werden, kann unter Koffein-Einfluss Ca^{2+} effektiv nur über NCX nach extrazellulär eliminiert werden (Bers 2001).

Im Gegensatz zu den Bedingungen unter Koffeininfusion ist die Relaxation unter physiologischen Bedingungen bei der Maus zu 90% abhängig von der SERCA2a-Funktion, so dass die Geschwindigkeit des Abfalls der elektrisch stimulierten Ca^{2+} -Transienten ein Maß für die SERCA2a-Aktivität ist (Bers 2001).

Die Auswertung der Daten aus den Messungen am Epifluoreszenz-Mikroskop erfolgte mit dem *IONWizard Analyze Version 5.0* (IonOptix).

2.6.2 Messungen des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks am Konfokalmikroskop

Alle Messungen am Konfokalmikroskop wurden zeitgleich zu den Messungen am Epifluoreszenzmikroskop mit den Kardiomyozyten der gleichen Mäuse von Herrn Thomas Sowa (Abteilung für Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt und von mir mit Hilfe des *Sparkmasters* (LSM-5 Pascal, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet.

Nach der Isolierung der Kardiomyozyten (siehe Kapitel 2.5) wurden diese, wie bereits in Kapitel 2.6.1 beschrieben, in der Messkammer ausplattiert. Sie wurden danach für 15 min bei RT und Dunkelheit mit dem Ca^{2+} -Farbstoff Fluo-4 AM (10 $\mu\text{mol/l}$, Teflabs, Austin, USA) beladen. Um überschüssigen extrazellulären Farbstoff zu entfernen, wurde die Messkammer anschließend 5 min lang mit Messtyrode ausgewaschen. Die Messungen der Ca^{2+} -Signale erfolgte bei RT unter kontinuierlicher Messtyroden-Superfusion, mit einer Flussrate von 55 ml/h, im *Linescan* Modus des Laserscanning-Konfokalmikroskops (LSM-5 Pascal, Zeiss, Jena, Deutschland). Jede Zelle wurde sowohl bei Feldstimulation mit einer Frequenz von 1 Hz, als auch ohne Stimulation gemessen. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 wurde mit einem Argon-Laser bei 488 nm angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde im Bereich >515 nm gemessen. Bei dieser Messtechnik werden „ Ca^{2+} -Sparks“ zur Quantifizierung des SR- Ca^{2+} -Lecks untersucht. Bei diesen handelt es sich um kurze elementare Ca^{2+} -

Freisetzungseignisse aus dem SR, welche entstehen, wenn sich ein Cluster von RyR2 spontan öffnet. Ein Ca^{2+} -Spark zeigt sich damit in den Registrierungen als kurzzeitiger lokal beschränkter Anstieg der Ca^{2+} -Fluoreszenz, wie in Abb. 2.5 dargestellt. Die Frequenz, in der Ca^{2+} -Sparks auftraten, wurde in der vorliegenden Arbeit als Maß für das diastolische SR- Ca^{2+} -Leck verwendet.

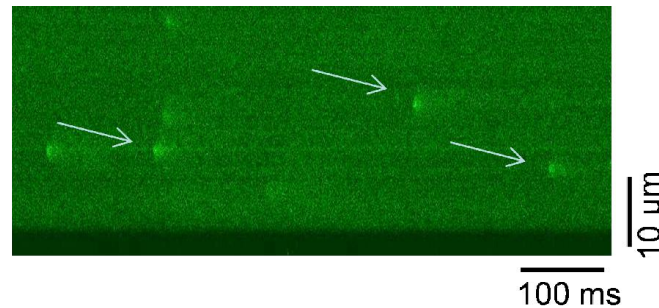


Abb. 2.5: Repräsentative Ca^{2+} -Sparks. Beispielhafte Darstellung der Registrierungen eines kurzzeitig lokal beschränkten Anstiegs der Ca^{2+} -Fluoreszenz in einer Konfokalmikroskopie-Messung.

Zusätzlich wurde mit dem Konfokalmikroskop ein Bild jeder gemessenen Zelle aufgezeichnet und deren Dimensionen bestimmt. Aus Länge und Breite der Zelle kann nach der Formel

$$\text{Zellvolumen} = \text{Zelllänge} * \text{Zellbreite} * (\text{Zellbreite} * 0,4)$$

auch das Volumen der Zelle abgeschätzt werden (Bers 2001).

2.6.3 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden alle von Herrn Roland Blume (Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt und von mir anschließend ausgewertet.

Die 2-D Ultraschalluntersuchungen wurden mit dem *Vevo*[®] 2100 *Imaging System* (VisualSonics, Toronto, Canada) und einem 30 MHz Schallkopf durchgeführt. Für die Narkoseeinleitung befand sich die Maus in einer Induktionskammer mit Isofluran (3 vol%). Während der Ultraschalluntersuchung lag die narkotisierte Maus in Rückenlage auf einer Wärmeplatte und war mit den Pfoten auf EKG-Elektroden fixiert. Die kontinuierliche Narkoseüberwachung der Maus bestand aus EKG,

Atemfrequenzkontrolle und rektaler Körpertemperatur. Die Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde über eine Gesichtsmaske (1,5 vol% Isofluran, 1 l/min Sauerstoff) aufrechterhalten.

Die basalen Messungen erfolgten bei einer Körpertemperatur von 37°C und einer Herzfrequenz (HF) von 450-550 Schlägen/min (bpm). Der Thorax der Maus wurde enthaart und mit gewärmtem Ultraschallgel bedeckt. Zunächst wurde im *B-Mode* mit einer Bildfrequenz von 300 bis 400 Hz die parasternale lange Achse des Herzens dargestellt. Dabei waren folgende Strukturen sichtbar: der linke Ventrikel mit linksventrikulärem Ausflusstrakt und Übergang in die Aorta ascendens, das Septum interventriculare, die Herzspitze und das linke Atrium. In der parasternalen kurzen Achse wurde der linke Ventrikel midpapillär aufgenommen und diente auch der Erstellung der *M-Mode* Aufnahmen.

Nach Registrierung des Echokardiogramms unter basalen Bedingungen wurde der Maus 10 µg/g Dobutamin (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) intraperitoneal injiziert und 2 min gewartet bis das Dobutamin vollständig systemisch angeflutet war. Daraufhin wurden die Aufnahmen, wie zuvor beschrieben, wiederholt. Die Parameter wurden alle sowohl systolisch als auch diastolisch gemessen (siehe Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Echokardiographisch gemessene Parameter.

Parameter	Abkürzung
linksventrikulärer enddiastolischer bzw. endsystolischer Längendurchmesser	Ld bzw. Ls
innere bzw. äußere linksventrikuläre Fläche in Diastole/Systole bzw. nur in der Systole	Area d/s bzw. Epi s
linksventrikuläre enddiastolische/endsystolische Vorderwand- bzw. Hinterwandstärke	AWTh d/s bzw. PWTh d/s
linksventrikulärer enddiastolischer bzw. -systolischer Durchmesser	LVIDD bzw. LVIDS

Aus den gemessenen Parametern wurden folgende Parameter berechnet:

Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraction (FAS, *fractional area shortening*):

$$\text{FAS (\%)} = (\text{LVEDA} - \text{LVESA}) / \text{LVEDA} \times 100$$

Linksventrikuläre Masse (LVM):

$$\text{LVM (mg)} = 1,05 \times [5/6 \times \text{Epi s} \times (\text{Ls} + \text{t}) - 5/6 \times \text{LVESA} \times \text{Ls}]$$

Hierbei stellt 1,05 das spezifische Gewicht des Muskels dar, „t“ steht für die repräsentative myokardiale Wanddicke, gebildet aus dem Mittelwert der linksventrikulären endsystolischen Vorderwand- und Hinterwandstärke.

Linksventrikuläres enddiastolisches bzw. endsystolisches Volumen (LVEDV/LVESV):

$$\text{LVEDV } (\mu\text{l}) = 5/6 \times \text{Ld} \times \text{Area d} \text{ bzw. } \text{LVESV} = 5/6 \times \text{Ls} \times \text{LVESA}$$

2.7 Statistische Auswertung

Alle Daten werden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) präsentiert. Mittels Student's t-Test für unverbundene bzw. verbundene Stichproben wurde die statistische Signifikanz ermittelt, es sei denn eine gesonderte Kennzeichnung liegt vor. Die Analysen wurden mit der Software *Graph Pad Prism 5*, *Microsoft Excel* sowie *SigmaStat 3.5* durchgeführt. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant bewertet und gekennzeichnet. Die Anzahl der untersuchten Tiere oder Zellen wird mit n bezeichnet. Alle Experimente und Auswertungen wurden verblindet durchgeführt.

2.8 Verwendete Materialien

2.8.1 PCR-Primer und Bedingungen

Die verwendeten „Vorwärts“- und „Rückwärts“-Primer („for“ bzw. „rev“) wurden alle von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tab. 2.2: Genotypisierung der I-1 KO-Linie.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	10:00	1
Denaturierung	94	00:30	
Hybridisierung	56	00:45	35
Elongation	72	00:45	
Elongation	72	10:00	1

Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	T _m (°C)
I-1-Ex1-for	CCCACGGAAGATCCAGTTTA	380	57
KO-Intr1-rev	CACTTAGCCGGGAAACTCTG		59
KO-neo-for	TAAAGCGCATGCTCCAGACT	280	57

PCR-Ansatz 50 μ l:

Substanz	Volumen (μ l)
Primer I-1-Ex1-for	3
Primer KO-Intr1-rev	1
Primer KO-neo-for	0,5
PCR-Puffer 10x	5
DMSO	2,5
dNTPs	0,5
Taq-Polymerase	1
DNA-Template	2
Aqua ad injectabilia	34,5

Tab. 2.3: Genotypisierung der CaMKII δ c-Linie.

PCR-Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	05:00	1
Denaturierung	94	01:00	
Hybridisierung	63	01:00	35
Elongation	72	02:00	
Elongation	72	10:00	1

Primer	Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	T _m ($^{\circ}$ C)
CaMK for	TTGAAGGGTGCCATCTTGACA	1000	58
CaMK rev	GGTCATGCATGCCTGGAATC		59

PCR-Ansatz 50 μ l:

Substanz	Volumen (μ l)
Primer CaMK for	1
Primer CaMK rev	1
PCR-Puffer 10x	5
dNTPs	1
Taq-Polymerase	0,4
DNA-Template	2
Aqua ad injectabilia	39,6

Die Taq-Polymerase und der PCR-Puffer 10x (enthält 20 mM $MgCl_2$) sind in der *DreamTaqTM Green DNA Polymerase* (Fermentas, Vilnius, Litauen) beinhaltet. Als Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) wurde der *dNTP Mix, 25 mM each* (Fermentas, Vilnius, Litauen) verwendet.

2.8.2 Substanzen

Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Koffein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dobutamin	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Ethanol absolute	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydrochloridsäure (HCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Liberase 1	Roche, Basel, Schweiz
Magnesiumsulfatseptehydrat (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Natriumchlorid 0,9%	Braun, Melsungen, Deutschland
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumedetat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenolrot	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Potassium-Chloride (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteinase K	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taurin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.8.3 Hilfsmittel und Geräte

<i>Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT</i>	BioRad, Hercules, USA
Analytikwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<i>Biosphere[®] Filter Tips</i>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Elektrophoresespannungsgerät <i>PowerPack P25</i>	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresespannungsgerät <i>PowerPac</i>	BioRad, Hercules, USA

Basic

Elektrophoresespannungsgerät <i>PowerPac HC</i>	BioRad, Hercules, USA
Elektrophoresesystem (Mini Protean [®] <i>electrophoreses cell</i>)	BioRad, Hercules, USA
Eppendorf <i>Safe Lock</i> Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Epifluoreszenzmikroskop	IonOptix, Milton, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Horizontalschüttler <i>Rocking Platform</i>	Biometra, Göttingen, Deutschland
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5804R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Magnetrührer IkaMag [®] Reo	Schütt, Göttingen, Deutschland
PCR-Gerät <i>GeneAmp[®] PCR System 9700</i>	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Photometer, <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	InoLab, Gunzenhausen, Deutschland
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipetten, serologisch 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Tischzentrifuge <i>Combi-Spin FVL-2400N</i>	Peqlab, Erlangen, Deutschland
<i>TissueLyser II</i>	Qiagen, Venlo, Niederlande
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex <i>Reax 200</i>	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, zunächst den zellulären Ca^{2+} -Haushalt und das SR-Ca^{2+} -Leck in Kardiomyozyten bei I-1-Ablation zu untersuchen, um den *in vivo* bereits beschriebenen antiarrhythmischen Phänotyp der I-1 KO-Mäuse auf zellulärer Ebene zu analysieren. Gleichzeitig sollen die phänotypischen Auswirkungen einer I-1-Ablation im Herzinsuffizienzmodell durch Kreuzung mit transgenen CaMKII δ c-Mäusen untersucht werden.

3.1 Charakterisierung des Ca^{2+} -Haushalts und des SR-Ca^{2+} -Lecks der I-1 KO-Mauslinie

3.1.1 Morphologische und funktionelle Charakterisierung der I-1 KO-Mäuse

Bevor die I-1 KO-Mauslinie auf zellulärer Ebene hinsichtlich des Ca^{2+} -Haushalts und des SR-Ca^{2+} -Lecks untersucht wurde, erfolgte die Erfassung des Herz- und des Körpergewichtes und eine echokardiographische Analyse der Kontraktilität, ermittelt durch die FAS (%). Es zeigte sich weder eine Hypertrophie noch eine Einschränkung der Kontraktilität in den I-1 KO-Mäusen (HG/KG (mg/g): I-1 KO $6,96 \pm 0,38$; WT $6,04 \pm 0,37$; $n \geq 8$; FAS (%): I-1 KO $49,40 \pm 3,68$; WT $45,6 \pm 2,55$; $n \geq 9$; Abb. 3.1 A+C).

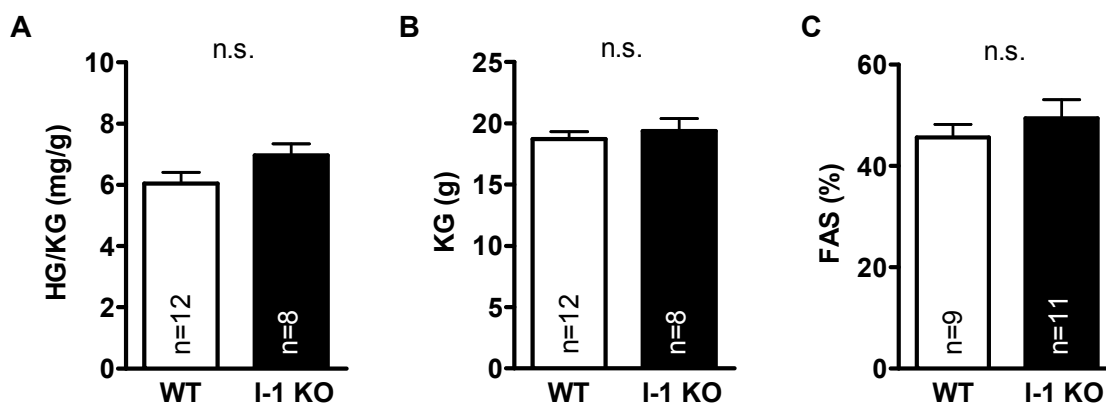


Abb. 3.1: Biometrie und funktionell echokardiographische Analyse der Kontraktilität der I-1 KO-Mauslinie. Darstellung (A) des Herzgewichts/Körpergewichtes (HG/KG), (B) des Körpergewichtes (KG) und (C) der FAS; die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Tiere an. Alle Analysen fanden im Alter von 6 Wochen statt.

3.1.2 Analyse des intrazellulären Ca^{2+} -Haushalts der I-1 KO-Kardiomyozyten

Verschiebungen des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts können zu Hypertrophie und Herzinsuffizienz führen, da Ca^{2+} die elektromechanische Kopplung in Kardiomyozyten in seiner Funktion als *second messenger* beeinflusst. Die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten wird in Mäusen fast ausschließlich über die SR- Ca^{2+} -Freisetzung durch den RyR2 generiert und bestimmt maßgeblich die Kontraktilität der Kardiomyozyten (Bers 2001; Bers 2002).

Im Folgenden werden der Ca^{2+} -Haushalt und das SR- Ca^{2+} -Leck der I-1 KO-Kardiomyozyten dem WT gegenübergestellt.

Die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop zur Analyse des intrazellulären Ca^{2+} -Haushalts und die Messungen am Konfokalmikroskop zur Charakterisierung der RyR2-Funktion erfolgten ausschließlich an Mäusen im Alter von 6-7 Wochen.

3.1.3 Effekte einer I-1-Ablation auf den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt

Der funktionelle Effekt der I-1-Ablation wurde durch Epifluoreszenz-Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten mittels Fura-2 *in vitro* untersucht. Die Sarkomerlängen-Verkürzung wurde simultan gemessen. Die Isolation der ventrikulären Kardiomyozyten wurde durch einen enzymatischen Verdau, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, durchgeführt. Das genaue Messprotokoll ist in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Die Zellen für die Daten-Auswertung hatten eine konstante diastolische Länge und eine klare Querstreifung. Wie auch in der Echokardiographie zeigte sich auch auf zellulärer Ebene keine eingeschränkte Kontraktilität in den isolierten I-1 KO-Kardiomyozyten, ermittelt durch die prozentuale Verkürzung der diastolischen Länge (Abb. 3.2 C). Auch die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten blieb unverändert, verglichen mit dem WT (Abb. 3.2 B). Damit korrelierend zeigten die Untersuchungen des SR- Ca^{2+} -Gehalts keinen Unterschied (Abb. 3.2 F). Der Relaxationsparameter RT50% beschreibt die benötigte Zeit bis die Amplitude des systolischen Ca^{2+} -Transienten auf 50% abgefallen ist und spiegelt hauptsächlich die SERCA2a-Funktion wider. Die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR, die in murinen Kardiomyozyten zum allergrößten Teil auf die SERCA2a-Funktion zurückzuführen ist (Bers 2002), zeigte bei I-1-Ablation keine Unterschiede (Abb. 3.2 E). Auch die NCX-Funktion, ermittelt durch

den Abfall des Koffein-induzierten Transienten, zeigte keinen Unterschied zwischen I-1 KO-Mäusen und dem WT (Abb. 3.2 G).

Betrachtet man das diastolische Ca^{2+} -Level in den I-1 KO-Mäusen, ließ sich jedoch ein signifikante Verminderung in den I-1 KO-Mäusen im Vergleich zum WT feststellen (Diastolisch Fura-2 F340/380 (1 Hz, 2 Hz, 4 Hz): I-1 KO $0,55 \pm 0,02$; $0,58 \pm 0,02$; $0,63 \pm 0,02$; WT $0,47 \pm 0,01$; $0,50 \pm 0,01$; $0,56 \pm 0,01$; $n \geq 45/4$; Abb. 3.2 D)

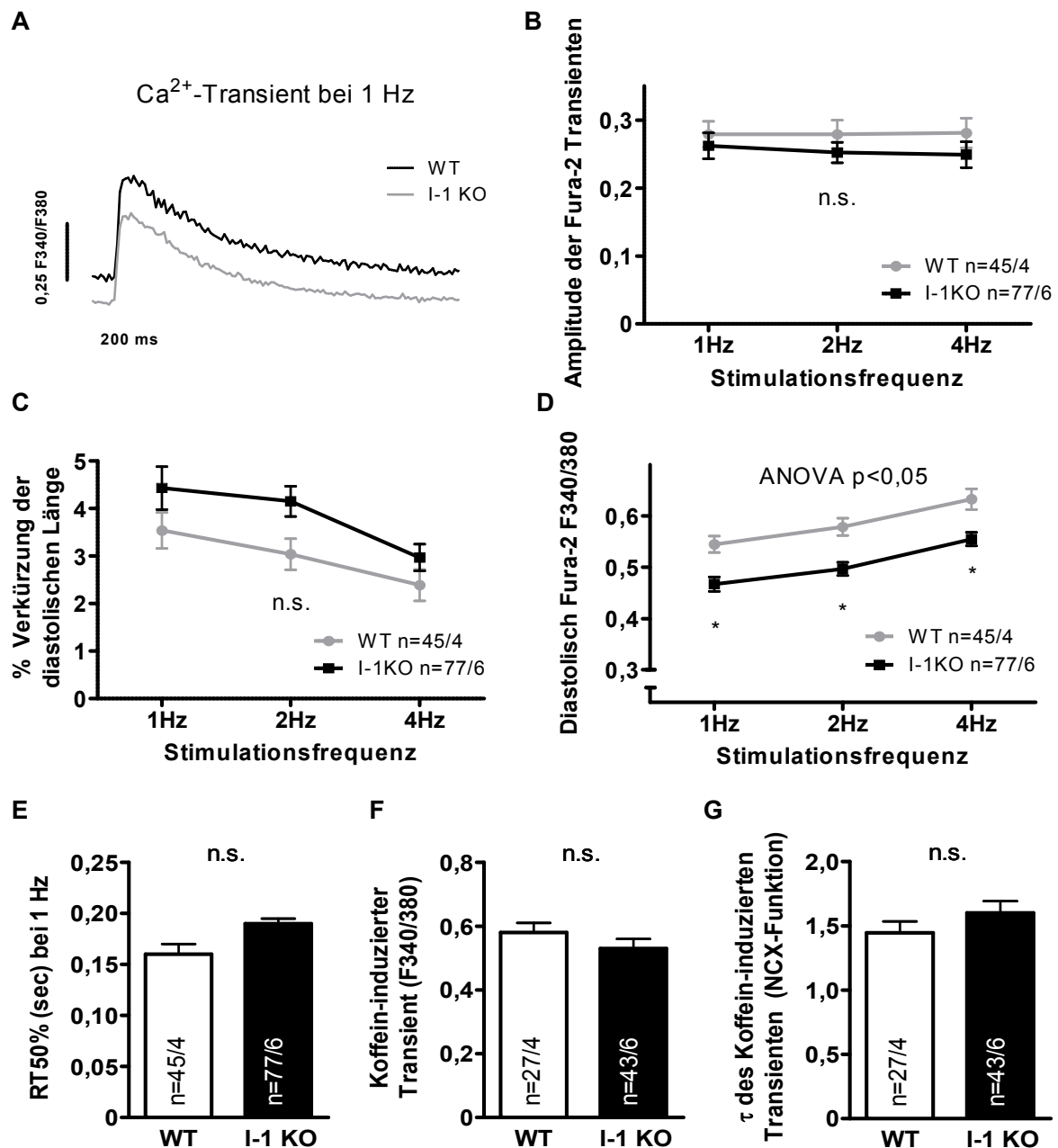


Abb. 3.2: Analyse des intrazellulären Ca²⁺-Haushalts in I-1 KO-Mäusen. Darstellung (A) einer repräsentativen Originalregistrierung eines Ca²⁺-Transients bei einer Feldstimulation mit 1 Hz, (B) der Amplitude der Ca²⁺-Transients bei einer Feldstimulation von 1, 2 und 4 Hz, (C) der % Verkürzung der diastolischen Länge, (D) des diastolischen Ca²⁺-Levels (Fura-2 F340/380), (E) der RT50% bei Feldstimulation mit 1 Hz (sec), (F) des Koffein-induzierten Transienten (F340/380) und (G) des Tau des Koffein-induzierten Transienten; die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Zellen/Herzen an. (B-D) ANOVA repeated measurements.

3.1.4 Effekte einer I-1-Ablation auf das SR-Ca²⁺-Leck

Eine erniedrigte intrazelluläre diastolische Ca²⁺-Konzentration ist unter anderem für ein vermindertes Leck am RyR2 verantwortlich (Bers 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die diastolische Durchlässigkeit bzw. Dichtigkeit des RyR2 in engem Zusammenhang mit dem Auftreten von Arrhythmien steht (Ai et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das SR-Ca²⁺-Leck mittels Ca²⁺-Spark-Messungen am Konfokalmikroskop untersucht. Dafür wurden die ventrikulären Kardiomyozyten, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, isoliert und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff Flou-4 beladen. Die *Linescans* am Konfokalmikroskop wurden unter konstanten Bedingungen (siehe Kapitel 2.6.2) durchgeführt.

Während die Ca²⁺-Spark-Größe (CaSpS) in den I-1 KO-Kardiomyozyten unverändert war, zeigte sich eine deutlich reduzierte Ca²⁺-Spark Frequenz (CaSpF (1/100 $\mu\text{m/s}$): I-1 KO $3,01 \pm 0,3$; WT $2,32 \pm 0,16$; $n \geq 145$ Zellen; Abb. 3.3 B) und damit verbunden auch ein signifikant reduziertes SR-Ca²⁺-Leck (um ca. 35% im Vergleich zum WT; Abb. 3.3 C).

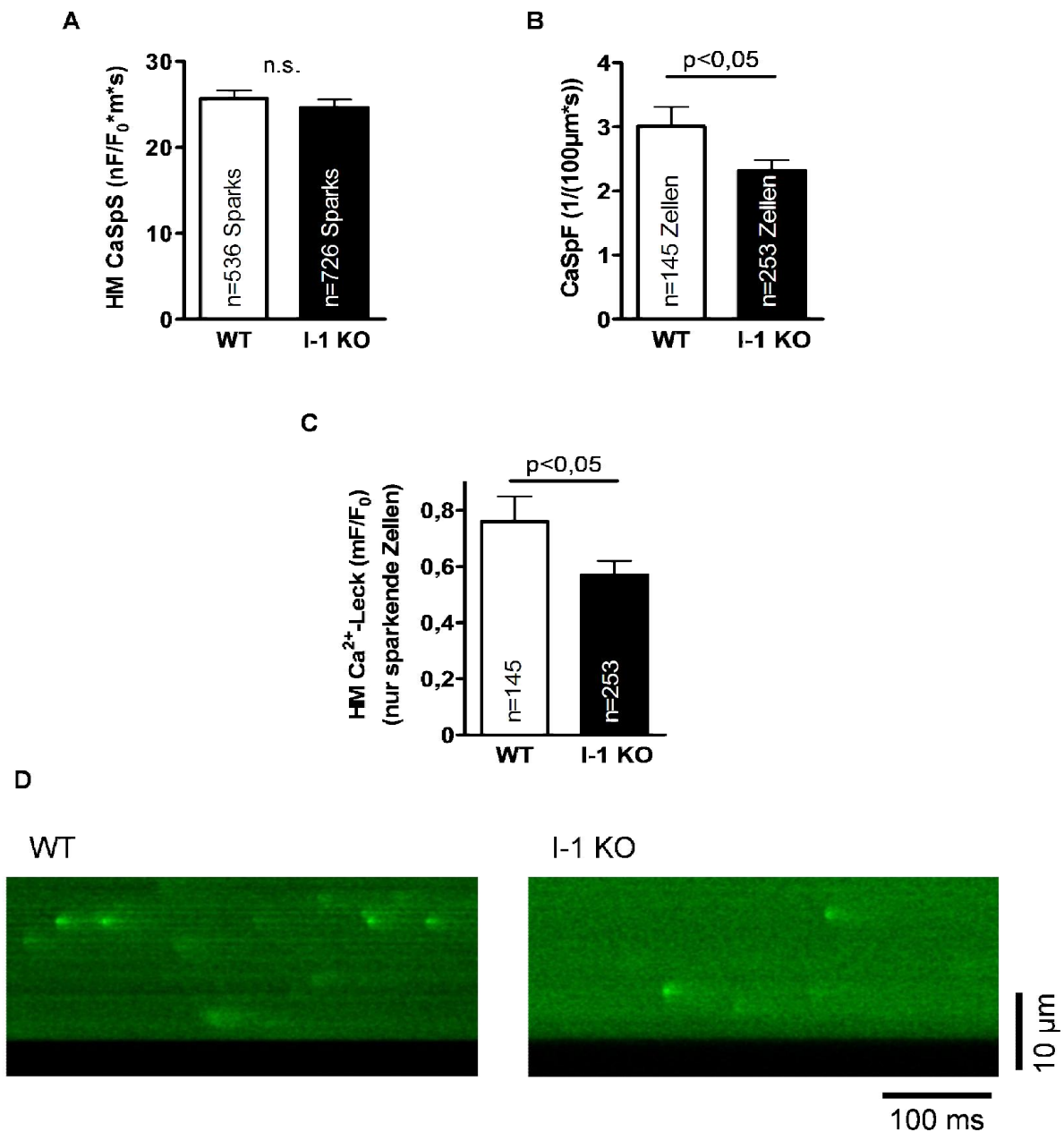


Abb. 3.3: Ca²⁺-Spark-Messungen am Konfokalmikroskop. Darstellung (A) der HM (half-maximum) Ca²⁺-Spark-Größe (HM CaSpS (nF/F₀*m*s)), (B) der Ca²⁺-Spark Frequenz (CaSpF (1/100 µm/s)), (C) des HM Ca²⁺-Lecks (mF/F₀; nur sparkende Zellen) und (D) repräsentativer Originalregistrierungen der konfokalen *Linescans* nach Hintergrundsubtraktion und Filterung im *Sparkmaster*.

3.1.5 Untersuchung des antiarrhythmischen Phänotyps auf zellulärer Ebene

Zur Untersuchung des antiarrhythmischen Phänotyps wurde das Auftreten von spontanen Ca²⁺-Freisetzungseignissen (*spontaneous Ca²⁺-release events* (SCaEs)) während einer 20 sec Stimulationspause untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Anteil an Zellen, die SCaEs aufwiesen, in den I 1 KO-Kardiomyozyten um

mehr als 50 % erniedrigt war, verglichen mit den WT (Abb. 3.4 B). Es konnte somit gezeigt werden, dass die Reduktion des SR- Ca^{2+} -Lecks mit einem antiarrhythmischen Phänotyp auf zellulärer Ebene korreliert.

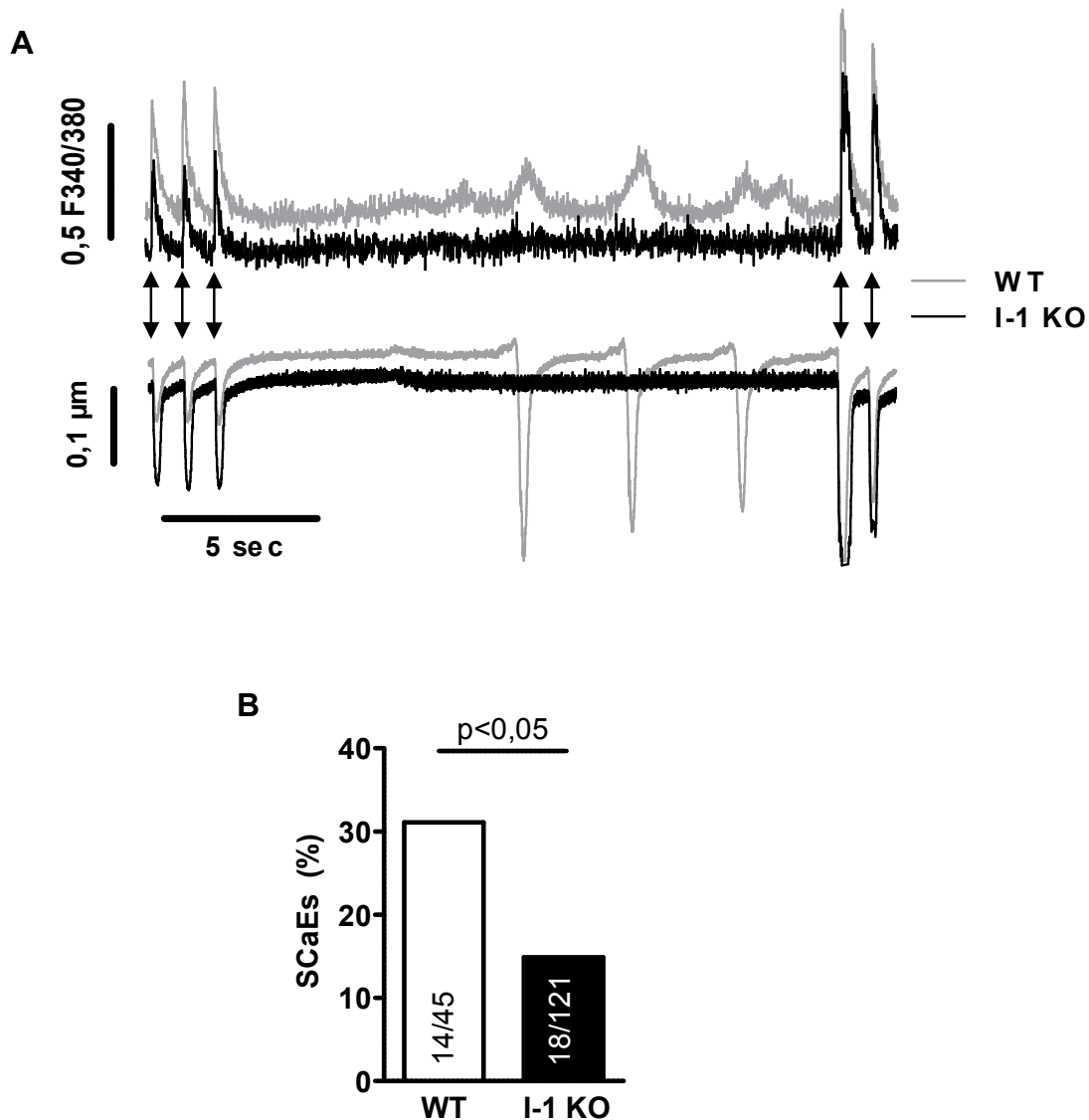


Abb. 3.4: Untersuchung von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungseignissen. (A) Originalregistrierungen des Ca^{2+} -Signals (oben) und der Zellverkürzung (unten) in I-1 KO- und WT-Kardiomyozyten während einer 20 sec Stimulationspause mit spontanen Ca^{2+} -Freisetzungseignissen im WT. Die Pfeile entsprechen den Stimulationsimpulsen. (B) Darstellung der SCaEs (%); die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der Zellen mit SCaEs im Verhältnis zur Gesamtanzahl der untersuchten Zellen an. (B) Fisher-Test.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass I-1 KO-Kardiomyozyten eine verminderte diastolische Ca^{2+} -Konzentration aufweisen, bei gleichzeitig erniedrigtem SR- Ca^{2+} -Leck und weniger SCaEs.

3.2 Kardiale Phänotypisierung der dC x I-1 KO-Mauslinie

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch ein I-1 KO bedingtes vermindertes SR- Ca^{2+} -Leck von Geburt an der Progress des schweren $\text{CaMKII}\delta_c$ -assoziierten Phänotyps verbessert wird. Deshalb wurden, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, I-1 KO-Mäuse mit transgenen $\text{CaMKII}\delta_c$ -Mäusen gekreuzt und anschließend kardial phänotypisiert.

3.2.1 Einfluss auf die Überlebenszeit

Entgegen der Hypothese, dass durch eine Ablation des I-1 eine Verbesserung des schweren Phänotyps der $\text{CaMKII}\delta_c$ zu erwarten ist, zeigte sich kein Unterschied im Überleben zwischen der dC x I-1 KO- und der dC-Mauslinie (Abb. 3.5). Beide Genotypen zeigten bereits nach 4 bis 6 Wochen eine erhöhte Mortalität. Erwartungsgemäß sind im WT und im I-1 KO innerhalb eines Untersuchungszeitraums von 25 Wochen keine Mäuse verstorben.

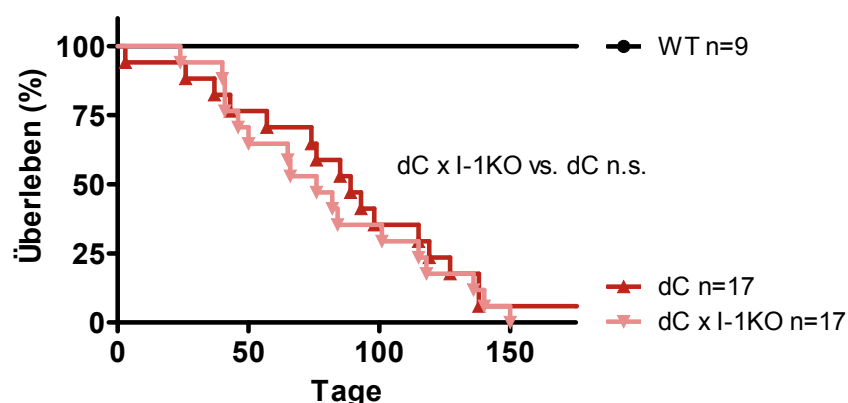


Abb. 3.5: Überlebensstudie mittels Kaplan-Meier-Analyse. Insgesamt wurden 43 Tiere parallel beobachtet und ihr Überleben mittels Kaplan-Meier analysiert. Im WT ist im Zeitraum von 175 Tagen kein Versterben eingetreten, jedoch war eine deutlich erhöhte Sterblichkeit in den dC und dC x I-1 KO-Mäusen zu erkennen.

3.2.2 Morphologische Charakterisierung der CaMKII δ_c -I-1 KO-Mauslinie

Morphologisch zeigten die dC x I-1 KO-Mäuse im Vergleich zu den dC-Mäusen bereits im Alter von 6 Wochen eine signifikant erhöhte kardiale Hypertrophie (HG/KG (mg/g): dC x I-1 KO $15,51 \pm 1,45$; dC $11,04 \pm 1,08$; $n \geq 7$; Abb. 3.6 A) wie auch eine verstärkte Hypertrophie der einzelnen isolierten Kardiomyozyten (Elongationsindex (Länge/Breite): dC x I-1 KO $6,27 \pm 0,14$; dC $5,37 \pm 0,12$; $n \geq 221$ Zellen; Abb. 3.6 E) bei gleichem KG in allen Genotypen (Abb. 3.6 B). Zudem wurde ein erhöhtes Lungengewicht in den dC x I-1 KO-Mäusen (LuG/KG (mg/g): dC x I-1 KO $12,63 \pm 2,68$; dC $8,99 \pm 1,69$; $n \geq 7$; Abb. 3.6 C) gemessen. Bezüglich des Lebergewichts konnten keine Unterschiede festgestellt werden (LeG/KG (mg/g): dC x I-1 KO $44,62 \pm 7,62$; dC $46,9 \pm 8,48$; $n \geq 7$; Abb. 3.6 D). Zusammenfassend zeigten die dC x I-1 KO-Mäuse in den biometrischen Daten eine schwerere kardiale Hypertrophie verglichen mit den dC-Mäusen. Weitere Messparameter sind im Anhang dargestellt (siehe Tab. 7.5 - Tab. 7.6).

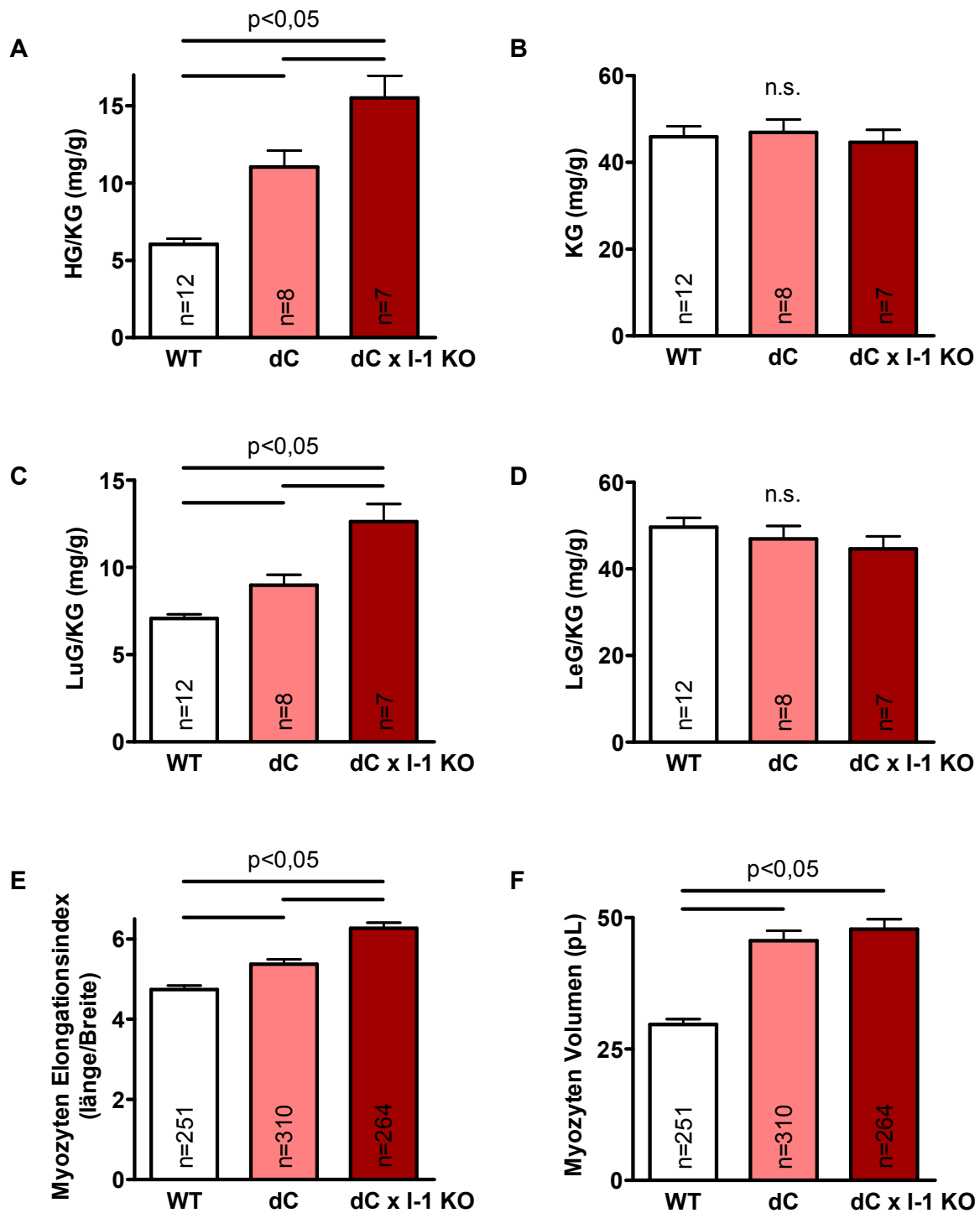


Abb. 3.6: (Zell-)Biometrische Analyse der dC x I-1 KO-Mauslinie. Darstellung (A) des Herzgewichts/Körpergewichts (HG/KG), (B) des Körpergewichts (KG), (C) des Lungengewichts/Körpergewichts (LuG/KG), (D) des Lebergewichts/Körpergewichts (LeG/KG), (E) des Elongationsindex und (F) des Myozytenvolumens im Alter von 6 Wochen. (A-D) n=Anzahl der untersuchten Tiere, (E-F) n=Anzahl der untersuchten Zellen.

3.2.3 Funktionelle Charakterisierung der CaMKII δ_c -I-1 KO-Mauslinie mittels Echokardiographie

Welche Auswirkungen haben nun die morphologischen Zeichen der vermehrten Hypertrophie auf die Herzfunktion der dC x I-1 KO-Linie im Gegensatz zur dC Linie *in vivo*? Hierzu wurde die Herzfunktion mittels Echokardiographie untersucht. Die Tiere waren alle im Alter von 6 Wochen und gleichgeschlechtlich. Die Mäuse wurden auch im Verlauf bis zum Alter von 11 Wochen weiter echokardiographisch kontrolliert.

Die erhobenen biometrischen Daten (siehe Kapitel 3.2.2) bestätigten sich in den morphologischen Messparametern der Echokardiographie. Als Messparameter für eine linksventrikuläre Hypertrophie wurde die linksventrikuläre Masse in Bezug zum Körpergewicht (LVM/KG) gesetzt. Als Maß für die linksventrikuläre Dilatation wurden der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) und das linksventrikuläre endsystolische Diameter (LVESD) verwendet. Der Prozentsatz der linksventrikulären Flächenverkürzungsfraktion (FAS) diente als Maß für die Kontraktilität. Alle nun folgenden Ergebnisse wurden an 6 Wochen alten Mäusen erhoben. Die dC x I-1 KO-Mäuse zeigten verglichen mit den dC-Mäusen auch echokardiographisch eine vermehrte kardiale Hypertrophie (LVM/KG (mg/g): dC x I-1 KO $6,14 \pm 0,31$; dC $4,98 \pm 0,25$; $n \geq 11$; Abb. 3.8 A) und eine stärkere kontraktile Dysfunktion (FAS (%): dC x I-1 KO $12,12 \pm 1,43$; dC $21,02 \pm 2,96$; $n \geq 11$; Abb. 3.8 B). In der Tendenz zeigte sich auch eine größere linksventrikuläre Dilatation (LVEDD (mm): dC x I-1 KO $5,27 \pm 0,15$; dC $4,99 \pm 0,21$; $n \geq 11$; LVESD (mm): dC x I-1 KO $4,95 \pm 0,17$; dC $4,51 \pm 0,27$; $n \geq 11$; Abb. 3.8 C-D). Bezüglich der Herzfrequenz zeigten sich keine Unterschiede zwischen dC und dC x I-1 KO -Mäusen (siehe Tab. 7.7). Insgesamt bestätigten die *in vivo* Daten der Echokardiographie die morphologischen Ergebnisse im Sinne einer weiteren kardialen Verschlechterung durch eine I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -Mäusen.

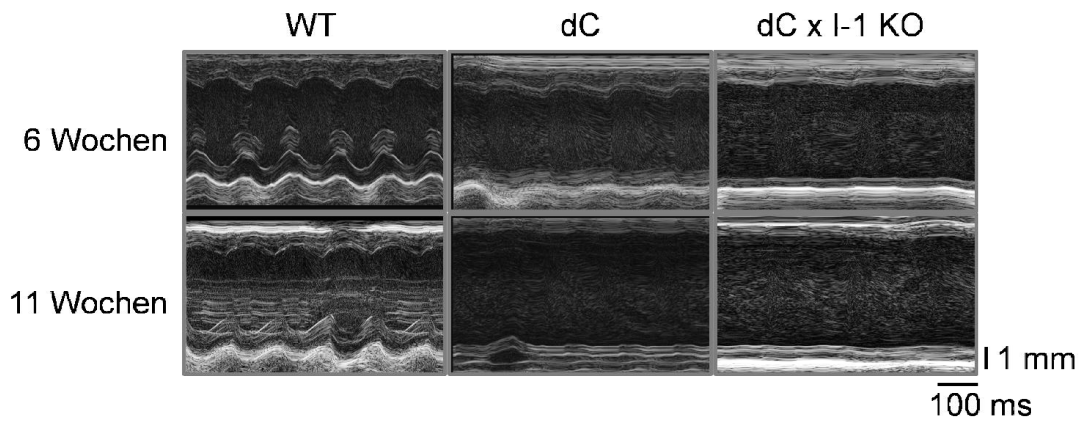


Abb. 3.7: Originalaufnahmen der Echokardiographie. Repräsentative *M-Mode* Aufnahmen von WT, dC und dC x I-1 KO-Mäusen im Alter von 6 und 11 Wochen, aufgenommen links parasternal in der kurzen Achse midpapillär.

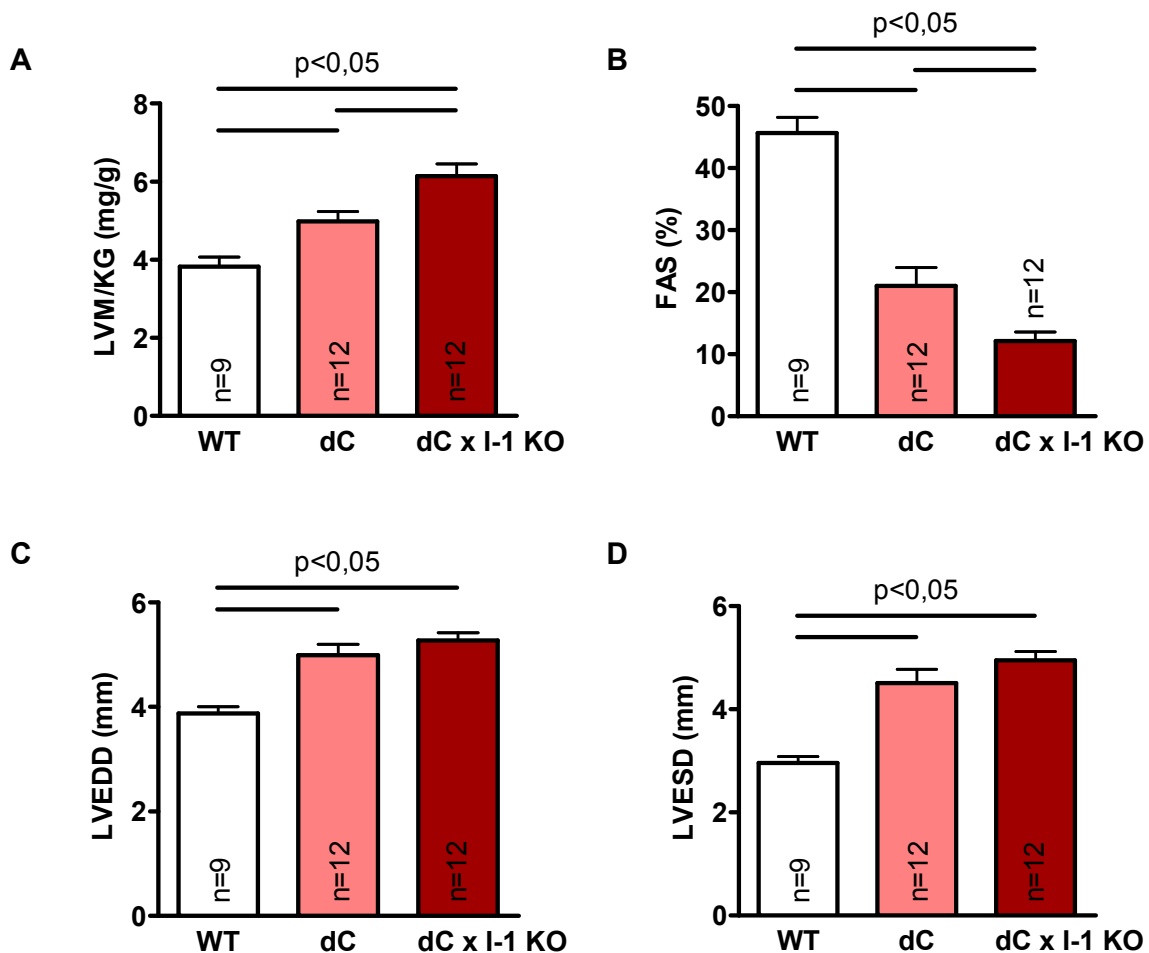


Abb. 3.8: Funktionelle Daten der Echokardiographie. Die Analysen fanden unter basalen Bedingungen im Alter von 6 Wochen statt. Darstellung (A) der FAS, (B) des LVM/KG, (C) des LVEDD und (D) des LVESD, jeweils bei Herzfrequenzen zwischen 460 und 530 bpm gemessen. Die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Tiere an.

Im zeitlichen Verlauf zwischen der 5. und 11. Lebenswochen zeigte sich in beiden Genotypen mit einer CaMKII δ -Überaktivierung echokardiographisch eine progressive Verschlechterung der Kontraktilität bis hin zur völligen Dekompensation (Abb. 3.9). Auffällig ist, dass sich sowohl die vermehrte Hypertrophie als auch die kontraktile Dysfunktion in den dC x I-1 KO-Mäusen verglichen mit den dC-Mäusen insbesondere im jungen Alter von 6 Wochen manifestiert. Im fortgeschrittenen Alter gleichen sich die Unterschiede bezüglich des LVM/KG Verhältnisses und die FAS in beiden Genotypen an.

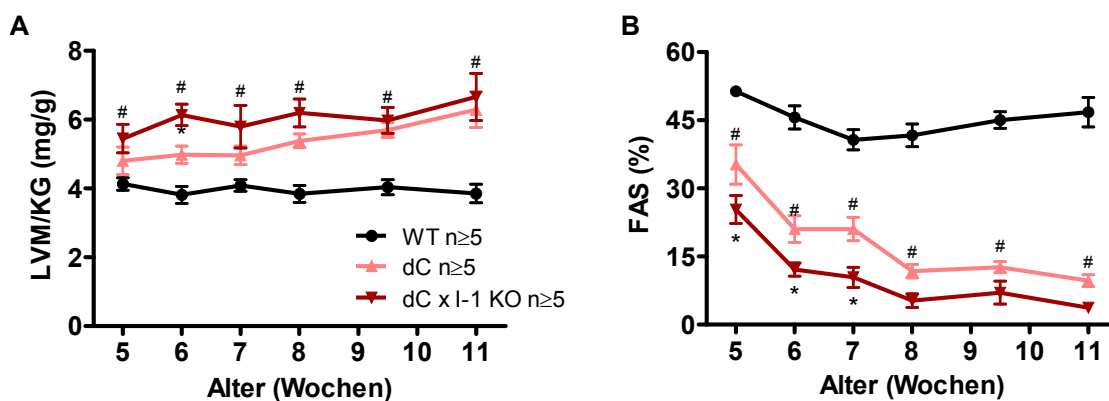


Abb. 3.9: Echokardiographische Parameter im Verlauf von der 5. bis zur 11. Lebenswoche. Darstellung (A) der linksventrikulären Masse/Körpergewicht (LVM/KG) und (B) der linksventrikulären Flächenverkürzungsfraction (FAS); n= Anzahl der untersuchten Tiere. ANOVA *repeated measures*. *p<0,05 dC x I-1 KO vs. dC; #p<0,05 dC x I-1 KO vs. WT

Unter β -adrenergem Stress, induziert durch intraperitoneale Gabe von 10 μ g/g Dobutamin (Fresenius), ließ sich in den Mäusen mit CaMKII δ -Überexpression jeweils eine deutliche Desensitivierung gegenüber der adrenergen Stimulation feststellen (Delta HF (%): WT $23,99 \pm 6,03$; dC $6,52 \pm 4,48$; dC x I-1 KO $2,18 \pm 2,18$; n \geq 8; Abb. 3.10). Tendenziell ist diese in den dC x I-1 KO-Mäusen sogar noch ausgeprägter als in den dC-Mäusen. Weitere Messparameter sind im Anhang dargestellt (siehe Tab. 7.7 - 7.8).

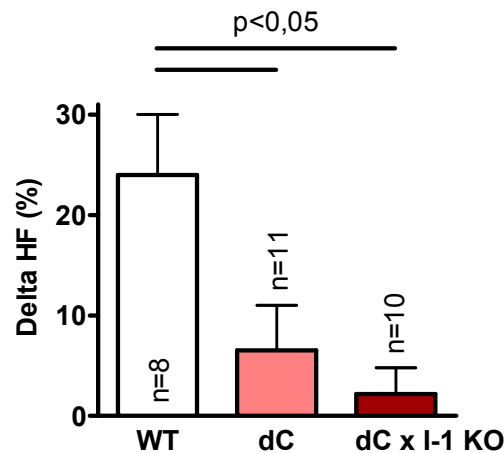


Abb. 3.10: Echokardiographie unter Dobutamin-Einfluss. Darstellung der prozentualen Änderung der HF unter Dobutamin-Einfluss (Delta FAS (%)) im Alter von 6 Wochen. Die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Tiere an.

3.2.4 Effekte einer I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ c-Mäusen auf den intrazellulären Ca $^{2+}$ -Haushalt

Die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop zur Analyse des intrazellulären Ca $^{2+}$ -Haushalts und die Messungen am Konfokalmikroskop zur Analyse des SR-Ca $^{2+}$ -Lecks der dC x I-1 KO-Linie erfolgten ausschließlich an Mäusen im Alter von 6 Wochen. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich bereits mittels Echokardiographie ein schwerer kardialer Phänotyp feststellen, jedoch führte dieser in diesem Alter noch nicht zum Vollbild einer Dekompensation. Zudem war im Alter von 6 Wochen auch erst ein sehr geringer Anteil der Mäuse mit transgener CaMKII δ c-Überexpression verstorben, sodass keine starke Beeinflussung durch potentielle Selektion anzunehmen war.

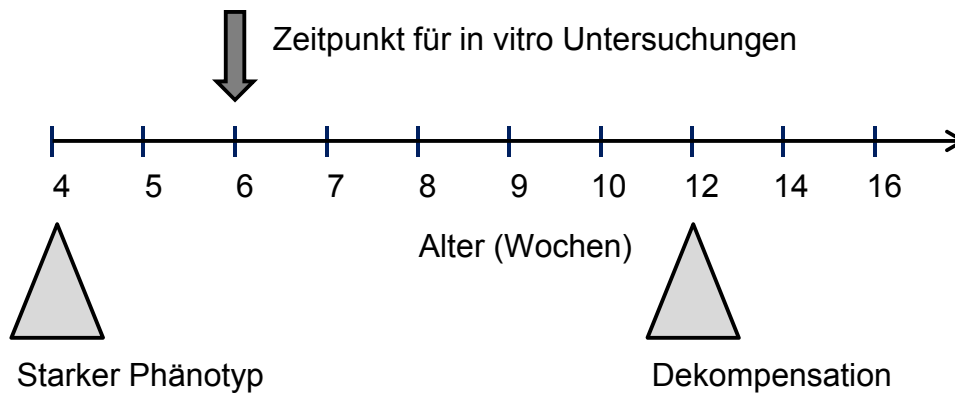


Abb. 3.11: Übersicht über den Messzeitpunkt der Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopie.

Auch in den dC und den dC x I-1 KO-Mäusen wurde der intrazelluläre Ca^{2+} -Haushalt mittels Epifluoreszenzmessung analysiert.

Die dC-Kardiomyozyten zeigten tendenziell verminderte Ca^{2+} -Transienten bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz (Transientenamplitude bei 4 Hz (F340/F380): WT $0,28 \pm 0,02$; dC $0,24 \pm 0,02$; dC x I-1 KO $0,19 \pm 0,01$; $n \geq 41$ Zellen/4 Herzen; Abb. 3.12 E). In den dC x I 1 KO-Kardiomyozyten war dieser Effekt noch einmal stärker ausgeprägt, sodass hier ein signifikanter Unterschied zum WT bestand. Wurden die Myozyten lediglich bei 1 Hz stimuliert, zeigte sich in der Tendenz der gleiche Effekt, jedoch in geringerer Ausprägung (Transientenamplitude bei 1 Hz (F340/F380): WT $0,28 \pm 0,02$; dC $0,25 \pm 0,02$; dC x I-1 KO $0,24 \pm 0,02$; $n \geq 45$ Zellen/4 Herzen Abb. 3.12 D).

Das diastolische Ca^{2+} -Level in den dC x I-1 KO und dC-Mäusen war deutlich erniedrigt verglichen mit dem WT (Abb. 3.12 C).

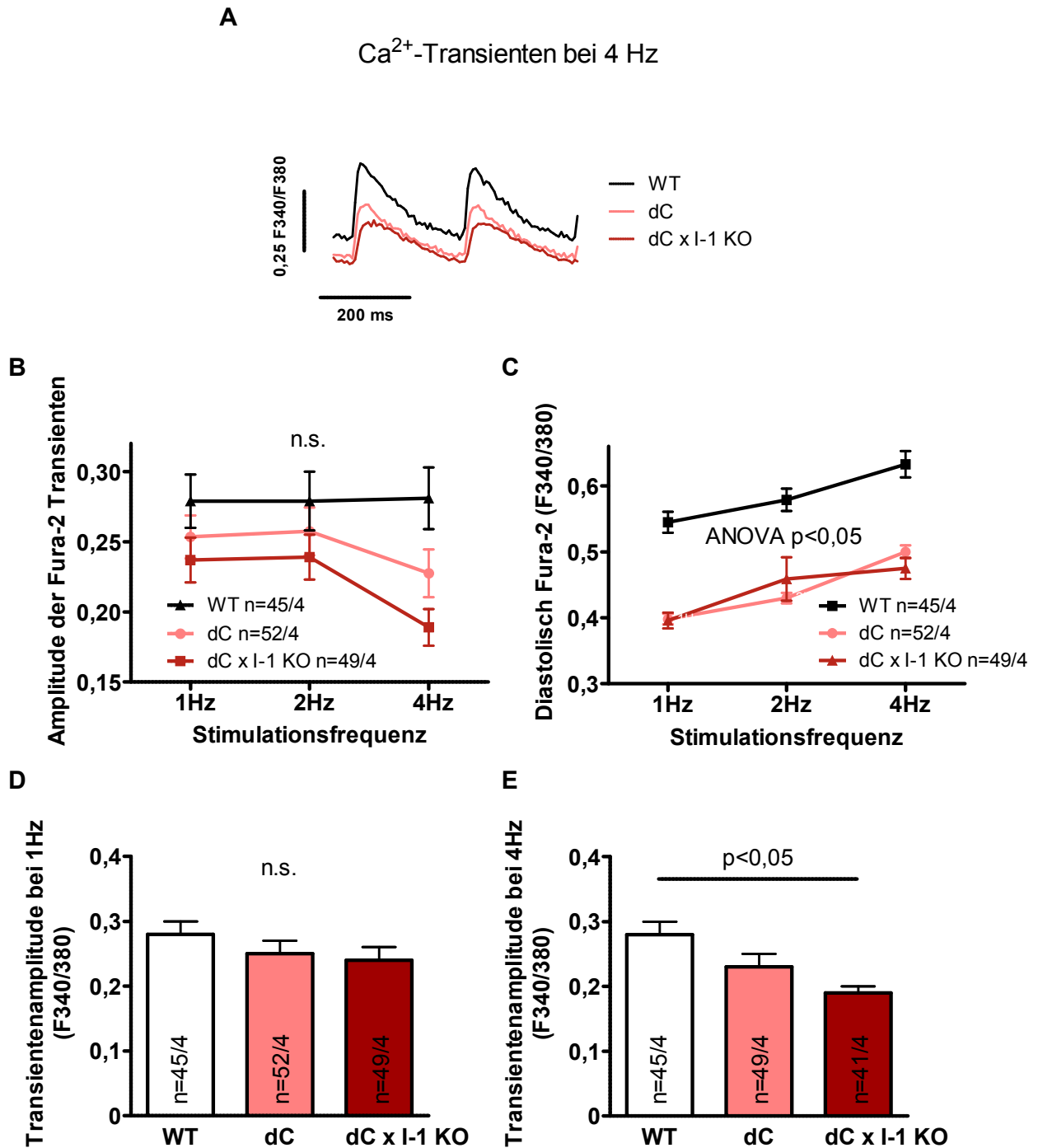


Abb. 3.12: Analyse des intrazellulären Ca²⁺-Haushalts in dC x I-1 KO-Mäusen. Darstellung (A) repräsentativer Originalregistrierungen der Ca²⁺-Transienten bei einer Feldstimulation von 4 Hz, (B) der Amplitude der Ca²⁺-Transienten bei einer Feldstimulation von 1, 2 und 4 Hz, (C) des diastolischen Ca²⁺-Levels (Fura-2 F340/380), (D) der Transientenamplitude bei 1 Hz und (E) 4 Hz; die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Zellen/Herzen an. (B-C) ANOVA *repeated measurements*.

Betrachtet man die Kinetik der Ca²⁺-Transienten, so ließ sich bei einer Stimulation mit 4 Hz eine verlangsamte RT50% in den dC x I-1 KO-Mäusen feststellen, verglichen

mit den dC und WT Mäusen (RT50% (sec) bei 4 Hz: WT $0,08 \pm 0,002$; dC $0,09 \pm 0,002$; dC x I-1 KO $0,1 \pm 0,005$; $n \geq 41/4$; Abb. 3.13 B). Dies spricht für eine verminderte SERCA2a-Funktion in den dC x I-1 KO-Kardiomyozyten. (in Kapitel 2.6 erläutert).

Bezüglich des SR- Ca^{2+} -Gehalts, gemessen durch die Amplitude des Koffein-induzierten Transienten, konnten keinerlei Unterschiede zwischen den dC und dC x I-1 KO-Mäusen festgestellt werden (Abb. 3.13 C). Es zeigte sich jedoch eine gesteigerte NCX-Funktion in den dC x I-1 KO-Mäusen verglichen mit dem WT und tendenziell auch zu den dC-Mäusen. (τ des Koffein-induzierten Transienten: WT $1,45 \pm 0,09$; dC $1,58 \pm 0,11$; dC x I-1 KO $1,81 \pm 0,11$; $n \geq 29/4$; Abb. 3.13 D).

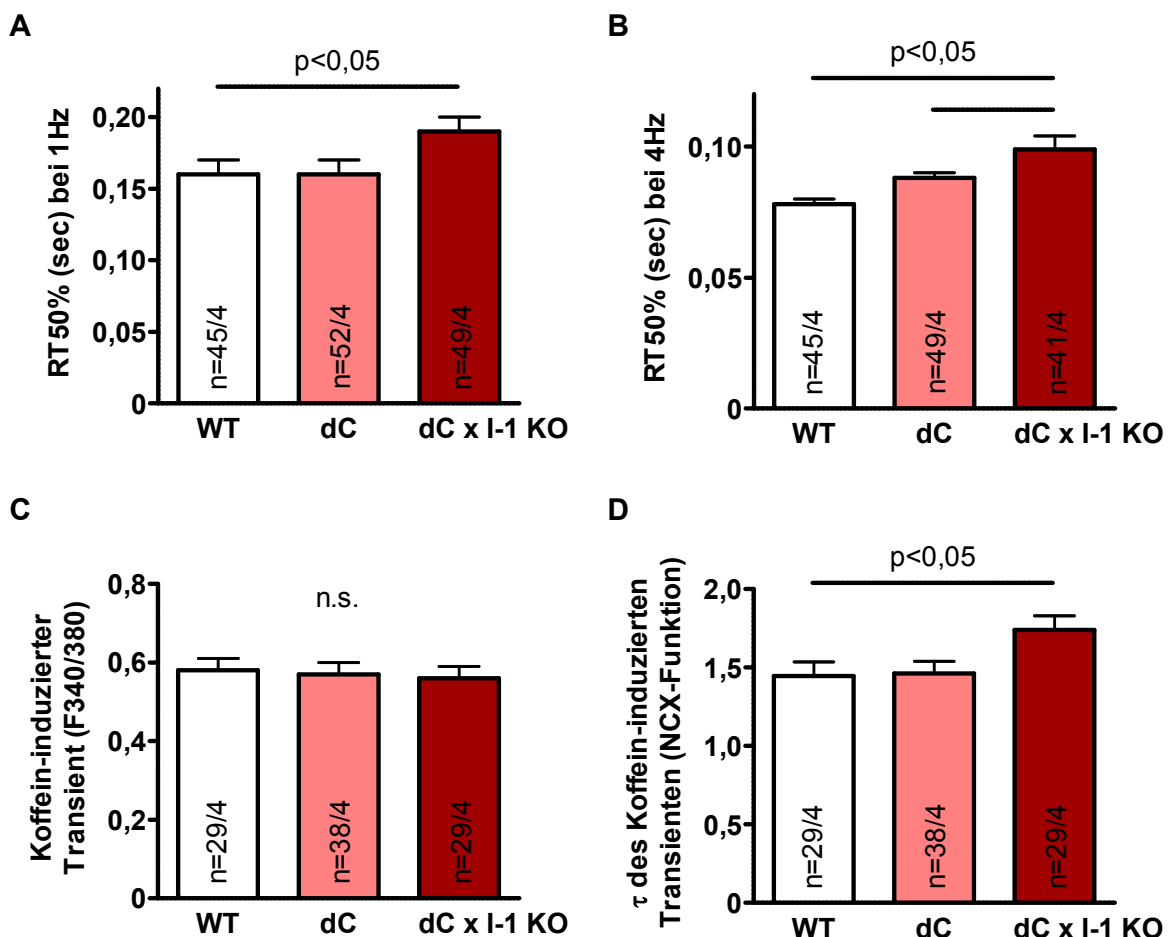


Abb. 3.13: Kinetik der Ca^{2+} -Transienten in dC x I-1 KO-Mäusen. Darstellung (A) der RT50% bei Feldstimulation mit 1 Hz (sec), (B) der RT50% bei Feldstimulation mit 4 Hz (sec), (C) des Koffein-induzierten Transienten (F340/380) und (D) des τ des Koffein-induzierten Transienten; die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der untersuchten Zellen/Herzen an.

3.2.5 Analyse des SR-Ca²⁺-Lecks in dC x I-1 KO-Mäusen

Das SR-Ca²⁺-Leck wurde in den dC x I-1 KO-Mäusen durch Messung von Ca²⁺-Sparks am Konfokalmikroskop untersucht.

Bezüglich des HM SR-Ca²⁺-Lecks konnten keinerlei entscheidende Unterschiede zwischen den dC x I-1 KO und den dC-Kardiomyozyten festgestellt werden (HM SR-Ca²⁺-Leck (nF/F₀*m*s): WT 25,67 ± 0,94; dC 38,25 ± 1,53; dC x I-1 KO 43,43 ± 2,13; n≥536 Sparks; Abb. 3.14 A). Gleichzeitig zeigte sich eine geringe Tendenz dahingehend, dass die Sparks der dC x I 1 KO-Kardiomyozyten etwas größer zu sein schienen, bei gleichzeitiger Tendenz zu weniger spontanen Ca²⁺-Freisetzungseignissen (HM SR-Ca²⁺-Leck (nF/F₀): WT 25,67 ± 0,94; dC 38,25 ± 1,53; dC x I-1 KO 43,43 ± 2,13; n≥145 Zellen; SCaEs (%):WT 31,11; dC 53,85; dC x I-1 KO 46,94; n≥45; Abb. 3.14 B-C).

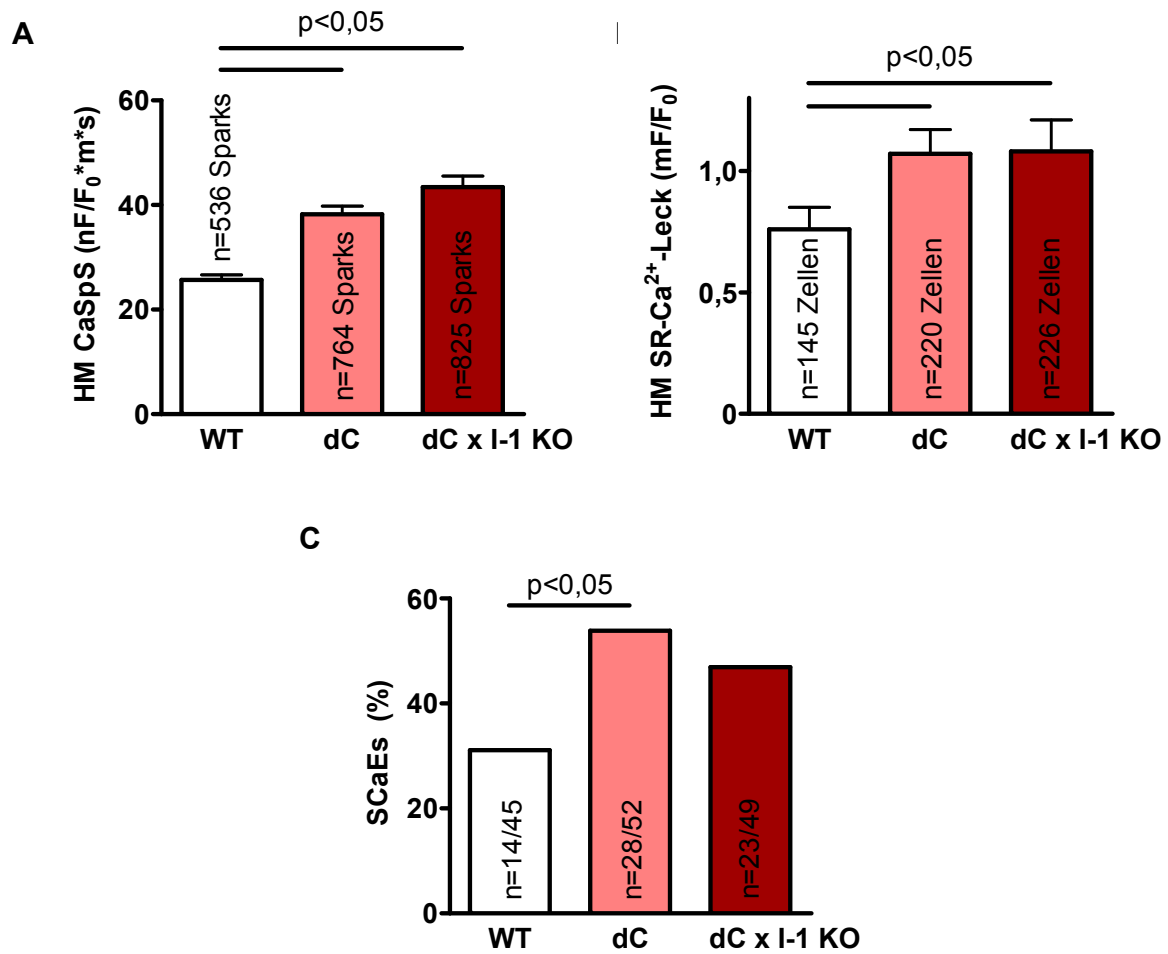


Abb. 3.14: Ca^{2+} -Spark Analyse der dC x I-1 KO-Mäuse. Darstellung (A) der Ca^{2+} -Spark-Größe (CaSpS HM ($nF/F_0 \cdot m \cdot s$)), (B) des HM Ca^{2+} -Lecks (mF/F_0) und (C) der SCaEs (%); die Zahl in den Säulen gibt, soweit nicht abweichend gekennzeichnet, die Anzahl der Zellen/Herzen an.

4 Diskussion

4.1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Fragestellung

Die chronische Herzinsuffizienz ist durch eine erniedrigte Auswurfleistung des Herzens charakterisiert. Trotz einer Fülle von Medikamenten, wie beispielsweise den β -Blockern, ist es bis heute nicht möglich, die Herzinsuffizienz kurativ zu behandeln.

Auf zellulärer Ebene kommt es aufgrund des erniedrigten Auswurfs des Herzens zu einer kompensatorischen sympathischen Überstimulation, die letztendlich zu einer Desensitivierung der β -Rezeptoren führt (Bristow et al. 1982). Wenn auch kontrovers diskutiert, könnte dieser Mechanismus einen Schutz vor chronischer adrenerger Überstimulation und somit vor Arrhythmien und Hypertrophie bedeuten. Dieser Mechanismus könnte zum klinischen Erfolg der β -Blocker in der Herzinsuffizienztherapie beitragen (Doughty et al. 1997).

Zwischen 30 und 40 % der an chronischer Herzinsuffizienz leidenden Patienten versterben an einem plötzlichem Herztod, der am wahrscheinlichsten durch ventrikuläre Arrhythmien ausgelöst wird (Packer 1985). Als Ursache hierfür kommen unter anderem ektope Erregungszentren in Frage. Auf zellulärer Ebene wird dies mit einem erhöhten diastolischen SR- Ca^{2+} -Leck durch den RyR2 in Zusammenhang gebracht. Die wissenschaftliche Forschung konzentrierte sich insbesondere auf die Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII und die PKA (Eisner et al. 2009). Uneinigkeit bestand darüber, welcher Mechanismus der entscheidende bezüglich der Hyperphosphorylierung des RyR2 und damit letztendlich verantwortlich für das erhöhte SR- Ca^{2+} -Leck in der Herzinsuffizienz ist. Marx et al. (2000) nehmen an, dass die PKA-abhängige Phosphorylierung des RyR2 an Serin 2808 der Hauptmechanismus ist, der durch ein erhöhtes SR- Ca^{2+} -Leck ektope Arrhythmien triggert (Marx et al. 2000). Diverse Arbeitsgruppen konnten indes zeigen, dass eine erhöhte CaMKII Aktivität zu einer Hyperphosphorylierung des RyR2 an Serin 2814 führt und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Arrhythmien steigert (Guo et al., 2006; Neef et al., 2010; Voigt et al., 2012; Neef und Maier, 2013). Zudem gelang auch im transgenen Mausmodell bereits ein entsprechender Nachweis (Sag et al., 2009; van Oort et al., 2010). Auch konnte gezeigt werden, dass eine CaMKII-

Inhibition, mehr noch als eine PKA-Inhibition, das proarrhythmische SR-Ca²⁺-Leck in experimentellen Herzinsuffizienzmodellen vermindert (Curran et al. 2007).

Ein relativ neu identifiziertes Element der β -adrenergen Signalkaskaden ist der I-1. PKA-abhängig aktiviert, hemmt der I-1 ausschließlich im phosphorylierten Zustand selektiv die PP1. Dies führt zu einer längeren und gesteigerten Phosphorylierung der I-1/PP1-sensitiven regulatorischen Phosphoproteine (Rodriguez et al. 2007). Dadurch ist der I-1 in das Ungleichgewicht der Kinasen und Phosphatasen der Herzinsuffizienz involviert. Sowohl in tierexperimentellen Herzinsuffizienzmodellen als auch in der menschlichen Herzinsuffizienz konnte gezeigt werden, dass die I-1 Expression herunterreguliert ist (El-Armouche et al. 2004). Diese Tatsache kann von besonderer therapeutischer Bedeutung sein, betrachtet man die laufende Diskussion der De- oder Resensitivierung in der Herzinsuffizienz.

Vor Beginn dieser Arbeit war bereits gezeigt worden, dass I-1 KO-Mäuse unter Isoprenalin-induziertem Stress vor ventrikulären Arrhythmien geschützt sind (El-Armouche et al. 2008). Zudem konnten Wittköpper et al. (2010) zeigen, dass es bei Mäusen mit doppeltransgener konstitutiv aktiver I-1 Überexpression zu vermehrten lethalen ventrikulären Tachykardien kommt, während sie unter Doxyzyklin-Gabe vor diesen Arrhythmien geschützt waren. Mechanistisch wurde dies in Zusammenhang mit einem erhöhtem SR-Ca²⁺-Leck gebracht (Wittköpper et al. 2010). Die zellulären Mechanismen sind bislang jedoch weitestgehend unbekannt. In I-1 KO-Mäusen wurde das SR-Ca²⁺-Leck bisher nicht untersucht. Der erste Abschnitt dieser Arbeit hatte zum Ziel, (i) die bisher nicht untersuchte Funktion des RyR2 in I-1 KO-Mäusen zu analysieren und (ii) damit im Zusammenhang stehend, die Veränderungen des Ca²⁺-Haushalts zu untersuchen und zu bewerten.

4.2 Das transgene Mausmodell als Krankheitsmodell der Herzinsuffizienz – Vorteile und Limitationen

Zunächst soll das in dieser Arbeit verwendete transgene Mausmodell als Grundlage dieser Forschungsergebnisse betrachtet und diskutiert werden.

Während der letzten 40 Jahre wurden Kleintiermodelle von Grundlagenforschern benutzt, um die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz zu erforschen und neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Ziel der Verwendung von Kleintiermodellen in der Herzinsuffizienzforschung ist es, die extrem komplexen und vielschichtigen Veränderungen in der Herzinsuffizienz zu vereinfachen, um dann gezielt bestimmte Veränderungen erfassen zu können.

Unbestreitbare Vorteile des Mausmodells sind die relativ kostengünstige Haltung der Tiere, die hohe und schnelle Reproduktionsrate der Mäuse, verbunden mit einer großen Anzahl gleichaltriger Tieren für experimentelle Untersuchungen und damit einer hohen statistischen Aussagekraft. Zudem gibt es inzwischen viele Untersuchungsmethoden, wie beispielsweise die Echokardiographie an Kleintieren, die eine aussagekräftige Analyse der kardialen Morphologie und funktioneller Parameter möglich machen (Tanaka et al. 1996). Bei der Verwendung von Krankheitsmodellen wird sehr häufig das Mausmodell verwendet, weil eine Vielzahl von etablierten transgenen und KO-Stämmen erhältlich ist.

Trotz dieser erheblichen Vorteile gibt es auch Limitationen des Mausmodells, die bei der Forschung und Evaluierung therapeutischer Ansatzpunkte kritisch zu betrachten sind. So unterscheidet sich beispielsweise die anatomische Größe des Herzens erheblich. Auch bezüglich der Herzfrequenz gibt es deutliche Unterschiede zwischen der Maus mit einer HF von 400-500 bpm und dem Menschen mit ca. 70 bpm, was auch zu Unterschieden des Ca^{2+} -Haushalts zwischen humanen und murinen Kardiomyozyten führt (Breckenridge 2010). Als bedeutendes Beispiel sei hier die Funktion der SERCA2a zu nennen. Die Relaxation des Herzmuskels in der Maus ist unter physiologischen Bedingungen zu ~90% abhängig von der SERCA2a, die die Ca^{2+} -Ionen wieder zurück in das SR pumpt. Im humanen Herzmuskel werden hingegen nur zu ~70% der Ca^{2+} -Ionen SERCA2a-abhängig zurück in das SR gepumpt. ~28% der Ca^{2+} -Ionen werden über den NCX zurück in den Extrazellulärraum gepumpt (Bers 2001).

Bei allen Chancen und Möglichkeiten, die die inzwischen relativ einfache Modulation des murinen Genoms mit sich bringt, sollten Limitierungen, die auch Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion sind, nicht unerwähnt bleiben. Es ist nämlich häufig sehr schwierig, Rückschlüsse von Daten aus murinen, zum Teil unregulierten

oder konstitutiv-aktiven Transgenen auf humane physiologische Proteinexpressionslevel zu ziehen (Cook et al. 2009). Trotz dieser Einschränkungen und Limitierungen des transgenen Mausmodells sind sie als Krankheitsmodell von enormer Wichtigkeit, um relevante Signalelemente und Signalwege in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz zu identifizieren. Deswegen wurde auch in dieser Arbeit ein transgenes Mausmodell als Krankheitsmodell gewählt.

4.3 I-1-Ablation führt nicht zu einer kontraktilen Dysfunktion

Im I-1 KO-Mausmodell wird bis heute kontrovers diskutiert, ob eine Ablation des I-1 zu einer Verschlechterung der Kontraktilität führt, wie es Carr et al. (2002) beschrieben haben. Ebenso wie zuvor von El-Armouche et al. (2008) gezeigt, konnten auch in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten keine Anzeichen einer kontraktilen Dysfunktion anhand der FAS (%) in den echokardiographischen Untersuchungen der I-1 KO-Tiere unter basalen Bedingungen festgestellt werden. Diese Ergebnisse weiter stützend, zeigte sich auch auf zellulärer Ebene keine eingeschränkte Kontraktilität in isolierten Kardiomyozyten der I-1 KO-Mäuse. Ermittelt wurde dies durch die prozentuale Sarkomerlängenverkürzung der diastolischen Länge.

4.4 I-1-Ablation reduziert das SR-Ca²⁺-Leck in murinen Kardiomyozyten und vermindert das diastolische Ca²⁺-Level

Das SR-Ca²⁺-Leck wurde mittels Ca²⁺-Sparkmessung am Konfokalmikroskop untersucht. Dabei zeigte sich wie erwartet und passend zu den oben genannten Ergebnissen von Wittköpper et al. (2010) und El-Armouche et al. (2008) in den I-1 KO-Kardiomyozyten eine verminderte CaSpF (1/(100 $\mu\text{m}^2\text{s}$)). Als Konsequenz war auch das SR-Ca²⁺-Leck in den I-1 KO-Kardiomyozyten verglichen mit dem WT vermindert. Trotz andauernder Diskussion über die Relevanz der RyR2-Phosphorylierung im Allgemeinen, ist mechanistisch betrachtet anzunehmen, dass die Ser2815-Hypophosphorylierung in I-1 KO-Mäusen ursächlich für das verminderte SR-Ca²⁺-Leck ist (El-Armouche et al. 2008). Wie es Bers (2001) bereits beschrieben hat, geht ein erhöhtes SR-Ca²⁺-Leck mit einer erniedrigten diastolischen Ca²⁺-

Konzentration einher (Bers et al. 2003; Duan 2010). Tatsächlich zeigte sich aber in den Epifluoreszenzmessungen der I 1 KO-Kardiomyozyten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, ein erniedrigtes diastolisches Ca^{2+} -Level verglichen mit dem WT.

Die unter anderem von Sag et al. (2009) beschriebene Methode zur Messung spontaner Ca^{2+} -Freisetzungseignisse (SCaEs) während einer definierten Stimulationspause diente auch in dieser Arbeit zur Erfassung des antiarrhythmischen Potenzials einer I-1-Ablation auf zellulärer Ebene. Voigt et al. (2012) beschreiben einen direkten Zusammenhang zwischen SCaEs und dem SR- Ca^{2+} -Leck. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten die I 1 KO-Kardiomyozyten während einer 20 sec Stimulationspause im Vergleich zum WT 35% weniger SCaEs bei gleichzeitig vermindertem SR- Ca^{2+} -Leck.

Nicht nur bei der Entstehung von Arrhythmien, sondern auch in der Entwicklung der Herzinsuffizienz spielt ein erhöhtes SR- Ca^{2+} -Leck eine erhebliche Rolle (Wehrens et al. 2004b; Yano et al. 2003). Dementsprechend könnte das erniedrigte SR- Ca^{2+} -Leck bei einer I-1-Ablation auch mit ursächlich für den bereits von El-Armouche et al. (2008) beschriebenen Schutz vor einem Herzinsuffizienzprogress sein.

4.5 I-1-Ablation im Herzinsuffizienzmodell einer transgenen CaMKII δ_c -Maus

In den oben geschilderten Ergebnissen zeigte sich ein klarer antiarrhythmischer Phänotyp auf zellulärer Ebene, welcher die *In-Vivo*-Ergebnisse von Wittköpper et al. (2010) stützt. Es drängt sich die Frage auf, inwiefern sich dies auch in der Herzinsuffizienz bestätigt.

Um das therapeutische Potenzial einer I-1-Ablation in einem Herzinsuffizienzmodell zu untersuchen, muss zunächst das am besten passende Modell gefunden werden. Verfolgt man dazu die oben genannten Ergebnisse des antiarrhythmischen Potentials der transgenen I-1-Ablation durch ein vermindertes SR- Ca^{2+} -Leck, richtet sich der Fokus schnell auf den RyR2. El-Armouche et al. (2008) konnten zeigen, dass es bei einer I-1-Ablation zu einer Hypophosphorylierung des RyR2 an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Serin 2815, nicht jedoch an der PKA-

Phosphorylierungsstelle Serin 2809, kommt. Dies wirft die Frage auf, ob die CaMKII-Phosphorylierungsstelle des RyR2 I-1 abhängig reguliert wird. Die PP1-vermittelte Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der CaMKII könnte in diesem Zusammenhang durch den I-1 inhibiert sein. In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Modell mit einer I-1-Ablation wäre dann genau Gegenzugliches der Fall, also eine CaMKII-Inaktivierung und eine verminderte Phosphorylierung des RyR2. Letztlich würde dieser Zusammenhang einen *crosstalk* zwischen den Signaltransduzierenden Elementen CaMKII und PKA erzeugen. In Neuronen konnte eine solche Abhängigkeit bereits gezeigt werden (Blitzer et al. 1998).

Im Maus-Herzinsuffizienzmodell mit transgener CaMKII δ_c -Überexpression kommt es zu einer starken RyR2-Hyperphosphorylierung und einem erhöhten SR-Ca²⁺-Leck. Interessanterweise wiesen die transgenen CaMKII δ_c -Mäuse bereits vor Ausprägung des schweren Phänotyps ein vermehrtes SR-Ca²⁺-Leck auf (Zhang et al. 2003; Ai et al. 2005). Dies führt zu der Hypothese, dass durch ein I-1 KO-bedingtes vermindertes Ca²⁺-Leck von Geburt an der Progress des schweren CaMKII δ_c -assoziierten Phänotyps verbessert wird. Deshalb wurden in dieser Arbeit transgene I-1 KO-Mäuse mit transgenen CaMKII δ_c -Mäusen gekreuzt. Für die basale kardiale Charakterisierung wurden drei Genotypen miteinander verglichen: transgene CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse, transgene CaMKII δ_c -Mäuse und der WT als Kontrollgruppe. Für die Experimente wurden ausschließlich gleichaltrige Geschwistertiere beider Geschlechter verwendet.

4.6 I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse verbessert nicht das Überleben

Wider Erwarten und entgegen der ursprünglichen Hypothese, dass eine I-1-Ablation den schweren Phänotyp der transgenen CaMKII δ_c -Überexpression verbessert, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen dC x I-1 KO-Mäusen und den dC-Mäusen bezüglich des Überlebens. In beiden Genotypen zeigte sich bereits nach 4-6 Wochen eine erhöhte Mortalität. Für die dC Mäuse wurde bereits von Zhang et al. (2003) eine massiv erhöhte Mortalität in transgenen CaMKII δ_c beschrieben. Es ist anzunehmen, dass sich bei erhöhten Tierzahlen sogar ein

signifikanter Unterschied hinsichtlich eines früheren Versterbens der transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse verglichen mit den CaMKII δ_c -Mäusen zeigen könnte.

4.7 I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäusen führt zu kardialer Hypertrophie

Passend zu den Daten der Überlebensstudie zeigten die dC x I-1 KO-Mäuse verglichen mit den dC-Mäusen eine noch stärkere kardiale Hypertrophie, gemessen anhand des HG/KG Verhältnisses. Zudem bestand auch eine verstärkte Hypertrophie der einzelnen isolierten Kardiomyozyten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Linksherzinsuffizienz mit daraus resultierendem Rückwärtsversagen und pulmonaler Stauung vorlag, da das Lungengewicht in den Mäusen mit transgener CaMKII δ_c -Überexpression deutlich erhöht war, nicht jedoch das Lebergewicht. Bei zusätzlicher I-1-Ablation vergrößerte sich das ohnehin schon erhöhte Lungengewicht der dC Mäuse noch zusätzlich, vermutlich im Sinne einer noch weiter eingeschränkten linksventrikulären Pumpfunktion.

4.8 Transgene CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse zeigen vermehrte kontraktile Dysfunktion in der Echokardiographie

Nach Erhebung der morphologischen Parameter der transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse, stellte sich die Frage, welche Auswirkungen die vermehrte kardiale Hypertrophie auf die funktionellen Parameter hat. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit echokardiographische 2D Analysen im Alter von 6 Wochen angefertigt und auch der Verlauf bis zum Alter von 11 Wochen weiter kontrolliert.

Die Entscheidung für eine Analyse der funktionellen kardiologischen Parameter mittels Echokardiographie und gegen beispielsweise eine Herzkatheteruntersuchung oder auch ein Kardio-MRT wurde aus mehreren Gründen getroffen. Insbesondere im Vergleich zur Herzkatheteruntersuchung ist die Echokardiographie eine nicht-invasive Untersuchungstechnik, die billiger, technisch einfacher und ohne speziell ausgestattete Räumlichkeiten durchführbar ist. Ein weiterer nicht zu bestreitender Vorteil der Echokardiographie ist die Möglichkeit, serielle Aufnahmen und zeitliche

Verlaufsanalysen zu erstellen. Aufgrund des großen operativen Eingriffs bei einer Herzkatheteruntersuchung der Maus mit Zugang über die Herzspitze oder die A. carotis ist eine zeitliche Verlaufsanalyse der Herzfunktion nicht möglich. Zudem kann bei der nicht-invasiven Echokardiographie eine mildere Narkose mit Isofluran vertreten werden, da es sich nicht um einen operativen Eingriff handelt. Der Einfluss der Anästhesie auf die Herzfunktion ist somit wesentlich geringer und spiegelt die physiologische Herzfunktion genauer wieder. Auch das Kardio-MRT ist eine nicht-invasive Untersuchungsmethode, mit der es möglich ist, serielle Verlaufsanalysen der Herzfunktion anzufertigen. Der technische und finanzielle Aufwand und die speziellen Räumlichkeiten für die Analyse mittels Kardio-MRT sind jedoch bedeutend größer im Vergleich zur Echokardiographie. Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Arbeit die Echokardiographie als Methode der Wahl zur Analyse der Herzfunktion der CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäuse gewählt.

Nachdem die morphologischen Untersuchungen der CaMKII δ_c -I-1 KO-Herzen bereits auf eine weitere Verschlechterung des CaMKII δ_c -Phänotyps bei zusätzlicher I-1-Ablation schließen ließen, zeigte sich tatsächlich auch in der funktionellen Analyse mittels Echokardiographie eine weitere Verschlechterung im Sinne einer kontraktilen Dysfunktion vor allem im Alter von 5-7 Wochen. Dass eine Verschlechterung der Kontraktilität in den dC x I-1 KO-Mäusen insbesondere im jungen Alter auftritt, passt zu den Ergebnissen von Huke et al. (2011), bei denen eine gezielte Inhibition der SR-lokalisierten CaMKII δ_c durch AIP (*Autocamtide-2-Related Inhibitory Peptide*) ebenfalls bei jungen Mäusen zu einer erheblichen kontraktilen Dysfunktion *in vivo* führte.

Unter β -adrenergem Stress, induziert durch intraperitoneale Gabe von Dobutamin, zeigten sich keine Unterschiede zwischen dC x I-1 KO und dC. Bei einem Vergleich mit dem WT lässt sich jeweils eine deutliche Desensitivierung gegenüber der adrenergen Stimulation feststellen wie sie auch schon zuvor in transgenen CaMKII δ_c -Mäusen beschrieben wurde (Grimm und Brown 2010). Zu einer noch stärkeren Desensitivierung durch eine I-1-Ablation in den CaMKII δ_c -Mäusen kam es hingegen nicht.

Es blieb die Frage nach der mechanistischen Ursache dieser sowohl morphologischen, als auch funktionellen Verschlechterung des CaMKII δ_c -Phänotyps durch eine I-1-Ablation.

4.9 I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäusen führt nicht zu einer Reversion der Veränderungen der elektromechanischen Kopplung

Um dieser Frage, gerade auch im Hinblick auf den zellulären Ca²⁺-Haushalt in den CaMKII δ_c -I-1 KO-Kardiomyozyten nachzugehen, wurden in dieser Arbeit Epifluoreszenz-Analysen an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt.

Maier et al. (2003) zeigten, dass eine CaMKII δ_c -Überexpression, verglichen mit dem WT, zu erniedrigten Ca²⁺-Transienten führt. Bei einer Stimulation mit 4 Hz konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich bei zusätzlicher I-1-Ablation in den CaMKII δ_c -Mäusen noch deutlich niedrigere Ca²⁺-Transienten feststellen lassen. Wurden die Myozyten lediglich mit 1 Hz stimuliert, zeigte sich in der Tendenz der gleiche Effekt. Es ist anzunehmen, dass dies im Zusammenhang mit der negativen Kraft-/Frequenzbeziehung und den physiologisch deutlich höheren HF der Mäuse (400-600 bpm) im Vergleich zum Menschen (60-80 bpm) steht. Die erniedrigten Ca²⁺-Transienten in den dC x I-1 KO-Mäusen spiegeln die funktionellen Daten der Echokardiographie wider, in denen sich eine deutlich reduzierte FAS (%) feststellen ließ.

Die diastolischen Ca²⁺-Konzentration in transgenen CaMKII δ_c -Mäusen ist von Maier et al. (2003) als deutlich erniedrigt beschrieben. Mechanistisch lässt sich dies am Ehesten noch im Zusammenhang mit einer 2-fach erhöhten NCX-Expression bei gleichzeitig erhöhtem SR-Ca²⁺-Leck und verminderter SERCA2a-Expression erklären (Maier et al. 2003).

Bei zusätzlicher I-1-Ablation in den CaMKII δ_c -Mäusen wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine erniedrigte diastolische Ca²⁺-Konzentration bei gleichzeitig gesteigerter NCX-Funktion festgestellt, jedoch lässt sich kein Unterschied zwischen den dC und den dC x I-1 KO-Mäusen feststellen. Während einer Stimulation mit 4 Hz konnte, verglichen mit den dC-Kardiomyozyten, ein tendenziell noch stärker

ausgeprägtes Relaxationsdefizit in den dC x I-1 KO Kardiomyozyten gezeigt werden. Da es bei einer I-1-Ablation zu einer verminderten Phosphorylierung des PLB und dadurch zu einer verringerten SERCA2a-vermittelten diastolischen SR-Ca²⁺-Aufnahme kommt (El-Armouche et al. 2008), könnte dies ein mechanistischer Ansatzpunkt sein, das noch größere Relaxationsdefizit in den dC x I-1 KO Kardiomyozyten zu erklären.

Überraschenderweise wurde im Rahmen dieser Arbeit zwischen den WT, den dC und den dC x I 1 KO-Kardiomyozyten kein Unterschied des SR-Ca²⁺-Gehalts anhand der Amplitude des Koffein-induzierten Transienten gemessen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Maier et al. (2003) und Zhang et al. (2003), die eine Erniedrigung des SR-Ca²⁺-Gehalts in CaMKII δ_c -überexprimierenden Mäusen zeigten.

4.10 I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -I-1 KO-Mäusen führt nicht zu einem verminderten SR-Ca²⁺-Leck

Wie bereits im Kapitel 3.1.2 beschrieben, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass I-1 KO-Mäuse auf zellulärer Ebene einen antiarrhythmischen Phänotyp haben. Sowohl die SCAEs als auch das SR-Ca²⁺-Leck waren signifikant vermindert bei einer Ablation des I-1.

Wie erwartet konnte auch in dieser Arbeit eine drastisch gesteigerte Anzahl an SCAEs in dC-Mäusen gezeigt werden (vgl. Sag et al. (2009)). Der protektive antiarrhythmische Phänotyp durch eine I-1-Ablation vermochte im Kontext des schweren CaMKII δ_c -Phänotyps das Auftreten der SCAEs nicht signifikant zu reduzieren. Auch bezüglich des SR-Ca²⁺-Lecks konnte keine Verbesserung durch Ablation des I-1 im transgenen CaMKII δ_c -Herzinsuffizienzmodell erreicht werden. Vieles spricht dafür, dass die Überexpression der sehr stark arrhythmogenen CaMKII, dem antiarrhythmischen Potenzial eines I-1 KO überwiegt. Alternativ zu betrachten wäre, dass eine I-1-Ablation zu einer geringeren Kompensationsfähigkeit nach Myokardschädigung führt und so den Phänotyp der CaMKII δ_c -Überexpression noch zusätzlich verschlimmert. Nicolaou et al. (2009) konnten zeigen, dass konstitutiv aktive I-1 Mäuse besser vor Ischämie-/ Reperfusionsschäden geschützt sind und ein besseres Kompensationsverhalten nach Myokardschädigung aufweisen

als der WT. Daraus ließe sich ableiten, dass die Kompensationsfähigkeit nach Myokardschädigung bei einer Ablation des I-1 vermindert sein könnte.

4.11 Vergleich zu anderen transgenen Modellen mit einer CaMKII-Inhibition

Es wurde bereits auf unterschiedliche Art und Weise versucht, die CaMKII δ_c in CaMKII δ_c -überexprimierenden Tieren zu hemmen, mit dem Ziel, den schweren herzinsuffizienten Phänotyp zu verbessern. Dieses Ziel wurde auch im Rahmen dieser Arbeit verfolgt.

Bei einem Vergleich von CaMKII δ KO-Mäusen mit dem WT konnte gezeigt werden, dass eine genetische Ablation der CaMKII δ nach TAC-Operation (*transaortic constriction*) zu weniger Hypertrophie, Dilatation und kontraktile Dysfunktion führt. Gleichzeitig blieb die bei Herzinsuffizienz bekannte Hyperphosphorylierung des RyR2 an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle aus. Damit verbunden kam es auch zu einer Reduktion des SR-Ca²⁺-Lecks (Backs et al. 2009; Ling et al. 2009). Kürzlich jedoch zeigten Cheng et al. (2012), dass eine Ablation der CaMKII δ bei einer schweren plötzlichen Nachlasterrhöhung auch gegenteilige Effekte im Sinne einer diastolischen Funktionseinschränkung mit pulmonaler Stauung verursachen kann. An dieser Stelle soll die aktuell laufende Diskussion über Auswirkungen eines CaMKII δ KO dahingestellt bleiben. Im Bezug auf die hier vorliegende Arbeit ist es sicherlich problematisch, die Ergebnisse eines CaMKII δ KO mit kompletter genetischer Ablation der CaMKII δ , mit denen einer indirekten Hemmung der CaMKII δ_c durch eine gesteigerte PP1-Aktivität aufgrund der I-1-Ablation zu vergleichen. Desweiteren ist die Herzinsuffizienzentwicklung durch das verwendete TAC-Modell mit plötzlich einsetzender Nachlasterrhöhung vom transgenen CaMKII δ_c -Mausmodell zu unterscheiden, bei dem es von Geburt an zu Veränderungen insbesondere des Ca²⁺-Haushaltes kommt.

Andere Versuche, den schweren Phänotyp der transgen überexprimierenden CaMKII δ_c -Mäuse zu verbessern, waren kürzlich gescheitert, hier insbesondere zu nennen sei die zielgerichtet SR-Expression des CaMKII-Inhibitors AIP im transgenen CaMKII δ_c -Mausmodell (Huke et al. 2011). Auch die Ablation von PLB auf einem

transgenen CaMKII δ_c -Hintergrund konnte den schweren herzinsuffizienten Phänotyp nicht entscheidend verbessern (Zhang et al. 2010).

Genau wie in den Ergebnissen dieser Arbeit führte eine Inhibition der SR-lokalisierten CaMKII durch AIP in transgenen CaMKII δ_c -Mäusen (CaMK/SR-AIP) zu vermehrter Hypertrophie, sowohl biometrisch *ex vivo* als auch auf zellulärer Ebene. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, war die Hypertrophie insbesondere bei jüngeren Mäusen noch stärker ausgeprägt als in den dC-Mäusen. Echokardiographisch zeigten die CaMK/SR-AIP Mäuse genau wie die dC x I-1 KO-Mäuse auch eine eingeschränkte Kontraktilität und ein vergrößertes LVM/KG Verhältnis (Huke et al. 2011). Ein Unterschied zwischen den CaMK/SR-AIP- und den dC x I-1 KO-Mäusen bestand allerdings bezüglich der LVEDD, also der linksventrikulären Dilatation. In den CaMK/SR-AIP-Mäusen zeigte sich diese in ausgeprägtem Maße, wohingegen es in den dC x I-1 KO-Mäusen zu keiner zusätzliche Dilatation kam, verglichen mit den dC-Mäusen. Huke et al. (2011) erklären die verminderte Kontraktilität *in vivo* bei gleichzeitig unveränderter Einzelzellfunktion mit der vermehrte Dilatation und der aus dem Laplace-Gesetz resultierenden verminderten Wandspannung und systolischen Herzfunktion. Trotz dieser Verschlechterung des Phänotyps der CaMK/SR-AIP Mäuse *in vivo* zeigten sie eine verbesserte elektromechanische Kopplung mit einem verminderten SR-Ca²⁺-Leck, was jedoch den schweren Phänotyp bei transgener CaMKII δ_c -Überexpression letztendlich auch nicht verbessern konnte.

Da in den hier zugrunde liegenden Untersuchungen zur elektromechanischen Kopplung und der Einzelzellkontraktilität keine wesentlichen Verschlechterungen der dC Mäuse bei gleichzeitiger I-1-Ablation festgestellt wurden, ist anzunehmen, dass die schlechtere Herzfunktion *in vivo* unter Umständen durch ein strukturelles Remodeling verursacht wird. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass es bislang unbekannte SR-unabhängige Interaktionen zwischen der CaMKII δ_c und dem I-1 gibt, die bei einer Ablation des I-1 zu einer weiteren Verschlechterung des schweren CaMKII δ_c -assoziierten Phänotyps führen.

4.12 Ausblick

Veränderungen des kardialen Ca^{2+} -Haushalts und des SR- Ca^{2+} -Lecks bei I-1-Ablation wurden im Rahmen dieser Arbeit umfassend untersucht und diskutiert. Um die hier beschriebenen Ergebnisse im Zusammenhang mit den Expressionslevels der Proteine der elektromechanischen Kopplung zu bewerten, müssen die Ergebnisse von derzeit laufenden Untersuchungen, die diese Frage adressieren, abgewartet werden. Zu nennen sind insbesondere das Expressionslevel des RyR2, der $\text{CaMKII}\delta_c$ und des PLB, sowie die Phosphorylierungszustände.

Die bereits im Kapitel 4.11 formulierte Hypothese, dass eine I-1-Ablation in transgenen $\text{CaMKII}\delta_c$ -Mäusen zu einem verstärkten kardialen Remodeling führen könnte, wird derzeit von unserer Arbeitsgruppe weiter verfolgt. Dazu werden histologische Untersuchungen zur Detektion von Fibrose und Apoptose durchgeführt.

Kürzlich wurden einige neu entdeckte Substrate der CaMKII identifiziert, die in der Regulation und Zusammensetzung der Myofilamente eine Rolle spielen. Genauso ist eine mögliche Interaktion von EPAC mit der $\text{CaMKII}\delta_c$ und I-1 denkbar, die bereits von unserer Arbeitsgruppe untersucht wird (Bossuyt et al. 2008; Cazorla et al. 2009; El-Armouche et al. 2007a; Pereira et al. 2007, Pereira et al. 2012). Es besteht die Möglichkeit, dass Unterschiede diesbezüglich die Verschlechterung des $\text{CaMKII}\delta_c$ -Phänotyps bei zusätzlicher I-1-Ablation erklären könnten. Zukünftige Untersuchungen sollten das Ziel haben, mögliche neue Schnittstellen zwischen dem I-1 und der $\text{CaMKII}\delta_c$ zu identifizieren. Dazu sollte auch eine Proteomik-Analyse durchgeführt werden.

Langfristig betrachtet sollte das zu Beginn dieser Arbeit formulierte übergreifende Ziel, nämlich das therapeutische Potenzial des I-1 zu untersuchen, weiter verfolgt werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse eines verminderten SR- Ca^{2+} -Lecks und eines antiarrhythmischen Phänotyps auf zellulärer Ebene bei I-1-Ablation unterstreichen die Relevanz dieser Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Herz-/Kreislaufkrankungen sind seit Jahren die häufigste Todesursache in unserer Bevölkerung. Insbesondere die Herzinsuffizienz ist dabei von erheblicher Bedeutung. Umso wichtiger ist es, molekulare Veränderungen der Signaltransduktion zu verstehen und neue therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. Auf zellulärer Ebene steht die β -adrenerge Desensitivierung im Vordergrund. Dadurch kommt es zu veränderter Expression und Phosphorylierung von Proteinen, die in der Ca^{2+} -Homöostase und elektromechanischen Kopplung eine entscheidende Rolle spielen.

Der I-1 fungiert als distales Verstärkerelement der β -adrenergen Signalkaskade. PKA-abhängig phosphoryliert und aktiviert, hemmt er selektiv die kardial dominierende PP1 und erhöht den Phosphorylierungszustand diverser Proteine. Letztendlich führt der I-1 somit zu einer erhöhten β -adrenergen Sensitivität. In der Herzinsuffizienz ist der I-1 herunterreguliert, und provokativ formuliert, kann in diesem Fall von einem „intrazellulären β -Blocker“ gesprochen werden. Ziel dieser Arbeit war es, den bereits *in vivo* gezeigten antiarrhythmischen Phänotyp der I-1 KO-Mäuse auf zellulärer Ebene zu analysieren. Gleichzeitig sollten die kardialen Auswirkungen einer I-1-Ablation im transgenen CaMKII δ_c -Mausmodell untersucht werden. Insoweit wird ein indirekter *crossstalk* zwischen der CaMKII δ_c und dem I-1 am RyR2 angenommen, da beide Proteine an der CaMKII δ_c -Phosphorylierungsstelle Ser2815 mit gegensätzlichem Effekt ansetzen. Die Hypothese ist, dass durch ein I-1 KO-bedingtes vermindertes SR- Ca^{2+} -Leck von Geburt an der schwere CaMKII δ_c -assoziierte Phänotyp verbessert werden kann.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zunächst der Ca^{2+} -Haushalt und das SR- Ca^{2+} -Leck in I-1 KO-Mäusen untersucht. Es zeigte sich, dass durch eine I-1-Ablation das diastolische Ca^{2+} -Level signifikant erniedrigt war. Damit in Einklang steht das verminderte SR- Ca^{2+} -Leck und ein deutlich reduziertes Auftreten von SCaEs. Diese Ergebnisse ließen einmal mehr vermuten, dass der antiarrhythmische Phänotyp der I-1 KO-Mäuse durch Reduktion des SR- Ca^{2+} -Lecks im dC-Kardiomyozyten zu einer Besserung führen kann. Überraschenderweise und entgegen unserer Hypothese führte eine I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ_c -Mäusen nicht zu einem verbesserten Überleben, sondern vielmehr zu einer verstärkten Hypertrophie und kontraktile

Dysfunktion. Die elektromechanische Kopplung wurde nicht wesentlich beeinflusst und zeigte keine entscheidenden Unterschiede verglichen mit den transgenen CaMKII δ_c -Mäusen ohne I-1-Ablation. Insbesondere wurde das SR-Ca²⁺-Leck nicht reduziert. Bis jetzt ist mechanistisch nicht geklärt, warum es zu dieser unerwarteten Verschlechterung des Phänotyps kam. Trotzdem stellt eine Inhibition des I-1, gerade auch in Hinblick auf das reduzierte SR-Ca²⁺-Leck und den antiarrhythmischen Phänotyp, weiterhin eine potentielle Therapieoption dar.

6 Literaturverzeichnis

- Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ Res* 97, 1314–1322
- Aitken A, Cohen P (1982): Isolation and characterisation of active fragments of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 147, 54–58
- Backs J, Backs T, Neef S, Kreuzer MM, Lehmann LH, Patrick DM, Grueter CE, Qi X, Richardson JA, Hill JA et al. (2009): The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2342–2347
- Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H: Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem* 157, 171–179
- Bers DM: Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2. Auflage; Kluwer, Dordrecht 2001
- Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198–205
- Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH (2003): Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and heart failure: roles of diastolic leak and Ca^{2+} transport. *Circ Res* 93, 487–490
- Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM (1998): Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science (New York, N.Y.)* 280, 1940–1942
- Boknik P, Vahlensieck U, Huke S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Neumann J, Schmitz W (2000): On the cardiac contractile, electrophysiological and biochemical effects of endothall, a protein phosphatase inhibitor. *Pharmacology* 61, 43–50
- Bossuyt J, Helmstadter K, Wu X, Clements-Jewery H, Haworth RS, Avkiran M, Martin JL, Pogwizd SM, Bers DM (2008): Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I δ and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure. *Circ Res* 102, 695–702
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB et al. (2004): PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10, 248–254
- Breckenridge R (2010): Heart failure and mouse models. *Dis Model Mech* 3, 138–143

- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982): Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307, 205–211
- Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing S, Allen PB, Greengard P et al. (2002): Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22, 4124–4135
- Carrier L (2007): Cardiac myosin-binding protein C in the heart. *Arch Mal Coeur Vaiss* 100, 238–243
- Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A, Lezoualc'h F (2009): The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14144–14149
- Cheng J, Xu L, Lai D, Guilbert A, Lim HJ, Keskanokwong T, Wang Y (2012): CaMKII inhibition in heart failure, beneficial, harmful, or both. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302, H1454-65
- Cohen P, Cohen PT (1989): Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264, 21435–21438
- Cohen PTW (2002): Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J Cell Sci* 115, 241–256
- Cook SA, Clerk A, Sugden PH (2009): Are transgenic mice the 'alkahest' to understanding myocardial hypertrophy and failure? *J Mol Cell Cardiol* 46, 118–129
- Curran J, Hinton MJ, Rios 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
- Dash R, Kadambi V, Schmidt AG, Tepe NM, Biniakiewicz D, Gerst MJ, Canning AM, Abraham WT, Hoit BD, Ligett SB, Lorenz JN, Dorn GW, Kranias EG (2001): Interactions between phospholamban and knockbeta-adrenergic drive may lead to cardiomyopathy and early mortality. *Circulation* 103, 889-896
- DiFrancesco D, Tortora P (1991): Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351, 145–147
- Doughty RN, Rodgers A, Sharpe N, MacMahon S (1997): Effects of beta-blocker therapy on mortality in patients with heart failure: A systematic overview of randomized controlled trials. *Eur Heart J* 18, 560–565

- Duan DD (2010): A leakage leads to failure: roles of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak via RyR2 in heart failure progression. *Hypertension* 55, 849–851
- Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P, Barford D (1997): Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* 16, 1876–1887
- Eisner DA, Kashimura T, O'Neill SC, Venetucci LA, Trafford AW (2009): What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis? *J Mol Cell Cardiol* 46, 474–481
- Ei-Armouche A, Eschenhagen T (2009): Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 14, 225–241
- Ei-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann W, Jäckel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J et al. (2003): Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* 17, 437–439
- Ei-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T (2004): Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res.* 61, 87–93
- Ei-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T (2006): Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 700–706
- Ei-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh Y, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L (2007a): Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43, 223–229
- Ei-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, Wittköpper K, Peeck M, Eschenhagen T (2007b): Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail* 9, 1077–1080
- Ei-Armouche A, Wittköpper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didié M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsöld B et al. (2008): Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 80, 396–406

- Elbrecht A, DiRenzo J, Smith RG, Shenolikar S (1990): Molecular cloning of protein phosphatase inhibitor-1 and its expression in rat and rabbit tissues. *J Biol Chem* 265, 13415–13418
- Engelhardt S, Böhm M, Erdmann E, Lohse MJ (1996): Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 27, 146–154
- Eschenhagen T (2008): Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 14, 485–487
- Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H (1998): The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 102, 1377–1384
- Goldberg AL (2003): Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895–899
- Grimm M, Brown JH (2010): Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 48, 322–330
- Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM (2006): Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 99, 398–406
- Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Imai M, Habib O, Sabbah HN (2003): Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285, H2373-81
- Gupta RC, Mishra S, Yang X, Sabbah HN (2005): Reduced inhibitor 1 and 2 activity is associated with increased protein phosphatase type 1 activity in left ventricular myocardium of one-kidney, one-clip hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 269, 49–57
- Hasenfuss G (1998): Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res*. 37, 279–289
- Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D (1993a): Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88, 107–115
- Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993b): The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 22, 6A-13A

- Hook SS, Means AR (2001): Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 471–505
- Huang FL, Glinzmann WH (1976): Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 70, 419–426
- Hudmon A, Schulman H. (2002): Structure–function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
- Huke S, Desantiago J, Kaetzel MA, Mishra S, Brown JH, Dedman JR, Bers DM (2011): SR-targeted CaMKII inhibition improves SR Ca²⁺ handling, but accelerates cardiac remodeling in mice overexpressing CaMKII δ C. *J Mol Cell Cardiol* 50, 230–238
- Hülsmann WC (2000): Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox). *Cardiovasc Res.* 45, 119-20, 122
- Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM et al. (2006): Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 98, 235–244
- Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G (2009): Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 14, 213–224
- Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chen J, Bers D et al. (2009): Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest* 119, 1230–1240
- Lohse MJ, Engelhardt S, Danner S, Böhm M (1996): Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization: from molecular biology to heart failure. *Basic Res Cardiol.* 91 Suppl 2, 29-34
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003): What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93, 896–906
- Lüss H, Klein-Wiele O, Bokn'ik P, Herzig S, Knapp J, Linck B, Müller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W et al. (2000): Regional expression of protein phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2349–2359

- MacDougall LK, Campbell DG, Hubbard MJ, Cohen P (1989): Partial structure and hormonal regulation of rabbit liver inhibitor-1; distribution of inhibitor-1 and inhibitor-2 in rabbit and rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1010, 218–226
- MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991): Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196, 725–734
- Maier L (2005): CaMKII δ overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling. *Braz J Med Biol Res* 38, 1293–1302
- Maier LS, Bers DM (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919–939
- Maier LS, Zhang T, Chen L, Desantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res* 92, 904–911
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365–376
- McMurray JJ, Stewart S (2000): Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83, 596–602
- Nakai J, Imagawa T, Hakamat Y, Shigekawa M, Takeshima H, Numa S (1990): Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* 271, 169–177
- Neef S, Maier LS (2013): Novel aspects of excitation-contraction coupling in heart failure. *Basic Res Cardiol* 108, 360
- 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
- Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Meyerinck L von, Döring V, Kalmar P (1988): Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet* 2, 936–937
- Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM (1991): Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 69, 1450–1457

- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997): Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29, 265–272
- Nicolaou P, Rondriguez P, Ren X, Zhou X, Qian J, Sadayappan S, Mitton B, Pathak A, Robbins J, Hajjar R, Jones K, Kranias EG (2000): Indicable expression of active protein-phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 104, 1012-1020
- Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, MacLennan DH (1990): Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265, 13472–13483
- Packer M (1985): Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation* 72, 681–685
- Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML (1991): Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* 325, 1468–1475
- Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Bénitah J et al. (2007): The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 583, 685–694
- Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, Laurent A, Métrich M, Domínguez-Rodríguez A, Lauton-Santos S, Lucas A, Benitah J, Bers DM et al. (2012): Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 52, 283–291
- Ringer S (1883): A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* 4, 29-42.3
- 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
- Rodriguez P, Mitton B, Waggoner JR, Kranias EG (2006): Identification of a novel phosphorylation site in protein phosphatase inhibitor-1 as a negative regulator of cardiac function. *J Biol Chem* 281, 38599–38608
- Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, Chen G, Kranias EG (2007): Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293, H762-9

- Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela M, Backs J, Olson EN, Brown JH et al. (2009): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail* 2, 664–675
- Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, Irino S, Sugimura T, Nagao M (1990): Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 81, 1272–1280
- Schröder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwinger RH, Weil J, Herzig S (1998): Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 98, 969–976
- Shaw RM, Colecraft HM (2013): L-type calcium channel targeting and local signaling in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 98, 177-186
- Solaro RJ, Rosevear P, Kobayashi T (2008): The unique function of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*.369, 82-87
- Takasago T, Imagawa T, Shigekawa M (1989): Phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor by cAMP-dependent protein kinase. *J Biochem* 106, 872–877
- Takasago T, Imagawa T, Furukawa K, Ogurusu T, Shigekawa M (1991): Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biochem* 109, 163–170
- Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J (1996): Transthoracic Echocardiography in Models of Cardiac Disease in the Mouse. *Circulation* 94, 1109–1117
- Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993): Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87, 454–463
- van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, Wang Q, Almeida AC de, Skapura DG, Anderson ME et al. (2010): Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation* 122, 2669–2679
- Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S et al. (2012): Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased

- Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 125, 2059–2070
- Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004a): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70
- Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Deng S, Vest JA, Cervantes D, Coromilas J, Landry DW, Marks AR (2004b): Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science (New York, N.Y.)* 304, 292–296
- 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
- Wittköpper K: Generierung und kardiale Phänotypisierung von Mäusen, die phosphor-mutierte Formen des Phosphatase-Inhibitor-1 herzspezifisch und conditional überexprimieren. Nat. Diss. Hamburg 2009
- Wittköpper K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsöld B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D et al. (2010): Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest* 120, 617–626
- Wittköpper K, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A (2011): Phosphatase-1 inhibitor-1 in physiological and pathological 5beta6-adrenoceptor signalling. *Cardiovasc Res.* 91, 392–401
- Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM (2006): Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest* 116, 675–682
- Xiao B, Jiang MT, Zhao M, Yang D, Sutherland C, Lai FA, Walsh MP, Wartier DC, Cheng H, Chen SRW (2005): Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res* 96, 847–855
- Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H, Chen SRW (2006): Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J* 396, 7–16
- Yamada M, Ikeda Y, Yano M, Yoshimura K, Nishino S, Aoyama H, Wang L, Aoki H, Matsuzaki M (2006): Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery

- ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy. *FASEB J* 20, 1197–1199
- Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Doi M, Tokuhisa T, Okuda S, Suetsugu M, Hisaoka T, Obayashi M, Ohkusa T et al. (2003): FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 107, 477–484
- Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H et al. (2002): The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277, 1261–1267
- Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, Brown JH (2003): The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912–919
- Zhang T, Guo T, Mishra S, Dalton ND, Kranias EG, Peterson KL, Bers DM, Brown JH (2010): Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca(2+) handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKIIdelta(C) transgenic mice. *Circ Res* 106, 354–362

6.1 Internetquellen

Invitrogen (2014): Anregungsspektrum Fura-2 AM, veröffentlicht auf

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html> (Webseite), Life Technologies – Invitrogen, Carlsbad, (USA) 2014 (25.02.2014, 11:00)

Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz Langfassung (2013), 1. Auflage.

Version 7, veröffentlicht auf

<http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/herzinsuffizienz/pdf/nvl-hi-lang-7.pdf> (Webseite), Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachangestellten (25.02.2014, 11:30)

Statistisches Bundesamt (2012): Anzahl der Gestorbenen nach ausgewählten

Todesursachen 2012, veröffentlicht auf

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html;jsessionid=1635D4B246F3354F2EDCF54439EB8FD4.cae2> (Webseite), Statistisches Bundesamt Wiesbaden (25.02.2014, 16:30)

Danksagung

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Ali El-Armouche herzlich für die Überlassung der ebenso interessanten wie ausgesprochen vielseitigen Promotionsarbeit. Dankbar bin ich ihm insbesondere auch für seine persönliche Unterstützung. Er war stets ansprechbar und hilfsbereit. Sein ungebrochener Optimismus wirkte stets motivierend und hat mein Interesse an der medizinischen Wissenschaft deutlich befördert. Die mir eingeräumte Möglichkeit, an Kongressen teilzunehmen, sei in diesem Zusammenhang ebenfalls dankbar erwähnt. Schließlich danke ich Herrn Prof. Dr. Ali El-Armouche und Herrn Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann für die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeits- und Forschungsbedingungen.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Katrin Wittköpper für ihre hervorragende Betreuung in der ersten Phase meiner Arbeit. Sie führte mich sehr gewissenhaft und äußerst fachkompetent in die Laborarbeit ein. Ihre große Hilfsbereitschaft, ihr freundlicher Umgang und ihr Vertrauen gaben mir zusätzliche Kraft zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Lars Maier dafür, dass er mich einen großen Teil meiner Versuche in seinem Labor durchführen ließ. Ich wurde dort sehr freundlich aufgenommen und es herrschte eine tolle Arbeitsatmosphäre. Dabei möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. Stefan Neef bedanken, der mich in die Versuchsmethodik eingearbeitet hat sowie wissenschaftlich und persönlich hervorragend betreute, insbesondere auch nachdem Frau Dr. Katrin Wittköpper leider nicht mehr unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung stand.

Mein großer Dank gilt des Weiteren den Herren Thomas Sowa und Timo Schulte für die freundliche und engagierte Zusammenarbeit sowie ihre ständige Hilfsbereitschaft. Ich danke schließlich Herrn Roland Blume für die Durchführung zahlreicher Echokardiographien und Frau Melanie Schulze für die äußerst zuverlässige Betreuung und Versorgung der dC x I-1 KO-Mauslinie.

Ich danke meiner ganzen Arbeitsgruppe, in der stets eine gute Arbeitsatmosphäre herrschte.

Lebenslauf

Am 23. Januar 1987 wurde ich als Tochter der Eheleute Christa und Peter Brammen in Wiesbaden geboren. Nach der Grundschulzeit, erfolgte der Besuch der Stormarnschule in Ahrensburg. 2006 schloss ich dort auch meine schulische Ausbildung erfolgreich mit der Allgemeinen Hochschulreife ab. Anschließend arbeitete ich als Volontärin in einer Tagesklinik in der ländlich geprägten Provinz Mpumalanga in Südafrika. Zum Sommersemester 2007 nahm ich das Humanmedizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Dort absolvierte ich die „Erste Ärztliche Prüfung“ im Frühjahr 2009. Im gleichen Jahr wurde ich Stipendiatin des Studienförderwerkes der Stiftung der Deutschen Wirtschaft (sdw). Ein Jahr später begann ich meine experimentelle Dissertation in der Abteilung für Pharmakologie am Herzzentrum der Universitätsmedizin Göttingen bei Herrn Prof. Dr. med. Ali El-Armouche. Im Dezember 2013 habe ich mit der „Zweiten Ärztlichen Prüfung“ mein Medizinstudium erfolgreich abgeschlossen. Seit April 2014 arbeite ich als Assistenzärztin in der Abteilung für Thoraxchirurgie am Vivantes Klinikum Berlin-Neukölln.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	
Abb.	Abbildung	
AC	Adenylylzyklase	
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i> , Angiotensin-Konversions-Enzym	
AP	Aktionspotenzial	
Area d/s	innere linksventrikuläre Fläche in der Diastole bzw. der Systole	
ATP	Adenosintriphosphat	
AWTh d	<i>Anterior wall thickness, end-diastolic</i> , linksventrikuläre enddiastolische Vorderwandstärke	
β-AR	β-Adrenozeptor	
bp	Basenpaare	
bpm	<i>beats per minute</i> , Schläge pro Minute	
°C	Grad Celsius	
Ca ²⁺	Calcium-Ion	
CaM	Calmodulin	
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-Kinase	
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	
C-Prot	Protein C	
CSQ	C-Prot	Protein C
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>	
dC	<i>DeltaC</i>	

dC x I-1 KO	CaMKII δ_c -I-1 KO
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Epi s	äußere linksventrikuläre Fläche in der Systole
FAS	<i>fractional area shortening</i> , linksventrikuläre Flächenverkürzungs-fraktion
FKBP12.6.	FK-Bindungsprotein 12.6.
for	forward 5'-3' Primer
g	Gramm
G-Protein	GTP-bindendes Protein
G _i -Protein	inhibitorisches GTB-bindendes Protein
G _s -Protein	stimulierendes GTB-bindendes Protein
h	Stunde
HCN-Kanal	<i>hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels</i>
HG	Herzgewicht
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
I-1	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1
I-2	Protein-Phosphatase-Inhibitor-2
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
Ktr	Positivkontrolle
l	Liter

Ld/s	linksventrikulärer enddiastolischer/endsystolischer Längendurchmesser
LeG	Lebergewicht
LTCC	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
LuG	Lungengewicht
LVEDV/LVESV	linksventrikuläres enddiastolisches/endsystolisches Volumen
LVIDd/s	linksventrikulärer enddiastolischer bzw. -systolischer Durchmesser
LVM	linksventrikuläre Masse
m	Meter
M	Mol/l
mAKAP	PKA-Ankerprotein
MHz	Megahertz
min	Minute
mol	Mol
MW	<i>molecular weight Marker</i> , Protein- bzw. DNA-Größenstandard
NCX	Natrium/Calcium-Austauscher
NYHA	New York Heart Association
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PP	Protein-Phosphatase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rcf	<i>relative centrifugal force</i> , relative

	Zentrifugalbeschleunigung
rev	Rückwärts 3'-5' Primer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT ₅₀	Repolarisationszeit bis 50%igem Spannungsabfall des Ca ²⁺ -Transienten
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SERCA2a	sarkoplasmatische Calcium-ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SV	Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TG	Transgen, transgene Tiere
Tnl	Troponin-I
U	<i>units</i> ; Enzymeinheit
UV	ultraviolett
V	Volt
vs.	<i>versus</i>
WT	Wildtyp

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Übersicht der β -Adrenozeptor-Signalkaskade in ventrikulären Kardiomyozyten.....	8
Abb. 1.2: Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz.....	11
Abb. 1.3: Aufbau der CaMK.....	13
Abb. 1.4: Verbindungselement zwischen PKA und PP1: der Inhibitor-1.....	16
Abb. 2.1: Kreuzungsstrategie zur Generierung der CamKII δ_c -I-1 KO-Linie.....	21
Abb. 2.2: Genotypisierung der CaMKII δ_c -I-1 KO-Mauslinie mittels PCR.....	23
Abb. 2.3: Kanülierung eines Mäuseherzens.....	25
Abb. 2.4: Anregungsspektrum von Fura-2 AM für verschiedene Ca ²⁺ -Konzentrationen.....	26
Abb. 2.5: Repräsentative Ca ²⁺ -Sparks.....	29
Abb. 3.1: Biometrie und funktionell echokardiographische Analyse der Kontraktilität der I-1 KO-Mauslinie.....	39
Abb. 3.2: Analyse des intrazellulären Ca ²⁺ -Haushalts in I-1 KO-Mäusen.....	42
Abb. 3.3: Ca ²⁺ -Spark-Messungen am Konfokalmikroskop.....	44
Abb. 3.4: Untersuchung von spontanen Ca ²⁺ -Freisetzungseignissen.....	45
Abb. 3.5: Überlebensstudie mittels Kaplan-Meier-Analyse.....	46
Abb. 3.6: (Zell-)Biometrische Analyse der dC x I-1 KO-Mauslinie.....	48
Abb. 3.7: Originalaufnahmen der Echokardiographie.....	50
Abb. 3.8: Funktionelle Daten der Echokardiographie.....	50
Abb. 3.9: Echokardiographische Parameter im Verlauf von der 5. bis zur 11. Lebenswoche.....	51
Abb. 3.10: Echokardiographie unter Dobutamin-Einfluss.....	52
Abb. 3.11: Übersicht über den Messzeitpunkt der Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopie.....	53
Abb. 3.12: Analyse des intrazellulären Ca ²⁺ -Haushalts in dC x I-1 KO-Mäusen.....	54
Abb. 3.13: Kinetik der Ca ²⁺ -Transienten in dC x I-1 KO-Mäusen.....	55
Abb. 3.14: Ca ²⁺ -Spark Analyse der dC x I-1 KO-Mäuse.....	57

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Echokardiographisch gemessene Parameter.	30
Tab. 2.2: Genotypisierung der I-1 KO-Linie.	32
Tab. 2.3: Genotypisierung der CaMKII δ c-Linie.	33
Tab. 7.1: Ergebnisse der Epifluoreszenzmessung isolierter Kardiomyozyten WT vs. I 1 KO, seriell gemessen.	93
Tab. 7.2: Ergebnisse der Epifluoreszenzmessung isolierter Kardiomyozyten I-1 KO vs WT.	94
Tab. 7.3: Sparkmessungen I-1 KO vs WT.	94
Tab. 7.4: Untersuchung von spontanen Ca ²⁺ -Freisetzungseignissen I-1 KO vs. WT.	94
Tab. 7.5: Biometrieergebnisse im Alter von 6 Wochen.	95
Tab. 7.6: Zellbiometrieergebnisse im Alter von 6 Wochen.	95
Tab. 7.7: Echokardiographieergebnisse	96
Tab. 7.8: Echokardiographieergebnisse im zeitlichen Verlauf.	96
Tab. 7.9: Ergebnisse der Epifluoreszenzmessung isolierter Kardiomyozyten WT vs. dC vs. dC x I-1 KO, seriell gemessen.	98
Tab. 7.10: Ergebnisse der Epifluoreszenzmessung isolierter Kardiomyozyten WT vs. dC vs. dC x I-1 KO.	99
Tab. 7.11: Sparkmessungen dC vs dC x I-1 KO.	99
Tab. 7.12: Untersuchung von spontanen Ca ²⁺ -Freisetzungseignissen I-1 KO vs. WT.	99

7.4 Ergebnistabellen

Alle Werte wurden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Zu Kapitel 3.1.3 Effekte einer I-1-Ablation auf den intrazellulären Ca²⁺-Haushalt

Tab. 7.1: Ergebnisse der Epifluoreszenzmessung isolierter Kardiomyozyten WT vs. I-1 KO, seriell gemessen. #p<0,05 I-1 KO vs WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der Zellen pro Herzen.

Messparameter	WT	I-1 KO	ANOVA
Amplitude (F340/F380) 1 Hz	0,28 \pm 0,02 n=45/4	0,26 \pm 0,02 n=77/6	
Amplitude (F340/F380) 2 Hz	0,28 \pm 0,02 n=45/4	0,25 \pm 0,02 n=77/6	
Amplitude (F340/F380) 4 Hz	0,28 \pm 0,02 n=45/4	0,25 \pm 0,02 n=77/6	ns
% Verkürzung der diastolischen Länge 1 Hz	3,54 \pm 0,38 n=44/4	4,43 \pm 0,35 n=70/6	
% Verkürzung der diastolischen Länge 2 Hz	3,04 \pm 0,33 n=42/4	4,15 \pm 0,32 n=75/6	
% Verkürzung der diastolischen Länge 4 Hz	2,39 \pm 0,33 n=39/4	4,43 \pm 0,28 n=68/6	ns
Diastolisch Fura-2 (F340/380) 1 Hz	0,55 \pm 0,02 n=45/4	0,47 \pm 0,01 n=77/6	
Diastolisch Fura-2 (F340/380) 2 Hz	0,58 \pm 0,02 n=45/4	0,46 \pm 0,03 n=77/6	
Diastolisch Fura-2 (F340/380) 4 Hz	0,63 \pm 0,02 n=45/4	0,56 \pm 0,01 n=74/6	#

Tab. 7.2: Ergebnisse der Epifluoreszenzmessung isolierter Kardiomyozyten I-1 KO vs WT.

$p < 0,05$ I-1 KO vs WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der Zellen pro Herzen.

Messparameter	WT	I-1 KO	t-Test
RT50% 1 Hz	0,16 ± 0,005 n=45/4	0,16 ± 0,005 n=75/6	ns
Koffein- induzierter Transient (F340/380)	0,59 ± 0,03 n=28/4	1,00 ± 0,04 n=43/6	ns
τ des Koffein- induzierten Transienten	1,45 ± 0,09 n=28/4	1,72 ± 0,2 n=43/6	ns

Zu Kapitel 3.1.4 Effekte einer I-1-Ablation auf das SR-Ca²⁺-Leck

Tab. 7.3: Sparkmessungen I-1 KO vs WT. # $p < 0,05$ I-1 KO vs WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der gemessenen Sparks oder Zellen.

Messparameter	WT	I-1 KO	t-Test
HM CaSpS (nF/F ₀ *m*s)	25,69 ± 0,94 n=536	24,65 ± 0,92 n=726	ns
CaSpF (1/(100 μ m*s))	2,97 ± 0,30 n=536	2,28 ± 0,16 n=726	#
HM Ca ²⁺ -Leck (mF/F ₀) (nur sparkende Zellen)	0,76 ± 0,09 n=145	0,57 ± 0,05 n=253	#

Zu Kapitel 3.1.5 Untersuchung des antiarrhythmischen Phänotyps auf zellulärer Ebene

Tab. 7.4: Untersuchung von spontanen Ca²⁺-Freisetzungseignissen I-1 KO vs. WT. # $p < 0,05$ I-1 KO vs WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der gemessenen Zellen.

Messparameter	WT	I-1 KO	Fisher- Test
ScaEs (%)	31% n=45	15% n=121	#

Zu Kapitel 3.1.1 Morphologische und funktionelle Charakterisierung der I-1 KO-Mäuse und Kapitel 3.2.2 Morphologische Charakterisierung der CaMKII δ -I-1 KO-Mauslinie

Tab. 7.5: Biometrieergebnisse im Alter von 6 Wochen. * $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. dC, # $p < 0,05$ I-1 KO vs WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der Tiere.

Messparameter	WT	I-1 KO	dC	dC x I-1 KO	t-Test
KG (g)	18,73 \pm 0,61 n=12	19,37 \pm 1,02 n=8	18,72 \pm 0,88 n=8	18,31 \pm 0,62 n=7	ns
HG/KG (mg/g)	6,04 \pm 0,37 n=12	6,96 \pm 0,38 n=8	11,04 \pm 1,08 n=8	15,51 \pm 1,45 n=7	*
LuG/KG (mg/g)	7,08 \pm 0,24 n=12	7,23 \pm 0,29 n=8	8,99 \pm 0,6 n=8	12,63 \pm 1,01 n=7	*
LiW/BW (mg/g)	49,62 \pm 2,15 n=12	45,90 \pm 2,46 n=8	46,90 \pm 3,0 n=8	44,62 \pm 2,88 n=7	ns

Tab. 7.6: Zellbiometrieergebnisse im Alter von 6 Wochen. * $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. dC, # $p < 0,05$ I-1 KO vs WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der Zellen.

Messparameter	WT	I-1 KO	dC	dC x I-1 KO	t-Test
Länge (μm)	112,4 \pm 1,59 n=251	120,8 \pm 1,53 n=221	137,0 \pm 1,96 n=310	154,5 \pm 1,99 n=264	*
Breite (μm)	25,02 \pm 0,38 n=251	26,57 \pm 0,61 n=221	28,52 \pm 0,73 n=310	26,92 \pm 0,48 n=264	ns
Fläche (μm^2)	2810 \pm 57,77 n=251	3156 \pm 69,28 n=221	3761 \pm 69,28 n=310	4148 \pm 87,88 n=264	*
Volumen (pL)	29,68 \pm 1,03 n=251	35,47 \pm 1,31 n=221	45,63 \pm 1,91 n=310	47,85 \pm 1,87 n=264	#
Elongationsindex (Länge/Breite)	4,74 \pm 0,1 n=251	4,96 \pm 0,12 n=221	5,37 \pm 0,12 n=310	6,27 \pm 1,14 n=264	*

Zu Kapitel 3.1.1 Morphologische und funktionelle Charakterisierung der I-1 KO-Mäuse und Kapitel 3.2.3 Funktionelle Charakterisierung der CaMKII δ c-I-1 KO-Mauslinie mittels Echokardiographie

Tab. 7.7: Echokardiographieergebnisse (a) basal und (b) unter 10 μ g/g Dobutamin. * $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. dC, # $p < 0,05$ I-1 KO vs WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der Tiere. a) basal

Parameter	WT	I-1 KO	dC	dC x I-1 KO	t-Test
LVM/KG (mg/g)	3,82 \pm 0,25 n=9	3,96 \pm 0,21 n=11	4,98 \pm 0,25 n=11	6,14 \pm 0,31 n=12	*
LVEDD (mm)	3,88 \pm 0,12 n=9	3,85 \pm 0,14 n=11	4,99 \pm 0,21 n=11	5,27 \pm 0,15 n=12	ns
LVEDS (mm)	2,96 \pm 0,13 n=9	2,71 \pm 0,18 n=11	4,43 \pm 0,22 n=11	5,06 \pm 0,23 n=12	ns
LVEDV (μ l)	65,57 \pm 6,01 n=9	63,98 \pm 5,12 n=11	126,29 \pm 12,96 n=11	143,21 \pm 11,03 n=12	ns
LVESV (μ l)	30,71 \pm 3,25 n=9	28,01 \pm 3,42 n=11	97,5 \pm 12,56 n=11	120,43 \pm 1,43 n=12	ns
FAS (%)	45,64 \pm 2,55 n=9	49,40 \pm 3,68 n=11	21,02 \pm 2,96 n=11	12,12 \pm 1,45 n=12	*
HR (bpm)	504 \pm 19 n=9	462 \pm 14 n=11	524 \pm 14 n=11	528 \pm 8 n=12	ns

b) unter 10 μ g/g Dobutamin

Parameter	WT	dC	dC x I-1 KO	t-Test
FAS (%)	69,24 \pm 2,76 n=9	34,24 \pm 5,84 n=11	23,78 \pm 3,7 n=11	ns
Delta FAS (%)	23,59 \pm 1,89 n=9	13,22 \pm 3,57 n=11	11,57 \pm 3,31 n=11	ns
HR (bpm)	617 \pm 11 n=8	553 \pm 14 n=11	532 \pm 19 n=10	ns
Delta HR (%)	23,99 \pm 6,03 n=8	6,52 \pm 4,48 n=11	2,18 \pm 2,18 n=10	ns

Tab. 7.8: Echokardiographieergebnisse im zeitlichen Verlauf. Alter (Wochen), * $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. dC, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der Tiere.

Parameter	Alter	WT	dC	dC x I-1 KO	ANOVA
FAS (%)	5	51,37 ± 1,11 n=6	35,25 ± 4,13 n=6	25,34 ± 3,09 n=7	*
	6	45,64 ± 2,55 n=9	21,02 ± 2,96 n=11	12,12 ± 1,45 n=12	
	7	40,69 ± 2,22 n=8	21,03 ± 2,57 n=9	10,41 ± 2,22 n=8	
	8	41,68 ± 2,49 n=6	11,76 ± 1,47 n=9	5,26 ± 1,51 n=6	
	9,5	45,05 ± 1,81 n=9	12,64 ± 1,24 n=7	7,03 ± 1,38 n=7	
	11	46,75 ± 3,24 n=8	9,69 ± 1,3 n=6	3,72 ± 0,73 n=6	
LVM/ KG (mg/g)	5	4,13 ± 0,18 n=6	4,80 ± 0,40 n=6	5,45 ± 0,42 n=7	ns
	6	3,82 ± 0,25 n=9	4,98 ± 0,25 n=11	6,14 ± 0,31 n=12	
	7	4,09 ± 0,17 n=8	4,96 ± 0,27 n=9	5,79 ± 0,62 n=8	
	8	3,83 ± 0,25 n=6	5,38 ± 0,2 n=9	6,20 ± 0,41 n=6	
	9,5	4,04 ± 0,22 n=9	5,7 ± 0,22 n=7	5,98 ± 0,36 n=7	
	11	3,85 ± 0,27 n=8	6,29 ± 0,52 n=6	6,66 ± 0,68 n=6	

Zu Kapitel 3.2.4 Effekte einer I-1-Ablation in transgenen CaMKII δ c-Mäusen auf den intrazellulären Ca²⁺-Haushalt

Tab. 7.9: Ergebnisse der Epifluoreszenzmessung isolierter Kardiomyozyten WT vs. dC vs. dC x I-1 KO, seriell gemessen. *p<0,05 dC x I-1 KO vs. dC, §p<0,05 dC x I-1 KO vs. WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der Zellen pro Herzen.

Messparameter	WT	dC	dC x I-1 KO	ANOVA
Amplitude (F340/F380) 1 Hz	0,28 ± 0,02 n=45/4	0,25 ± 0,02 n=52/4	0,24 ± 0,02 n=49/4	
Amplitude (F340/F380) 2 Hz	0,28 ± 0,02 n=45/4	0,26 ± 0,02 n=52/4	0,24 ± 0,02 n=49/4	
Amplitude (F340/F380) 4 Hz	0,28 ± 0,02 n=45/4	0,24 ± 0,02 n=49/4	0,19 ± 0,01 n=41/4	ns
Diastolisch Fura-2 (F340/380) 1 Hz	0,55 ± 0,02 n=45/4	0,40 ± 0,01 n=52/4	0,40 ± 0,01 n=49/4	
Diastolisch Fura-2 (F340/380) 2 Hz	0,58 ± 0,02 n=45/4	0,43 ± 0,01 n=52/4	0,46 ± 0,03 n=49/4	
Diastolisch Fura-2 (F340/380) 4 Hz	0,63 ± 0,02 n=45/4	0,50 ± 0,01 n=49/4	0,48 ± 0,02 n=41/4	§

Tab. 7.10: Ergebnisse der Epifluoreszenzmessung isolierter Kardiomyozyten WT vs. dC vs. dC x I-1 KO. * $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. dC, § $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der Zellen pro Herzen.

Messparameter	WT	dC	dC x I-1 KO	t-Test
RT50% 1 Hz	0,16 ± 0,005 n=45/4	0,19 ± 0,005 n=52/4	0,19 ± 0,006 n=49/4	§
RT50% 4 Hz	0,08 ± 0,002 n=45/4	0,08 ± 0,001 n=49/4	0,10 ± 0,005 n=41/4	*§
Koffein- induzierter Transient (F340/380)	0,59 ± 0,03 n=29/4	0,57 ± 0,03 n=38/4	0,56 ± 0,03 n=29/4	ns
τ des Koffein- induzierten Transienten	1,45 ± 0,09 n=29/4	1,59 ± 0,11 n=38/4	1,81 ± 0,11 n=29/4	§

Zu Kapitel 3.2.5 Analyse des SR-Ca²⁺-Lecks in dC x I-1 KO-Mäusen

Tab. 7.11: Sparkmessungen dC vs dC x I-1 KO. * $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. dC, § $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der gemessenen Sparks oder Zellen.

Messparameter	WT	dC	dC x I-1 KO	t-Test
CaSpS (nF/F _{0m})	25,69 ± 0,94 n=536	38,25 ± 1,53 n=763	43,43 ± 2,13 n=825	§
CaSpF (1/100 μ m/s)	2,97 ± 0,30 n=536	2,79 ± 0,19 n=219	2,49 ± 0,14 n=266	ns
Ca ²⁺ -Leck (mF/F ₀ *1/s) (alle Zellen)	0,76 ± 0,09 n=145	1,07 ± 0,10 n=219	1,08 ± 0,13 n=266	ns

Tab. 7.12: Untersuchung von spontanen Ca²⁺-Freisetzungseignissen I-1 KO vs. WT. * $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. dC, § $p < 0,05$ dC x I-1 KO vs. WT, ns (nicht signifikant), n=Anzahl der gemessenen Zellen.

Messparameter	WT	dC	dC x I-1 KO	Fisher- Test
ScaEs (%)	31% n=45	54% n=52	47% n=49	Ns