

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

Auswirkungen des neuartigen CaMKII-Inhibitors
SMP-114 auf das diastolische SR Ca^{2+} -Leck
und die elektromechanische Kopplung isolierter
Herzmuskelzellen

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen
vorgelegt von

Christian Martin Mann
aus
White Plains, New York, USA

Göttingen 2015

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

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med C. Dellas

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Oktober 2015

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Physiologie der Herzmuskelzelle	3
1.1.1 Die elektromechanische Kopplung	3
1.2 Die Ca²⁺ / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)	5
1.2.1 Regulation des Ca ²⁺ -Stoffwechsels durch die CaMKII	5
1.3 Herzinsuffizienz	7
1.3.1 Definition, klinisches Bild und Ursachen	7
1.3.2 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	9
1.3.3 Veränderte elektromechanische Kopplung bei Herzinsuffizienz	10
1.3.4 Proarrhythmogene Ereignisse im insuffizienten Myokard	12
1.4 Die Rolle der CaMKII für die Entwicklung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien	13
1.4.1 CaMKII und Herzinsuffizienz	13
1.4.2 CaMKII und Arrhythmien	13
1.5 Inhibition der CaMKII – Auswirkungen und Möglichkeiten	16
1.5.1 Etablierte CaMKII-Inhibitoren und ihre Auswirkungen	16
1.5.2 Nachteile der etablierten CaMKII-Inhibitoren	18
1.5.3 SMP-114 – ein neuartiger CaMKII-Inhibitor	18
1.6 Fragestellung	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Vorbereitung der Materialien und Isolation der Herzmuskelzellen	21
2.1.1 Isolation der Kardiomyozyten aus Mäuseherzen	21
2.1.2 Zusammensetzung der Normaltyrode	22
2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe	23
2.1.4 Zusammensetzung der Fluoreszenzfarbstofflösungen	25
2.1.5 Vorbereitung der CaMKII-Inhibitoren	26
2.2 Vorbereitung der Messungen	26
2.2.1 Vorbereiten der Messkammern und Auftragen der Kardiomyozyten	26
2.2.2 Farbstoffinkubation	27
2.2.3 Inkubation mit den Inhibitoren	27
2.3 Simultane Messung von Ca²⁺-Fluoreszenz und Sarkomerlänge am Epifluoreszenz-Mikroskop	28
2.3.1 Versuchsaufbau	28
2.3.2 Messprotokoll	31
2.3.3 Auswertung der Messdaten	34
2.4 Messungen am Konfokalmikroskop	35
2.4.1 Aufbau des Konfokalmikroskops	35
2.4.2 Messungen und Protokoll	38
2.4.3 Auswertung	41

2.5	Statistik	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	Diastolisches Ca²⁺-Leck	45
3.1.1	Quantitative Ca ²⁺ -Spark-Auswertung	45
3.1.2	Ca ²⁺ -Spark-Frequenz	46
3.1.3	Zelluläres diastolisches Ca ²⁺ -Leck	48
3.1.4	Anteil sparkender Zellen	49
3.1.5	Diastolisches Ca ²⁺ -Leck bezogen auf alle Zellen	50
3.2	Untersuchung der elektromechanischen Kopplung	51
3.2.1	Diastolische Ca ²⁺ -Elimination und Zellrelaxation	52
3.2.2	Diastolische Ca ²⁺ -Level	54
3.2.3	Ca ²⁺ -Transienten Amplituden	54
3.3	Auswirkungen von SMP-114 auf die Myozyten-Kontraktion	56
3.4	Spontane Ca²⁺-Freisetzungseignisse (SCR-Events)	56
3.5	Post-Pausen-Potenzierung von Ca²⁺-Transienten und Sarkomerlängenverkürzung	58
3.6	SR Ca²⁺-Gehalt	60
3.7	Frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation	62
3.8	GPZ5851 und GPZ7505 – Evaluation der Effekte zweier weiterer potenzieller CaMKII-Inhibitoren	63
3.8.1	Auswirkungen von GPZ5851 auf die elektromechanische Kopplung	63
3.8.2	Auswirkungen von GPZ5851 auf Ca ²⁺ -Spark-Frequenz und Anteil sparkender Zellen	65
3.8.3	Effekte von GPZ7505 auf die elektromechanische Kopplung	65
4	DISKUSSION	69
4.1	SMP-114 reduziert das SR Ca²⁺-Leck dramatisch	69
4.2	Reduktion von zellulären Arrhythmien durch SMP-114	71
4.3	Stärkere Post-Pausen-Potenzierung durch SMP-114	73
4.4	Uneinheitliche Effekte von SMP-114 auf die elektromechanische Kopplung	73
4.5	SMP-114 zeigt keinen Effekt auf den Gesamt-Ca²⁺-Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums	77
4.6	Effekte der potenziellen CaMKII-Inhibitoren GPZ5851 und GPZ7505	78
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
6	LITERATURVERZEICHNIS	81

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1 Elektromechanische Kopplung und Phosphorylierungsziele der CaMKII	3
Abbildung 1-2 Struktur der CaMKII mit funktionell wichtigen Domänen.....	6
Abbildung 1-3 Circulus Vitiosus der Herzinsuffizienz	9
Abbildung 1-4 KN-93-Strukturformel	16
Abbildung 1-5 Angriffsstellen der etablierten CaMKII-Inhibitoren	17
Abbildung 1-6 SMP-114-Strukturformel	19
Abbildung 2-1 Strukturformel Fura-2 und Exzitations- bzw. Emissionsmaxima.....	23
Abbildung 2-2 Fluo-3- und Fluo-4-Strukturformeln	25
Abbildung 2-3 Strahlengang und Versuchsaufbau am Epifluoreszenzmikroskop.....	29
Abbildung 2-4 Sarkomerlängenregistrierung, Originalaufzeichnung	30
Abbildung 2-5 Ausschnitt aus einer Aufzeichnung von Fura-2-Fluoreszenz-Ratio und Sarkomerlänge.....	31
Abbildung 2-6 Koffeintransientenmessung.....	33
Abbildung 2-7 Ca ²⁺ -Fluoreszenztransient (Fura-2 AM)	34
Abbildung 2-8 Sarkomerlängen	35
Abbildung 2-9: Strahlengang beim Konfokalmikroskop	36
Abbildung 2-10 Messung am Konfokalmikroskop unter Stimulation	40
Abbildung 2-11 Quantitative Ca ²⁺ -Spark-Auswertung	42
Abbildung 2-12 Ca ²⁺ -Spark-Frequenz der Zelle und Messzeitraum.....	43
Abbildung 3-1 Ca ²⁺ -Spark-Amplitude und Ca ²⁺ -Spark-Dauer FDHM.....	45
Abbildung 3-2 Reduzierte Ca ²⁺ -Spark-Größe unter SMP-114.....	46
Abbildung 3-3 Ca ²⁺ -Spark-Messdaten in Wildtyp-Zellen.....	47
Abbildung 3-4 SMP-114 reduziert Ca ²⁺ -Spark-Frequenzen	48
Abbildung 3-5 Diastolisches Ca ²⁺ -Leck bezogen auf sparkende Zellen	49
Abbildung 3-6 Anteil sparkender Zellen	50
Abbildung 3-7 Diastolisches Ca ²⁺ -Leck bezogen auf alle Zellen	51
Abbildung 3-8 Originalregistrierungen von Fluo-3-Transienten	52
Abbildung 3-9 Relaxationszeit des Ca ²⁺ -Transienten	53
Abbildung 3-10 Diastolische Fura-2-Fluoreszenzratio	54
Abbildung 3-11 Ca ²⁺ -Transientenamplituden bei 1 – 4 Hz Stimulationsfrequenz	55
Abbildung 3-12 Kontraktion	56
Abbildung 3-13 SCR-Events während 30-sekündiger Stimulationsunterbrechung.....	57
Abbildung 3-14 SCR-Events innerhalb der 30-sekündigen Stimulationspause.....	57
Abbildung 3-15 Post-Pausen-Potenzierung.....	58
Abbildung 3-16 Relative Post-Pausen-Transientenamplituden-Potenzierung	59
Abbildung 3-17 Post-Pausen-Potenzierung der Sarkomerlängenverkürzung	60
Abbildung 3-18 Amplituden der Koffein-induzierten Transienten als Korrelat für den Gesamt SR Ca ²⁺ -Gehalt der Zellen	61
Abbildung 3-19 Fractional SR Ca ²⁺ -Release bei 1 Hz-Stimulation	62
Abbildung 3-20 Frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation	63
Abbildung 3-21 Sarkomerlängenverkürzung GPZ5851	64
Abbildung 3-22 Ca ²⁺ -Spark-Frequenz unter GPZ5851	65
Abbildung 3-23 Verlängerung der Ca ²⁺ -Transienten-Relaxationszeit durch GPZ7505	66
Abbildung 3-24 Post-Pausen-Potenzierung GPZ7505	67
Abbildung 3-25 Koffein-Transienten-Amplituden als Messgröße des SR Ca ²⁺ -Gehalts unter GPZ7505	67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC3-I	<i>autocamtide-2 inhibitory peptide</i>
AIP	<i>autocamtide 2-related inhibitory peptide</i>
AM	Azetoxy-methylester
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosin-triphosphat
Ca ²⁺ , [Ca ²⁺] _i	Kalzium-Ion, Kalziumionenkonzentration intrazellulär
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKII δ_C	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ , zytosolische Isoform
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
δ_C -TG, δ_C -transgen	CaMKII δ_C -transgen
DMSO	Dimethylsulfoxid
FKBP12.6	FK506(Tacrolimus)-binding protein 12.6
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
I _{Ca}	einwärtsgerichteter Ca ²⁺ -Strom
KN-92	2-[N-(4'-Methoxybenzonsulfonyl)]amino-N-(4'-chlorophenyl)-2-propenyl-N-methylbenzylaminphosphat
KN-93	N-[2-[N-(4-Chlorocinnamyl)-N-methylaminomethyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzonsulfonamidphosphat
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
myrAIP	myristoyliertes <i>autocamtide 2-related inhibitory peptide</i>
Na ⁺ , [Na ⁺] _i	Natrium-Ion, intrazelluläre Natriumionenkonzentration
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte / reduzierte Form)
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
ns	nicht statistisch signifikant
NT	Normal-Tyrodienlösung
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
rt50, rt80	Zeit bis zum Abfall des Ca ²⁺ -Transienten um 50 % bzw. 80 % seiner Amplitude
RyR2	Ryanodin-Rezeptor
SCR-Events	spontane SR Ca ²⁺ -Freisetzungseignisse
SERCA	SR Ca ²⁺ -ATPase
SR	sakroplasmatisches Retikulum
TAC	transverse aortale Konstriktion
TG	transgen
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

Die Herzinsuffizienz ist die Unfähigkeit des Herzens, das für die Versorgung des Organismus mit sauerstoffreichem Blut benötigte Herzzeitvolumen zu fördern. Pathophysiologisch wird ausgehend von der Kreislaufinsuffizienz ein Circulus Vitiosus durchlaufen: Um die Versorgung der minderperfundierten Endorgane zu gewährleisten, werden der Sympathikus, das Renin/Angiotensin/Aldosteron-System und andere neuroendokrine Mediatoren aktiviert. Diese vermögen über Tachykardie, Vasokonstriktion und Volumen-/Salzretention zwar kurzfristig die Perfusion zu verbessern, leiten aber einen als Remodeling bekannten Umbauprozess des Herzmuskels ein. In der Folge führt dies weiter zur Verschlechterung der Pumpleistung und mindert darüber hinaus das Ansprechen auf die kompensatorische neuroendokrine Aktivierung. Klinisch fallen insbesondere die Symptome einer verminderten körperlichen Belastbarkeit, Dyspnoe und Volumenüberlastung mit Ödemen auf.

Eine Herzinsuffizienz ist der häufigste Grund für einen Krankenhausaufenthalt (STATISTISCHES BUNDESAMT 2012) und die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (STATISTISCHES BUNDESAMT 2012). Da ihre Inzidenz im höheren Lebensalter steigt, ist im Zuge des fortschreitenden demographischen Wandels mit einer weiter anwachsenden Fallzahl in den kommenden Jahren zu rechnen (STATISTISCHES BUNDESAMT 2011).

Die Mechanismen, die zur Entstehung der Herzinsuffizienz beitragen, wurden bereits intensiv beforscht. Obwohl in den letzten Jahrzehnten viele Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Herzschwäche gewonnen wurden, beruht die Pharmakotherapie weiterhin auf bewährten Medikamenten wie ACE-Hemmern, Beta-Rezeptorenblockern, Diuretika, AT1-Rezeptorblockern und Aldosteron-Antagonisten. Kürzlich wurde der neuere Wirkstoff Ivabradin als weitere pharmakotherapeutische Option nach Ausreizen der etablierten Therapiemöglichkeiten, oder wenn Beta-Rezeptorenblocker kontraindiziert sind, in die Empfehlungen der Leitlinien aufgenommen (McMURRAY et al. 2012).

Trotz kontinuierlicher Optimierung der Therapie ist die Prognose der Herzinsuffizienz weiterhin nicht gut. In einer von 1990 - 1999 durchgeführten Studie lag die 5-Jahres-Letalität bei männlichen Patienten mit Herzinsuffizienz bei 59 % und damit vergleichbar mit der Sterblichkeit maligner Erkrankungen (LEVY et al. 2002); in einer auf den Zeitraum von 1996 – 2000 bezogenen Auswertung von Kohortendaten lag die

5-Jahres-Sterblichkeit bei 50 % für männliche Patienten und bei 46 % für weibliche (ROGER et al. 2004). In circa der Hälfte der Fälle findet man den plötzlichen Herztod durch tachykarde Rhythmusstörungen als Todesursache (FARR und BASSON 2004), neben dem Tod durch Pumpversagen eine der Haupttodesursachen. Um die Volkskrankheit Herzinsuffizienz erfolgreicher behandeln zu können, ist es daher lohnenswert, neue Therapieansätze zu evaluieren. Hierbei sollte der Fokus auch auf bislang therapeutisch nicht genutzte Kenntnisse über die Entstehungsmechanismen der Herzinsuffizienz gerichtet werden.

Eine entscheidende Rolle hierbei spielt die Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Kinase II, kurz CaMKII, deren Aktivität im insuffizienten humanen Myokard erhöht ist (HOCH et al. 1999) und deren experimentelle Überexpression eine Herzinsuffizienz induzieren kann (MAIER et al. 2003). Ausgehend von aktuellen Forschungsergebnissen, die positive Auswirkungen einer Inhibierung dieses Enzyms belegen (SOSSALLA et al. 2010), möchte ich in der vorliegenden Arbeit neuartige potenzielle CaMKII-Inhibitoren testen und charakterisieren, die durch Inhibierung dieser Proteinkinase in die Entstehungskaskade der Herzinsuffizienz eingreifen und diese unter Umständen aufhalten können. Da die CaMKII auch maßgeblich an der Entstehung von Arrhythmien beteiligt ist (VAN OORT et al. 2010), wird ein wesentlicher Fokus hierbei auf molekulare und zelluläre Arrhythmiekorrelate gerichtet sein.

Ich werde einleitend die Physiologie der Herzmuskelzelle und die elektromechanische Kopplung beschreiben und darlegen, wie die CaMKII diese reguliert. Ausgehend von den pathophysiologischen Veränderungen in der Herzinsuffizienz werde ich beschreiben, welche Auswirkungen einer Inhibition dieses Enzyms bereits bekannt sind und welche Möglichkeiten für eine therapeutische Anwendung sich daraus ergeben. Auf dieser Basis werde ich mit etablierten Methoden die Wirkungen neuartiger CaMKII-Inhibitoren auf isolierte Herzmuskelzellen untersuchen und versuchen, mit der Charakterisierung dieser Substanzen erste Schritte in Richtung Erweiterung des Therapiespektrums der Herzinsuffizienz zu gehen.

1.1 Physiologie der Herzmuskelzelle

1.1.1 Die elektromechanische Kopplung

Der Mechanismus, der auf einen elektrischen Stimulus hin zu einer geordneten Verkürzung der Myofilamente und damit zu einer Kontraktion der Herzmuskelzelle führt, wird elektromechanische Kopplung bezeichnet. Der wichtigste Botenstoff, der direkt zur Aktivierung der Kontraktionskaskade der Myofilamente führt, sind Ca^{2+} -Ionen. Um die Kontraktion einzuleiten, muss die intrazelluläre Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen steigen, für eine Relaxation müssen diese wieder aus dem Zytosol eliminiert werden (BERS 2001).

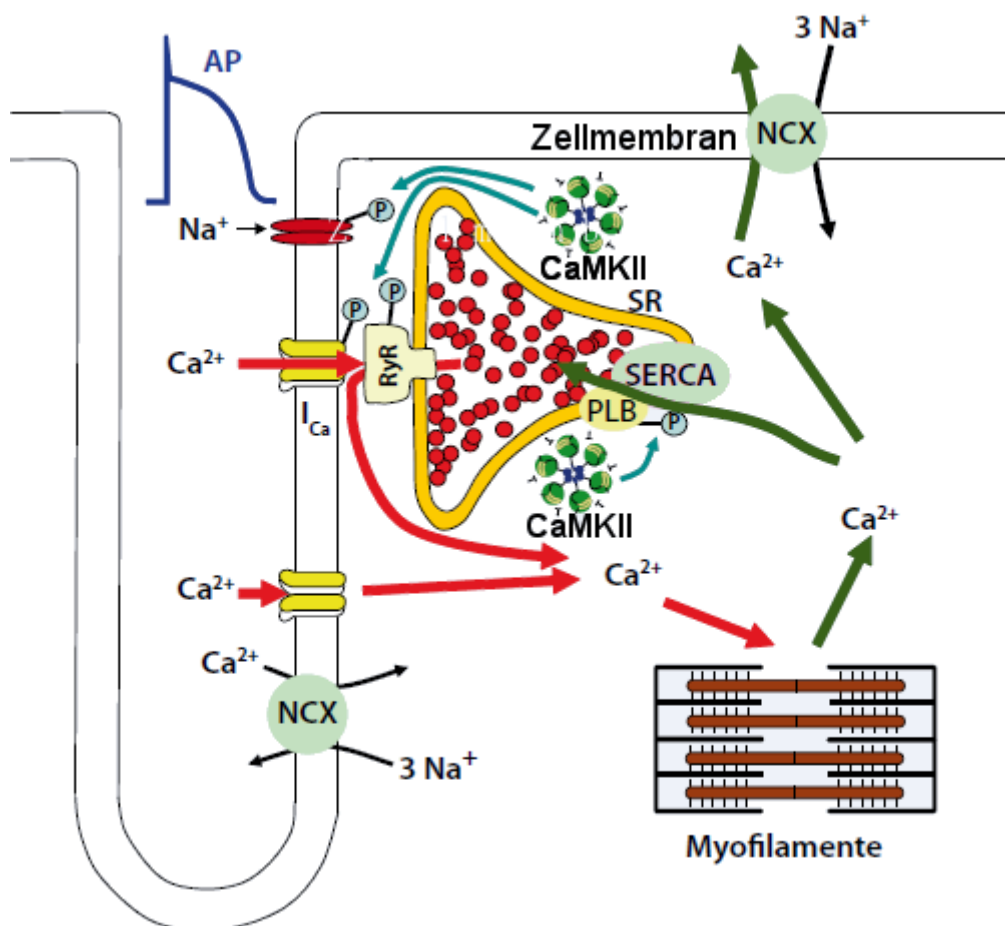


Abbildung 1-1 Elektromechanische Kopplung und Phosphorylierungsziele der CaMKII (türkisfarbene Pfeile). Modifiziert nach ROKITA et al. 2011, S. 96.

Nachdem die Zellmembran im Rahmen des schnellen Aufstiegs des AP depolarisiert wurde, das hauptsächlich durch einen Einstrom von Na^+ -Ionen durch spannungsgesteuerte Na_v -Kanäle getragen wird, öffnen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran und bewirken einen Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) in die Zelle. Die einströmenden Ca^{2+} -Ionen triggern schließlich die Öffnung von im sarkoplasmatischen Retikulum (SR)

verankerten und räumlich nahe den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen lokalisierten Ca^{2+} -Kanälen, den Ryanodin Rezeptoren (RyR2), was zu einem Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem als Ca^{2+} -Speicher fungierenden SR ins Zytosol führt. Dieser auch als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bezeichnete Vorgang trägt die für die Kontraktion notwendige Erhöhung der intrazellulären Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen (BERS 2001). Freies Ca^{2+} bindet an das Myofilamentprotein Troponin C, was die Aktivierung der mechanischen Kontraktionskaskade der Myofilamente bewirkt.

Für die Relaxation der Zelle müssen die Ca^{2+} -Ionen wieder aus dem Zytosol eliminiert werden. Diese Elimination tragen im Wesentlichen zwei aktive Ca^{2+} -Transporter. Die sarkoplasmatische SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), deren Aktivität durch Bindung des inhibitorischen Proteins Phospholamban (PLB) reguliert wird, befördert je zwei Ca^{2+} -Ionen unter Hydrolyse eines Moleküls Adenosintriphosphat (ATP) zurück in das SR (TADA et al. 1982). Der zellmembranständige Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) transportiert Ca^{2+} -Ionen aus der Zelle heraus; die Triebkraft hierfür bilden drei ins Zellinnere einströmende Na^+ -Ionen je Ca^{2+} -Ion, die dem Konzentrationsgradienten und negativen Ruhepotential folgen (BERS 2001). Unter physiologischen Bedingungen werden in humanen Herzmuskelzellen etwa 70 % der Ca^{2+} -Ionen über die SERCA2 in das SR zurückgepumpt und 28 % über den NCX in den Extrazellulärraum befördert (BERS 2002). Die Elimination über sogenannte langsame Wege - wie der Transport in die Mitochondrien oder über eine sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase - trägt nur einen sehr kleinen Anteil von < 1 % zur Kalziumelimination bei (BERS 2002). In Mäusekardiomyozyten beträgt das Verhältnis etwa 90 % SERCA2, 9 % NCX und 1 % langsame Wege (LI et al. 1998).

Für die Homöostase der elektromechanischen Kopplung und deren Regulation sind in den letzten Jahren hauptsächlich zwei Proteinkinasen als verantwortlich identifiziert worden: Die Proteinkinase A (PKA) als wichtiger Mediator des sympathischen Nervensystems in der Herzmuskelzelle und die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) (NEEF und MAIER 2007).

Die PKA wird durch hohe intrazelluläre Konzentrationen von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert, welches am G-Protein des β -Adrenorezeptors bei Sympathikusaktivierung entsteht (KORBMACHER und GREGER 2005). Sie phosphoryliert PLB an der Stelle SER16 und mindert dadurch dessen inhibierende Wirkung auf die SERCA2. Die dadurch gesteigerte SERCA2-Funktion

führt zu einer erhöhten Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR. Über Phosphorylierung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals und des Ryanodin-Rezeptors steigert die PKA deren Offenwahrscheinlichkeiten und sorgt somit für einen größeren Ca^{2+} -Ionen-Einstrom ins Zytosol während der Systole. Diese molekularen Mechanismen vermitteln die klassischen akuten positiv inotropen, chronotropen und lusitropen Effekte einer Sympathikusaktivierung, gehen andererseits bei länger fortdauernder erhöhter PKA-Aktivität mit dilatativer Kardiomyopathie und erhöhter Sterblichkeit im Mausmodell einher (ANTOS et al. 2001).

1.2 Die Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

1.2.1 Regulation des Ca^{2+} -Stoffwechsels durch die CaMKII

Zweiter zentraler Regulator der elektromechanischen Kopplung neben der PKA ist die CaMKII. Diese multifunktionelle Serin- und Threoninreste phosphorylierende Proteinkinase hat wichtige Funktionen in verschiedenen Geweben wie dem zentralen Nervensystem und in der Regulation von Entzündungsprozessen (WESTRA et al. 2009, SILVA et al. 1992). Es sind bislang vier verschiedene Isoformen des Enzyms, α , β , γ , und δ bekannt. Während die α - und β -Isoform hauptsächlich im zentralen Nervensystem vorkommen (SILVA et al. 1992), werden die CaMKII δ und γ insbesondere im Herzmuskel exprimiert, wobei die CaMKII δ den weitaus größeren Anteil ausmacht (BRAUN und SCHULMANN 1995). Von der CaMKII δ existieren die Splicevariante δ_C , die überwiegend im Zytosol lokalisiert ist, und δ_B , die überwiegend im Nukleus Transkriptionsprozesse reguliert (ZHANG et al. 2007). Die CaMKII weist drei für ihre Funktion wichtige Domänen auf (vgl. Abbildung 1-2). Neben einem aminoterminalen katalytischen Zentrum und einer carboxyterminalen Domäne, die die Oligomerisierung zu einem aus 6 - 12 Untereinheiten bestehenden radförmigen Komplexes ermöglicht (BRAUN und SCHULMANN 1995), ist eine regulatorische Domäne mit teils überlappenden autoinhibitorischen und Calmodulin-bindenden Bereichen für die Aktivitätssteuerung der Kinase entscheidend (MAIER und BERS 2002).

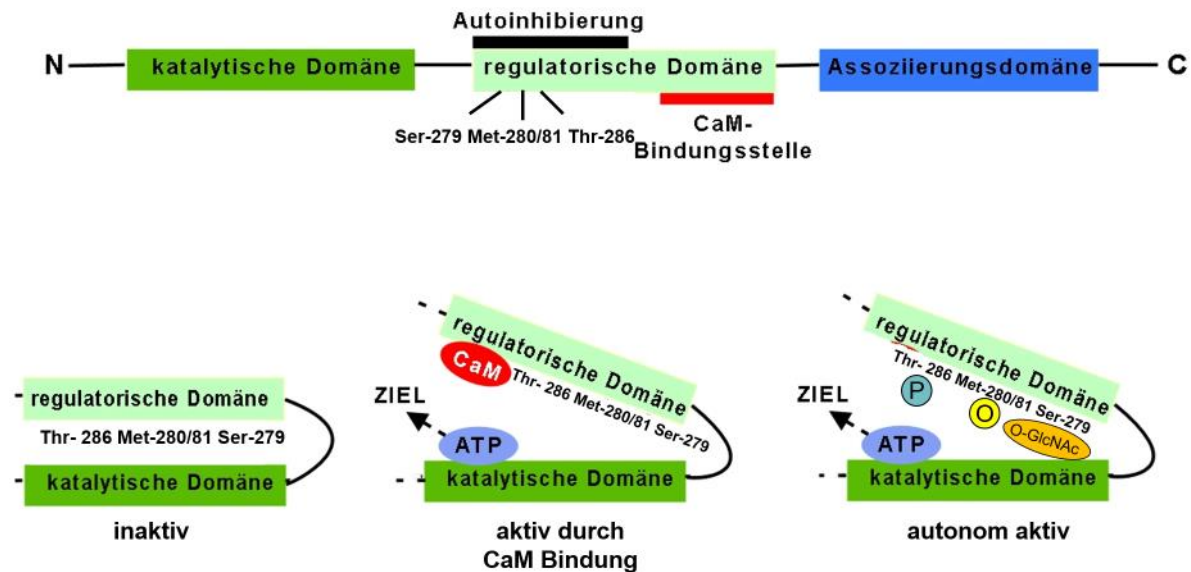


Abbildung 1-2 Struktur der CaMKII mit funktionell wichtigen Domänen. Oben: Schematische Darstellung der funktionell wichtigen Domänen. Unten: Aktivitätsstatus der CaMKII. Neben der katalytischen Domäne, die das Phosphatgruppen-übertragende katalytische Zentrum enthält, sind die aktivitätssteuernde regulatorische Domäne und die die Oligomerisierung ermöglichende Assoziationsdomäne des Enzyms dargestellt. Direkt aktiviert wird die CaMKII durch Bindung des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes (CaM). Durch Autophosphorylierung an der Stelle Thr-286, nach Met-280/81 Oxidation oder Übertragung einer O-linked N-Acetylglucosamin-Gruppe (O-GlcNAc) vermag sie aber selbst nach Dissoziation des Ca^{2+} -CaM noch aktiv zu bleiben.

Bei Bindung des Calmodulin/ Ca^{2+} -Komplexes (Ca-CaM) umlagert dieser auch autoinhibitorische Bereiche und führt darüber zu einer Aktivierung des Enzyms, wofür intrazellulär erhöhte $[\text{Ca-CaM}]$ erforderlich ist (MAIER et al. 2006), welche wiederum mit steigender $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zunimmt (HOOK und MEANS 2001). Halbmaximale Aktivierung der CaMKII δ wird bei $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von ca. 500 - 1000 nM erreicht, was Kalziumionenkonzentrationen während der Systole entspricht (MAIER 2005).

Einmal aktiviert, vermag die CaMKII durch Autophosphorylierung an der Stelle Threonin-286 einerseits die Affinität zum CaM zu erhöhen, was zu Folge hat, dass CaM selbst bei abfallenden Ca^{2+} -Spiegeln einige Sekunden lang weiter gebunden bleibt und die CaMKII somit weiterhin aktiv ist. Andererseits verbleibt die CaMKII durch diese Autophosphorylierung auch nach Dissoziation von CaM zu 20 – 80 % weiter aktiv und kann so auch in Abwesenheit von hohen Ca^{2+} -Spiegeln und nach Dissoziation des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes ihre Zielproteine phosphorylieren (MAIER und BERS 2002). Auch durch Oxidierung von Methionin M280/M281 (ERICKSON et al. 2008) und durch O-linked-Glykolysierung, der Übertragung einer O-linked N-Acetylglucosamin-Gruppe auf S279 (ERICKSON et al. 2013), verbleibt die CaMKII

nach Dissoziation des CaM im Offen-Zustand. Somit wirkt sie nicht nur in der Systole, sondern bleibt für einige Zeit der Diastole aktiv.

Als wichtige Phosphorylierungsziele für die elektromechanische Kopplung der CaMKII wurden bisher Phospholamban, der L-Typ-Ca²⁺-Kanal, der Ryanodin-Rezeptor RyR2 (MAIER und BERS 2002), Na⁺- und K⁺-Kanäle (WAGNER et al. 2006, WAGNER et al. 2009) und Histon-Deazetylasen (HDACs) (ZHANG et al. 2007) identifiziert.

Durch Phosphorylierung des Phospholambans am THR17 verliert dieses seinen inhibitorischen Effekt auf die SERCA2a. Die CaMKII vermittelt dadurch bei unveränderter SERCA2a-Expression eine Entthemmung dieser und dadurch eine Steigerung der Ca²⁺-Rückaufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum (MAIER und BERS 2002).

Die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 wird durch CaMKII-bedingte Phosphorylierung erhöht. In der Diastole führt die erhöhte RyR2-Offenwahrscheinlichkeit zu einer erhöhten Frequenz spontaner Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR und zusammen mit erhöhter L-Typ-Ca²⁺-Offenwahrscheinlichkeit zu spontanen Ca²⁺-Freisetzungseignisse, frühen und späten Nachdepolarisationen (VAN OORT et al. 2010, SAG et al. 2009). Diese proarrhythmogenen Ereignisse können über den NCX Herzrhythmusstörungen hervorrufen. In diesem Zusammenhang ist auch die Verstärkung des sogenannten späten I_{Na} durch die CaMKII zu erwähnen, der unter anderem über erhöhtes [Na⁺]_i eine Destabilisierung des Ruhemembranpotentials und somit eine Suszeptibilität für Arrhythmien bedingt (WAGNER et al. 2006).

Histon-Deazetylasen (HDAC) assoziieren am Genom mit dem Transkriptionsfaktor *Myocyte Enhancer Factor 2* (MEF2), dessen Aktivierung die Expression von für Hypertrophie-induzierende Proteine kodierenden Genen fördert. Nach Phosphorylierung, die sowohl durch CaMKII_{δC} als auch CaMKII_{δB} erfolgen kann, dissoziiert HDAC vom MEF2 und fördert damit die Hypertrophisierung der Herzmuskelzelle (LU et al. 2000, ZHANG et al. 2007).

1.3 Herzinsuffizienz

1.3.1 Definition, klinisches Bild und Ursachen

Die Insuffizienz des Herzens ist definiert als das Unvermögen, den Körper mit einem angemessenen Herzzeitvolumen und damit ausreichend Blut bzw. Sauerstoff zu versorgen. Herzinsuffizienz äußert sich klinisch durch verminderte körperliche

Leistungsfähigkeit, Dyspnoe und Flüssigkeitsretention, die sich in Ödemen ausdrückt. (BUNDESÄRZTEKAMMER 2012) Unterschieden werden eine systolische Insuffizienz mit einer eingeschränkten linksventrikulären Pumpfunktion und eine diastolische Dysfunktion mit veränderter Relaxations- und Füllungsphase des linken Ventrikels bei erhaltener oder kaum verminderter Auswurffraktion. Als Schwellenwert der Auswurffraktion zur Diagnose einer systolischen Insuffizienz werden $< 35 - 40\%$ linksventrikuläre Auswurffraktion (*ejection fraction*, EF) angesehen, die in der Routinediagnostik echokardiographisch bestimmt wird. Bei Gesunden beträgt die EF $> 55\%$, auch bei Werten um 50% können schon Symptome einer Herzinsuffizienz auftreten (BUNDESÄRZTEKAMMER 2012).

Klinisch eingestuft wird die Herzinsuffizienz nach der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA), wobei ausschließlich die Leistungsfähigkeit des Patienten beurteilt wird. Von asymptomatischen Patienten mit NYHA-Stufe I reicht das Spektrum über leichte und mittelschwere Einschränkung der physischen Belastbarkeit bei NYHA II-III bis hin zu Beschwerden in Ruhe bei NYHA-Stufe IV (BUNDESÄRZTEKAMMER 2012). Auch für die Therapieentscheidung und Auswahl der Medikamente wird diese Einteilung in Krankheitsstufen herangezogen.

Die 5-Jahres-Mortalität von Patienten mit Herzinsuffizienz betrug in einer großen Fall-Kontroll-Studie Ende der 1990er an der Population von Olmsted County, Minnesota (USA) 48% und übertrifft damit die Sterblichkeitsraten vieler maligner Tumoren (SCHOCKEN et al. 2008). Zu der hohen Morbidität und Letalität tragen die häufigen akuten Dekompensationen einer chronischen Herzinsuffizienz bei, die sich klinisch in neu aufgetretener Ruhedyspnoe, Hypotension, Volumenüberlastung mit Ödemen oder Halsvenenstauung manifestieren können (BUNDESÄRZTEKAMMER 2012). Innerhalb der ersten 60 Tage nach Dekompensation einer Herzinsuffizienz versterben ca. 10% der Patienten (MUTH et al. 2006).

Die Haupttodesursache bei Herzinsuffizienzpatienten ist der plötzliche Herztod durch ventrikuläre Herzrhythmusstörungen (BARDY et al. 2005). PACKER verglich 1985 mehrere Studienergebnisse und konstatierte, dass der mit ventrikulären Arrhythmien assoziierte plötzliche Herztod $33 - 47\%$ aller Todesfälle bei Herzinsuffizienzpatienten ausmachte. Neuere Daten aus der Sudden Cardiac Death in Heart Failure Trial (SCD-HeFT) weisen über einen medianen Beobachtungszeitraum von 45,5 Monaten an Patienten der NYHA-Klassen II-III in der Kontrollgruppe, die weder mit dem

Antiarrhythmikum Amiodaron noch mit implantierbarem Cardioverter-Defibrillator (ICD) versorgt wurde, eine Letalität von 28,8 % aus, wovon 39 % infolge tachykarder Rhythmusstörungen verstarben. Selbst über alle Gruppen hinweg – inklusive der pharmakotherapeutisch oder mit ICD versorgten Patienten – machten Tachyarrhythmien mit 31 % noch die häufigste Todesursache aus (PACKER et al. 2009).

Führende Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz sind die Folgen einer koronaren Herzerkrankung und arterieller Hypertonus. Sie sind bei ca. 70 – 90 % aller Patienten zu finden. Seltener ursächlich sind die dilatativen, hypertrophen und hypertroph-obstruktiven Kardiomyopathien, Klappenitien, Arrhythmien, Alkoholmissbrauch und bestimmte kardiotoxische Medikamente (BUNDESÄRZTEKAMMER 2012).

1.3.2 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Bei unzureichender Pumpfunktion des Herzens werden Kompensationsmechanismen aktiviert, die kurzfristig das Herzzeitvolumen steigern, langfristig aber zur Entstehung und Verschlechterung einer Herzinsuffizienz führen (BUNDESÄRZTEKAMMER 2012).

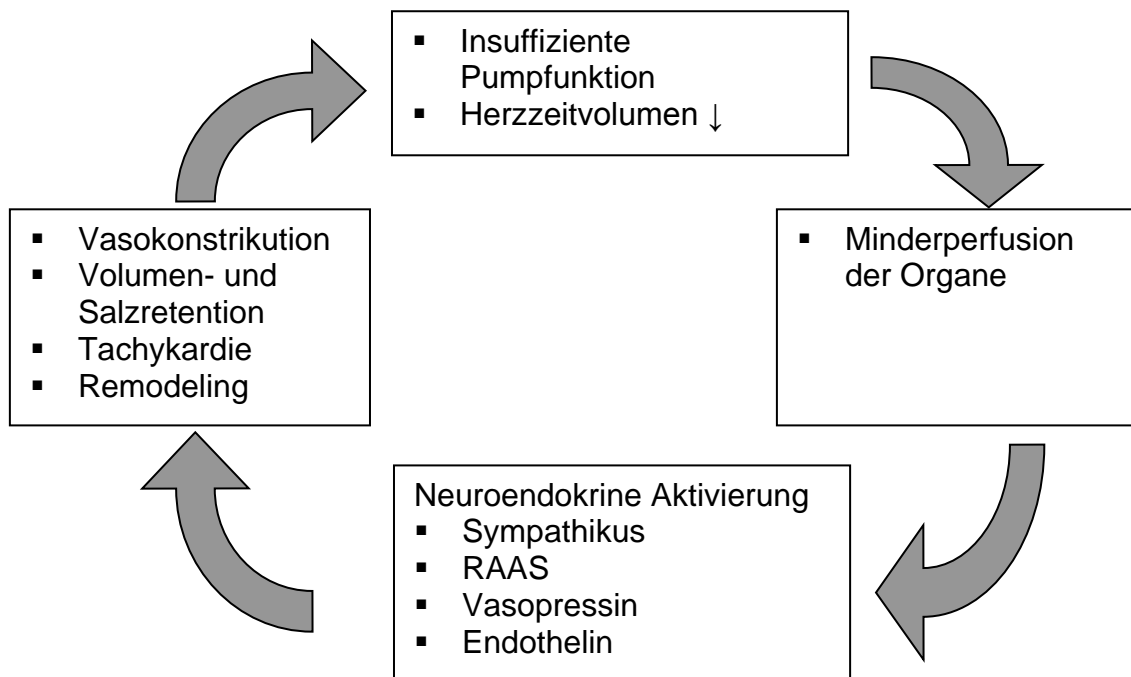


Abbildung 1-3 Circulus Vitosus der Herzinsuffizienz. Bei unzureichender Pumpleistung des Herzens werden die Endorgane ungenügend mit sauerstoffreichem Blut versorgt. Um dies zu kompensieren, werden neuroendokrine Systeme wie der Sympathikus und das RAAS aktiviert, die die Vor- und Nachlast steigern können und den Organperusionsdruck kurzfristig zu erhöhen vermögen. Langfristig wird dadurch das Herz weiter geschädigt und die Pumpfunktion nimmt weiter ab.

Als Reaktion auf die Verringerung der Auswurfleistung des Herzens werden das sympathische Nervensystem und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) vermehrt aktiviert (LIP et al. 2000). β -Adrenozeptoren-vermittelt werden die Herzfrequenz und die myokardiale Kontraktilität gesteigert, was zu einer passageren Restitution der Pumpfunktion führt. Gleichzeitig bewirkt die Sympathikusaktivierung eine periphere Vasokonstriktion und somit eine Erhöhung der Nachlast und des Blutdrucks. Auch das RAAS wirkt über Angiotensin II vermittelt vasokonstriktiv, ebenso das Peptid Endothelin. Die Natrium und Wasser retinierenden Effekte des Aldosteron steigern das zirkulierende Blutvolumen und damit die Vorlast. Diese als neurohumorale Aktivierung zusammengefassten Vorgänge vermögen über einen längeren Zeitraum die Versorgung des Körpers mit ausreichend Blut und Sauerstoff aufrechtzuerhalten und so die klinische Manifestation der Herzinsuffizienz hinauszuzögern (LIP et al. 2000).

Gleichzeitig initiieren die exzessive Sympathikusaktivierung, die gesteigerte Vor- und Nachlast jedoch Umbauprozesse im Herzmuskel, deren Gesamtheit als linksventrikuläres Remodeling bekannt ist. Im Einzelnen treten vermehrt Apoptosen der Herzmuskelzellen, Hypertrophien und fokale Myokardnekrosen auf (LIP et al. 2000). Eine Umstrukturierung der extrazellulären Matrix und der Herzarchitektur führt zu einer Dilatation des Ventrikels (BERS 2001).

An der Zelloberfläche nimmt unter der ständigen Sympathikusaktivierung die Zahl der β -Adrenozeptoren ab, was eine verminderte Übertragung der positiv inotropen Effekte, also eine Minderung der Kontraktionskraft und damit eine erneute Verschlechterung der Auswurfleistung, bedingt. Daraufhin wird kompensatorisch die Aktivität des Sympathikus und des RAAS weiter gesteigert und andere vasokonstriktiv wirkende Peptide wie Endothelin-1, das auch als ungünstiger prognostischer Marker der schweren Herzinsuffizienz gilt, sezerniert (LIP et al. 2000). Es wird ein Circulus Vitiosus durchlaufen, der über dauerhafte neurohumorale Aktivierung, Steigerung von Nach- und Vorlast und proinflammatorische Zytokine den Progress der Herzinsuffizienz unterhält und beschleunigt (vgl. Abbildung 1-3, ROKITA et al. 2011)

1.3.3 Veränderte elektromechanische Kopplung bei Herzinsuffizienz

Die oben beschriebene Insuffizienz der zellulären Kontraktion trotz erhöhter Katecholaminspiegel beruht im Wesentlichen auf Änderungen des Ca^{2+} -Stoffwechsels und einer gestörten elektromechanischen Kopplung. Da Ca^{2+} -Ionen, wie in Kapitel 1.1.1

beschrieben, direkt den Kontraktionszyklus in Gang setzen, haben Veränderungen der systolischen und diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytosol unmittelbare Auswirkungen auf die zelluläre Kontraktion (BERS 2001).

Allgemein anerkannt ist, dass bei Herzinsuffizienz die intrazellulären Ca^{2+} -Transienten der Herzmuskelzellen eine verminderte Amplitude aufweisen, dass also auf ein Aktionspotential folgend weniger Ca^{2+} freigesetzt wird als in gesunden Zellen (NEEF und MAIER 2007). Dazu trägt unter anderem ein verringerter Gesamt SR Ca^{2+} -Gehalt bei. Hierauf wirken sich maßgeblich zwei Prozesse aus: Das in insuffizienten Zellen deutlich vergrößerte diastolische SR Ca^{2+} -Leck, das einen ständigen Verlust von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR und damit geringere Ca^{2+} -Speicherkapazität bedingt (MAIER et al. 2003), sowie eine reduzierte Ca^{2+} -Rückaufnahme in das SR wegen verminderter SERCA2a-Expression und gesteigerter NCX-Expression (HASENFUSS 1998). Das auf ein Aktionspotential hin freigesetzte Ca^{2+} wird also zu einem größeren Anteil als beim Gesunden über den NCX aus der Zelle herausbefördert, woraus ein Ca^{2+} -Verlust der Zelle resultiert (ROKITA et al 2011).

Das erhöhte SR Ca^{2+} -Leck beruht maßgeblich auf einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der RyR2, welche über verschiedene Regulationsmechanismen beeinflusst wird. Neben Einflüssen von Ca^{2+} , Mg^{2+} , NAD^+/NADH , ATP und FKBP12.6, dessen Bindung den RyR2 im geschlossenen Zustand stabilisiert (BRILLANTES et al. 1994), dessen Expression bei Herzinsuffizienz jedoch nicht verändert scheint (HASENFUSS und PIESKE 2002), ist die Phosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors von entscheidender Bedeutung für dessen Offenwahrscheinlichkeit. Eine Hypothese besagt, dass die PKA über eine Phosphorylierung an der Stelle SER2808 die Dissoziation des stabilisierenden FKBP12.6 bewirkt. Tatsächlich wird diese als wichtiger Mediator der positiv inotropen Wirkung als Teil der sogenannten „fight or flight“-Reaktion akuter Sympathikusaktivierung angesehen (NEEF und MAIER 2007).

Es gab Kontroversen, ob die PKA oder die CaMKII entscheidend das erhöhte SR Ca^{2+} -Leck bedingen. In letzter Zeit mehren sich die Hinweise aus verschiedenen Arbeitsgruppen, dass dem Beitrag der CaMKII wohl größere Relevanz zukommt (NEEF und MAIER 2007), zumal die β -Rezeptordichte an der Oberfläche insuffizienter Herzmuskelzellen verringert ist und somit das Ansprechen auch der PKA auf Sympathikus-Aktivierung bei Herzinsuffizienz reduziert ist. Darüber hinaus zeigten

NEUMANN et al. 1997, dass auch andere PKA-Zielproteine wie PLB bei Herzinsuffizienz vermindert und nicht vermehrt phosphoryliert sind.

Der zweite zentrale Regulator, die CaMKII, phosphoryliert den RyR2 primär an der Stelle SER2814. Diese Phosphorylierung führt nicht zur Dissoziation von FKBP12.6 sondern scheint direkt die Offenwahrscheinlichkeit zu erhöhen (WEHRENS et al. 2004).

SR Ca^{2+} -Leck und verminderte SR Ca^{2+} -Rückaufnahme führen über niederamplitudige Ca^{2+} -Transienten und dadurch verringerte Aktivierung des Kontraktionsmechanismus der Myofilamente zu einer zellulären Kontraktionsinsuffizienz. Zu beobachten ist diese insbesondere bei höheren Herzfrequenzen. Während im gesunden Myokard die Kontraktionsamplitude mit steigender Frequenz zunimmt (positive Kraft-Frequenz-Beziehung), bleibt sie in insuffizienten Herzmuskelzellen gleich oder fällt sogar ab (negative Kraft-Frequenz-Beziehung) (MAIER 2006).

1.3.4 Proarrhythmogene Ereignisse im insuffizienten Myokard

Die führende Todesursache bei herzinsuffizienten Patienten ist der plötzliche Herztod durch Herzrhythmusstörungen (vgl. 1.3.1). Als zelluläre Arrhythmiekorrelate werden die späte Nachdepolarisierung (Delayed after Depolarization, DAD) (CHEN et al. 2004) und spontane SR Ca^{2+} -Freisetzungseignisse (SCR-Events), auch „spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release events (SCaEs)“ (VOIGT et al. 2012), angesehen. SCR-Events beschreiben einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel, oft gefolgt von einer Kontraktion, ohne erkennbaren Stimulus während der Diastole (WEHRENS et al. 2003).

Arrhythmiekorrelat auf molekularer Ebene ist die spontane Öffnung eines oder mehrerer RyR2 in der Diastole und die daraus resultierende spontane, lokalisierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, die konsekutiv über einen einwärtsgerichteten Strom über den NCX zu einer Depolarisierung der gesamten Zelle in der Diastole und damit potentiell zur Initiierung einer Arrhythmie führen kann (NEEF et al. 2010). Die lokalisierten, spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen sind mittels Konfokalmikroskopie als sogenannte Ca^{2+} -Sparks sicht- und messbar und korrelieren in der Frequenz ihres Auftretens mit der Suszeptibilität für Arrhythmien *in vivo* (SAG et al. 2009). Die in 1.3.3 beschriebene erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 trägt somit nicht nur zum verminderten SR Ca^{2+} -Gehalt bei Herzinsuffizienz bei, sondern könnte darüber hinaus mit für die Entstehung oft tödlich endender Arrhythmien verantwortlich sein (RESPRESS et al. 2012).

1.4 Die Rolle der CaMKII für die Entwicklung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien

1.4.1 CaMKII und Herzinsuffizienz

Konsistent mit den in 1.2 beschriebenen physiologischen und pathophysiologischen Auswirkungen, die eine gesteigerte Aktivität der CaMKII haben kann, wurde bereits Ende der 1990er Jahre gezeigt, dass in humanem insuffizientem Myokard die CaMKII vermehrt exprimiert und aktiviert wird (HOCH et al. 1999, SOSSALLA et al. 2010). Weiter untermauert wurde ihre Rolle bei der Entstehung der Herzinsuffizienz durch den Nachweis einer deutlich erhöhten CaMKII-Expression und Aktivität nach künstlicher Nachlasterrhöhung durch TAC- Operation bei Mäusen im Alter von 8 Wochen (ZHANG et al. 2003). Den letztendlichen Nachweis, dass die CaMKII nicht nur kompensatorisch vermehrt aktiv sondern zentral involviert in der Entstehung einer Herzinsuffizienz ist, wurde 2003 erbracht.

ZHANG et al. (2003) generierten Mäuse, welche die CaMKII δ_C im Herzen transgen überexprimieren. Im Alter von 16 Wochen zeigten die transgenen Mäuse *in vivo* Zeichen einer Herzinsuffizienz wie Ventrikeldilatation und -vergrößerung oder pulmonale Stauung. Das Herz war in Relation zur Körpermasse deutlich vergrößert, was ein Zeichen der Herzhypertrophie darstellt. 25 – 50 % der Mäuse starben in den ersten Generationen frühzeitig. Untersuchungen auf zellulärer Ebene an isolierten Kardiomyozyten zeigten eine signifikante Verringerung der Kontraktionsamplitude (ZHANG et al. 2003). Gegenüber dem Wildtyp sind in Myokardzellen transgener Mäuse Ca²⁺-Transientenamplitude, diastolisches [Ca²⁺]_i und SR Ca²⁺-Gehalt stark verringert (MAIER et al. 2003). Die als Ca²⁺-Sparks messbaren spontanen diastolischen Ca²⁺-Freisetzungen aus dem SR sind in CaMKII δ_C -transgenen Mäusen trotz des niedrigeren SR Ca²⁺-Gehalts erhöht (MAIER 2005).

Man kann also konstatieren, dass die CaMKII nicht nur in humanem insuffizientem Myokard vermehrt aktiv ist und modulierend auf wichtige Schlüsselproteine der elektromechanischen Kopplung einwirkt, sondern dass eine vermehrte Expression der CaMKII δ_C im Tiermodell eine Herzinsuffizienz hervorrufen kann.

1.4.2 CaMKII und Arrhythmien

Proarrhythmogene Ereignisse auf molekularer Ebene sind lokalisierte Ereignisse von unstimuliertem Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR durch RyR2, die konfokalmikroskopisch als

Ca²⁺-Sparks messbar sind (WEHRENS et al. 2005, vgl. 1.3.4). Bereits 2003 konnten MAIER et al. eine erhöhte Ca²⁺-Spark-Frequenz nach Überexpression der CaMKII nachweisen. Als Ursache für dieses größere Ca²⁺-Leck wurde schon 2003 eine gesteigerte CaMKII-abhängige Phosphorylierung der Ryanodin-Rezeptoren angesehen, welche bereits nachweisbar war, bevor signifikante Auswirkungen auf den zellglobalen Ca²⁺-Haushalt und *in vivo* oder *in vitro* Zeichen einer manifesten kardialen Insuffizienz zu beobachten waren (ZHANG et al. 2003). WEHRENS et al. konnten 2004 zeigen, dass besonders bei höheren Herzfrequenzen die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an SER2814 und nicht die PKA-abhängige an SER2808 erhöht war.

Aktuelle Ergebnisse von RESPRESS et al. 2012 untermauern die Schlüsselstellung der CaMKII weiter, indem sie entscheidende Auswirkungen erhöhter Phosphorylierung des RyR2 an der Stelle SER2814 auf das Auftreten proarrhythmogener SCR-Events (vgl. 1.3.4) nachwiesen. Sie entwickelten das Knock-In-Mausmodell S2814A, bei dem in der Aminosäuresequenz des RyR2 Serin an der Stelle 2814 durch Alanin ersetzt wurde und somit das Phosphorylierungsziel der CaMKII nicht mehr phosphoryliert werden kann. Isolierte S2814A-Kardiomyozyten zeigten 16 Wochen nach Nachlasterhöhung durch transverse aortale Konstriktion (TAC) nur halb so häufig SCR-Events wie Wildtypzellen. Konsistent mit der Annahme, dass CaMKII-abhängige Phosphorylierung an Stelle SER2814 für diese drastischen Unterschiede verantwortlich ist, ließ sich der Anteil an Zellen mit SCR-Events in WT Mäusen durch Applikation des CaMKII-Inhibitors KN-93 signifikant reduzieren, während bei S2814A-Kardiomyozyten keine weitere Reduktion möglich war (RESPRESS et al. 2012). Die Phosphorylierung an Stelle S2808, die als prinzipielle PKA- und eventuell sekundäre CaMKII-Phosphorylierungsstelle gilt, war weder in humanen insuffizienten Myokardproben noch in Mäusekardiomyozyten nach TAC vermehrt phosphoryliert. Somit legen diese und andere Veröffentlichungen nahe, dass tatsächlich die CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR2 an SER2814 und nicht durch die PKA an Stelle SER2808 für das häufige Auftreten von Arrhythmien in der Herzinsuffizienz verantwortlich sein könnte (VAN OORT et al. 2010).

Dass nicht nur zelluläre oder molekulare potentielle Trigger von Arrhythmien durch CaMKII-bedingte RyR2-Phosphorylierung vermehrt auftreten, sondern dass auch *in vivo* eine erhöhte Anfälligkeit für Arrhythmien besteht, konnten VAN OORT et al. 2010 mit einem Knock-In-Mausmodell mit konstitutioneller Phosphorylierung der CaMKII-Stelle Ser-2814 am RyR2, der S2814D-Linie, zeigen. Diese Mäuse wiesen unter

sympathomimetischer Stimulation mit Epinephrin oder Koffein signifikant mehr anhaltende ventrikuläre Tachykardien auf als Wildtypmäuse. Gleichzeitig waren auch hier erhöhte Ca^{2+} -Spark-Frequenzen nachweisbar. In derselben Arbeit wurde der Schutz der oben vorgestellten S2814A-Maus gegenüber der Entwicklung von ventrikulären Tachykardien durch overdrive-pacing evident. Während $\frac{3}{4}$ der Wildtyp-Mäuse 8 Wochen nach TAC auf overdrive-pacing hin Arrhythmien entwickelten, war dies nur bei 14 % der S2814A-Mäuse der Fall (VAN OORT et al. 2010).

WAGNER et al. wiesen 2006 eine erhöhte Arrhythmie-Rate in CaMKII δ_C -transgenen Mäusen nach und identifizierten den gesteigerten späten Natriumeinstrom (late I_{Na}) als weiteren möglichen CaMKII-vermittelten proarrhythmogenen Mechanismus. Der late I_{Na} kann neben einer AP-Verlängerung bei Herzinsuffizienz mit zu einer Na^+ -Überladung der Zellen beitragen, was wiederum die Ca^{2+} -Extrusion über den NCX wegen des geringeren transmembranösen Gradienten beeinträchtigt und zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zelle führen kann. Die late I_{Na} bedingte Ca^{2+} -Überladung der Zelle wird wiederum mit diastolischer Dysfunktion und proarrhythmogenen Nachdepolarisationen in Verbindung gebracht (SOSSALLA et al. 2008).

Über die Rolle der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung des RyR2 für das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien hinaus, für die es mittlerweile wachsende Evidenz gibt, könnte die Suszeptibilität für Arrhythmien auch im Vorhofmyokard relevant sein. NEEF et al. untersuchten 2010 die Rolle der CaMKII in Proben von Patienten mit Vorhofflimmern und fanden erhöhte RyR2-Phosphorylierung an SER2814 und erhöhte Ca^{2+} -Spark-Frequenzen. CHELU et al. 2009 zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für Vorhofflimmern in Mäusemodellen mit erhöhtem RyR2-Leck und eine verminderte Anfälligkeit im gegen die CaMKII-Phosphorylierung geschützten S2814A-Modell. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die CaMKII auch an der Entstehung von Vorhofflimmern beteiligt zu sein scheint.

Die Rolle der CaMKII in der Entstehung von Arrhythmien macht sie als therapeutisches Ziel der Herzinsuffizienztherapie und auch speziell der Herzinsuffizienz-assoziierten Arrhythmien hoch interessant. Auch eine neuartige Therapie bei Vorhofflimmern kann klinische Relevanz haben, weil neu aufgetretenes Vorhofflimmern eine bestehende Herzinsuffizienz verschlechtern und zu Dekompensationen führen kann und Vorhofflimmern darüber hinaus mit einem massiv erhöhten Embolie- und Schlaganfallrisiko einhergeht (CAMM et al. 2010).

1.5 Inhibition der CaMKII – Auswirkungen und Möglichkeiten

Vor dem Hintergrund der großen Rolle, die die CaMKII für die Entstehung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien spielt, haben schon seit über einem Jahrzehnt Forschungsgruppen daran gearbeitet, die Aktivität dieses Enzyms zu blockieren. Einige potente Inhibitoren sind heute bekannt und in wissenschaftlicher Anwendung. Sie sollen im Folgenden vorgestellt werden. Bislang sind die Inhibitoren ausschließlich zur experimentellen und nicht zur klinischen Anwendung verfügbar.

1.5.1 Etablierte CaMKII-Inhibitoren und ihre Auswirkungen

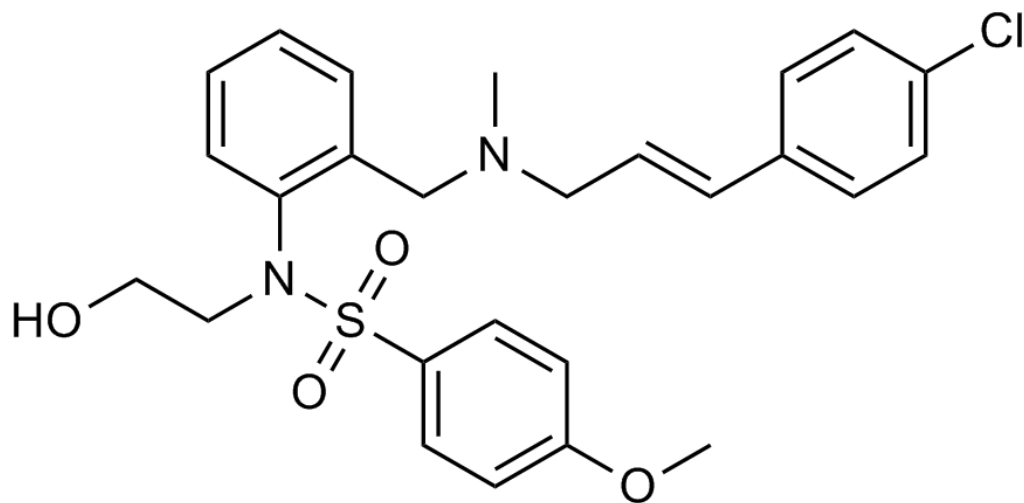


Abbildung 1-4 KN-93-Strukturformel

KN-93 (Abbildung 1-4) blockiert kompetitiv die Bindungsstelle von Calmodulin (Abbildung 1-5) und somit die Aktivierung der CaMKII (ANDERSON et al. 1998). Seine Potenz, die CaMKII zu inhibieren, wurde von vielen Arbeitsgruppen (u.a. MAIER et al. 2003, ANDERSON et al. 1998, SOSALLA et al. 2010) unter Beweis gestellt. Wie auch für einige andere hier nicht näher besprochene CaMKII-Inhibitoren (vgl. BRAUN und SCHULMAN 1995) ließ sich für KN-93 ein direkter hemmender Effekt auf den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal nachweisen (ANDERSON et al. 1998). Dieser kann u. U. die Aussagekraft von den Kalziumstoffwechsel betreffenden experimentellen Messungen kompromittieren.

Eine aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften zu unterscheidende Gruppe von Inhibitoren sind Peptide, namentlich AC3-I und AIP (*autocamtide-2-related inhibitory peptide*). Letzteres hat eine Strukturähnlichkeit zur autoinhibitorischen Domäne der CaMKII, worüber es mutmaßlich seine hemmende Wirkung entfaltet (ISHIDA et al. 1995), indem es sterisch den Zugang zu Substraten verhindert (Abbildung 1-5). Auch

für AIP konnten diverse Gruppen zeigen, dass es Effekte der erhöhten CaMKII-Aktivität am Herzen rückgängig machen kann (KOHLHAAS et al. 2006, CURRIE et al. 2003). Ein Nachteil der Peptid-Inhibitoren war zunächst ihre Membranimpermeabilität, die allerdings durch chemische Modifikation, die Myristoylierung, überwunden werden konnte. Bislang sind für sie keine CaMKII-unabhängigen unspezifischen Effekte bekannt (MAIER und BERS 2002, KOHLHAAS 2006).

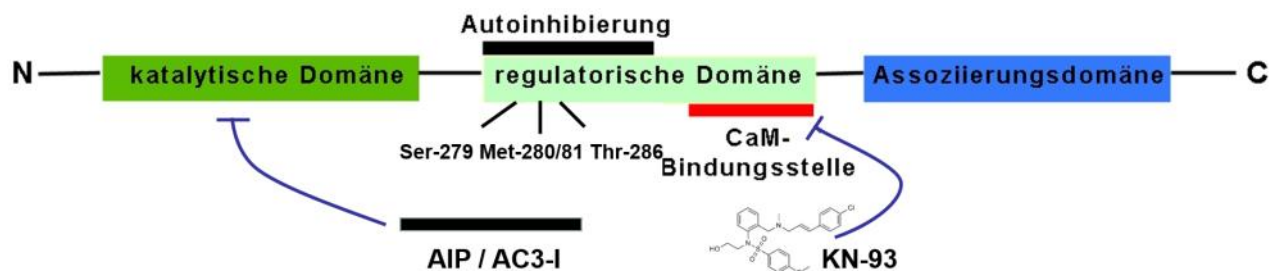


Abbildung 1-5 Angriffsstellen der etablierten CaMKII-Inhibitoren KN-93 blockiert kompetitiv die Bindungsstelle des CaM und verhindert dadurch eine Aktivierung der CaMKII. Die Peptidinhibitoren AIP und AC3-I sind strukturell der Autoinhibitionsdomäne der CaMKII sehr ähnlich und können ihre Wirkung über eine Blockierung des Zugangs von Substraten zum aktiven Zentrum entfalten.

Unter Verwendung des strukturell und bezüglich des Blockierungsmechanismus dem AIP ähnelnden AC3-I entwickelten ZHANG et al. (2005) ein transgenes Mausmodell, in dem über eine ständige autochthone Expression von AC3-I die CaMKII-Aktivität Mäuse dauerhaft um über 40 % reduziert ist. Anhand dieses Modells ließ sich nachweisen, dass durch dauerhafte Inhibition der CaMKII in AC3-I-transgenen Mäusen aber auch in langfristig pharmakotherapeutisch mit KN-93 behandelten Wildtyp-Mäusen das Remodeling der elektromechanischen Kopplung (vgl. 1.3.2; 1.3.3), die Änderungen der Ca^{2+} -Homöostase und damit schließlich auch die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach chirurgisch herbeigeführtem Myokardinfarkt reduziert werden kann. Gleichzeitig blieben dabei die physiologischen und lebenswichtigen akuten Effekte einer Sympathikus-Wirkung an β -Adrenozeptoren, die positive Inotropie und Lusitropie erhalten (ZHANG et al. 2005).

Neuere Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass eine Reduktion zellulärer Arrhythmiekorrelate durch CaMKII-Inhibition auch die Anfälligkeit für Arrhythmien senken kann (vgl. 1.3.4). Es konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung der CaMKII-Phosphorylierungsstelle am RyR2 zu einer verringerten Anfälligkeit für die Entwicklung ventrikulärer Tachykardien führt (VAN OORT et al. 2010). SAG et al. 2009 wiesen für den CaMKII-Inhibitor KN-93 *in vitro* antiarrhythmische Effekte nach, die in derselben Arbeit sogar bei Applikation *in vivo* im Mausmodell die Inzidenz von

Arrhythmien nach β -adrenerger Provokation mittels Isoproterenol senkten. Die Beobachtung antiarrhythmischer Effekte *in vitro* wie *in vivo* weckt die Hoffnung, in der CaMKII-Inhibition einen neuen Ansatz in der Herzinsuffizienztherapie gefunden zu haben, der gleichzeitig die Therapie der Krankheit selber und die Prävention der häufigsten Todesursache von Herzinsuffizienz-Patienten leisten könnte (FARR und BASSON 2004, SAG et al. 2009). Die Inhibition der CaMKII erscheint damit als neues, hochinteressantes pharmakotherapeutisches Ziel in der Therapie der Herzinsuffizienz und kardialer Arrhythmien.

1.5.2 Nachteile der etablierten CaMKII-Inhibitoren

Neben den in 1.5.1 besprochenen Nachteilen in Bezug auf chemische Eigenschaften der etablierten CaMKII-Inhibitoren muss nach über einer Dekade intensiver Forschung festgehalten werden, dass man trotz großer Fortschritte im Verständnis der Rolle der CaMKII in der Entstehung der Herzinsuffizienz noch weit davon entfernt ist, diese Errungenschaften therapeutisch auszunutzen. Keiner der oben besprochenen und bewährten CaMKII-Inhibitoren ist für die Anwendung am Menschen zugelassen. Es handelt sich um rein experimentell verwendbare Substanzen. KN-93 gilt in höheren Konzentrationen als zytotoxisch (WESTRA et al. 2010). Ein weiteres Problem von KN-93 und Peptid-Inhibitoren wie AIP wäre ihre Applikationsform. Beide wären nur nach parenteraler Verabreichung bioverfügbar (vgl. ZHANG et al. 2005). Für Herzinsuffizienzpatienten, die in aller Regel lebenslang behandelt werden müssen, wäre ein oral bioverfügbares Präparat wünschenswert. Mit Hinblick auf die Lebensqualität der Patienten, die Compliance und auch die volkswirtschaftlichen Kosten hätte vor dem Hintergrund der jahrelang bewährten Stufentherapie ein oral wirksames Präparat auch deutlich bessere Aussichten, eine Zulassung zu erhalten.

1.5.3 SMP-114 – ein neuartiger CaMKII-Inhibitor

Im Jahre 2004 wurde vom europäischen Patentamt ein Wirkstoff namens SMP-114 zur Applikation in Tablettenform bei Patienten mit rheumatoider Arthritis patentiert (TAKADA et al. 2006). Dieses Präparat entfaltet seine Wirkung über eine Inhibition der CaMKII, die auch an der Induktion der Produktion proinflammatorischer Zytokine, die die Pathogenese rheumatischer Erkrankungen vorantreiben, beteiligt ist (WESTRA et al. 2009).

Für SMP-114 konnte gezeigt werden, dass es die CaMKII-abhängige Produktion von vaskulärem endotheliale Wachstumsfaktor bereits in niedrigeren Konzentrationen als

KN-93 signifikant reduziert. Dabei war es in Konzentrationen bis 30 μM ohne zytotoxische Effekte anwendbar (WESTRA et al. 2010). In einem Tiermodell für rheumatoide Arthritis waren sowohl Gelenkschwellung als auch ein Gelenk-Destruktions-Index unter Therapie mit SMP-114 in Kombination mit dem Standardmedikament Methotrexat signifikant stärker vermindert als bei der Monotherapie mit Methotrexat (TAGASHIRA und FUKUSHIMA 2008). SMP-114 zeigte sich in einer klinischen Phase I Studie am Menschen als sicher ohne relevante Nebenwirkungen für alle applizierten Dosen bis 120 mg p.o. (TAKADA et al. 2006). In einer Phase II Studie wurde SMP-114 in verschiedenen Konzentrationen als wirksam in der Behandlung von Patienten mit rheumatoider Arthritis befunden (TAKADA et al. 2006).

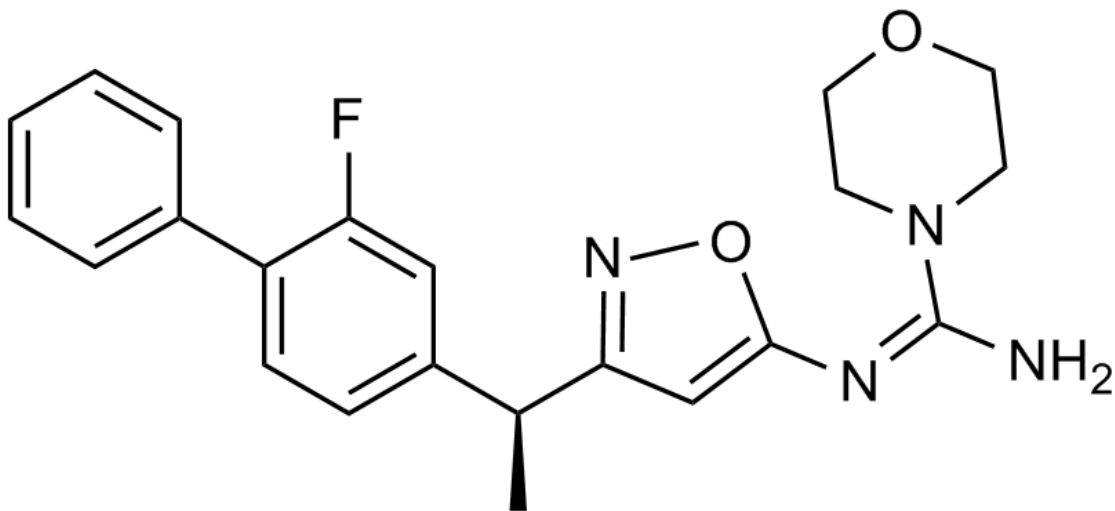


Abbildung 1-6 SMP-114-Strukturformel. Quelle: TAGASHIRA und FUKUSHIMA 2008, S. 2

Obwohl damit bereits seit einigen Jahren ein vielversprechender, im Menschen anwendbarer und oral verfügbarer, neuer CaMKII-Inhibitor zur Verfügung steht, wurde bislang weder eine Erforschung einer möglichen Wirkung auf Herzmuskelzellen noch eines Nutzens für die Therapie der Herzinsuffizienz betrieben. Wenn sich positive Ergebnisse ergäben, wäre dank der bereits in klinischen Studien erwiesenen Verträglichkeit im Menschen die Hoffnung auf ein neues, wirksames Medikament gerechtfertigt.

1.6 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es daher, die Auswirkungen des neuartigen CaMKII-Inhibitors SMP-114 auf zentrale zelluläre Korrelate der Herzinsuffizienz zu erforschen. Mit Fokus auf Veränderungen der elektromechanischen Kopplung, des SR

Ca²⁺-Lecks, arrhythmogener Ereignisse und der Zellkontraktion soll die Wirkung von SMP-114 auf isolierte murine Ventrikelmuskardzellen charakterisiert werden.

Folgende zentrale Fragestellung leitet sich daraus ab:

Ist SMP-114 in der Lage, die pathologischen Veränderungen der elektromechanischen Kopplung in der Herzinsuffizienz sowie die Mechanismen der Arrhythmogenese positiv zu beeinflussen?

Die relevantesten Teilaspekte der Untersuchung werden sein:

- a) Wie wirkt sich die Applikation von SMP-114 auf das Ca²⁺-Leck des sarkoplasmatischen Retikulums aus?
- b) Verbessert sich damit einhergehend die Post-Pausen-Potenzierung von Ca²⁺-Transienten und Kontraktionsamplitude?
- c) Wie wirkt sich SMP-114 auf das Auftreten von spontanen arrhythmogenen Ca²⁺-Release-Events aus?

Durch In-silico-Screening wurden darüber hinaus von Greenpharma S.A.S (Orléans, Frankreich) aus einer großen Bibliothek („Greenpharma Natural Compound Library“) natürlich vorkommender Stoffe eine Reihe von *small molecule*-Substanzen identifiziert, welche durch Bindung an die CaMKII deren Aktivität inhibieren könnten und damit weitere neuartige CaMKII-Inhibitoren darstellen würden. Zwei dieser Substanzen sind GPZ5851, hierbei handelt es sich um Haematein, und GPZ7505.

Exemplarisch soll auch für diese Substanzen untersucht werden, ob sie die gewünschten Effekte zeigen. Als Positiv-Vergleichsgruppe wurde der etablierte CaMKII-Inhibitor AIP in myristoylierter Form hinzugezogen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Vorbereitung der Materialien und Isolation der Herzmuskelzellen

2.1.1 Isolation der Kardiomyozyten aus Mäuseherzen

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden Herzmuskelzellen aus die CaMKII δ_C überexprimierenden transgenen Mäusen (ZHANG et al. 2003) sowie Wildtyp-Mäusen isoliert. Die Mäuse wurden von geschulten biologisch-technischen Assistenten des Labors anästhesiert und getötet. Anschließend wurde das Herz präpariert und entnommen. Alle Tierexperimente sind der zuständigen Tierschutzkommission im Rahmen des Antrags „Untersuchung von isolierten Einzelzellen, multizellulären Muskelstreifen und Herzmuskelhomogenaten von Kaninchen, Ratte und Maus“ (Az T14.06) angezeigt worden und wurden unter Berücksichtigung der GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS (1996) durchgeführt.

Die Isolation der Kardiomyozyten (vgl. LI et al. 1998, SAG 2007) erfolgte in einer Langendorff-Perfusionsanlage. Das entnommene Herz wurde dabei retrograd mit einer Isolationslösung, die das verdauende Enzym Kollagenase enthielt, perfundiert. Dadurch wurde das bindegewebige Gerüst des Herzens aufgelöst. Nach 7 – 10 min wurde das Herz von der Perfusionsanlage entfernt und mechanisch dissoziiert. Die Zellsuspension wurde anschließend über eine Nylongaze (Porendurchmesser: 200 μm) filtriert. Nach Sedimentation der isolierten Kardiomyozyten in einem Falcon-Röhrchen wurde der Verdauenzym-haltige Überstand abpipettiert und die Zellen einer schrittweisen Adaptation an höhere Ca²⁺-Konzentrationen zugeführt („Kalziumaufbau“). Dabei wurden die Ventrikelmuskelzellen stufenweise in Lösungen mit steigenden Ca²⁺-Konzentrationen überführt. Bei Raumtemperatur wurden Schritte von 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,3 und 1,8 mmol/L Ca²⁺ mit jeweils 7-minütigen Intervallen durchgeführt.

Als biometrische Daten wurden vor der Isolation das Herz- und Körpergewicht mit einer Feinwaage (Modell Acculab Atilon, Sartorius Group Göttingen, Deutschland) gewogen und das Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht berechnet.

2.1.2 Zusammensetzung der Normaltyrode

Als Umgebungslösung der isolierten Kardiomyozyten während der Messungen wurde eine Lösung definierter Molaritäten in Wasser („Normaltyrode“, NT) verwendet. Diese bildete die Grundlage aller Lösungen, die während der Experimente mit den Zellen in Kontakt kamen. Zur Bereitung wurden die jeweiligen Stoffmengen abgewogen und mit bidestilliertem Wasser bis auf 1 L aufgefüllt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur unter pH-metrischer Kontrolle mit NaOH auf den gewünschten pH-Wert von 7,54 titriert.

Normaltyrode (Raumtemperatur)		ph=7,54 mit NaOH	
Substanz (Hersteller)	Molarität [mM]	Molgewicht [g/mol]	Masse zur Bereitung von 1 L Lösung [g]
KCl (Merck, Darmstadt / Deutschland)	4	74,56	0,2982
NaCl (Fluka - SIGMA-ALDRICH, Buchs / Schweiz)	140	58,44	8,182
MgCl₂ (Merck, Darmstadt / Deutschland)	1	95,21	0,0952
HEPES (Carl Roth GmBH, Karlsruhe / Deutschland)	5	238,31	1,192
Glucose (Merck, Darmstadt / Deutschland)	10	180,16	1,802
CaCl₂ (SIGMA-ALDRICH, München / Deutschland)	2	238,31	CaCl ₂ aus höhermolariger wässriger Lösung auf Konzentration von 2 mM hinzupipettiert
gelöst in 1 L bidestilliertem H ₂ O			

Tabelle 2-1: Molaritäten und Stoffmengen zur Bereitung von 1 L Normal-Tyrodenslösung

Für die Bereitung einer Koffein-haltigen Tyrode (10 mM) wurden anschließend 1,942 g Koffein in 1 L Normaltyrode gelöst. Die mit Inhibitoren versetzte Tyrode wurde durch Verdünnung der entsprechenden Menge einer höherkonzentrierten Inhibitor-Vorratslösung (s. 2.1.5) gewonnen. Um die Messungen nicht durch mögliche unspezifische Lösungsmittelleffekte auf die Zellen zu beeinflussen, wurde den nicht-Dimethylsulfoxid(DMSO)-haltigen Inhibitorlösungen und der Negativkontrolle ebenfalls entsprechende Mengen dieses Lösungsmittels zugesetzt.

2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Absorbiert ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül ein Photon des Exzitationslichtes, kann dadurch ein Elektron auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Dieses Niveau hat jedoch nur eine begrenzte Lebensdauer, und beim Zurückfallen des Elektrons auf das ursprüngliche Energieniveau wird ein Teil der zuvor absorbierten Energie als Licht emittiert. Da nicht die gesamte zuvor absorbierte Energie als Licht emittiert wird, ist dieses Licht langwelliger und energieärmer als das Exzitationslicht. Aus der chemischen Struktur eines jeden Fluoreszenzfarbstoffs ergeben sich charakteristische Exzitations- und Emissionskurven mit Maxima in bestimmten Wellenlängenbereichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-3, Fluo-4 und Fura-2 verwendet. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie selektiv mit Ca^{2+} -Ionen Chelatkomplexe bilden und dadurch ihr Fluoreszenzverhalten ändern. Diese Änderung rührt daher, dass sich bei Bindung des Farbstoffs an ein Ca^{2+} -Ion die Elektronendichte im Ringsystem (s. Abbildung 2-1 und Abbildung 2-2) verringert. Durch diese veränderte chemische Umgebung werden die elektronischen Niveaus verschoben. Somit ist in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen eine Absorption bei kürzeren Wellenlängen, entsprechend höheren Photonenenergien, zu erwarten.

Die Fluoreszenzeigenschaften wie Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge und die Intensität der Emission ändern sich, sobald ein Ca^{2+} -Ion gebunden wird. Durch Änderungen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ändern sich also auch die relativen Fluoreszenz-Intensitäten.

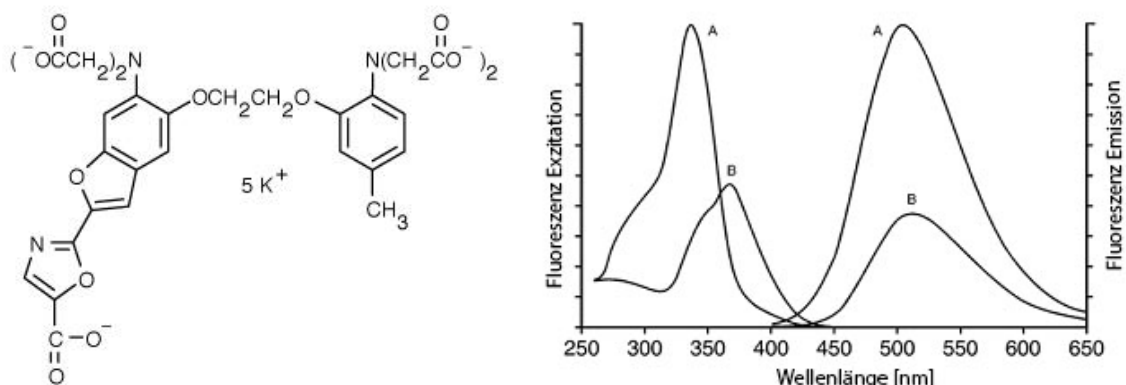


Abbildung 2-1 Strukturformel Fura-2 und Exzitations- bzw. Emissionsmaxima von Fura-2 AM. Modifiziert nach THE MOLECULAR PROBES HANDBOOK 2010, o. S.

A: Exzitations-/Emissionskurven für die Ca^{2+} -gebundene Form B: Exzitations-/Emissionskurven ohne Bindung von Ca^{2+} -Ionen. Auffallend sind die unterschiedlichen Exzitationsmaxima, mittels derer sich über Verhältnisbildung quantitative Aussagen über den Anteil Ca^{2+} -gebundener und nicht Ca^{2+} -bindender Fura-2-Moleküle und somit über die Ca^{2+} -Konzentration treffen lassen.

Bei der intrazellulären Ca^{2+} -Fluoreszenzmessung wird zwischen ratiometrischen und nicht-ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffen unterschieden:

- Ratiometrische Fluoreszenz-Farbstoffe weisen bei Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen andere Exzitations- und Emissionsmaxima als unter Ca^{2+} -Bindung auf. Die Bildung des Verhältnisses der Fluoreszenz-Intensitäten der Wellenlängenbereiche beider Emissionsmaxima hat den Vorteil, dass die Messergebnisse nicht durch unterschiedliche Farbstoffbeladung einzelner Zellen beeinträchtigt werden. Als ratiometrischer Farbstoff wurde Fura-2 in der zellmembranpermeablen Form des Azetoxymethylesters (Fura-2 AM) verwendet. Dessen Absorptionsmaximum liegt in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen bei einer Wellenlänge von 363 nm und verschiebt sich bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen in den kurzwelligeren Bereich von 335 nm (THE MOLECULAR PROBES HANDBOOK 2010; s. Abbildung 2-1). Durch Registrierung der emittierten Fluoreszenz bei unterschiedlichen Exzitationswellenlängen lässt sich das Verhältnis zwischen Ca^{2+} -gebundenen und nicht Ca^{2+} -bindenden Fura-2-Molekülen bestimmen. Fura-2 hat eine hohe Ca^{2+} -Ionen-Pufferkapazität. Diese beeinflusst den Abfall des Ca^{2+} -Transienten und verlängert die gemessene Relaxationszeit.
- Bei nicht-ratiometrischen Farbstoffen ist die Intensität der Fluoreszenz abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration der Umgebung, es erfolgt keine nennenswerte spektrale Verschiebung. Bei physiologischen Bedingungen besteht ein annähernd linearer Zusammenhang; in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen findet nahezu keine Fluoreszenz statt (HARKINS et al. 1993). Die verwendeten Farbstoffe Fluo-3 und Fluo-4 zeichnen sich durch ein günstiges Verhältnis von Signal und Hintergrundrauschen aus, außerdem puffern sie Ca^{2+} -Ionen in wesentlich geringerem Ausmaß als Fura-2. Gerade bei niedrigen Transientenamplituden und fehleranfälligen Berechnungen wie der Abfallszeit des Transienten sind ein möglichst wenig schwankendes Signal und ein geringer Puffereffekt vorteilhaft. Daher ist Fluo-3 besser zur Untersuchung des Transientenabfalls beziehungsweise der SERCA-Funktion geeignet. Bei Fluo-4 sind gegenüber Fluo-3 lediglich zwei Chlor-Atome am 3-Ring-System mit delokalisierten Elektronen durch Fluor ersetzt (s. Abbildung 2-2), was das Exzitationsmaximum durch den größeren elektronenziehenden Effekt des Fluors um circa 12 nm in Richtung kurzwelligeres Licht verschiebt und so für die

Messungen am Konfokalmikroskop mit Exzitation durch einen Argonionen-Laser der Wellenlänge 488 nm besser geeignet ist (THE MOLECULAR PROBES HANDBOOK 2010).

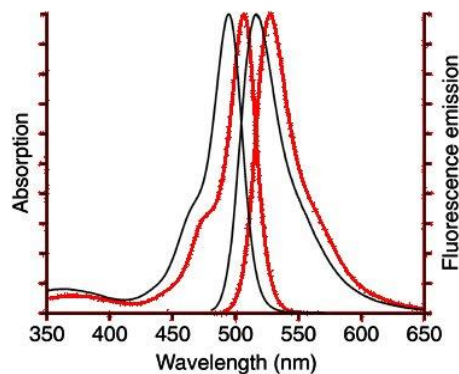
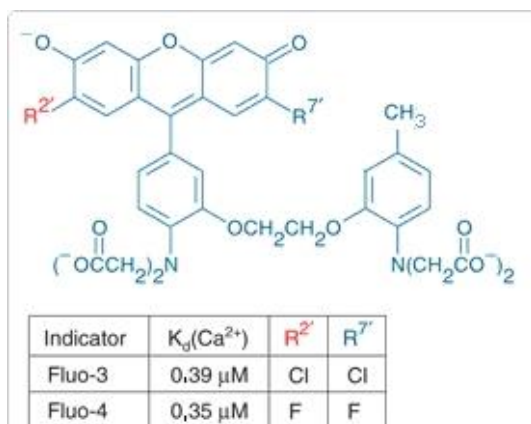


Abbildung 2-2 Fluo-3- und Fluo-4-Strukturformeln, Absorptions- und Emissionskurven (Ca^{2+} -gesättigt, rot: Fluo-3 AM; schwarz: Fluo-4 AM)

Unterscheidung lediglich durch Chlor- bzw. Fluor-Atome an den Resten R^2 und R^7 . Dadurch wird das Absorptionsmaximum in den kurzwelligeren Bereich verschoben, wo die Wellenlänge des in der Konfokalmikroskopie verwendeten Argon-Lasers liegt. Modifiziert nach THE MOLECULAR PROBES HANDBOOK 2010, o. S.

2.1.4 Zusammensetzung der Fluoreszenzfarbstofflösungen

Zur Bereitung von 1 mM Lösungen der Fluoreszenzfarbstoffe wurden 1 mg des jeweiligen Farbstoffs in 998,1 μL (Fura-2 AM, $M = 1001,86 \text{ g/mol}$; SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland) bzw. 885 μL (Fluo-3 AM, $M = 1129,86 \text{ g/mol}$; Molecular Probes, Eugene, USA) DMSO gelöst und unter Lichtausschluss bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zum Ansetzen der portionierten Farbstofflösung in der gewünschten Konzentration 10 μM wurden bei Rotlicht 50 μL der Vorratslösungen mit 5 μL Pluronic® F-127 (20 % Lösung in DMSO, Molecular Probes, Eugene, USA), ein oberflächenaktiver Stoff, der die Löslichkeit von Azetoxymethylestern in Wasser verbessert, und 5 mL Normaltyrode ($[\text{Ca}^{2+}] = 2 \text{ mM}$) gemischt. Die so erhaltene Lösung wurde in Portionen zu je 200 μL auf lichtdichte Eppendorf®-Cups aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Fluo-4 AM ($M = 1096,95 \text{ g/mol}$; Molecular Probes, Eugene, USA), welches bereits in verarbeitungsbereiten 50 μg -Einheiten vorlag, wurde in 45,6 μL DMSO gelöst, was eine Konzentration von 1 mM ergab. Analog zum Vorgehen bei den anderen Farbstoffen wurden 4,56 μL Pluronic® F-127 (20 % Lösung in DMSO) und 4,56 mL Normaltyrode unter Lichtausschluss zugegeben. Im nächsten Schritt wurde zu je 200 μL in lichtdichte Eppendorf®-Cups aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Bei einigen Versuchsreihen, bei denen die Farbstoffinkubation gleichzeitig mit der Inkubation mit den CaMKII-Inhibitoren erfolgte, wurde der Farbstofflösung noch vor der Aliquotierung die entsprechende Menge der jeweiligen Inhibitor-Vorratslösung zugesetzt.

2.1.5 Vorbereitung der CaMKII-Inhibitoren

In allen Messreihen kam SMP-114 ($M = 394,95 \text{ g/mol}$; Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan) in $10 \mu\text{M}$ -Konzentration zum Einsatz. In dieser Konzentration hatte es in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten positive Effekte in der Erforschung als Mittel gegen die rheumatoide Arthritis gezeigt (u.a. WESTRA et al. 2010; vgl. 1.5.3). Es wurde zunächst eine Stammlösung der Konzentration 10 mmol/L in DMSO angesetzt. Diese wurde dann in entsprechender Menge den Mess- oder Färbelösungen zupipettiert, um dort jeweils eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ zu erreichen.

Als etablierter CaMKII-Inhibitor wurde in vielen Messreihen AIP in myristoylierter Form (myr-AIP, $M = 1708,1 \text{ g/mol}$), die lipophiler und somit leichter membrangängig als das reine AIP ist, verwendet. Auch hier wurde eine 1 mM -Vorratslösung in bidestilliertem Wasser angesetzt, welche anschließend zum Ansetzen von $1 \mu\text{M}$ -Lösungen verwendet wurde.

In einigen Messreihen wurden darüber hinaus weitere potentielle CaMKII-Inhibitoren, GPZ5851 ($M = 300,263 \text{ g/mol}$; Greenpharma S.A.S, Orléans, Frankreich) und GPZ7505 ($M = 254,238 \text{ g/mol}$; Greenpharma S.A.S, Orléans, Frankreich) getestet. Hiervon wurden ebenfalls Vorratslösungen nach dem oben beschriebenen Verfahren angelegt. Die Messkonzentrationen waren für GPZ5851 $5 \mu\text{mol/L}$ und für GPZ7505 $10 \mu\text{mol/L}$.

2.2 Vorbereitung der Messungen

2.2.1 Vorbereiten der Messkammern und Auftragen der Kardiomyozyten

Die Messkammern bestehen aus vorgefertigten Kunststoffrahmen, die genau in die Aussparung des Objektisches des Mikroskops passen. Auf die Unterseite dieser Kunststoffrahmen wurden Deckgläschen so geklebt, dass sie dessen zentrale rechteckige Aussparung komplett nach unten verschlossen, so dass das Deckgläschen den Boden der Messkammer bildete und als Objektträger fungierte.

Vor dem Beschicken der Messkammern wurde der Boden der Messkammer flächig mit ca. 1,5 µL Laminin (Sigma L2020, SIGMA-ALDRICH, München / Deutschland) bestrichen, das ein Arretieren und eine Haftung der vitalen Myozyten auf dem Messkammerboden gewährleisten sollte. Nach dem Antrocknen des Laminins wurden etwa 500 µL der Zellsuspensionen aus dem letzten Ca^{2+} -Aufbauschnitt vorsichtig in die Messkammer pipettiert. Hieran schloss sich eine fünfzehnminütige Pause an, während der die Kardiomyozyten bei Raumtemperatur sedimentieren und sich auf dem Boden der Messkammer absetzen konnten. Danach wurde der Überstand, in dem sich unter anderem abgestorbene Zellen befanden, abpipettiert und mit der Farbstoffinkubation fortgeföhren.

2.2.2 Farbstoffinkubation

Nach Plattierung der Zellen (2.2.1) wurde der Überstand der Plattierlösung abpipettiert und durch 200 µL Farbstofflösung ersetzt. Hieran schloss sich eine Farbstoffinkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit an. Vor Beginn der Messung wurde die Färbelösung vorsichtig mittels wiederholtem manuellen Pipettieren durch entsprechende mit Inhibitoren versetzte Tyrodenlösung ausgetauscht, anschließend unter Superfusion weitere 5 min ausgewaschen.

2.2.3 Inkubation mit den Inhibitoren

Bereits vor Beginn der Messungen am Mikroskop wurde die Zellsuspension aufgeteilt und mit den Inhibitoren der jeweiligen Messreihe inkubiert. In den ersten Messreihen am Epifluoreszenzmikroskop wurden die Zellen im Rahmen der letzten beiden Schritte des Kalziumaufbaus (vgl. 2.1.1) aufgeteilt und die jeweiligen Inhibitoren-Vorratslösungen bis zur gewünschten Konzentration hinzupipettiert. Anschließend wurden zur Verblindung die 15 mL-Röhren und die mit dem Inhibitor versetzte Messtyrode von einer dritten Person randomisiert. Der Entblindungsschlüssel wurde bis nach Abschluss und Auswertung der Messreihe verwahrt und erst anschließend entblindet. Die Inkubation mit dem Inhibitor erfolgte über insgesamt 15 Minuten.

Aufgrund der höheren Anzahl an Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen und daraus resultierend einer Zahl von 5-7 zu randomisierenden Gruppen pro Messtag wurde das Vorgehen für die Messungen am Konfokalmikroskop modifiziert. Die 15-minütige Inkubation mit dem Inhibitor erfolgte hier gleichzeitig mit der

Farbstoffinkubation (vgl. 2.2.2). Hierzu wurde der Inhibitor in definierter Menge bereits beim Ansetzen der Farbstofflösung zugesetzt. Diese inhibitorhaltigen Färbelösungen wurden wiederum von Mitarbeitern des Labors randomisiert und mit Buchstaben gekennzeichnet. Auch hier blieb der Verblindungsschlüssel bis nach Auswertung der Messungen unter Verwahrung.

Der Vorteil dieses modifizierten Vorgehens war, dass die Zellen so nicht bereits während des Kalziumaufbaus aufgeteilt werden brauchten. Dies wäre bei der höheren Anzahl an Gruppen aufgrund des begrenzten Volumens an Kardiomyozytensuspension nicht praktikierbar gewesen. Nachdem die ersten Messreihen am Konfokalmikroskop erfolgreich verliefen, wurde wegen der einfacheren Praktikierbarkeit und der Gewährleistung einer stets genau konstanten Inkubationszeit für alle Gruppen bei allen folgenden Messungen auf diese Weise verfahren.

2.3 Simultane Messung von Ca^{2+} -Fluoreszenz und Sarkomerlänge am Epifluoreszenz-Mikroskop

Die Epifluoreszenz-Messungen wurden an einem „Myocyte Calcium & Contractility Recording System“ (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) durchgeführt, dessen wesentlicher Bestandteil ein Nikon Eclipse TE200-U-Mikroskop ist, durchgeführt. Dieses System ermöglicht die simultane Registrierung der vom Objekt emittierten und mittels eines Photomultipliers aufgezeichneten Fluoreszenz sowie der über eine Kamera (IonOptix Myocam Myozytenkamera) mit Bildverarbeitungssoftware ermittelten Sarkomerlängen als Funktion der Zeit. Für die Auswertung der Daten wurde die Software IonWizard 5.0 (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) verwendet.

2.3.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 2-3 dargestellt. In den Strahlengang eingeschaltete dichroitische Spiegel reflektieren im Gegensatz zu herkömmlichen Spiegeln nur den Anteil des Lichts ober- oder unterhalb einer bestimmten Wellenlänge und lassen den jeweils anderen Anteil passieren. Somit ermöglichen sie eine spektrale Aufspaltung des Lichts und die Umlenkung in verschiedene Richtungen, beispielsweise auf verschiedene Filter oder Photomultiplier.

Im verwendeten Versuchsaufbau für die Fura-2-Messungen wurde über Filter und dichroitische Spiegel (Abbildung 2-3, 3) kurzwelliges Licht einer Xenon-Bogenlampe

(1) zur Fluoreszenzanregung auf das Objekt gelenkt. Zusätzlich traf rotes Licht einer Wellenlänge > 650 nm auf die Zellen, welches für die Sarkomerlängenaufzeichnung durch die Myozytenkamera benötigt wurde. Dieses beeinträchtigte aufgrund des unterschiedlichen Wellenlängenbereichs und des Filteraufbaus die Fluoreszenzmessungen nicht.

Der dichroitische Spiegel (4, 505 nm-Langpass) spiegelte kurzwelliges Licht ($\lambda < 505$ nm) der Bogenlampe auf das Objekt, ließ jedoch das Fluoreszenzlicht ($\lambda > 505$ nm) sowie das rote Licht passieren. Nach Umlenkung über einen Spiegel leitete ein weiterer dichroitischer Spiegel (6, 685 nm-Langpass) das emittierte Fluoreszenzlicht einem Photomultiplier (8) und das rote Durchlicht der Myozytenkamera (7) zu. Bei Messungen mit dem ratiometrischen Farbstoff Fura-2 wurde das Licht der Bogenlampe über einen mit 240 Hz rotierenden Drehschalter („Hyperswitch“ (3)) alternierend in zwei verschiedene Strahlengänge mit unterschiedlichen Spektralfiltern aufgespaltet. Auf diese Weise wurde wechselweise Licht der Wellenlängenbereiche der Absorptionsmaxima von Fura-2 im Ca^{2+} -gebundenen und -ungebundenen Zustand (340 nm bzw. 380 nm) auf das Objekt gelenkt.

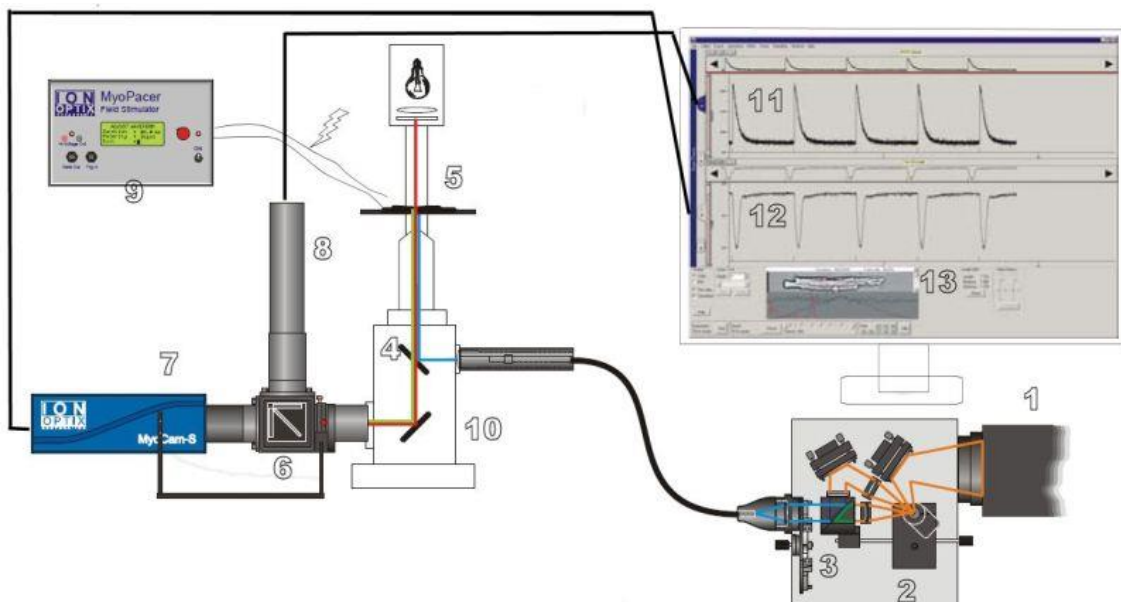


Abbildung 2-3 Strahlengang und Versuchsaufbau am Epifluoreszenzmikroskop. Modifiziert nach IonOptix 2011, S. 2

1 Xenon Bogenlampe, 2 Hyperswitch-Spiegel, 3 Dichroitischer Exzitationspiegel und Filter, 4 Dichroitischer Emissionsspiegel, 5 Objektstisch mit Objekt – von oben transmittiertes Licht (rot), 6 Dichroitischer Spiegel, 7 Myozyten-/Sarkomerlängen-Kamera, 8 Photomultiplier, 9 Gleichspannungs-Pacer, 10 optisches Mikroskop, 11 Fluoreszenz-Aufzeichnung, 12 Sarkomerlängen-Aufzeichnung, 13 Live-Bild der Kamera

Im Computerprogramm IonWizard (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) wurde die mittels Photomultiplier registrierte Fluoreszenz (11) und die aus dem Bild der angeschlossenen Kamera gemessene Sarkomerlänge (12) als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Zum Beginn einer Messung wurde mit Hilfe des Mikroskops dazu eine morphologisch intakte, sich gleichmäßig und rhythmisch kontrahierende Zelle ausgewählt und in der Mitte des am Monitor sichtbaren Bildausschnitts (13) positioniert, die Kamera so gedreht, dass die Sarkomerzeichnung senkrecht zur Horizontalen im Bildausschnitt stand, und Blenden so justiert, dass die komplette Zelle den Messausschnitt ausfüllte. Per Feintrieb wurde nachfokussiert, bis die Kamera ein scharfes Bild zeigte.

Ein rechteckiger Bereich innerhalb der Zelle wurde für die Sarkomerlängenerfassung ausgewählt, und zwar so, dass unter dem Live-Bild der Kamera (13) ein scharfes Signal für die Sarkomerlängenmessung erreicht wurde. Über schnelle Formen-Transformationen wurde aus diesen Bildinformationen in Echtzeit die Sarkomerlänge berechnet und registriert.

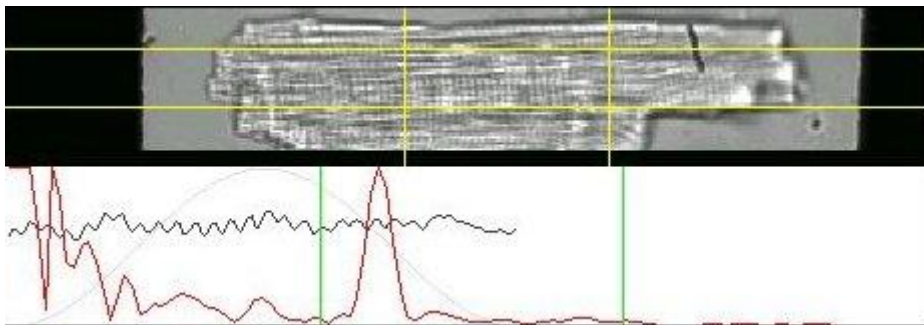


Abbildung 2-4 Sarkomerlängenregistrierung, Originalaufzeichnung

Durch Markieren eines Bereichs mit paralleler, vertikal zur Hauptachse des Bildes stehender Sarkomerzeichnung (gelbe Linien) konnte die Sarkomerlänge im Programm IonWizard (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) in Echtzeit berechnet und als Funktion der Zeit registriert werden.

Vor Beginn einer Messung wurden die vorbereiteten Messkammern in die dafür vorgesehene Vertiefung am Objektisch des Epifluoreszenzmikroskops eingespannt, Stimulationselektroden mit einer Gleichspannung von 20 mV angelegt und die Zellen mit einer Frequenz von 1 Hz repetitiv stimuliert. Um möglichst gleich bleibende Bedingungen zu ermöglichen und die Ergebnisse durch Effekte kurz nach Beginn der Stimulation nicht zu beeinflussen, ließ man die Zellen für ca. 3 min einschlagen, bevor mit den Messungen begonnen wurde.

2.3.2 Messprotokoll

Die Fluoreszenz und die Sarkomerlänge wurden nach einem für die jeweilige Versuchsreihe vorgesehenen Protokoll gemessen. Das Messprotokoll beinhaltete zunächst eine Stimulation mit 1 Hz, und zwar so lange, bis die Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängenverkürzungen eine gleich bleibende Amplitude (*steady state*) erreicht hatten. Danach wurde die Stimulationsfrequenz auf 2 Hz verdoppelt und wieder das Erreichen einer gleich bleibenden Ca^{2+} -Transientenamplitude abgewartet. Analog dazu verlief der folgende Schritt auf 4 Hz. Eine beispielhafte Aufzeichnung der Fluoreszenz und der Sarkomerlänge einer nach diesem Protokoll gemessenen Zelle ist in Abbildung 2-5 dargestellt.

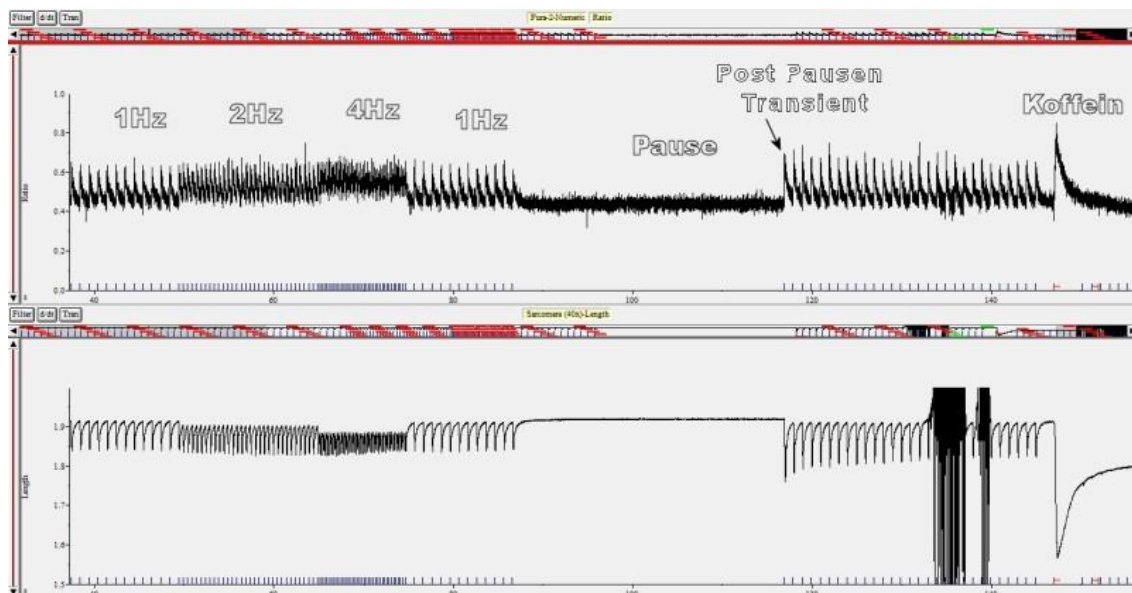


Abbildung 2-5 Ausschnitt aus einer Aufzeichnung von Fura-2-Fluoreszenz-Ratio und Sarkomerlänge zur Veranschaulichung des Messprotokolls bei einer Mausherzmuskelzelle

Nach Zurückregeln der Frequenz auf 1 Hz und erneutem Abwarten eines *steady states* wurde die Stimulation für 30 s unterbrochen. Der erste auf diese Stimulationspause folgende Transient wird als Post-Rest- oder Post-Pausen-Transient bezeichnet. Er gibt in Relation zu den Transienten vor der Pausierung Aufschluss über die Kontraktion der Zelle bei längerer Stimulationspause. Während der Pause erfolgt eine vermehrte SR Ca^{2+} -Beladung, da der Ca^{2+} -Rücktransport ins SR über die SERCA2a den spontanen Ca^{2+} -Verlust aus dem SR über RyR2 überwiegt. Der Post-Pausen-Transient ist damit ein Maß für die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR.

Treten innerhalb der Stimulationspause spontane Ca^{2+} -Freisetzungen, messbar als Anstieg der Fluoreszenz, auf, so werden diese nicht stimulierten Ereignisse als „SCR-Events“ (vgl. 1.4.2) bezeichnet.

Unter laufender 1 Hz-Stimulation zum erneuten Erreichen des steady states wird anschließend eine Kanülennadel neben der Zelle auf dem Objektträger platziert, über welche unmittelbar nach Pausierung der Stimulation 10 mM Koffein-haltige Tyrode direkt auf die Zelle appliziert wurde.

Koffein führt zu einer Öffnung der in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) sitzenden Ca^{2+} -permeablen Ryanodin-Rezeptoren (RyR2), die daraufhin einen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR ins Zytosol bedingt. Weil im Gegensatz zur physiologischen Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR hier kein rascher Verschluss des RyR2 erfolgt, fällt der Ca^{2+} -Ausstrom deutlich größer aus und es kommt annähernd zu einem Ausgleich zwischen den Ca^{2+} -Konzentrationen des SR und des Zytosols. In der Fluoreszenzkurve resultiert ein höheramplitudiger und langsamer abfallender Ca^{2+} -Transient im Vergleich zu den vorhergehenden Transienten unter 1 Hz-Stimulation, der sogenannte Koffeintransient. Dessen Amplitude ist abhängig vom Gehalt an Ca^{2+} -Ionen im sarkoplasmatischen Retikulum und stellt daher ein Korrelat des SR Ca^{2+} -Gehalts dar. (KOHLHAAS 2006) Aus dem Verhältnis der Amplituden von elektrisch stimulierten Transienten bei 1 Hz und von Koffein-induzierten Transienten lässt sich die prozentuale SR Ca^{2+} -Ausschüttung bei 1 Hz-Stimulation (*fractional release*) berechnen.

Die Fluoreszenz und Kontraktionskurve einer beispielhaften Koffeintransientenmessung ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Mittels eines in das Infusionssystem eingeschalteten elektronischen Durchflussreglers ließ sich auf Knopfdruck eine definierte Menge der Koffeinlösung pro Zeiteinheit in die unmittelbare Umgebung der untersuchten Zelle applizieren. Eine Sekunde vor der Applikation wurde die Stimulierung pausiert.

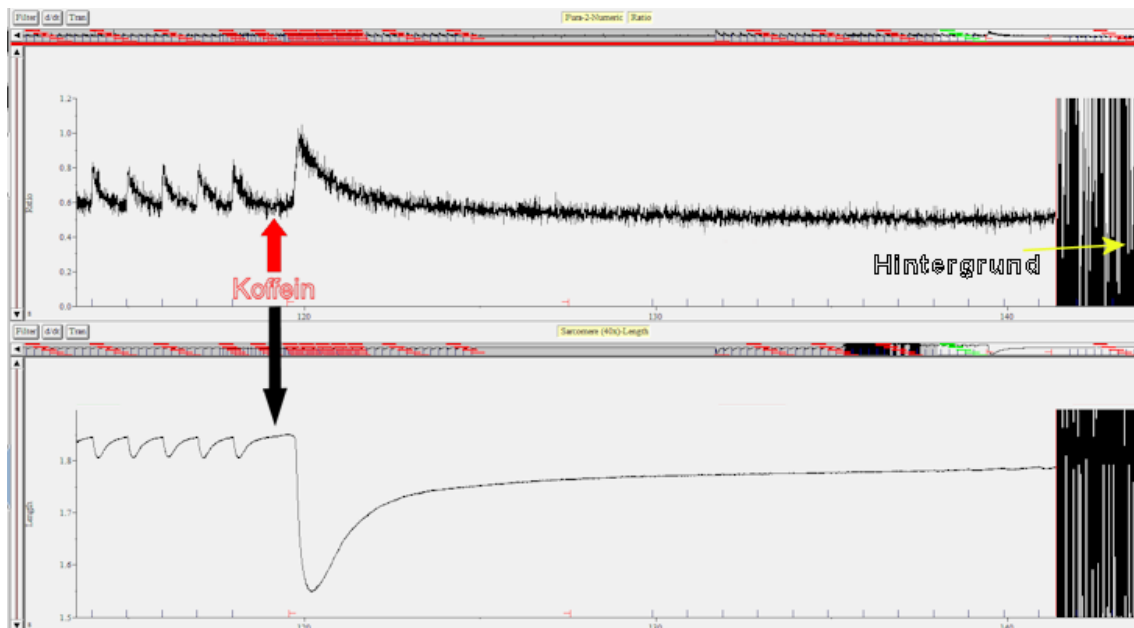


Abbildung 2-6 Koffeintransientenmessung

Die Stimulation wurde pausiert und Koffein-Tyrolenlösung über ein Infusionsschlauchsystem appliziert. Dies löst den Koffeintransienten und eine Kontraktion der Zelle aus. Zur Prüfung der Vitalität der Zelle, wurde nach Abfall des Transienten die Stimulation wieder gestartet. Vitale Zellen zeigten Kontraktionen geringer, langsam steigender Amplitude. Als Abschluss einer jeden Messung wurde die Hintergrundfluoreszenz in der Umgebung der Zelle aufgezeichnet.

Sobald ein spontaner Abfall der Fluoreszenz des Koffeintransienten sichtbar war, wurde die Koffeinapplikation gestoppt. Da die RyR2 durch Applikation von Koffein eine Zeit lang im Offenzustand verbleiben, werden durch SERCA ins SR beförderte Ca^{2+} -Ionen nicht dort gespeichert, sondern können durch RyR2 direkt wieder ins Zytosol entweichen. Der Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird deswegen fast komplett über den NCX getragen (vgl. 1.1.1). Die Kinetik des Koffeintransientenabfalls, beschrieben durch Relaxationszeiten und τ lässt somit einen Rückschluss auf die Funktion des NCX zu.

Um zu demonstrieren und aufzuzeichnen, dass die Zelle nach Koffeinapplikation noch vital und kontraktionsfähig war, wurde nach komplettem Abfall des Koffeintransienten die Stimulation wieder angeschaltet, worauf zunächst deutlich kleinere aber in ihrer Amplitude stetig ansteigende Ca^{2+} -Transienten und Kontraktionen sicht- und messbar waren. War eine Zelle nach Messung des Koffein-Transienten nicht mehr vital, wurde sie für die Messung des SR Ca^{2+} -Gehalts nicht herangezogen.

Zum Abschluss einer jeden Messung wurde die Hintergrundfluoreszenz bestimmt (s. Abbildung 2-6). Dazu wurde der Objektisch so bewegt, dass nicht mehr die Zelle im zu messenden Bereich lag, der durch das Kamera Live-Bild einsehbar war, sondern die unmittelbare Umgebung der Zelle. Diese Hintergrundfluoreszenz wurde vor der

Auswertung einzeln für jede Zelle im Programm IonWizard (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) angegeben und abgezogen.

Je nach Hauptaugenmerk der Fragestellungen der einzelnen Versuchsreihen wurde teilweise auf einzelne Abschnitte des Messprotokolls zugunsten einer größeren Anzahl an gemessenen Zellen pro Versuchstag verzichtet.

2.3.3 Auswertung der Messdaten

Zur Auswertung der aufgezeichneten Fluoreszenz- und Sarkomerlängenverkürzungsdaten wurden die Programme IonWizard 5.0 (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) und Microsoft Excel verwendet. Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz wurde aus einer Reihe von Transienten im *steady state* der Stimulation ein Mittelwert-Transient errechnet. Hieran wurde mittels des Programms eine Funktion angepasst. Sowohl Parameter der Funktion, wie u.a. Baseline, die Basisratio vor Anstieg des Transienten, als auch aus der Funktion berechnete Werte wie Amplitude und die Relaxationszeit, *time to baseline*, wurden in Tabellenform ausgegeben. Diese Schritte wurden für die Fluoreszenz und für die Sarkomerlänge durchgeführt und für 1 Hz-, 2 Hz-, 4 Hz-, vor Post-Pausen- und vor Koffein-Transienten wiederholt. Für die Transienten nach Stimulationspause (Post-Pausen) und die Transienten nach Koffeinapplikation wurden keine Gruppen von Transienten gemittelt, sondern über die Funktion „Add Transient“ an der entsprechenden Stelle ein Transient eingefügt, dessen Parameter ebenfalls vom Programm berechnet wurden.

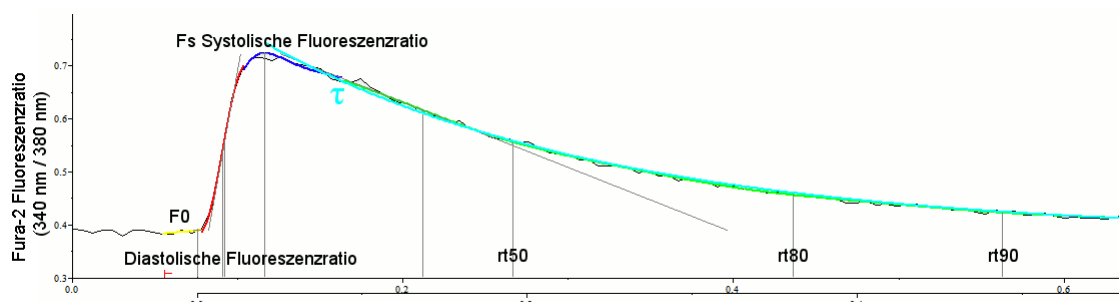


Abbildung 2-7 Ca^{2+} -Fluoreszenztransient (Fura-2 AM)

Diastolische Fluoreszenzratio (F0), Systolische Fluoreszenzratio (Fs), monoexponentielle Transientenabfallfunktion in türkis (τ), und Zeiten bis zum Transientenabfall auf 50%, 80%, 90% der Amplitude ($\text{rt}50_{\text{Ca}}$, $\text{rt}80_{\text{Ca}}$, $\text{rt}90_{\text{Ca}}$) sind gekennzeichnet.

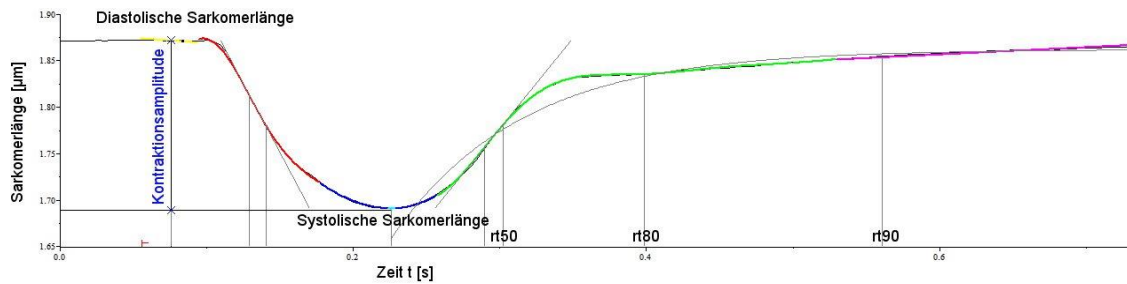


Abbildung 2-8 Sarkomerlängen

Diastolische Sarkomerlänge – Systolische Sarkomerlänge = Kontraktionsamplitude sowie die Zeiten bis Relaxation um 50 %, 80 %, 90 % der Kontraktionsamplitude sind gekennzeichnet.

Die so gewonnenen Daten ließen sich in Microsoft Excel kopieren. Es wurde für jede gemessene Zelle eine Datei angelegt. Hier wurden die Daten übersichtlich und für die weitere Auswertung optimiert gesichert. In einer großen Tabelle wurden die gemessenen Zellen nach den unterschiedlichen Interventionen – SMP-114, Kontrolle und gegebenenfalls weitere Inhibitoren - sortiert untereinander eingefügt und Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, so dass Vergleiche der unterschiedlichen Gruppen unternommen werden konnten.

Zusätzlich zu den Auswertungen der Transienten- und Sarkomerlängenverkürzungsamplituden und -kinetik wurden Statistiken der während der dreißigsekündigen Stimulationspause fakultativ auftretenden SCR-Events (vgl. 1.3.4) erhoben. Hier wurde die Frequenz ihres Auftretens über ein Stimulationspausenintervall von 30 s bestimmt (VOIGT et al. 2012).

2.4 Messungen am Konfokalmikroskop

2.4.1 Aufbau des Konfokalmikroskops

Das Konfokalmikroskop ist ein Lichtmikroskop, das sich in der Erzeugung des Bildes von klassischen Lichtmikroskopen, wie auch dem in der Epifluoreszenzmessanlage verwendeten, unterscheidet. Es ermöglicht die scharfe Darstellung einer Ebene des Objekts unter Ausblendung der darüber und darunter liegenden Schichten.

Beim Lichtmikroskop ist am Okular und damit auch am Detektor eines bildverarbeitenden Computers ein Bild zu sehen, das jeweils eine Ebene des Objekts scharf und darüber und darunter liegende Schichten unscharf darstellt. Manuell kann über den Feintrieb die jeweils gewünschte Ebene fokussiert werden.

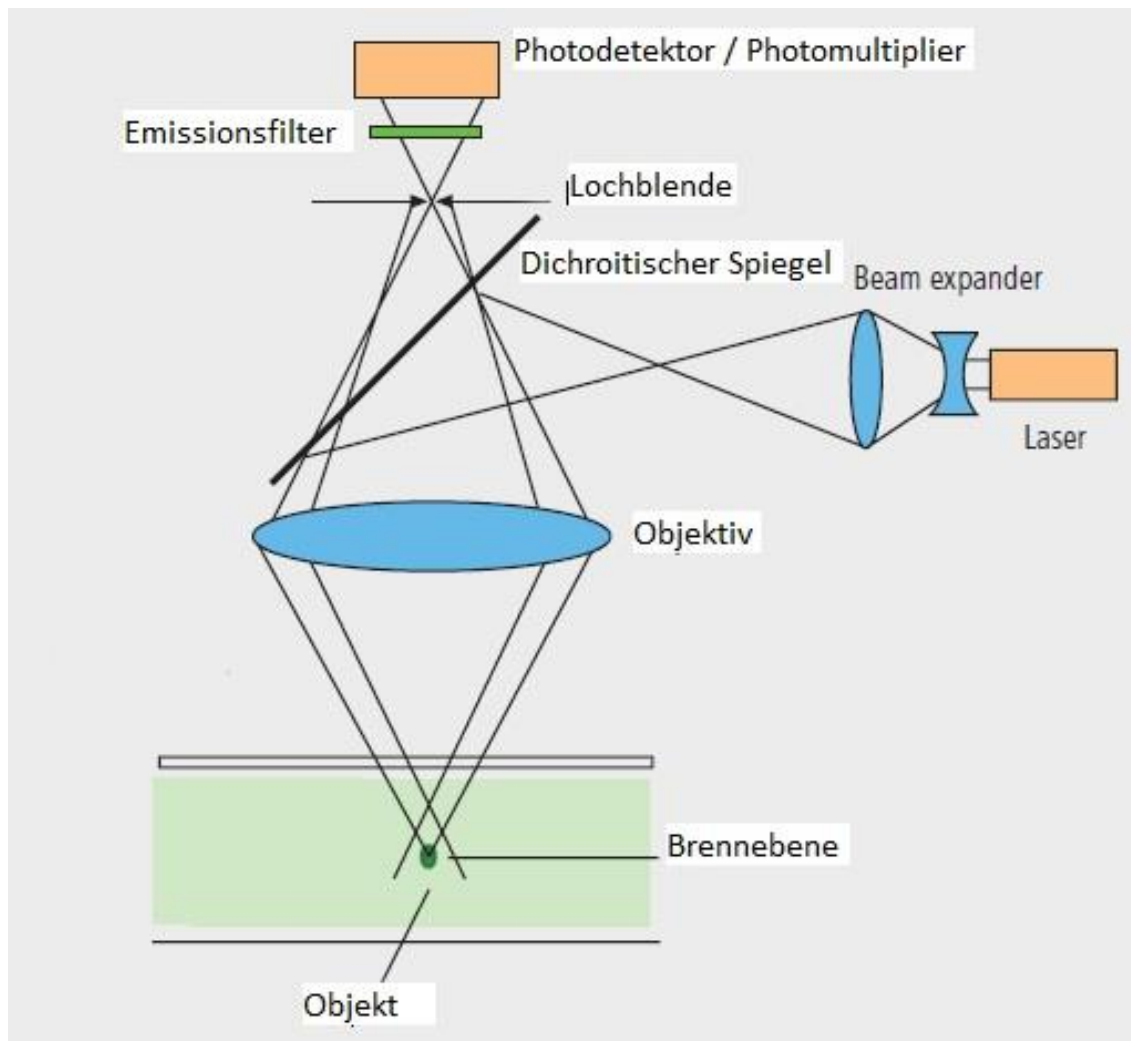


Abbildung 2-9: Strahlengang beim Konfokalmikroskop. Modifiziert nach WILHELM, S. 5:

Ein Laser wird über einen dichroitischen Spiegel und die Objektivlinse in einem Punkt des Objekts fokussiert. Das so angeregte Objekt emittiert fluoreszierendes Licht. Das aus dem Brennpunkt emittierte Licht (schwarz) wird über das Objektiv durch eine bildseitig konfokale Lochblende und einen Emissionsfilter geleitet und mittels Photodetektor registriert. Emittierte Fluoreszenz von außerhalb der Brennebene (rosa) kann die bildseitige Lochblende zu großen Teilen nicht passieren. Diese Ausblendung von Licht nicht fokaler Ebenen bewirkt, dass fast ausschließlich die Fluoreszenz aus einem fokalen Punkt vom Detektor/Photomultiplier aufgezeichnet wird.

Das Konfokalmikroskop funktioniert hingegen nach dem Prinzip eines Punktscanners. Der Strahlengang wird in Abbildung 2-9 veranschaulicht. Als Anregungslicht wird ein Laser, im verwendeten Setup der Firma Zeiss ein Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm (SAG et al. 2009), über einen dichroitischen Spiegel auf das Objekt gelenkt und durch die Objektivlinse in einem Punkt des Objekts fokussiert. Eine vorgeschaltete Lochblende bewirkt, dass die Anregung eines fokalen Punktes erfolgt und diejenige der Umgebung minimiert wird, damit möglichst wenig Licht aus Objektbereichen jenseits des fokussierten Punktes emittiert wird. Das vom Objekt emittierte Licht wird wiederum über das Objektiv, abgebildet. Durch eine Lochblende in der bildseitigen Brennebene des Objektivs kann nur das Licht passieren, das aus der objektseitigen Fokalebene

stammt, da es hier wieder als Punkt abgebildet wird. Die Ebene der Lochblende ist mit dem fokussierten Objektpunkt konfokal. Licht aus Bereichen außerhalb der Brennebene kann die enge Blendenapertur nicht durchdringen. Auf den dahinter liegenden Detektor/Photomultiplier, gelangt fast ausschließlich Licht aus dem fokussierten Punkt; das Licht aus nicht fokussierten Bereichen wurde durch die Lochblende ausgeblendet. Ein Emissionsfilter lässt darüber hinaus nur Licht ab einer kritischen Wellenlänge passieren. Primär wird somit nur ein Punkt und kein ganzes Bild aufgezeichnet.

Ein Bild entsteht erst dadurch, dass der Laser das Objekt durchrastert, indem er immer neue Punkte des Objekts fokussiert und fokale Abbildungen von allen Punkten des ausgewählten Objektbereichs erstellt. Per Computer werden die einzelnen aufgezeichneten Bildpunkte dann zu einem Bild zusammengesetzt. Durch dieses Vorgehen wird eine sehr dünne Ebene scharf abgebildet; die Bildinformation aus nicht fokalen Ebenen wird fast komplett ausgeblendet. Das Betrachten einer dünnen Ebene aus einem weitaus dickeren Objekt wird auch als *optical sectioning* bezeichnet (WILHELM).

Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ist ähnlich wie bei der Epifluoreszenzmikroskopie möglich, auch das Vorgehen zur Farbstoffinkubation ist gleich. Idealerweise werden Farbstoff-Analoga verwendet, deren Absorptionsmaximum nahe der Wellenlänge des anregenden Lasers liegt. Verwendet wurde der nicht ratiometrische Farbstoff Fluo-4 AM, dessen Absorptionsmaximum nahe bei 488 nm, der Wellenlänge des verwendeten Argon Lasers, liegt, wodurch auch die emittierte, registrierte Fluoreszenz stärker ist (GEE et al. 2000). Ein 505 nm-Langpass-Emissionsfilter lässt nur emittierte Fluoreszenz mit einer Wellenlänge > 505 nm passieren und sorgt für eine weitere Konzentration der vom Photomultiplier registrierten Lichtinformation auf die vom fokussierten Punkt emittierte Fluoreszenz (MAURITZ et al. 2008).

Neben dem Vorteil, Punkte aus der Brennebene abzubilden und Licht von außerhalb der Brennebene auszublenden, hat das Konfokalmikroskop gegenüber der klassischen Lichtmikroskopie weitere Vorteile. Als sogenannte *time series* (WILHELM) kann ein definierter Ausschnitt eines Objekts mit einer zeitlichen Auflösung im Mikrosekundenbereich repetitiv gescannt werden und so dynamische Änderungen der Fluoreszenz zeitlich und räumlich hochaufgelöst aufgezeichnet werden.

Besonders interessant ist diese Funktion, wenn man die Rolle des RyR2-Lecks in der Entstehung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien betrachtet (vgl. 1.3.4, 1.4.2). Mittels Konfokalmikroskopie ist es möglich, das Auftreten von einzelnen spontanen Ca^{2+} -Freisetzungseignissen, sogenannten Ca^{2+} -Sparks (SAG et al. 2009), zu registrieren. Aus den aufgezeichneten Daten kann im Anschluss qualitativ die Ca^{2+} -Spark-Frequenz errechnet werden. Zusätzlich ist eine quantitative Untersuchung der Ca^{2+} -Spark-Größe und -Kinetik möglich.

2.4.2 Messungen und Protokoll

Die Messungen wurden an einem LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt. Als Lichtquelle diente ein Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm.

Analog zum Vorgehen bei der Epifluoreszenzmikroskopie wurden murine Kardiomyozyten isoliert und einem Kalziumaufbau in Schritten von 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM, 1,3 mM und 1,8 mM mit jeweils 7-minütigen Intervallen zugeführt. Es wurden Messungen an $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Kardiomyozyten und an Zellen von Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

Als Farbstoff wurde Fluo-4 AM verwendet, ein Analogon des bei der Epifluoreszenz verwendeten Fluo-3, dessen Absorptionsmaximum Richtung kürzerer Wellenlängen verschoben ist.

Die Farbstoffinkubation erfolgte über 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Der jeweilige zu testende Inhibitor war vorher in der gewünschten Konzentration dem Farbstoff zugesetzt worden, so dass die Farbstoff- und Inhibitorinkubation simultan erfolgten. Nach 15 min wurde der Farbstoff abpipettiert und durch inhibitorhaltige Tyrode substituiert. Die Messkammer wurde in der Halterung am Objektivtisch platziert und Stimulationselektroden angelegt. Zum Einschlagen wurden die Zellen für ca. 3 min mit 0,5 Hz bei 20 mV stimuliert.

In dieser Zeit wurde auf der Workstation das Computerprogramm LSM Pascal (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) gestartet und das Konfigurationsprofil Fluo-4 AM ausgewählt. Eine neue Datenbank zum Abspeichern der Messdateien und Bilder wurde angelegt.

Zum Auswählen einer Zelle wurde der visuelle Modus aktiviert, der eine Verwendung der Apparatur als konventionelles Lichtmikroskop und somit das Aussuchen einer

gleichmäßig kontrahierenden Zelle ermöglicht; der Objektisch wurde so justiert, dass die Zelle etwa in der Mitte des Blickfelds zu liegen kam und eine manuelle Vorfokussierung wurde durchgeführt.

Nach der Auswahl und Einstellung einer Zelle wurde die Anlage auf den Konfokalmodus umgeschaltet und eine Übersichtsaufnahme des zentralen Blickfelds, ein sogenannter Frame-Scan erstellt. Im Computerprogramm wurde dies als zweidimensionales Abbild einer Zellebene dargestellt. Nun wurden bei laufendem repetitiven Scan die Detektorverstärkung, die Laserintensität und per Feintrieb die gewünschte Zellebene auf optimale Messbedingungen eingestellt.

Die tatsächliche Messung bestand in einem repetitiven Scannen einer Linie der Zelle im LineScan-Modus und der Darstellung der Fluoreszenzwerte dieser Linie über 5000 Messzyklen in 3,84 s. Dazu wurde im Computerprogramm durch das Ziehen einer Linie in die Zelle der zu messende Bereich definiert; dabei wurde die Linie so gewählt, dass 1/6 davon außerhalb der Zelle lag, um für die spätere Auswertung das Hintergrundsignal mit zu erfassen. Über Wahl des Zoomfaktors 6 wurde jede gemessene Linie auf 38,4 μm normiert. Bei 512 Pixeln pro Linie ergab dies eine Pixelgröße von 0,075 μm . Diese Linie wurde 5000 Mal ohne Verzögerung (*delay* = 0 ms) gescannt. Daraus ergab sich eine Pixelzeit von 0,768 μs , als Pixelvolumen wurden $0,075 \mu\text{m} \cdot 0,075 \mu\text{m} \cdot 0,075 \mu\text{m} = 0,000421875 \mu\text{m}^3$ angenommen.

Nach Abzug des aufgezeichneten Hintergrundes, der 1/6 der gemessenen 38,4 μm Linie betrug, konnte die Ca^{2+} -Spark-Frequenz in der in der Literatur gängigen Einheit Ca^{2+} -Sparks pro 100 μm pro Sekunde errechnet werden.

Über die Funktion *time series* wurde die definierte Linie auf der Zelle bei laufender Stimulation 5000 Mal durchgerastert. Als Bild am Computer stellt sich die Linie in horizontaler Richtung dar, die nächste Zeile zeigt dieselbe Linie beim zweiten Scandurchlauf und so wiederholt sich dieses bis zum 5000. Durchlauf. Dargestellt ist im Bild also immer die gleiche Linie zu 5000 aufeinander folgenden Zeitintervallen. Diese Aufzeichnung wurde für jede Zelle einmal unter Stimulation mit 20 mV mit einer Frequenz von 0,5 Hz und einmal in Stimulationspause durchgeführt. Pro Messkammer wurden maximal 13 Zellen gemessen, was einer maximalen Messzeit pro Kammer von ungefähr 15 Minuten entsprach. Abbildung 2-10 veranschaulicht anhand originaler Daten das Vorgehen bei den Messungen am Konfokalmikroskop.

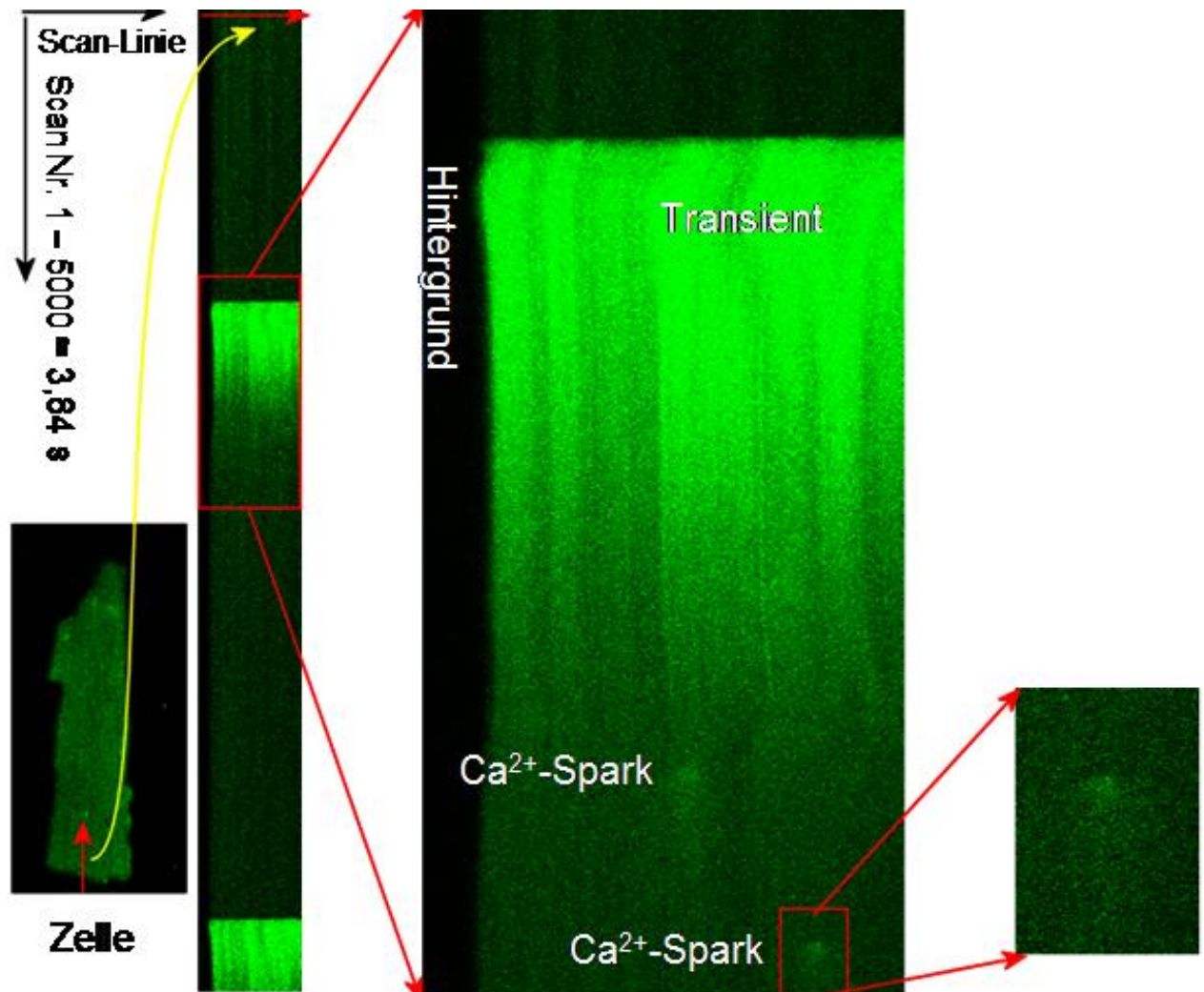


Abbildung 2-10 Messung am Konfokalmikroskop unter Stimulation, *time series* mit Ausschnittsvergrößerungen

Es wurde eine Linie definierter Länge in die ausgewählte Zelle hineingezogen (Linien-Scan) und über die Funktion *time series* diese Linie 5000 Mal repetitiv gescannt. Als 2. Bild von links ist der gesamte Scan, der sich über insgesamt 3,84 s erstreckte abgebildet. In der Ausschnittsvergrößerung ist gut ein Transient als plötzlich über die ganze gescannte Linie ansteigende Fluoreszenz zu erkennen, außerdem erkennt man am linken Bildrand den Hintergrund, dessen Fluoreszenzwerte vor der Auswertung abgezogen wurden. Kurz nach Abfall des Transienten wird die Kontraktion durch Verbreiterung des linksseitigen Hintergrundes sichtbar. In der folgenden Diastole treten 2 Ca^{2+} -Sparks als örtlich und zeitlich begrenzter Fluoreszenzanstieg in Erscheinung. In der weiteren Vergrößerung ist ein Ca^{2+} -Spark in seiner zeitlichen und räumlichen Ausdehnung besser erkennbar.

Wenn die Kalziumkonzentration im Zytosol steigt, steigt durch Ca^{2+} -Bindung des Farbstoffs Fluo-4 auch die emittierte Fluoreszenz an, was sich bildmorphologisch als helles Leuchten deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Erfolgt der Anstieg stimulationsgetriggert, ist durch das simultane Öffnen der Ryanodin-Rezeptoren der ganzen Zelle ein gleichzeitiger Fluoreszenz-Anstieg über den gesamten betrachteten Zellausschnitt zu beobachten (vgl. Abbildung 2-10). Nachfolgend wird in der Regel

eine Kontraktion der Zelle in der Form sichtbar, dass auf der Linie mehr Hintergrund und weniger fluoreszierende Zelle zu sehen ist, da diese sich durch Kontraktion etwas aus der betrachteten Linie entfernt. (vgl. Abbildung 2-10) Der Abfall des Ca^{2+} -Transienten und die Relaxation der Zelle sind als Fluoreszenzabfall und sich wieder Ausdehnen der Zelle erkennbar.

Die als Ca^{2+} -Sparks (englisch für „Funken“) bezeichneten spontanen lokalisierten Ca^{2+} -Freisetzungen traten nicht in jeder gemessenen Zelle auf. Sie stellten sich als zeitlich und örtlich begrenzter Fluoreszenzanstieg dar, wie in Abbildung 2-10 mit * bezeichnet zu sehen.

2.4.3 Auswertung

Das Auftreten von Ca^{2+} -Sparks im gemessenen Bereich einer Zelle wurde qualitativ und quantitativ ausgewertet, um Rückschlüsse auf die Ca^{2+} -Spark-Frequenz und -Kinetik zu erhalten. Für die qualitative Auswertung wurden die gespeicherten Dateien nach Abschluss der Messung erneut geöffnet, die registrierten Ca^{2+} -Sparks gezählt und die Gesamtzahl für jede Zelle in eine Excel-Tabelle übertragen. Die Auswertung erfolgte verblindet, erst nach Abschluss der Auswertungen einer jeden Messreihe wurde der Umschlag mit dem Verblindungsschlüssel geöffnet. In der Tabellenkalkulation wurden für die einzelnen Gruppen Mittelwerte der Ca^{2+} -Spark-Frequenz bezogen auf alle gemessenen Zellen, bezogen auf alle sparkenden Zellen und zusätzlich der Anteil sparkender Zellen an allen gemessenen Zellen berechnet und mittels T-Tests und Fischer-Tests auf statistische Signifikanz untersucht.

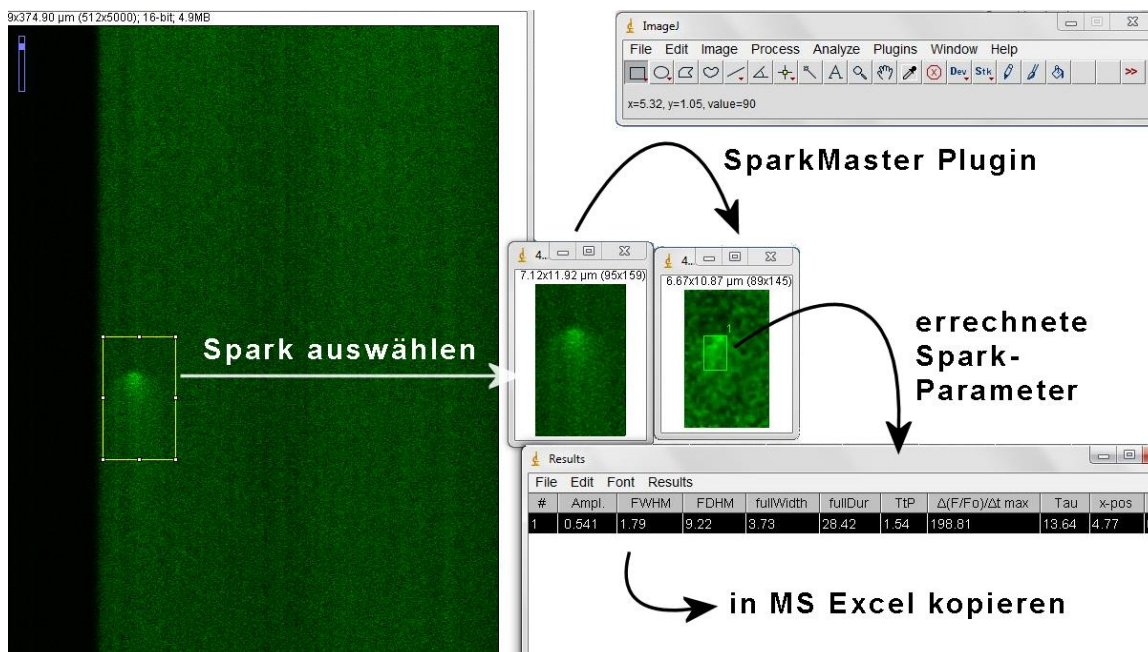


Abbildung 2-11 Quantitative Ca²⁺-Spark-Auswertung

Der Bereich um einen Ca²⁺-Spark herum wurde markiert (linkes Fenster), dupliziert (mittleres Fenster) und mit dem Plugin „Ca²⁺-Sparkmaster“ automatisiert erfasst. Diese berechnete Parameter zur Ca²⁺-Spark-Kinetik (Results), welche in eine Excel-Tabelle (im Hintergrund) übertragen und dort statistisch ausgewertet wurden.

Die quantitative Auswertung und die Analyse der Ca²⁺-Spark-Kinetik erfolgte mit der Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, USA) mittels des Plugins „Ca²⁺-SparkMaster“ von E. Picht. Abbildung 2-11 stellt das Vorgehen zur Quantifizierung der Ca²⁺-Sparks vor. Durch Mittelung eines Bereichs der Hintergrundfluoreszenz wurde die Grundfluoreszenz bestimmt und für die Ca²⁺-Spark-Auswertungen abgezogen. Um einen Ca²⁺-Spark herum wurde eine rechteckige Auswahl gezogen und dieser Bereich der Aufzeichnung dupliziert. Das Plugin Ca²⁺-Sparkmaster analysierte anhand automatisiert den Ca²⁺-Spark und gab im Results-Fenster die Daten Amplitude = F/F₀, Breite des Ca²⁺-Sparks (fullWidth), Breite bei noch halbmaximaler Intensität (FWHM), Gesamtdauer (fullDur) und Dauer bis halbmaximale Intensität (FDHM) aus. Diese wurden in eine Excel-Tabelle überführt, wo hieraus noch die Gesamtgröße des Ca²⁺-Sparks = fullWidth·fullDur·Ampl und die SizeHM = FWHM · FDHM · Ampl berechnet wurde. Aus allen gemessenen Ca²⁺-Sparks einer Zelle wurde das gesamt-Ca²⁺-Leck und das halbmaximale Ca²⁺-Leck über eine Summierung aller Gesamtgrößen bzw. aller SizeHM der in der Zelle aufgetretenen Ca²⁺-Sparks berechnet. Die Ca²⁺-Spark-Frequenz wurde in einer separaten Excel-Tabelle ausgewertet, indem für jede auswertbare Zelle eingetragen wurde, wie viele Ca²⁺-Sparks sie aufwies. Unter der Annahme, dass in jeder Zelle Ca²⁺-Sparks auftreten, sich die Ca²⁺-Spark-Frequenzen interindividuell jedoch stark unterscheiden, besteht eine

heuristische Wahrscheinlichkeit innerhalb eines kurzen Messzeitraums Ca^{2+} -Sparks aufzuzeichnen oder nicht, wie Abbildung 2-12 veranschaulicht.

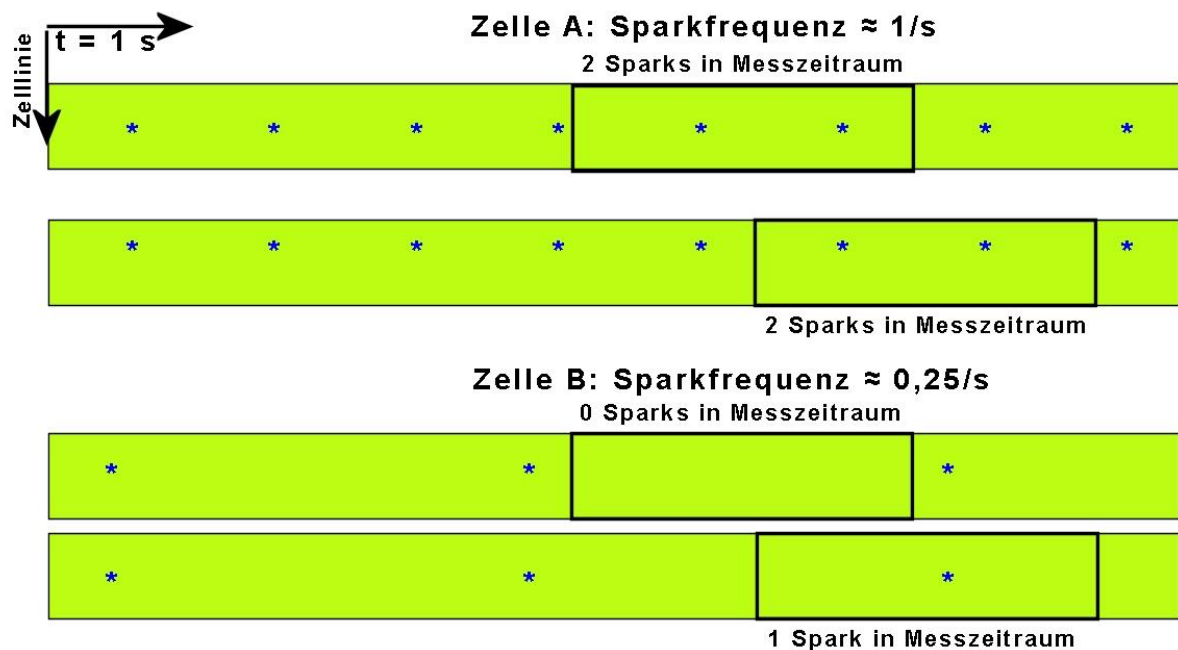


Abbildung 2-12 Ca^{2+} -Spark-Frequenz der Zelle und Messzeitraum

Kontinuierliche schematische Darstellung von 2 Zellen mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Spark-Frequenzen (* = Ca^{2+} -Spark) und Veranschaulichung der Bedeutung des Zeitpunktes, an dem der Messzeitraum (schwarz) beginnt.

Die Messung der Ca^{2+} -Sparks am Konfokalmikroskop erfolgte pro Scan über einen Zeitraum von wenigen Sekunden. Bei einer Zelle mit hoher Ca^{2+} -Spark-Frequenz (Zelle A) war die Wahrscheinlichkeit hoch, Ca^{2+} -Sparks zu registrieren und die Frequenz korrekt ermitteln zu können. Bei einer Zelle mit niedrigerer Ca^{2+} -Spark-Frequenz ergab sich heuristisch eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, im Messzeitraum keinen Ca^{2+} -Spark aufzuzeichnen (Zelle B, oben). Dies bedeutete nicht, dass die Zelle keine Ca^{2+} -Sparks aufwies, sondern nur, dass während des Messzeitraums keiner auftrat. Bei einem anderen Startzeitpunkt der Messung, wäre 1 Ca^{2+} -Spark registriert worden (Zelle B, unten). Bei Messzeiträumen, die kleiner als das Ca^{2+} -Sparkintervall der jeweiligen Zelle sind, wird die registrierte Ca^{2+} -Spark-Frequenz somit bei einer Messung immer entweder über- oder unterschätzt. Um eine korrekte Abbildung der tatsächlichen Ca^{2+} -Spark-Frequenz zu ermöglichen, müssen sowohl diejenigen Messungen, die eine Ca^{2+} -Spark-Frequenz von 0 / Messzeitraum anzeigen, als auch diejenigen mit Ca^{2+} -Sparkfrequenz > 0 / Messzeitraum in die Auswertung einbezogen werden.

Da die Wahrscheinlichkeit besteht, keinen Ca^{2+} -Spark während des Messzeitraums aufzuzeichnen, obwohl die Zelle eine Ca^{2+} -Spark-Frequenz > 0 / Messzeitraum aufweist, besteht die Gefahr, die Ca^{2+} -Spark-Frequenz zu überschätzen, wenn nur diejenigen Zellen zu ihrer Berechnung herangezogen werden, die im Messzeitraum Ca^{2+} -Sparks aufweisen (nachfolgend vereinfachend als „sparkende Zellen“ bezeichnet). Die Ca^{2+} -Spark-Frequenz sollte daher bezogen auf alle gemessenen Zellen berechnet werden und nicht nur bezogen auf die sparkenden Zellen. Analog sollten bei Berechnung des

diastolischen Ca^{2+} -Lecks pro Zelle auch die im Messzeitraum nicht sparkenden Zellen mit einem Leck von 0 in die Berechnung einbezogen werden. Da in der Literatur oftmals nur die Ca^{2+} -Spark-Frequenz bezogen auf sparkende Zellen angegeben wird, werde ich in der vorliegenden Arbeit die Ca^{2+} -Spark-Frequenz zusätzlich auch in dieser Form angeben.

2.5 Statistik

Mittels der Tabellenkalkulation Microsoft Excel und dem Statistik- und Grafikprogramm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler SEM berechnet.

In den Abbildungen und Diagrammen sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte dargestellt und die Standardfehler SEM des Mittelwerts als Fehlerbalken in positiver und negativer Richtung abgebildet.

Auf statistische Signifikanz wurden die Messergebnisse mit dem Student's t-test für unabhängige Stichproben geprüft. Als statistisches Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt. Sofern nicht anders vermerkt, werden auf diesem Niveau signifikante Unterschiede zwischen verglichenen Gruppen mit in den Diagrammen mit * gekennzeichnet.

Für binäre Beobachtungen wie zum Beispiel bei der Berechnung des Anteils sparkender Zellen, der Gegenüberstellung von Zellen, die Ca^{2+} -Sparks aufwiesen gegenüber solchen, die keine aufwiesen, wurde zur Signifikanztestung der Fisher-Test angewendet. Auch mit dem Fisher-Test errechnete p-Werte werden mitsamt den Ergebnissen angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Diastolisches Ca²⁺-Leck

3.1.1 Quantitative Ca²⁺-Spark-Auswertung

Die quantitative Auswertung von 728 Ca²⁺-Sparks (NT: 497; SMP-114: 231) in CaMKII δ_C -transgenen Herzmuskelzellen zeigte, dass SMP-114 die Amplitude der Ca²⁺-Sparks (F/F₀) signifikant reduziert.

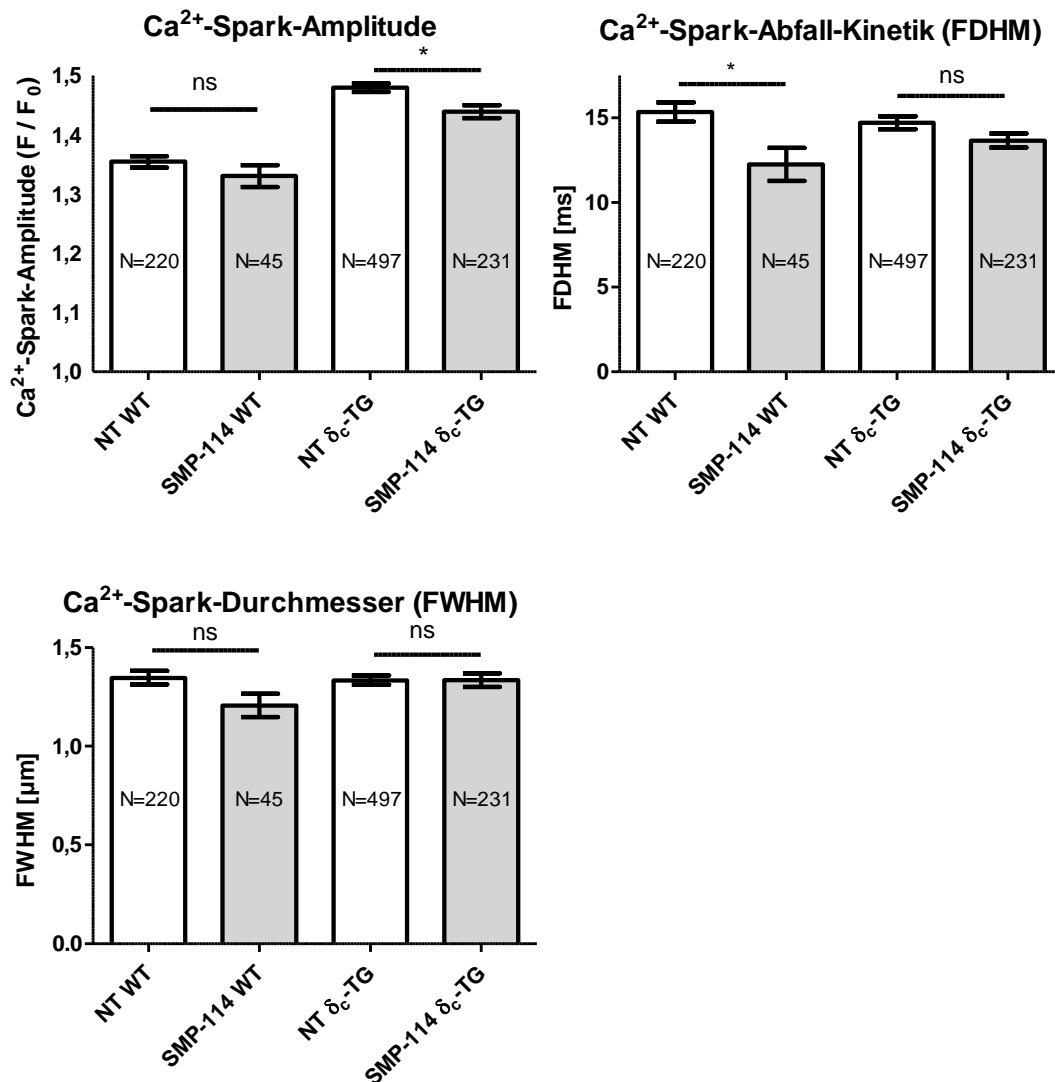


Abbildung 3-1 Ca²⁺-Spark-Amplitude und Ca²⁺-Spark-Dauer FDHM

Während die Amplitude der Ca²⁺-Sparks durch SMP-114 in transgenen Zellen signifikant reduziert wird, ist die Dauer bis zum Abfall auf halbmaximale Intensität der Ca²⁺-Sparks im Wildtyp signifikant reduziert, in transgenen Zellen nur tendenziell ($p = 0,09$). Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich bezüglich des Ca²⁺-Spark-Durchmessers FWHM.

Nicht signifikant aber tendenziell kleiner unter SMP-114 waren FDHM $13,7 \pm 0,4$ ms (SMP-114) versus $14,7 \pm 0,4$ ms (NT; $p = 0,09$) und die SizeHM $28,0 \pm 1,4$ μ m · ms (SMP-114) gegenüber $32,2 \pm 1,6$ μ m · ms (NT; $p = 0,10$). Die beiden letztgenannten waren in den Versuchen an Wildtyp-Zellen unter SMP-114 signifikant verringert –

FDHM auf $12,3 \pm 1,0$ ms (SMP-114: $N = 45$ Ca^{2+} -Sparks in 27 Zellen) von $15,3 \pm 0,6$ ms (NT: $N = 220$ Ca^{2+} -Sparks in 41 Zellen; $p = 0,02$), FD $20,7 \pm 1,5$ ms (SMP-114) versus $24,8 \pm 0,8$ ms (NT; $p = 0,03$) und SizeHM auf $21,6 \pm 3,1$ $\mu\text{m} \cdot \text{ms}$ (SMP-114) von $28,9 \pm 1,5$ $\mu\text{m} \cdot \text{ms}$ (NT; $p = 0,04$). Zusammenfassend kann man sagen, dass in transgenen wie in Wildtyp-Mauszellen die Ca^{2+} -Sparks tendenziell kürzer und weniger intensiv waren, während bezüglich des Durchmessers der Ca^{2+} -Sparks in keiner Messreihe signifikante Veränderungen observiert wurden.

Die gleichgerichteten Unterschiede von Intensität und Dauer bewirkten, dass unter SMP-114 die halbmaximale Ca^{2+} -Spark-Größe (*Size HM*), also die zeitliche mal räumliche Ausdehnung bis zum halbmaximalen Abfall multipliziert mit der Amplitude F/F_0 bei Ca^{2+} -Sparks in Wildtyp-Zellen signifikant um 25,3 % ($p = 0,04$; $N_{\text{NT}} = 220$, $N_{\text{SMP-114}} = 45$) und in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Zellen zwar nicht signifikant ($p = 0,10$; $N_{\text{NT}} = 497$, $N_{\text{SMP-114}} = 231$) aber auch um 13,1 % geringer war. (vgl. Abbildung 3-2).

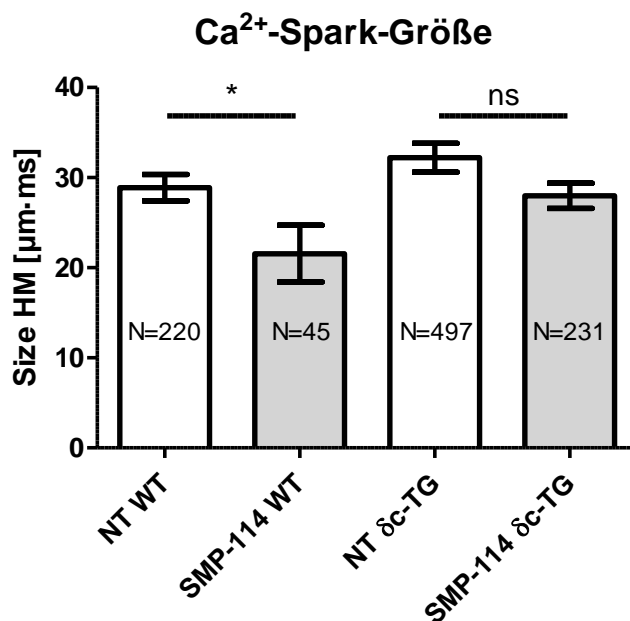


Abbildung 3-2 Reduzierte Ca^{2+} -Spark-Größe unter SMP-114

Im Wildtyp unter SMP-114 signifikant kleinere Size HM als unter Normaltyrode, in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -Zellen nicht statistisch signifikant ($p = 0,10$)

3.1.2 Ca^{2+} -Spark-Frequenz

Die Ca^{2+} -Spark-Frequenz ergibt sich aus der Häufigkeit des Auftretens von Ca^{2+} -Sparks während der Aufzeichnungsperiode. Wie im Kapitel Material und Methoden (vgl. 2.4.3 und Abbildung 2-12) diskutiert ist hinsichtlich der Ca^{2+} -Spark-Frequenz eine Betrachtung über alle registrierten Aufzeichnungen hinweg am aussagekräftigsten. Der Vollständigkeit halber werden im Folgenden aber auch ergänzend die Werte bezogen

auf ausschließlich Aufzeichnungen mit mindestens einem Ca^{2+} -Spark während der Aufzeichnungsperiode gezeigt.

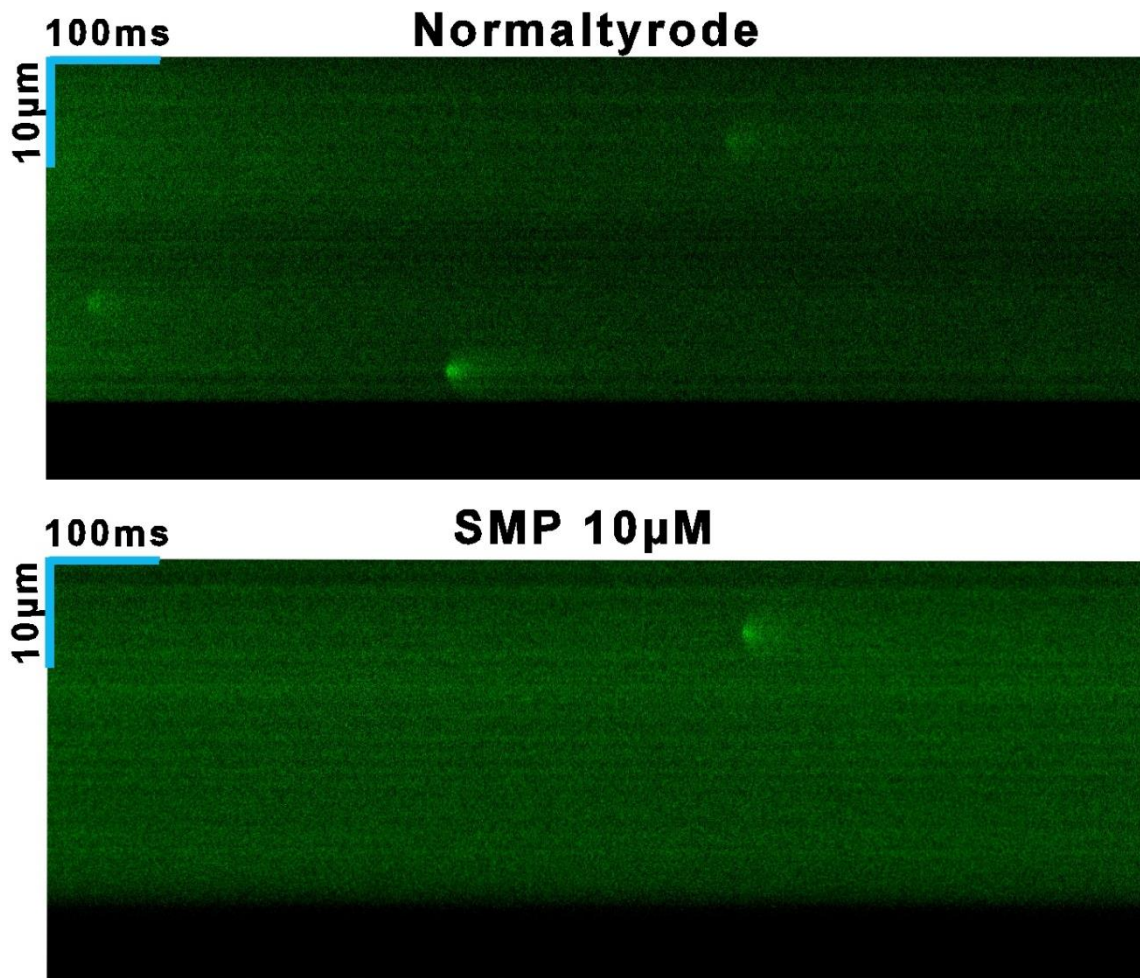


Abbildung 3-3 Ca^{2+} -Spark-Messdaten in Wildtyp-Zellen

Abgebildet ist ein einsekündiger Ausschnitt von Original-Aufzeichnungen. Bei der oberen Messung (Normaltyrode) sind drei Ca^{2+} -Sparks unterschiedlicher Intensität und Dauer zu identifizieren. Unter SMP-114 weist eine vergleichbare Zelle im gleichen Zeitraum einen Ca^{2+} -Spark auf.

SMP-114 führte zu einer signifikanten Reduktion der Ca^{2+} -Spark-Frequenz um 80 % ($p < 0,0001$; $N_{\text{NT}} = 120$, $N_{\text{SMP-114}} = 121$ gemessene Zellen) in Wildtyp- und 65 % ($p = 0,0001$, $N_{\text{NT}} = 404$, $N_{\text{SMP-114}} = 417$ gemessene Zellen) in δ_{C} -transgenen Zellen wie Abbildung 3-3 veranschaulicht. Bezogen nur auf sparkende Zellen betrug die Reduktion 69 % in Wildtyp-Zellen ($p = 0,0001$; $N_{\text{NT}} = 41$, $N_{\text{SMP-114}} = 27$ sparkende Zellen) und 42 % in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Zellen ($p = 0,0027$; $N_{\text{NT}} = 132$, $N_{\text{SMP-114}} = 105$ sparkende Zellen). Die Ergebnisse der Ca^{2+} -Spark-Frequenz Messungen sind in Abbildung 3-4 zusammengefasst.

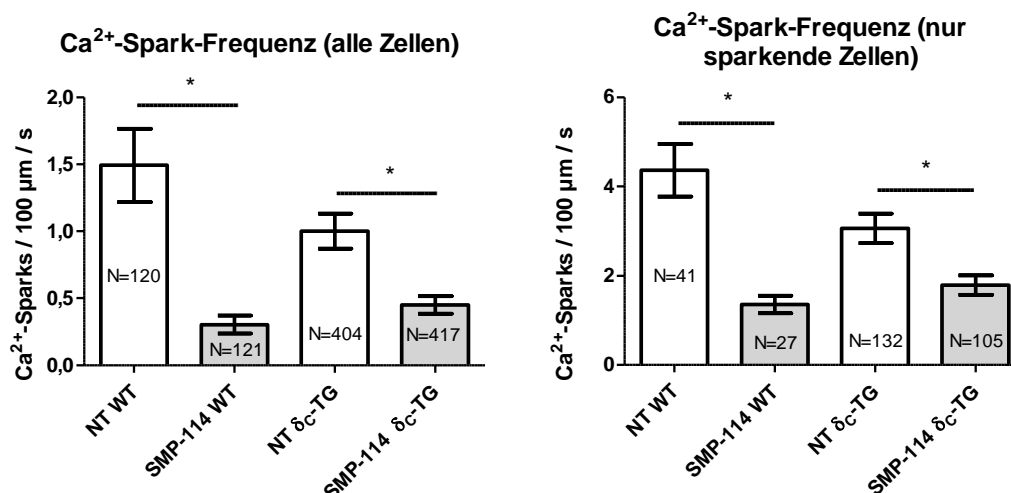


Abbildung 3-4 SMP-114 reduziert Ca²⁺-Spark-Frequenzen

Signifikante Reduktion der Ca²⁺-Spark-Frequenzen in Wildtyp- und transgenen Zellen unter SMP-114.

3.1.3 Zelluläres diastolisches Ca²⁺-Leck

Die Summe der Größen aller Ca²⁺-Sparks einer Zelle ergibt das Ca²⁺-Gesamtleck. Entsprechend gehen hier nicht nur die Größe der einzelnen Ca²⁺-Sparks sondern auch die Häufigkeit ihres Auftretens (d.h. ihre Frequenz) ein. In Abbildung 3-5 ist zu erkennen, dass das diastolische Ca²⁺-Leck HM auf dem gemessenen Zellabschnitt unter SMP-114 10 μM um 77 % im Wildtyp ($p = 0,0001$; $N_{NT} = 41$; $N_{SMP-114} = 27$) und 49 % in δ_C-transgenen ($p = 0,005$, $N_{NT} = 132$; $N_{SMP-114} = 105$) geringer ist als in der Negativkontrolle. Zusätzlich zur Angabe des Lecks bezogen auf den gemessenen Zellabschnitt ist das Leck HM in Abbildung 3-5 durch Division durch den gemessenen Zellabschnitt (32 μm) und die Messdauer (3,84 s) auch als Steigerung der Grundfluoreszenz durch die Ca²⁺-Sparks angegeben. Dies beeinflusst lediglich den Betrag und die Einheit der Ergebnisse, nicht jedoch relative Unterschiede und Signifikanzniveaus.

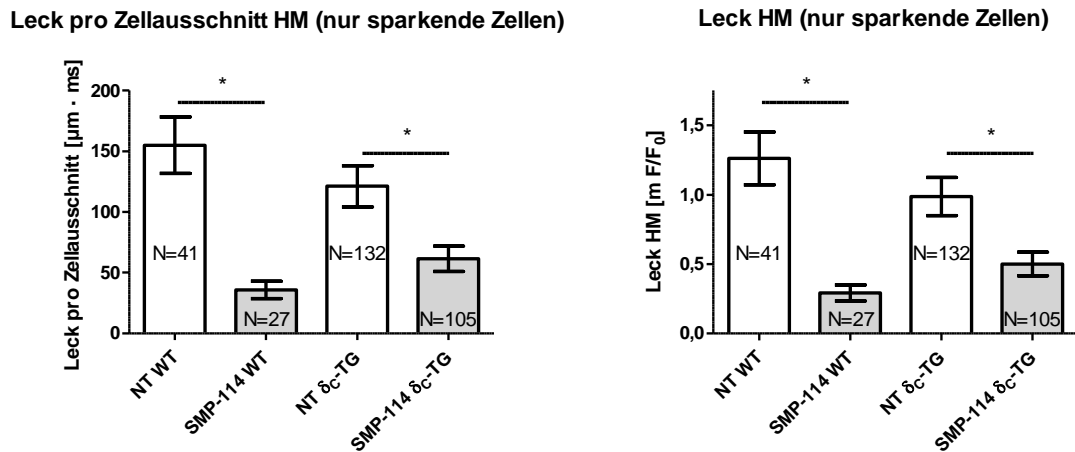


Abbildung 3-5 Diastolisches Ca²⁺-Leck bezogen auf sparkende Zellen

In Wildtyp wie in transgenen Mäusen signifikant geringeres Leck pro gemessenem Zellausschnitt unter SMP-114 gegenüber Normaltyrode. Durch Division durch gemessenen Zellabschnitt (32 µm) und Messdauer (3,84 s) ergibt sich das Leck HM (rechter Teil der Abbildung).

3.1.4 Anteil sparkender Zellen

Ausgeprägte Effekte hatte SMP-114 nicht nur in Bezug auf Ca²⁺-Spark-Größe und Frequenz. Auch der Anteil an Zellen, die während des Messzeitraums Ca²⁺-Sparks aufwiesen, war unter SMP-114 deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Bei einer Betrachtungsweise, bei der Zellen ohne Ca²⁺-Spark während der Aufzeichnungsperiode nicht in die Berechnung der Ca²⁺-Spark-Frequenz eingehen, muss entsprechend der Anteil dieser „nicht-sparkenden“ Zellen berücksichtigt werden. Von allen gemessenen Zellen wiesen während des Messzeitraums von 3,84 s im Wildtyp unter SMP-114 10 µM 22,3 % der Zellen Ca²⁺-Sparks auf gegenüber 34,2 % in der Kontrolle (p = 0,0458; N_{NT} = 120, N_{SMP-114} = 121 Zellen). In CaMKIIδ_C-transgenen Zellen zeigten unter SMP-114 25,2 % und unter Normaltyrode 32,7 % der Zellen Ca²⁺-Sparks (p = 0,0208; N_{NT} = 404, N_{SMP-114} = 417 Zellen).

Abbildung 3-6 fasst die Ergebnisse für die einzelnen Gruppen mit den Ergebnissen des Fischer-Tests auf Signifikanz zusammen.

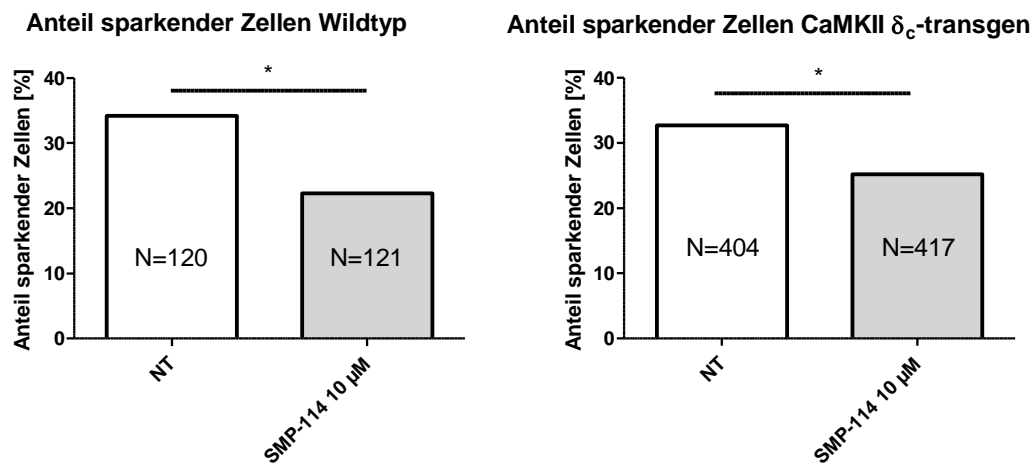


Abbildung 3-6 Anteil sparkender Zellen

Signifikant geringerer Anteil sparkender Zellen unter SMP-114 10 μ M ($p_{\text{Wildtyp}} = 0,05$, $p_{\delta_c\text{-transgen}} = 0,02$)

3.1.5 Diastolisches Ca^{2+} -Leck bezogen auf alle Zellen

In 3.1.3 wurde das durchschnittliche diastolische Ca^{2+} -Leck einer sparkenden Zelle berechnet und eine Reduktion durch SMP-114 beschrieben. Interessant ist jedoch in einem aus vielen Zellen bestehenden Zellverbund nicht nur das Ca^{2+} -Leck der Zellen, die in der Diastole Ca^{2+} -Ionen aus dem SR verlieren, sondern auch wie groß der Anteil der Zellen, die ein messbares Ca^{2+} -Leck aufweisen, ist. Dieser wurde in 3.1.4 beschrieben. Bringt man nun diese beiden relevanten Größen in einer Kalkulation zusammen, erhält man das durchschnittliche diastolische Ca^{2+} -Leck aller gemessenen Zellen. Da SMP-114 bereits jeden einzelnen dieser Faktoren reduzierte, ist folglich der Gesamteffekt eine noch dramatischere Reduktion des SR Ca^{2+} -Lecks, wie in Abbildung 3-7 ersichtlich.

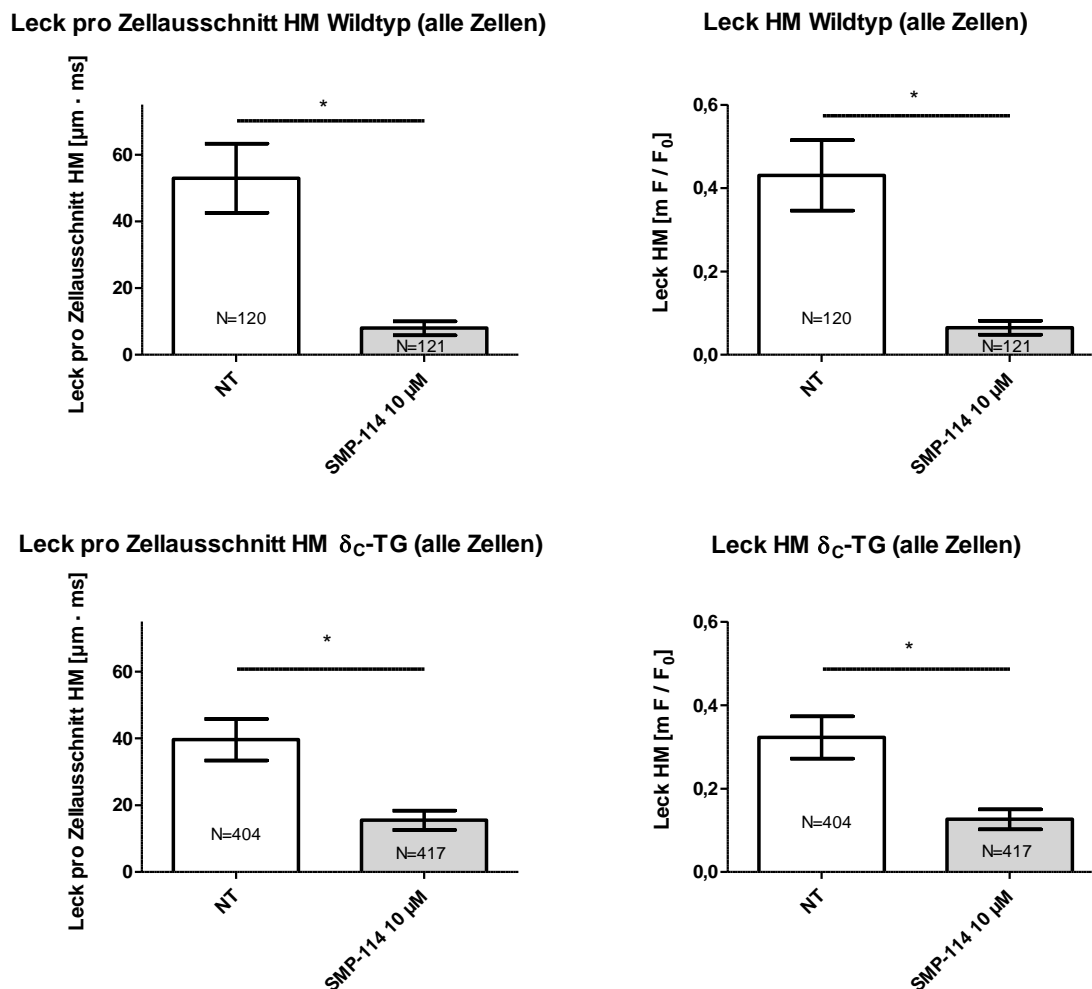


Abbildung 3-7 Diastolisches Ca²⁺-Leck bezogen auf alle Zellen

Dramatische Reduktion des Ca²⁺-Verlusts aus dem SR während der Diastole nach Vorinkubation mit SMP-114 sowohl in Wildtyp- als auch in CaMKII δ_C -transgenen Kardiomyozyten.

Das Leck bis halbmaximale Intensität sinkt unter SMP-114 um 85 % ($p < 0,0001$; $N_{\text{NT}} = 120$, $N_{\text{SMP-114}} = 121$) im Wildtyp und um 61 % ($p = 0,0004$ $N_{\text{NT}} = 404$, $N_{\text{SMP-114}} = 417$) in transgenen Mäusen.

Zusammenfassend wird unabhängig von der Art der Ca²⁺-Spark-Auswertung der mit dem Konfokalmikroskop messbare diastolische Ca²⁺-Verlust aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Applikation von SMP-114 über alle Versuchsreihen, Maus-Genotypen und Kalkulationsweisen hinweg massiv reduziert.

3.2 Untersuchung der elektromechanischen Kopplung

Am Epifluoreszenzmikroskop wurden mittels der Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2 (ratiometrisch, vgl. 2.1.3) und Fluo-3 (nicht ratiometrisch vgl. 2.1.3) die zytosolische Kalziumkonzentration und mit der Myozytenkamera (vgl. 2.3) die Sarkomerlänge isolierter muriner Herzmuskelzellen unter Normaltyrode und nach Applikation von

SMP-114 gemessen, teilweise ergänzt durch eine Positivkontrolle mit dem etablierten CaMKII-Inhibitor myrAIP (vgl. 2.1.5) in der Konzentration 1 μM . Die Ergebnisse verschiedener relevanter Parameter sind im Folgenden dargestellt. Aufgrund der in 2.1.3 diskutierten Eigenschaften eignet sich als Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 besser als Fura-2 zur Untersuchung des Transientenabfalls, da es im Vergleich eine weniger ausgeprägte Pufferkapazität für Ca^{2+} -Ionen aufweist.

3.2.1 Diastolische Ca^{2+} -Elimination und Zellrelaxation

Als Parameter für die Geschwindigkeit der diastolischen Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol wurde die Dauer bis zum Abfall des Ca^{2+} -Transienten um 50 % respektive 80 % seiner Amplitude (rt50 / rt80) gewählt und gemessen. Da die Ca^{2+} -Elimination im Wesentlichen über die SERCA2a und zu einem kleineren Anteil über den NCX erfolgt, hängt die Geschwindigkeit des Abfalls des zytosolischen freien Ca^{2+} entscheidend von der Funktion dieser beiden Proteine ab. Über Hemmung der SERCA2a-Inhibition durch Phospholamban reguliert die CaMKII diese Prozesse. (vgl. 1.2.1) In diese Messungen wurde der etablierte CaMKII-Inhibitor myristoyliertes AIP als Positivkontrolle in der Konzentration 1 μM sowie ein weiterer potentieller CaMKII-Inhibitor, GPZ5851 5 μM einbezogen.

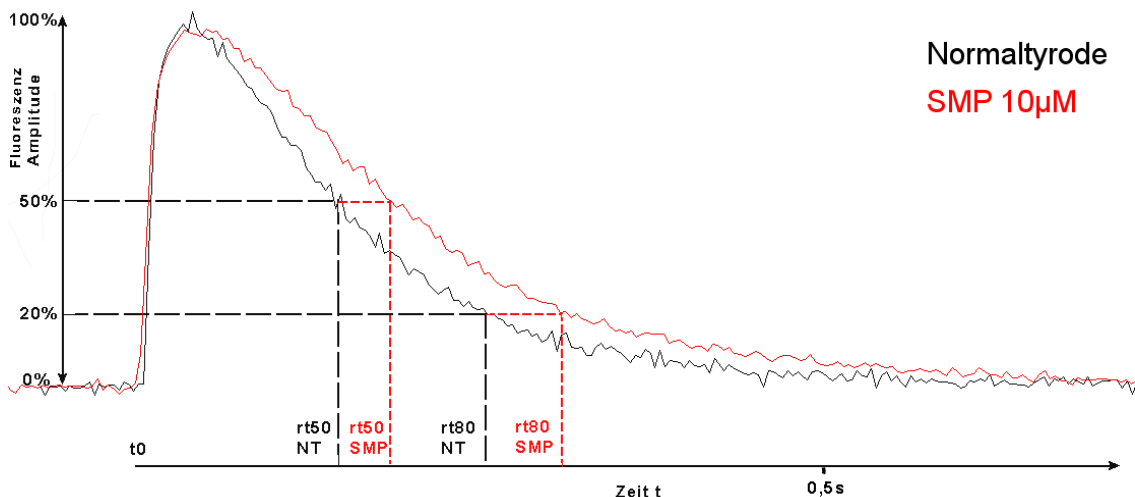


Abbildung 3-8 Originalregistrierungen von Fluo-3-Transienten SMP-114 (rot) und Normaltyrode (schwarz) im Vergleich

Bei unveränderter Amplitude ist in dieser Originalaufzeichnung einer Messung an $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Kardiomyozyten die verlängerte Zeit bis zum Abfall des Ca^{2+} -Fluoreszenz-Transienten um 50 % respektive 80 % der Gesamtamplitude (rt50 und rt80) erkennbar.

Wie Abbildung 3-9 zeigt, führt SMP-114 in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Kardiomyozyten zu einer signifikanten Verlängerung der Relaxationszeiten Für den etablierten Inhibitor

myrAIP weist der Trend in die gleiche Richtung, ohne jedoch Signifikanzniveaus zu erreichen ($p_{\text{myrAIP rt80 Fura-2}} = 0,22$).

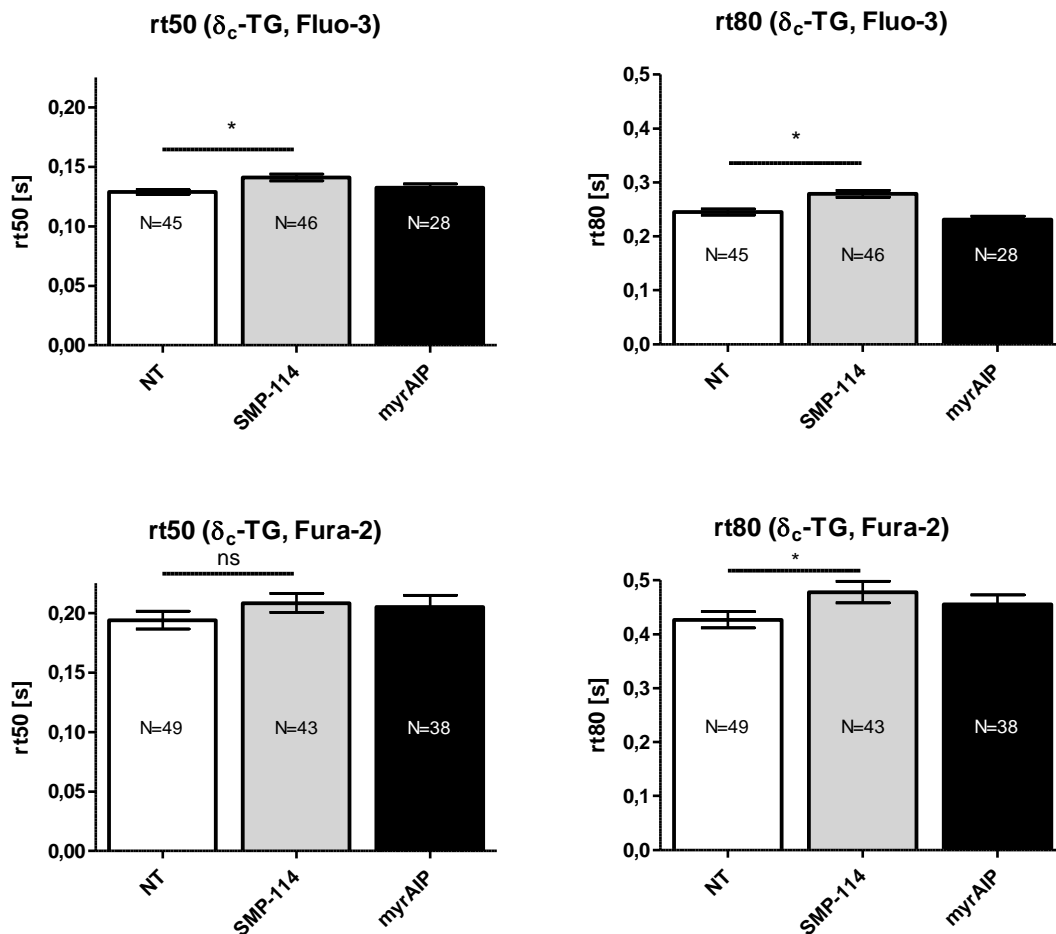


Abbildung 3-9 Relaxationszeit des Ca^{2+} -Transienten

Verlängerung der Relaxationszeiten des Ca^{2+} -Transienten unter SMP-114, signifikant für rt50 in den Fluo-3-Messungen und für die rt80 bei beiden Farbstoffen. Keine signifikanten Veränderungen unter den anderen Inhibitoren, wobei die Trends bei myrAIP als etabliertem CaMKII-Inhibitor ebenfalls Richtung Verlängerung gehen. Auffallend ist die deutlich geringere Varianz bei Fluo-3, die sich in kleineren Standardfehlern bei vergleichbarer Anzahl gemessener Zellen ausdrückt.

In den Versuchsreihen im Wildtyp ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Messungen der rt50 unter Normaltyrode und SMP-114 10 μM ($0,19 \pm 0,01$ s, $N_{\text{NT}} = 100$ vs. $0,19 \pm 0,01$ s, $N_{\text{SMP-114}} = 94$; $p = 0,60$ mit Fura-2 bzw. $0,13 \pm 0,003$ s, $N_{\text{NT}} = 32$ vs. $0,14 \pm 0,003$ s, $N_{\text{SMP-114}} = 27$; $p = 0,33$ mit Fluo-3). Ebenso wenig ergaben sich hier signifikante Änderungen der rt80 ($0,43 \pm 0,01$ s, $N_{\text{NT}} = 98$ vs. $0,42 \pm 0,01$ s, $N_{\text{SMP-114}} = 94$; $p = 0,72$ mit Fura-2 bzw. $0,22 \pm 0,01$ s, $N_{\text{NT}} = 32$ vs. $0,25 \pm 0,01$ s, $N_{\text{SMP-114}} = 27$; $p = 0,55$ mit Fluo-3). Die deutlichen Unterschiede bei der Messung der gleichen Parameter mit den beiden verschiedenen Farbstoffen verdeutlichen Unterschiede die auf die Ca^{2+} -Pufferkapazität und ein stärkeres

Signalrauschen bei Fura-2 zurückzuführen sein könnten (vgl. 2.1.3). Die relativen Änderungen sind jedoch in den unterschiedlichen Messreihen gleichgerichtet.

Für die Wiederverlängerung der Sarkomere ergaben sich weder im Wildtyp noch in transgenen Mäusen signifikante Unterschiede zwischen SMP-114, NT und myrAIP.

3.2.2 Diastolische Ca^{2+} -Level

Als Maß für die diastolische zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wurde die Fura-2-Fluoreszenzratio am Ende der Diastole, also im Zeitraum unmittelbar vor einem erneuten Transientenaufstrich, herangezogen.

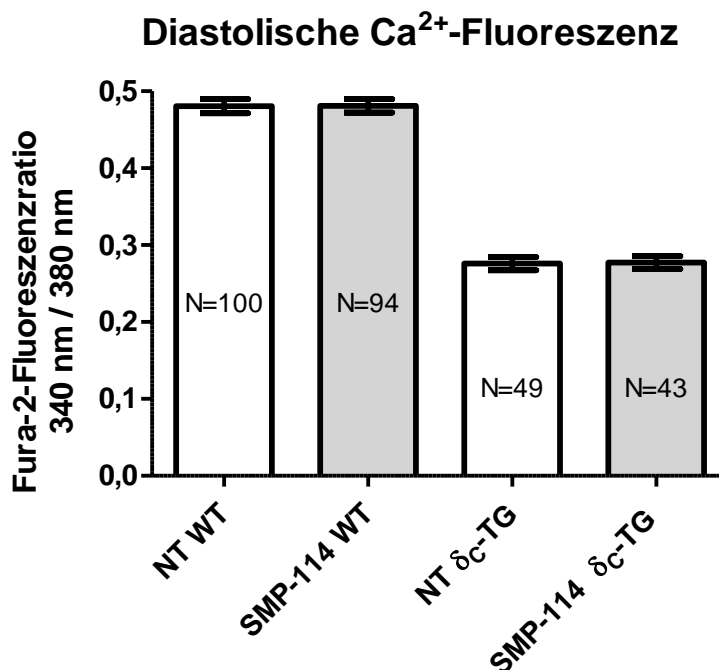


Abbildung 3-10 Diastolische Fura-2-Fluoreszenzratio

Weder in Wildtyp-, noch in $\text{CaMKII}\delta_c$ -transgenen Kardiomyozyten lassen sich unter SMP-114 Unterschiede gegenüber Normaltyrode in Bezug auf diastolische Ca^{2+} -Level erkennen.

SMP-114 zeigte keinerlei Effekt auf das diastolische Ca^{2+} . Im Wildtyp betrug die Ratio für beide Gruppen $0,48 \pm 0,01$ ($N_{\text{NT}} = 100$, $N_{\text{SMP-114}} = 94$), in $\text{CaMKII}\delta_c$ -transgenen Kardiomyozyten $0,28 \pm 0,01$ für Normaltyrode und $0,28 \pm 0,01$ für SMP-114 ($N_{\text{NT}} = 49$, $N_{\text{SMP-114}} = 43$)

3.2.3 Ca^{2+} -Transienten Amplituden

SMP-114 zeigte keinen Effekt auf die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude in Wildtyp-Kardiomyozyten bei 1 Hz Stimulationsfrequenz (Fura-2-Amplitude: $0,20 \pm 0,01$ (NT) vs. $0,18 \pm 0,01$ (SMP-114), $p = 0,36$, $N_{\text{NT}} = 100$, $N_{\text{SMP-114}} = 94$; Fluo3-F/ F_0 : $2,56 \pm 0,15$ (NT) vs. $2,53 \pm 0,20$ (SMP-114); $p = 0,92$, $N_{\text{NT}} = 32$, $N_{\text{SMP-114}} = 27$). In $\text{CaMKII}\delta_c$ -transgenen

Zellen zeigten sich unter Fura-2 sehr niedrige Amplituden, wobei bei gleichzeitig vorhandenem Signalrauschen die Aussagekraft der errechneten Parameter eingeschränkt ist. Hier schien zunächst die Amplitude unter NT signifikant größer zu sein als unter SMP-114 ($0,09 \pm 0,01$ (NT) vs. $0,06 \pm 0,01$ (SMP-114); $N_{NT} = 49$; $N_{SMP-114} = 43$ $p = 0,01$). Dieser Unterschied wurde durch anschließende F/F_0 -Messungen mit Fluo-3 jedoch nicht bestätigt ($2,07 \pm 0,08$ (NT) vs. $2,07 \pm 0,08$ (SMP-114), $N_{NT} = 45$; $N_{SMP-114} = 46$).

Bei höheren Stimulationsfrequenzen (4 Hz im Wildtyp; 2 und 4 Hz in transgenen Zellen) zeigten sich unter SMP-114 signifikant geringere Fura-2-Transientenamplituden (Abbildung 3-11).

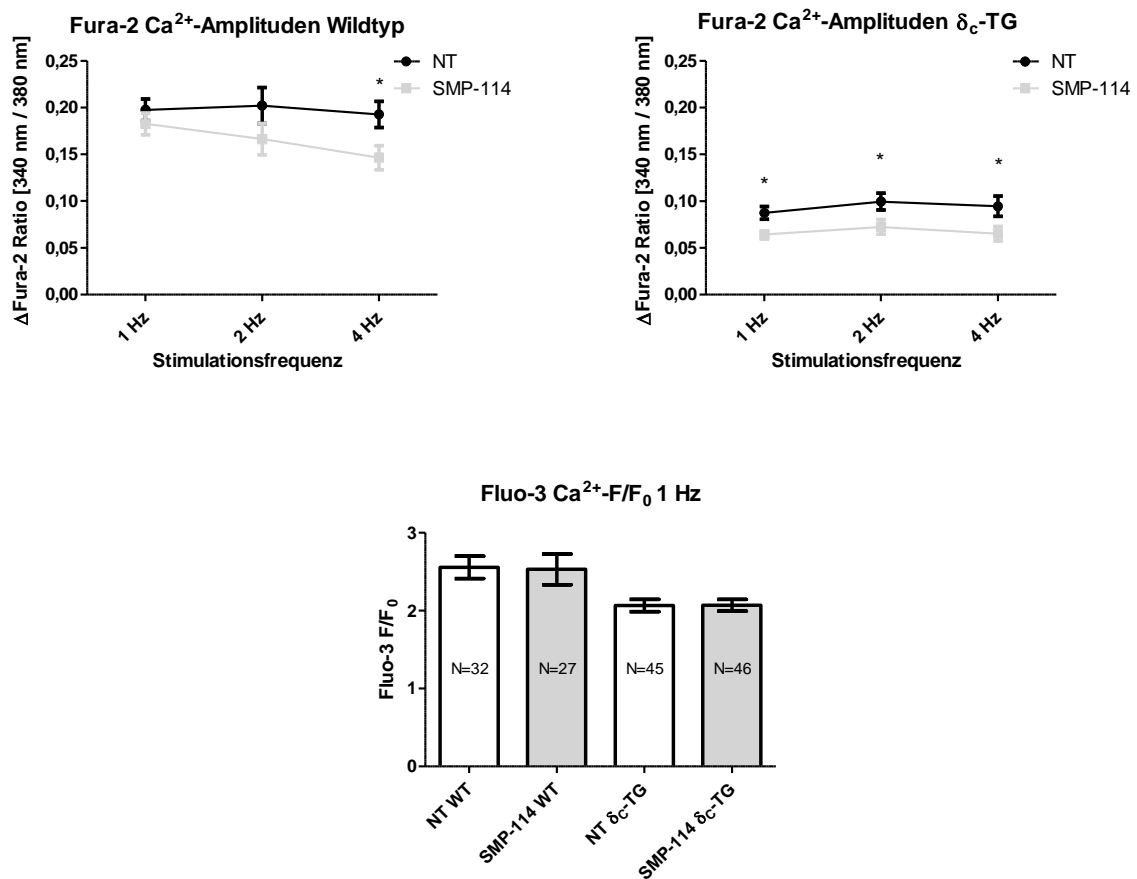


Abbildung 3-11 Ca²⁺-Transientenamplituden bei 1 – 4 Hz Stimulationsfrequenz

Im Wildtyp (NT: $N_{1\text{ Hz}} = 100$, $N_{2\text{ Hz}} = 34$, $N_{4\text{ Hz}} = 82$; SMP-114: $N_{1\text{ Hz}} = 94$, $N_{2\text{ Hz}} = 28$, $N_{4\text{ Hz}} = 59$) unter SMP-114 10 μM bei höheren Frequenzen abnehmende Amplituden, bei 4 Hz signifikant geringer als unter Normaltyrode. In transgenen Zellen (NT: $N_{1\text{ Hz}} = 49$, $N_{2\text{ Hz}} = 31$, $N_{4\text{ Hz}} = 26$; SMP-114: $N_{1\text{ Hz}} = 43$, $N_{2\text{ Hz}} = 26$, $N_{4\text{ Hz}} = 25$) gleich bleibende bis steigende Amplituden sowohl unter SMP-114 als auch unter Normaltyrode. Über alle Frequenzen hinweg signifikant größere Amplituden unter Normaltyrode.

3.3 Auswirkungen von SMP-114 auf die Myozyten-Kontraktion

Als Maßstab für die Kontraktionsamplitude der Zelle wurde mit der Myozytenkamera die Sarkomerlänge kontinuierlich als Funktion der Zeit aufgezeichnet (vgl. 2.3) und hinsichtlich der prozentualen systolischen Verkürzung ausgewertet.

In Wildtyp-Kardiomyozyten zeigte SMP-114 keinen signifikanten Effekt auf die Kontraktilität ($4,26 \pm 0,32$ (NT) vs. $4,09 \pm 0,32$ (SMP-114); $p = 0,70$, $N_{NT} = 100$, $N_{SMP-114} = 92$). In den Messungen an CaMKII δ_C -transgenen Zellen wirkte SMP-114 in der verwendeten Konzentration negativ inotrop ($4,22 \pm 0,31$ (NT) vs. $3,21 \pm 0,21$ (SMP-114); $p < 0,01$, $N_{NT} = 94$, $N_{SMP-114} = 88$) (Abbildung 3-12).

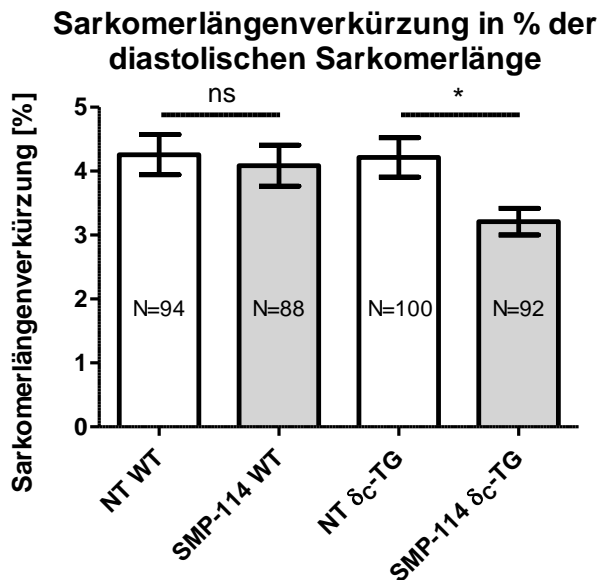


Abbildung 3-12 Kontraktion

Die Sarkomerlängenverkürzung wurde im Wildtyp durch SMP-114 nicht beeinflusst ($p = 0,70$), dagegen war die Kontraktion der Sarkomere in transgenen Zellen unter SMP-114 deutlich geringer als unter Normaltyrode ($p = 0,01$).

3.4 Spontane Ca²⁺-Freisetzungseignisse (SCR-Events)

In 1.3.4 und 1.4.2 wurden spontane Ca²⁺-Freisetzungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in der Diastole, sogenannte SCR-Events, als *In vitro*-Korrelat der Arrhythmie neigung beschrieben (WEHRENS et al. 2003). SMP-114 führte in Wildtyp-Kardiomyozyten zu einer deutlichen Reduktion dieser arrhythmogenen Ereignisse während einer dreißigsekündigen Stimulationspause um 62,7 % ($0,93 \pm 0,22$ vs. $0,35 \pm 0,11$; $p = 0,02$, $N_{NT} = 84$ Zellen, $N_{SMP-114} = 78$ Zellen, vgl. Abbildung 3-14) Auch in den Messungen transgener Zellen zeigte sich eine tendenzielle Reduktion, die bei

deutlich geringerer Zahl durchgeführter Messungen allerdings keine Signifikanz erreichte ($1,12 \pm 0,38$ vs. $0,58 \pm 0,21$; $p=0,23$, $N_{NT}=25$ Zellen, $N_{SMP-114}=24$ Zellen).

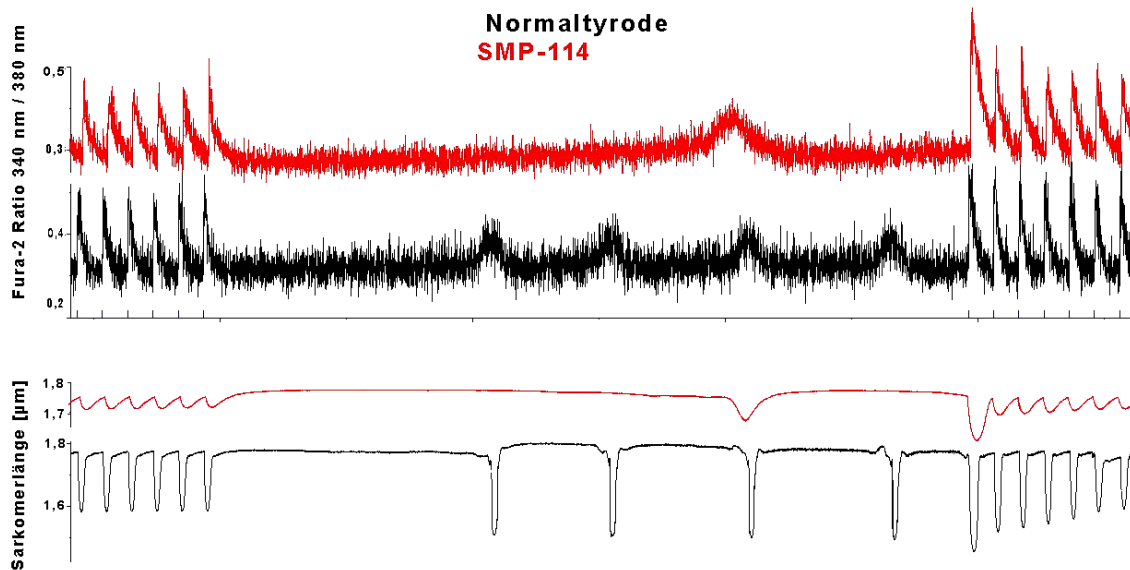


Abbildung 3-13 SCR-Events während 30-sekündiger Stimulationsunterbrechung.

Originalregistrierungen zweier Wildtyp-Kardiomyozyten

Unter SMP-114 (rot) wurden signifikant weniger SCR-Events registriert als unter Normaltyrode.

SCR events während 30 s-Stimulationspause

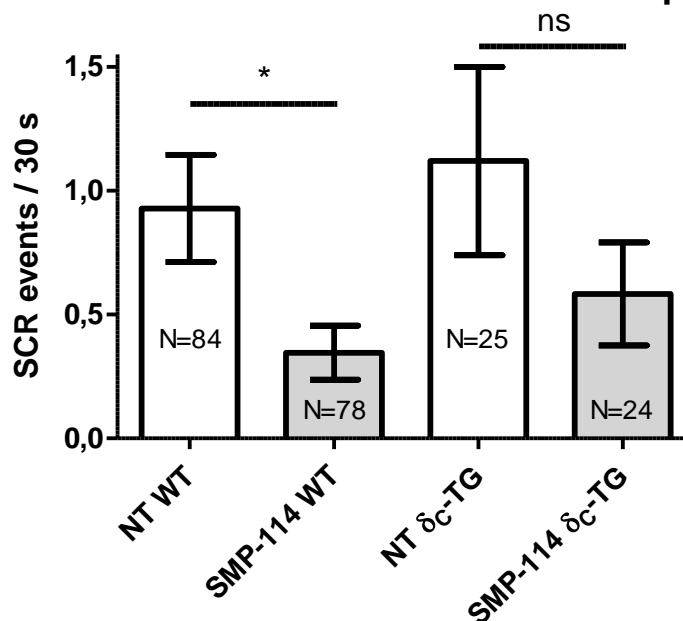


Abbildung 3-14 SCR-Events innerhalb der 30-sekündigen Stimulationspause

Im Wildtyp signifikante Reduktion der durchschnittlich auftretenden SCR-Events unter SMP-114. Es wurden in beiden Gruppen deutlich weniger CaMKII δc -transgene Zellen gemessen; hier ergab sich kein signifikanter Unterschied.

3.5 Post-Pausen-Potenzierung von Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängenverkürzung

Die Post-Pausen-Potenzierung stellt ein Maß für die Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR dar (vgl. 2.3).

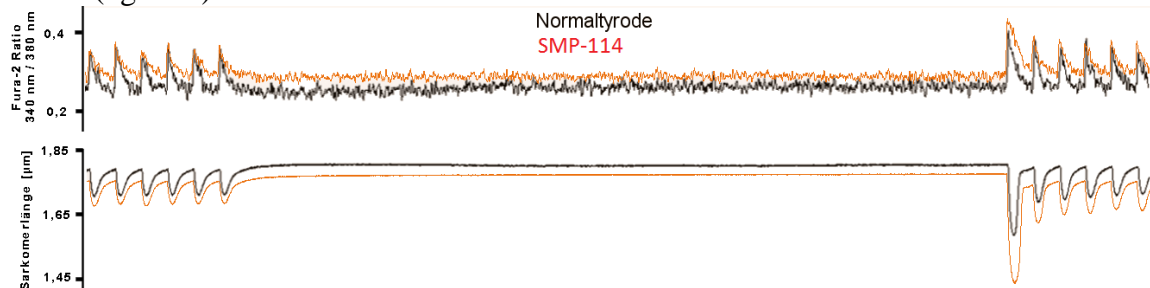


Abbildung 3-15 Post-Pausen-Potenzierung

Originalaufzeichnung $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgen zum Vergleich zwischen SMP-114 (rot) und Normaltyrode (schwarz).

Diese beispielhafte Aufzeichnung zeigt oben die unter SMP-114 (rot) stärkere Ca^{2+} -Transienten-Amplitudenpotenzierung nach 30 Sekunden Stimulationspause. Unten ist die noch stärker ausgeprägte Kontraktionsamplitudenpotenzierung um mehr als das vierfache aufgezeichnet.

Traten während der Stimulationspause spontane Ca^{2+} -Freisetzungen bzw. Kontraktionen auf, so wurde die betreffende Zelle nicht in die Auswertung einbezogen.

In Abbildung 3-16 ist die Potenzierung der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden nach der Stimulationspause dargestellt. SMP-114 führt dabei zu einer Verbesserung der Post-Pausen-Potenzierung, welche in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Kardiomyozyten ($139,7 \pm 5,4$ % (NT) vs. $174,4 \pm 10,3$ % (SMP-114); $p < 0,01$, $N_{\text{NT}} = 15$, $N_{\text{SMP-114}} = 18$) noch ausgeprägter als in Wildtyp-Zellen ist ($137,2 \pm 4,3$ % (NT) vs. $152,1 \pm 4,9$ % (SMP-114); $p = 0,03$, $N_{\text{NT}} = 60$, $N_{\text{SMP-114}} = 65$).

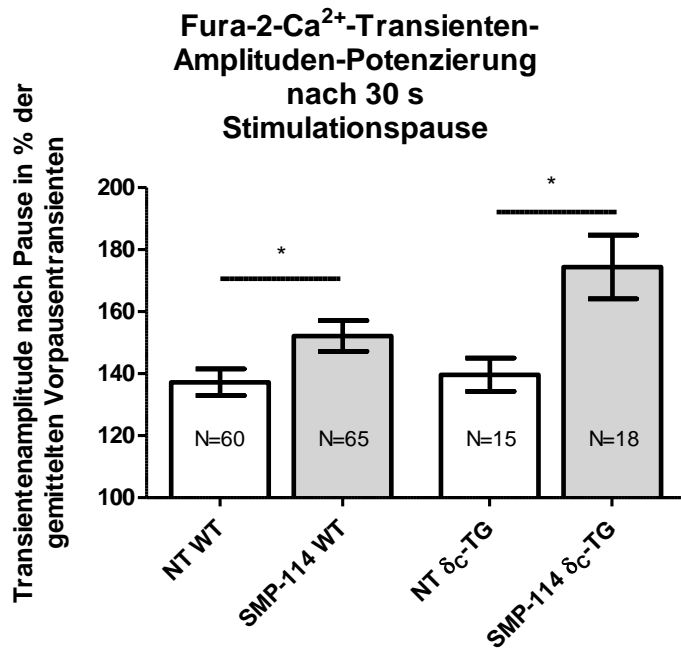


Abbildung 3-16 Relative Post-Pausen-Transientenamplituden-Potenzierung

100 % entsprechen der Amplitude des Vor-Pausen-Transienten. Sowohl im Wildtyp als auch in transgenen Zellen signifikant größere prozentuale Amplitudenpotenzierung unter SMP-114 10 μ M.

Die ausgeprägtere Potenzierung der Ca²⁺-Transientenamplituden schlug sich auch in größeren Kontraktionsamplituden nieder. Die Sarkomerlängenverkürzung nach der Pause war in WT- und CaMKII δc -transgenen Zellen deutlich stärker als vor der Pause. Das Ausmaß der Kontraktionspotenzierung ist je nach Genotyp unterschiedlich. In CaMKII δc -transgenen Zellen bewirkt SMP-114 10 μ M eine statistisch signifikant größere Verstärkung (255,4 \pm 32,6 % (NT) vs. 434,8 \pm 66,1 % (SMP-114), $p = 0,03$, $N_{NT} = 13$, $N_{SMP-114} = 15$) während die tendenzielle Verstärkung im Wildtyp nicht signifikant ist (197,2 \pm 16,5 % (NT) vs. 235,0 \pm 15,4 % (SMP-114); $p = 0,10$, $N_{NT} = 55$, $N_{SMP-114} = 64$). (Abbildung 3-17)

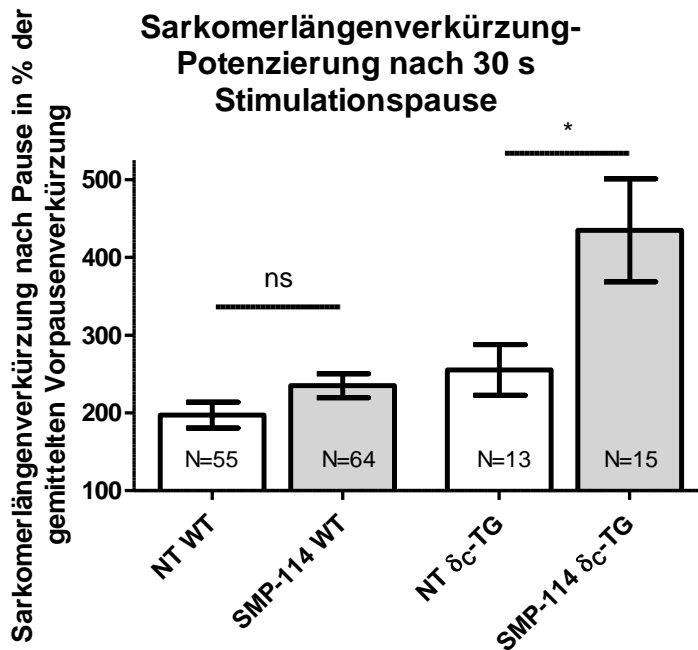


Abbildung 3-17 Post-Pausen-Potenzierung der Sarkomerlängenverkürzung

Dargestellt ist das Verhältnis Prozentuale Sarkomerlängenverkürzung nach Pause / Prozentuale Sarkomerlängenverkürzung vor Pause in %. In transgenen Zellen signifikant höhere Potenzierung unter SMP-114, in WT-Zellen tendenziell bessere Potenzierung.

Auch fällt im Vergleich der Genotypen unter SMP-114 die Potenzierung der Kontraktionskraft in den transgenen Zellen um fast 200 % stärker als in Wildtyp-Zellen aus ($434,8 \pm 66,1$ %, $N_{\delta_c - SMP-114} = 15$ vs. $235,0 \pm 15,5$ %, $N_{WT - SMP-114} = 64$; $p < 0,0001$) während die Ca^{2+} -Amplituden (Abbildung 3-16) sich nur 22,3 % stärker erhöhten ($174,4 \pm 10,3$ %, $N_{\delta_c - SMP-114} = 18$ vs. $152,1 \pm 4,9$ %, $N_{WT - SMP-114} = 65$; $p = 0,04$). Unter NT fand sich weder die Ca^{2+} -Transienten, noch die Kontraktionsamplitudenverstärkung betreffend ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen.

3.6 SR Ca^{2+} -Gehalt

Der Ca^{2+} -Gehalt im sarkoplasmatischen Retikulum der Zelle wurde wie in 2.3.2 beschrieben mittels Koffein-induzierter Transienten abgeschätzt. Die Amplituden der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten blieben unter SMP-114 gegenüber Normaltyrode unverändert. Es konnte keine signifikanten Unterschiede des SR Ca^{2+} -Gehalts festgestellt werden, auch wenn die Mittelwerte unter SMP-114 im Wildtyp tendenziell höher lagen als unter NT ($0,34 \pm 0,02$ (NT) vs. $0,38 \pm 0,03$ (SMP-114); $p = 0,28$, $N_{NT} = 39$, $N_{SMP-114} = 34$).

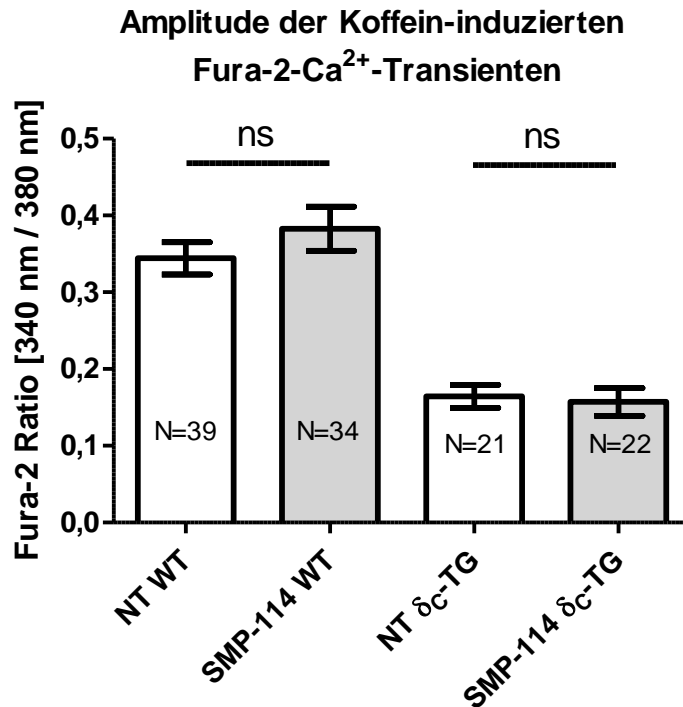


Abbildung 3-18 Amplituden der Koffein-induzierten Transienten als Korrelat für den Gesamt SR Ca²⁺-Gehalt der Zellen

Es sind keine signifikanten Unterschiede der Amplituden erkennbar, wohl aber ein allgemein deutlich geringerer SR Ca²⁺-Gehalt der transgenen Zellen.

Die Relaxationskinetik der Koffein Transienten kann Aufschluss über die Funktion des NCX geben, da bei durch Koffein anhaltend geöffnetem RyR2 ein Speichern der Ca²⁺-Ionen im SR nicht möglich ist und die Ca²⁺-Elimination aus dem Zytosol überwiegend über den NCX getragen wird (vgl. 2.3.2). Während die rt_{50} im Wildtyp unter SMP-114 signifikant verkürzt war ($1,09 \pm 0,09$ s (NT) vs. $0,87 \pm 0,04$ s (SMP-114); $p = 0,04$; $N_{NT} = 39$, $N_{SMP-114} = 33$) waren weder rt_{80} ($2,08 \pm 0,14$ s (NT) vs. $1,94 \pm 0,10$ s (SMP-114); $p = 0,42$; $N_{NT} = 32$, $N_{SMP-114} = 31$) noch die Zeitkonstante τ ($1,70 \pm 0,11$ (NT) vs. $1,63 \pm 0,10$ (SMP-114); $p = 0,67$; $N_{NT} = 39$, $N_{SMP-114} = 34$) signifikant verändert. In den Messungen an CaMKII δ_C -transgenen Zellen zeigten sich für keinen der Relaxationsparameter signifikante Unterschiede zwischen Normaltyrode und SMP-114.

Aus dem Verhältnis zwischen elektrisch stimulierten Transienten bei 1 Hz, verglichen mit dem Koffein-induzierten Transienten, lässt sich die prozentuale Ca²⁺-Freisetzung des Gesamt SR Ca²⁺-Gehalts bei kontinuierlicher 1 Hz-Stimulation (*fractional release*) berechnen.

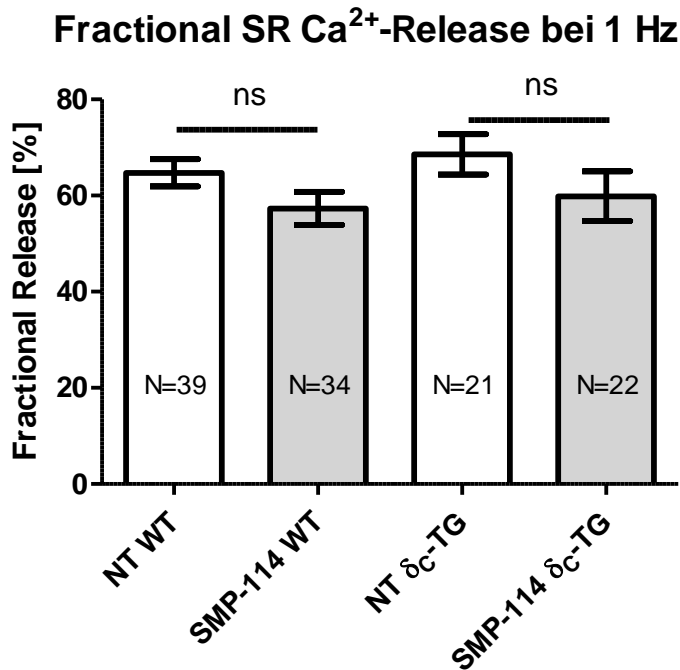


Abbildung 3-19 Fractional SR Ca²⁺-Release bei 1 Hz-Stimulation

Durch Bilden des Verhältnisses der 1 Hz-Fura-2-Amplituden zu den Amplituden der Koffein-Transienten erhält man Informationen darüber, welcher Anteil der im SR gespeicherten Kalziumionen pro Schlag freigesetzt werden. Bei den Messungen fanden sich weder im Wildtyp noch in transgenen Zellen signifikante Unterschiede.

In den Messungen zur vorliegenden Arbeit fanden sich nach SMP-114 Inkubation keine signifikanten Unterschiede des *fractional release* gegenüber Normaltyrode (Wildtyp: 64,7±2,8 % (NT) vs. 57,3±3,4 % (SMP-114); $p = 0,10$, $N_{NT} = 39$, $N_{SMP-114} = 34$; δ_C -TG: 68,6±4,2 % (NT) vs. 59,9±5,2 % (SMP-114); $p = 0,20$, $N_{NT} = 21$, $N_{SMP-114} = 22$)

3.7 Frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation

Eine Rolle der CaMKII für die frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation war in der Vergangenheit angenommen worden, neuere Arbeiten haben jedoch keine CaMKII-Abhängigkeit dieses Mechanismus gezeigt. Auch in der vorliegenden Arbeit hatte SMP-114 10 μ M keinen Einfluss auf die frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation (Abbildung 3-20). Das Verhältnis zwischen rt_{80} bei 2 Hz und rt_{80} bei 1 Hz lag unter SMP-114 bei $0,59 \pm 0,02$ ($N_{SMP-114} = 28$) gegenüber Normaltyrode $0,63 \pm 0,02$ ($N_{NT} = 34$, $p = 0,15$) im Wildtyp. In CaMKII δ_C -transgenen Zellen betrug das Verhältnis $rt_{80_{2\text{ Hz}}} / rt_{80_{1\text{ Hz}}}$ $0,38 \pm 0,03$ (SMP-114, $N = 25$) gegenüber $0,38 \pm 0,02$ (NT, $N = 28$). Auch im Vergleich der $rt_{80_{4\text{ Hz}}}$ und $rt_{80_{1\text{ Hz}}}$ zeigte ließ sich kein Einfluss von SMP-114 beobachten.

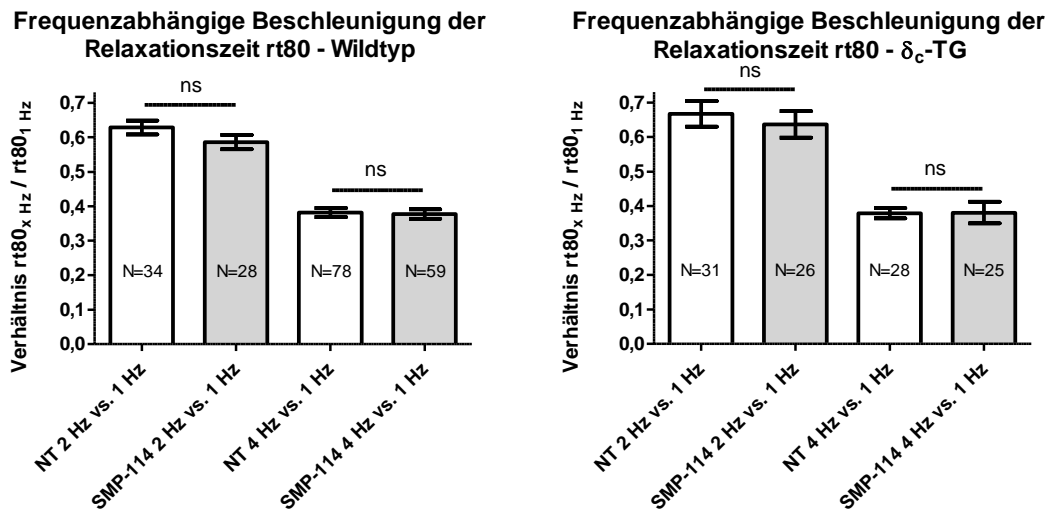


Abbildung 3-20 Frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation

In beiden Gruppen findet sowohl in Wildtyp als auch in CaMKII δ_C -transgenen Zellen eine Verkürzung der Relaxationszeiten bei 2 Hz- und 4 Hz-Stimulationsfrequenzen gegenüber 1 Hz statt, keine signifikanten Unterschiede zwischen Normaltyrode und SMP-114.

3.8 GPZ5851 und GPZ7505 – Evaluation der Effekte zweier weiterer potenzieller CaMKII-Inhibitoren

Als zusätzliche potenzielle CaMKII-Inhibitoren wurden die small molecules GPZ5851 und GPZ7505 in einigen Messreihen neben SMP-114 10 μM , myrAIP und Normaltyrode getestet. Die gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden gebündelt zusammengefasst, da GPZ5851 und GPZ7505 nicht in allen Experimenten getestet wurden und eine Integration in die oberen Abschnitte die Übersichtlichkeit der Darstellung und Diskussion mindern würde. Ebenso wird auf die Gründe, warum beide Ansätze nicht mit allen Methoden gemessen wurden, eingegangen werden.

3.8.1 Auswirkungen von GPZ5851 auf die elektromechanische Kopplung

Die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop wurden bedingt durch die chronologische Abfolge der Durchführung der Experimente für GPZ5851 nur an CaMKII δ_C -transgenen Zellen durchgeführt.

Die Relaxationszeit rt_{50} und rt_{80} wurde durch GPZ5851 5 μM nicht signifikant beeinflusst (Fluo-3: $rt_{50_{\text{NT}}} = 0,13 \pm 0,00 \text{ s}$ vs. $rt_{50_{\text{GPZ5851}}} = 0,13 \pm 0,00 \text{ s}$; $p = 0,14$ und $rt_{80_{\text{NT}}} = 0,25 \pm 0,01 \text{ s}$ vs. $rt_{80_{\text{GPZ5851}}} = 0,24 \pm 0,01 \text{ s}$ $p = 0,29$; jeweils $N_{\text{NT}} = 45$, $N_{\text{GPZ5851}} = 32$), auch bei den Fura-2 Messungen zeigten sich keinerlei Unterschiede.

Während weder die Amplituden der Fura-2 Ca^{2+} -Transienten ($0,09 \pm 0,01$ (NT) vs. $0,08 \pm 0,01$ (GPZ5851), $p = 0,140$, $N_{\text{NT}} = 49$, $N_{\text{GPZ5851}} = 50$) noch die F/F_0 der Fluo-3-Messungen ($2,07 \pm 0,08$ (NT) vs. $2,30 \pm 0,15$ (GPZ5851), $p = 0,15$, $N_{\text{NT}} = 45$, $N_{\text{GPZ5851}} = 32$) eine signifikante Änderung gegenüber Normaltyrode erkennen ließen, war die prozentuale Sarkomerlängenverkürzung in der Fura-2 Messreihe tendenziell ($3,9 \pm 0,5$ % (NT) vs. $5,0 \pm 0,3$ % (GPZ5851); $p = 0,06$, $N_{\text{NT}} = 49$, $N_{\text{GPZ5851}} = 50$) und in der Fluo-3-Messreihe (Abbildung 3-21) durch GPZ5851 5 μM signifikant verbessert ($4,5 \pm 0,4$ % (NT) vs. $7,1 \pm 0,7$ % (GPZ5851); $p = 0,001$; $N_{\text{NT}} = 45$, $N_{\text{GPZ5851}} = 32$).

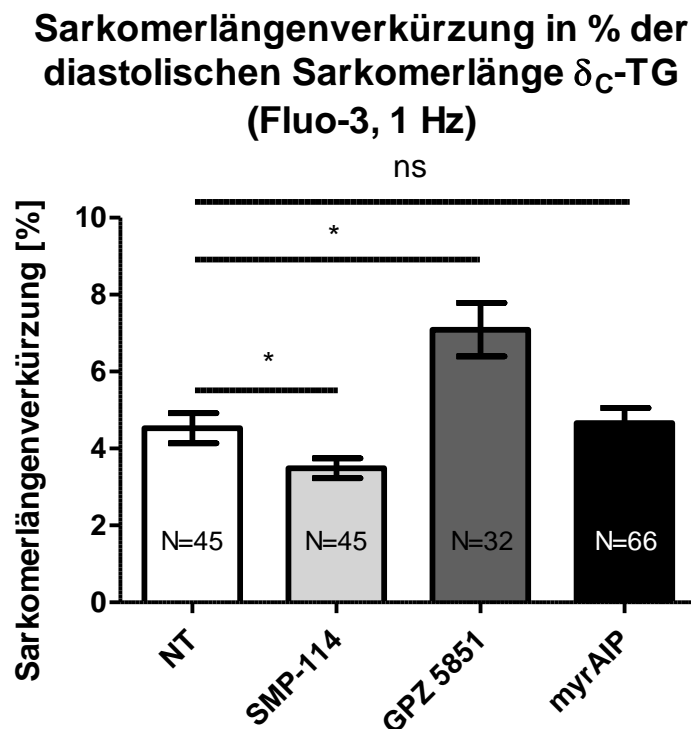


Abbildung 3-21 Sarkomerlängenverkürzung GPZ5851

Signifikant stärkere prozentuale Kontraktion unter GPZ5851 5 μM gegenüber Normaltyrode. Dagegen verringert sich die Kontraktionsamplitude unter SMP-114 10 μM signifikant. Nach Inkubation mit dem etablierten CaMKII-Inhibitor myrAIP 1 μM keine Veränderung der Sarkomerlängenverkürzung.

Die Post-Pausen-Potenzierung von Fura-2- Ca^{2+} -Transienten-Amplituden ($139,7 \pm 5,4$ % (NT) vs. $130,0 \pm 13,0$ % GPZ5851; $p = 0,43$; $N_{\text{NT}} = 15$, $N_{\text{GPZ5851}} = 9$) und Sarkomerlängenverkürzung ($255,4 \pm 32,6$ % (NT) vs. $252,4 \pm 43,9$ % (GPZ5851); $p = 0,96$, $N_{\text{NT}} = 13$, $N_{\text{GPZ5851}} = 8$) waren ebenso wenig signifikant verändert wie die Fura-2-Koffein-Transienten-Amplitude als Gradmesser für den SR Gesamt Ca^{2+} -Gehalt der Zelle ($0,16 \pm 0,02$ (NT) vs. $0,13 \pm 0,01$ (GPZ5851); $p = 0,10$, $N_{\text{NT}} = 21$, $N_{\text{GPZ5851}} = 20$).

3.8.2 Auswirkungen von GPZ5851 auf Ca²⁺-Spark-Frequenz und Anteil sparkender Zellen

Auch Ca²⁺-Spark-Messungen wurden mit GPZ5851 nur an CaMKII δ_C -transgenen Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der Ca²⁺-Spark-Frequenz bezogen auf alle Zellen ($1,00 \pm 0,13$ (NT) vs. $0,90 \pm 0,13$ (GPZ5851) Ca²⁺-Sparks pro Zelle; $p = 0,02$, $N_{NT} = 404$, $N_{GPZ5851} = 361$).

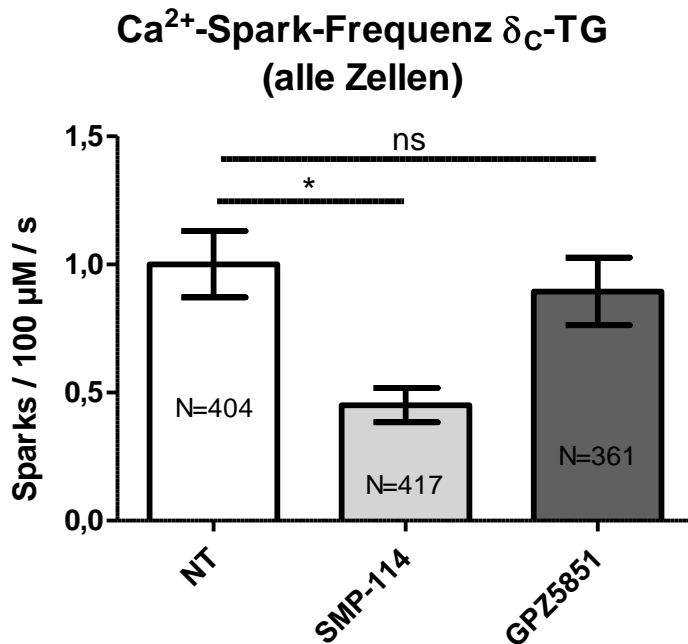


Abbildung 3-22 Ca²⁺-Spark-Frequenz unter GPZ5851

Nicht signifikante Reduktion der Ca²⁺-Spark-Frequenz unter GPZ5851. Die Reduktion durch SMP-114 fällt wesentlich stärker aus und ist statistisch signifikant.

Die Reduktion der Ca²⁺-Spark-Frequenz fiel unter GPZ5851 nicht so deutlich aus wie durch SMP-114. Auch der Anteil sparkender Zellen war im Gegensatz zu SMP-114 gegenüber Normaltyrode nicht signifikant reduziert (32,7% NT vs. 30,2% GPZ5851; $p = 0,48$).

3.8.3 Effekte von GPZ7505 auf die elektromechanische Kopplung

Der potentielle CaMKII-Inhibitor GPZ7505 wurde in den Experimenten am Epifluoreszenzmikroskop an Wildtyp-Kardiomyozyten im Vergleich zu Normaltyrode untersucht. Auf die diastolische Ca²⁺-Elimination zeigten sich die in Abbildung 3-23 dargestellten Effekte.

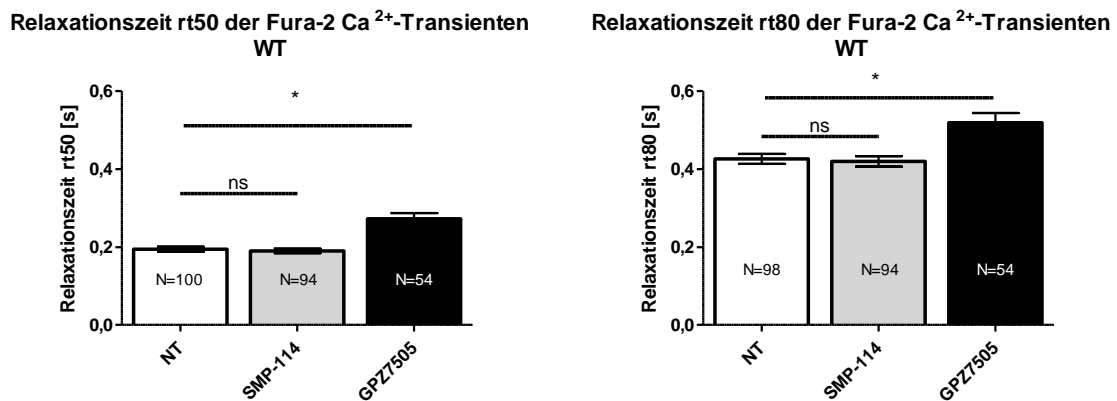


Abbildung 3-23 Verlängerung der Ca²⁺-Transienten-Relaxationszeit durch GPZ7505

Sowohl die rt50 als auch die rt80 sind unter GPZ7505 Inkubation deutlich verlängert. Im Wildtyp keine Veränderung der Relaxationszeit unter SMP-114.

Der deutlich verlängerten Relaxationszeit standen um 31,8 % signifikant ($0,20 \pm 0,01$ (NT) vs.: $0,14 \pm 0,01$ (GPZ7505); $p < 0,001$, $N_{NT} = 100$, $N_{GPZ7505} = 54$) kleinere Fura-2-Transientenamplituden gegenüber. Die erniedrigte Ca²⁺-Freisetzung ging auch mit einer tendenziell geringeren Sarkomerlängenverkürzung von: $4,3 \pm 0,3$ % (NT) vs. $3,4 \pm 0,3$ % (GPZ7505); $p = 0,01$, $N_{NT} = 100$, $N_{GPZ7505} = 54$) einher.

Während die Fura-2-Basisratio als Messgröße für die diastolische Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ nicht signifikant verändert war ($0,481 \pm 0,009$ (NT) vs. $0,469 \pm 0,011$ (GPZ 7505); $p = 0,435$; $N_{NT} = 100$, $N_{GPZ7505} = 54$) ergab sich eine nur sehr schwach ausgeprägte Post-Pausen-Potenzierung der Ca²⁺-Transienten (Abbildung 3-24) und verringerte Koffein-Transienten-Amplituden (Abbildung 3-25) als Maß des SR Ca²⁺-Gehalts.

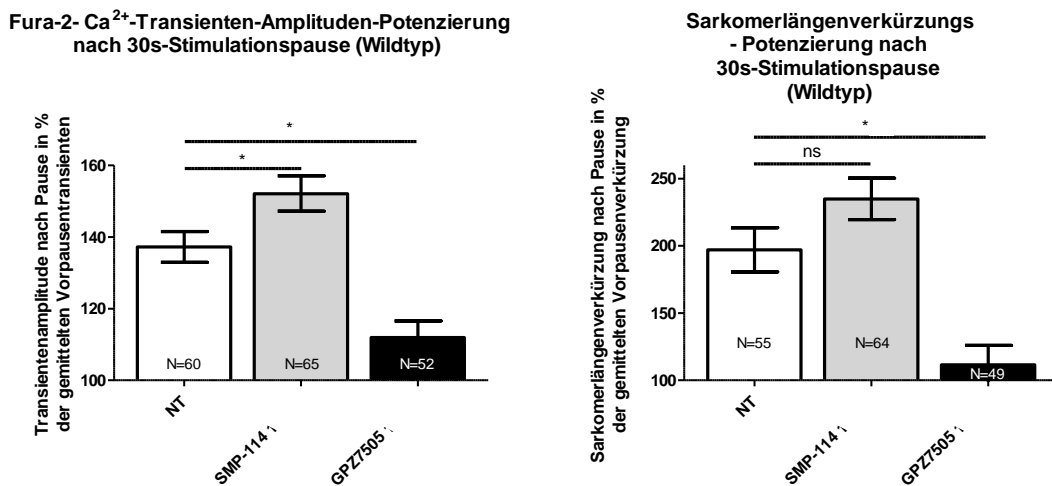


Abbildung 3-24 Post-Pausen-Potenzierung von Ca²⁺-Transientenamplitude und Sarkomerlängenverkürzung unter GPZ7505

Wesentlich geringer ausgeprägte Post-Pausen-Potenzierung von Ca²⁺-Transienten und Kontraktions-Amplituden im Vergleich zu Normaltyrode und SMP-114 unter GPZ7505.

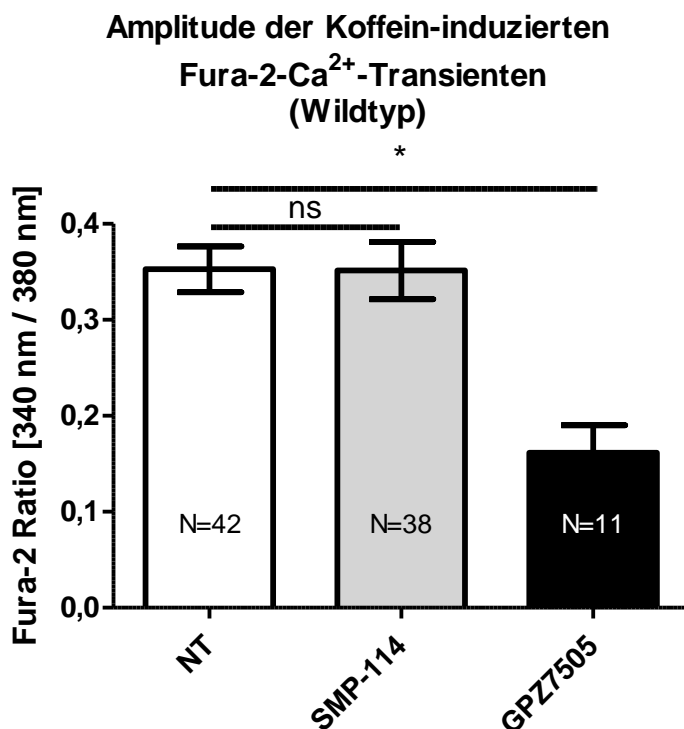


Abbildung 3-25 Koffein-Transienten-Amplituden als Messgröße des SR Ca²⁺-Gehalts unter GPZ7505

Deutlich geringerer SR Ca²⁺-Gehalt nach Inkubation mit GPZ7505. Keine Änderung unter SMP-114.

Ca²⁺-Spark-Messungen konnten mit GPZ7505 nicht ausgewertet werden, da in der Mehrzahl der gemessenen Zellen ausschließlich der GPZ7505-Gruppe reproduzierbar nach Beginn der Messung eine arrhythmische Bewegung der gesamten Zelle auftrat, während derer die Fluo-4-Fluoreszenz in der gesamten Zelle durchgehend extrem hohe Werte aufwies. In der Folge verlor die Zelle ihre Integrität, rollte sich zu einem

kugelförmigen Gebilde zusammen und starb. Dieses Phänomen trat auf, nachdem sich die Zelle vor dem Laser-Scan morphologisch völlig intakt und gleichmäßig auf jede Stimulation hin kontrahierend gezeigt hatte. Das beschriebene arrhythmische Wabern trat erst bei oder nach der ersten Messung auf, während die Zelle im Fokus des Argon-Lasers lag. Dieses Phänomen war in parallel durchgeführten Konfokal-Messungen mit anderen Substanzen nicht zu beobachten.

Ob GPZ7505 die Resistenz der Zellen gegen Stress (Laserstrahleinwirkung) herabminderte, das Molekül selbst zu toxischen Spaltprodukten zerfiel oder andere Gründe zu diesem Phänomen führten, konnte nicht beurteilt werden. Eine Verwertung der Konfokal-Messungen war damit für GPZ7505 in jedem Fall nicht möglich und da auch bei Einsatz in der niedrigeren Konzentration von 1 μM das gleiche Phänomen auftrat, wurde diese Substanz in den anderen Experimenten zur vorliegenden Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen des neuartigen CaMKII-Inhibitors SMP-114 auf Herzmuskelzellen untersucht. Nachdem SMP-114 für den Einsatz gegen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis schon in klinischen Phase II-Studien an menschlichen Probanden und Patienten getestet wurde und diverse wissenschaftliche Arbeiten Wirkungen etwa auf die Produktion von Zytokinen, putativ vermittelt über eine Inhibition der CaMKII, darlegen (vgl. 1.5.3), war es Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, die Effekte von SMP-114 auf Kardiomyozyten zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass SMP-114 die Zahl und das Ausmaß spontaner Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und somit das diastolische Ca^{2+} -Leck isolierter muriner Kardiomyozyten dramatisch verringert. Damit wird eine wichtige pathophysiologische Grundlage von Arrhythmie-Initiierung und Herzinsuffizienz-Entwicklung reduziert. In diesem Zusammenhang fiel auch die Reduktion der SCR-Events, spontaner Ca^{2+} -Freisetzungen ins Zytosol mit sukzessiver Zellkontraktion, auf. Diese beiden genannten Effekte entsprechen den von einem CaMKII-Inhibitor zu erwartenden Wirkungen, die für etablierte Inhibitoren von verschiedenen Gruppen in der Vergangenheit gezeigt wurden (u.a. SAG et al. 2009, VOIGT et al. 2012, MAIER et al. 2003).

Ein erwarteter Effekt eines CaMKII-Inhibitors war auch in der Verlängerung der Transientenrelaxationszeit zu beobachten, die in den Messungen von Kardiomyozyten der die $\text{CaMKII}\delta_C$ überexprimierenden transgenen Mäuse evident war. Ursächlich könnte dies auf eine in Folge der CaMKII-Inhibition durch SMP-114 verminderte Phosphorylierung von Phospholamban mit konsekutiv vermehrter SERCA2a-Hemmung zurückzuführen sein (vgl. 1.2).

Keine Effekte von SMP-114 waren dagegen auf die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten, die Kontraktionsamplitude, die Koffein-Transienten als Korrelat des Gesamt SR Ca^{2+} -Gehalts sowie die zytosolischen diastolischen Ca^{2+} -Level nachweisbar.

4.1 SMP-114 reduziert das SR Ca^{2+} -Leck dramatisch

Die Häufigkeit des Auftretens von Ca^{2+} -Sparks – spontanen, lokalisierten Ca^{2+} -Freisetzungen durch Cluster von öffnenden Ryanodin-Rezeptoren in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums – wurde unter SMP-114 im Wildtyp drastisch reduziert. Die Verringerung betrug über die Hälfte bei ausschließlicher Betrachtung von

sparkenden Zellen bzw. über drei Viertel bei Einbeziehung auch nicht-sparkender Zellen gegenüber der Kontrolle. Auch in CaMKII δ_C -transgenen Zellen wurde statistisch signifikant die Ca²⁺-Spark-Frequenz um mehr als die Hälfte reduziert. Solch drastische Reduktionen der Ca²⁺-Spark-Frequenz sind bislang für etablierte CaMKII-Inhibitoren wie KN-93 (u.a. MAIER et al. 2003, SAG et al. 2009, NEEF et al. 2010) und AIP (CURRIE et al. 2004) beschrieben.

Bei der Quantifizierung der Ca²⁺-Spark-Parameter (vgl. 3.1.1) fiel auf, dass die Ca²⁺-Spark-Amplitude unter SMP-114 geringfügig vermindert war, wobei diese nur in transgenen Zellen statistische Signifikanz erreichte. Auch die Dauer (FDHM) der einzelnen Ca²⁺-Sparks war tendenziell kürzer unter SMP-114, hier jedoch lediglich im Wildtyp signifikant. Die räumliche Ausdehnung der Ca²⁺-Sparks war ebenfalls im Wildtyp signifikant und in CaMKII δ_C -transgenen Zellen tendenziell kleiner.

Auch in der Literatur finden sich für diese Ca²⁺-Spark-Charakteristika unter CaMKII-Inhibition keine stark ausgeprägten Effekte. SAG et al. 2009 fanden keine signifikanten Unterschiede der Ca²⁺-Spark-Amplitude unter KN-93 bei Isoproterenol-Provokation gegenüber dem inaktiven Analogon KN-92. VAN OORT et al. 2010 beobachteten ebenfalls keine Änderungen der Amplitude, Dauer (FDHM) und Größe (FSHM) durch konstitutionelle Ausschaltung der CaMKII-Phosphorylierungsstelle S2814 des RyR2 in der S2814A-Maus (vgl. 1.4.2) gegenüber der konstitutionell aktivierten Phosphorylierung in der S2814D-Maus oder in Wildtyp-Mäusen. Die Ergebnisse dieser beiden Publikationen legen ebenso wie die Resultate der vorliegenden Arbeit nahe, dass der positive Effekt einer CaMKII-Inhibition auf das SR Ca²⁺-Leck und die Arrhythmieentwicklung hauptsächlich auf die in allen Arbeiten verringerte Ca²⁺-Spark-Frequenz und nicht primär auf eine geringere Größe der einzelnen Ca²⁺-Sparks zurückzuführen ist.

Abhängig von Ca²⁺-Spark-Frequenz und -Größe ist das gesamte diastolische SR Ca²⁺-Leck pro Zelle. Das *Total Leak HM* wurde durch SMP-114 signifikant auf weniger als ein Viertel in Wildtyp-Zellen und weniger als die Hälfte in transgenen Zellen reduziert.

In die obige Berechnung des Ca²⁺-Lecks pro Zelle gehen nur sparkende Zellen ein. Konsequenterweise muss der unter SMP-114 ebenfalls signifikant geringere Anteil an Zellen, die während des Messzeitraums keine Ca²⁺-Sparks aufweisen, auch in die Berechnung des diastolischen Ca²⁺-Lecks Eingang finden (vgl. 2.4.3, Abbildung 2-12). Wenn alle nicht-sparkenden Zellen in die Berechnung einbezogen werden, ergibt sich

eine dramatische Verringerung des *Total Leak HM* durch SMP-114 um 85 % im Wildtyp und 61 % in CaMKII δ_C -transgenen Zellen.

Ähnlich deutliche Auswirkungen etablierter CaMKII-Inhibitoren auf das SR Ca²⁺-Leck sind auch in der Literatur zu finden (u.a. SAG et al. 2009; NEEF et al. 2010). Auch in Experimenten an humanen Ventrikel-Muskelstreifen aus herzinsuffizienten Patienten konnten SOSALLA et al. 2010 zeigen, dass die etablierten CaMKII-Inhibitoren KN-93 und AIP das SR Ca²⁺-Leck reduzieren.

SAG et al. konnten darüber hinaus schon 2009 nachweisen, dass eine Reduktion des SR Ca²⁺-Lecks *in vitro* durch KN-93 auch *in vivo* mit einer reduzierten Suszeptibilität für Arrhythmien korreliert. VAN OORT et al. zeigten 2010, dass eine verringerte Phosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors durch die CaMKII an deren spezifischer Stelle S2814 zu einer Verringerung der oben genannten *in vitro*-Arrhythmie-Korrelate und darüber hinaus auch zu einer reduzierten *in vivo* Suszeptibilität für Arrhythmien führt. Diese Erkenntnisse unterstreichen die klinische Relevanz des SR Ca²⁺-Lecks und machen einen therapeutischen Einsatz von SMP-114 in der Herzinsuffizienz umso interessanter, gerade vor dem Hintergrund der oralen Bioverfügbarkeit sowie der bereits erfolgten klinischen Phase II Studien (vgl. 1.5.3) in der rheumatoiden Arthritis.

Zusätzliche klinische Bedeutung erlangen diese Ergebnisse, wenn man die erhöhte Ca²⁺-Spark-Frequenz und das erhöhte SR Ca²⁺-Leck in humanen Proben von Vorhofflimmer-Patienten, die NEEF et al. 2010 sowie VOIGT et al. 2012 nachweisen konnten, betrachtet. In deren Arbeit waren diese beiden gegenüber Proben von Patienten ohne Vorhofflimmern erhöhten Parameter durch den CaMKII-Inhibitor KN-93 reversibel. Da für diese zytotoxische, experimentelle Substanz (vgl. 1.5.2) jedoch keine Zulassung für die klinische Anwendung beantragt ist, wäre die Evaluation der Effekte von SMP-114 auf Vorhofflimmer-Proben ein interessanter weiterer Schritt mit potenziell hoher klinischer Bedeutung.

4.2 Reduktion von zellulären Arrhythmien durch SMP-114

SCR-Events sind definiert als spontane Ca²⁺-Freisetzungseignisse der gesamten Zelle (im Gegensatz zu Ca²⁺-Sparks, welche streng lokal subzelluläre Ereignisse sind) mit konsekutiv damit einhergehender spontaner Kontraktion der Zelle (vgl. RESPRESS et al. 2012). Diese werden als zelluläre Arrhythmie-Korrelate angesehen und ihr Auftreten

während der Stimulationspause entsprechend als zelluläres Maß für die Arrhythmogenese genutzt (VOIGT et al. 2012; SAG et al. 2009)

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduktion von SCR-Events während einer dreißigsekündigen Stimulationspause durch SMP-114 gezeigt werden. RESPRESS et al. konnten 2012 zeigen, dass sowohl der CaMKII-Inhibitor KN-93 als auch eine blockierte CaMKII-Phosphorylierungsstelle am Ryanodin-Rezeptor (S2814A-Maus) sich in geringerer Inzidenz und niedrigeren Mittelwerten von SCR-Events niederschlagen. Sie konnten keine Unterschiede bezüglich der SCR event-Häufigkeit zwischen der pharmakologischen CaMKII-Inhibition mit KN-93 und der genetischen Ryanodin-Rezeptor Phosphorylierungsprävention der S2814A-Maus erkennen und vermuten daher, in der CaMKII-abhängigen RyR2-Phosphorylierung an der Stelle S2814 den wesentlichen Promotor des erhöhten SR Ca^{2+} -Lecks und der erhöhten Arrhythmie-Anfälligkeit bei Herzinsuffizienz und hoher CaMKII-Aktivität gefunden zu haben (vgl. RESPRESS et al. 2012, VAN OORT et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit führt SMP-114 zu einer Reduktion von SCR-Events. Gleichzeitig ist das SR Ca^{2+} -Leck stark reduziert. Entsprechend kann vermutet werden, dass auch hier die durch CaMKII-Inhibition herbeigeführte Reduktion des Ca^{2+} -Lecks durch den Ryanodin-Rezeptor Grundlage für diese antiarrhythmischen Effekte ist, zumal auch in anderen Arbeiten eine Korrelation zwischen erhöhtem SR Ca^{2+} -Leck und Häufigkeit des Auftretens von SCR-Events gefunden werden konnte (vgl. SARMA et al 2010, RESPRESS et al. 2012). Nachdem SAG et al. 2009 eine Verringerung der Arrhythmie-Inzidenz *in vivo* durch den CaMKII-Inhibitor KN-93 nachweisen konnten und auch die S2814A-Maus *in vivo* seltener Arrhythmien aufweist als Wildtyp-Mäuse, deutet das reduzierte Auftreten der SCR-Events auf einen antiarrhythmischen Effekt des SMP-114 hin. Dies erscheint besonders bedeutsam vor dem Hintergrund, dass 30 – 50 % der Herzinsuffizienz-Patienten in Folge von Arrhythmien sterben (vgl. 1.3.1; PACKER et al. 2009) und dass die absolute Arrhythmie bei Vorhofflimmern mit Herzinsuffizienz assoziiert ist und deren Klinik verschlechtern kann (vgl. 1.3.4; 1.4.2). Im Hinblick auf die *in vivo* nachgewiesenen positiven antiarrhythmischen Effekte einer CaMKII-Inhibition wäre daher auch eine *in vivo*-Evaluation des oral bioverfügbaren SMP-114 bezüglich der Reduktion von Arrhythmien ein weiterer interessanter Schritt.

4.3 Stärkere Post-Pausen-Potenzierung durch SMP-114

Beim Vergleich der Ca^{2+} -Transienten vor und nach 30 Sekunden Stimulationspause fiel auf, dass unter SMP-114 die prozentuale Amplitudenpotenzierung signifikant höher ausfiel als unter Normaltyrode. Dabei war diese in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -überexprimierenden transgenen Zellen noch ausgeprägter als im Wildtyp. Einhergehend mit der größeren Ca^{2+} -Freisetzung nach Stimulationspause fiel auch die Zunahme der Kontraktionsamplitude unter SMP-114 höher aus. Wiederum in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Zellen war der Unterschied mit einer Zunahme auf mehr als ein Vierfaches der gemittelten Vorpausenkontraktionsamplitude unter SMP-114 gegenüber einer 2,5-fachen Steigerung unter Normaltyrode stärker ausgeprägt. In den Wildtyp-Zellen zeigte sich ebenfalls eine tendenziell deutlichere Potenzierung, die im Gegensatz zu den gemessenen transgenen Zellen jedoch statistisch nicht signifikant war.

Insgesamt zeigen damit diese Messungen eine deutlich verbesserte Ca^{2+} -Akkumulationsfähigkeit des SR durch SMP-114. Für die etablierten CaMKII -Inhibitoren KN-93 und AIP ist ein derartiges Post-Stimulationspausen-Verhalten mit Ca^{2+} -Transienten- und Kontraktionsamplitudenpotenzierung bereits beschrieben, was auf Veränderungen der Ca^{2+} -Freisetzungs- und Eliminationsprozesse, die auch ein geringeres diastolisches SR Ca^{2+} -Leck inkludieren, zurückgeführt wird (vgl. u.a. SOSALLA et al. 2010).

4.4 Uneinheitliche Effekte von SMP-114 auf die elektromechanische Kopplung

Fura-2 ist aufgrund seiner hohen Ca^{2+} -Pufferung nicht gut zur Untersuchung der Abfall-Kinetik der Ca^{2+} -Transienten geeignet. Mit dem hierfür sehr viel besser geeigneten Farbstoff Fluo-3 (vgl. 2.1.3) zeigt sich unter SMP-114 in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Zellen eine hochsignifikante Verlängerung der Relaxationszeiten, in Wildtyp-Zellen fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (vgl. 3.2.1). Unter SMP-114 blieb dabei dennoch in beiden Genotypen die frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation erhalten. Diese stellt die Fähigkeit des Herzmuskels dar, bei höheren Herz- bzw. Stimulationsfrequenzen (und damit kürzeren Zyklusdauern) die Relaxation zu beschleunigen bzw. die Relaxationsphase zu verkürzen (vgl. 3.7). Für eine potentielle klinische Anwendung von SMP-114 ist es wichtig, dass die frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation nicht stark beeinträchtigt wird, da ansonsten die

Ventrikelfüllung in der Diastole bei höheren Herzfrequenzen beeinträchtigt werden könnte (vgl. DeSANTIAGO et al. 2002; HASENFUSS et al. 1994).

In dieser Arbeit ließ sich weder im Wildtyp- noch in TG-Kardiomyozyten ein Effekt von SMP-114 auf die diastolischen zytosolischen Ca^{2+} -Level nachweisen, die über die Fura-2- Ca^{2+} -Fluoreszenz in der Diastole bestimmt wurden. NEEF et al. hatten 2010 in humanen Vorhofmyokardzellen aus Patienten mit Vorhofflimmern erhöhte diastolische Ca^{2+} -Level nachweisen können, die durch den CaMK-Inhibitor KN-93 auf die Werte vergleichbar mit denen aus Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus zurückzuführen waren. In Zellen aus Patienten mit Sinusrhythmus war durch CaMK-Inhibition allerdings keine weitere Reduktion der diastolischen Ca^{2+} -Spiegel zu beobachten. Dass in der vorliegenden Arbeit kein Effekt von SMP-114 zu beobachten war, könnte einerseits auf Unterschiede in der Physiologie zwischen humanen Vorhof- und murinen Ventrikelzellen, wie längerer AP-Dauer mit u.U. größerer Auswirkung einer durch CaMK-Inhibition verlangsamten Ca^{2+} -Elimination (rt50 , rt80 \uparrow) beruhen, andererseits deutet das bei TG gegenüber WT nicht erhöhte Ca^{2+} -Leck (3.1.3) darauf hin, dass auch bei TG-Mäusen möglicherweise noch keine ausgeprägte Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung vorlag. Analog zu den bei NEEF et al. 2010 beobachteten fehlenden Einflüssen einer CaMK-Inhibition auf die diastolischen Ca^{2+} -Level im Sinusrhythmus-Myokard, könnten somit die fehlenden Einflüsse hier auch durch die in TG nicht erhöhten Ausgangswerte begründet sein.

Die Effekte von SMP-114 auf die Amplitude bzw. das F/F_0 der Ca^{2+} -Transienten waren uneinheitlich. Bei im Wildtyp unveränderten 1 Hz-Fura-2-Amplituden zeigten die ohnehin extrem niedrigen Amplituden in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Zellen eine signifikant geringere Höhe unter SMP-114. Diese Unterschiede wurden in Fluo-3- F/F_0 -Messungen jedoch nicht bestätigt. Bei höheren Stimulationsfrequenzen 2 Hz und 4 Hz war unter Fura-2 eine zunehmende Beeinträchtigung der Amplitudenhöhen insbesondere unter SMP-114 zu beobachten, die bei 4 Hz sowohl im Wildtyp als auch in $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -transgenen Zellen signifikant geringer als unter Normaltyrode ausfielen (vgl. 3.2.3). An humanem insuffizienten Myokardmuskelstreifen zeigten SOSALLA et al. (2010) eine positive Auswirkung einer CaMK-Inhibition auf die von der Ca^{2+} -Ausschüttung abhängige Kraft-Frequenz-Beziehung. Dass die Ca^{2+} -Freisetzung (gemessen über die Fura-2 Amplitude) in der vorliegenden Arbeit durch SMP-114 nicht gesteigert wurde, könnte wiederum durch die fehlende manifesten Herzinsuffizienz der TG-Zellen

bedingt sein, auch SOSALLA et al. (2010) sahen keinen signifikanten Effekt an Muskelstreifen aus nicht insuffizienten Schafsherzen.

Ein ähnlich uneinheitliches Bild wie die Ca^{2+} -Amplituden zeichnete die Betrachtung des durchschnittlichen Ausmaßes der Sarkomerlängenverkürzung als Messgröße für die Kontraktionskraft. Während auch hier im Wildtyp keine Unterschiede unter SMP-114 zur Normaltyrode messbar waren, fiel die Sarkomerlängenverkürzung der CaMKII δ_{C} -transgenen Zellen signifikant geringer als unter Normaltyrode aus. Diese beobachtete negativ inotrope Wirkung steht zunächst also im Kontrast zu der unter SMP-114 ebenfalls in transgenen Zellen auffälligen signifikant größeren Post-Pausen-Kontraktionspotenzierung (vgl. 3.5, 4.2).

Ein möglicher Erklärungsansatz dieses Phänomens – signifikant geringere Kontraktionskraft unter SMP-114 bei 1 Hz-Stimulation, signifikant stärkere Potenzierung der Kontraktionskraft nach 30 Sekunden Stimulationspause – ist die in transgenen Zellen unter SMP-114 verlängerte Relaxationszeit der Ca^{2+} -Transienten, die auf die durch CaMKII-Inhibition reduzierte SERCA-Funktion mit konsekutiv verlangsamtem Rücktransport der Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol ins SR zurückzuführen sein könnte. In Folge dessen stehen beim nächsten Aktionspotenzial weniger Ca^{2+} -Ionen zur Freisetzung aus dem SR zu Verfügung. Besonders auch bei den höheren Stimulationsfrequenzen kann somit ein langsamerer Ca^{2+} -Transientenabfall negative Auswirkungen auf das beim nächsten Stimulus zur Ausschüttung zur Verfügung stehende Ca^{2+} -Reservoir haben und dadurch zu niedrigeren Amplituden führen. Zumindest gegen ausgeprägte Auswirkungen der verlängerten Transientenabfallszeit bei 1 Hz spräche allerdings der insgesamt unveränderte Gesamt SR Ca^{2+} -Gehalt (vgl. 3.6, 4.5).

Die deutlichere Post-Pausen-Potenzierung könnte hingegen auf das dramatisch geringere diastolische SR Ca^{2+} -Leck (vgl. 3.1.5, 4.1) zurückzuführen sein, dessen Effekt sich bei einer fast dreißigsekündigen Diastole deutlicher auswirkt als bei einer Diastolendauer von unter einer Sekunde während der normalen Stimulation. Wahrscheinlich ist meiner Ansicht nach, dass der geringere Ca^{2+} -Ionen-Verlust über das SR den größeren Anteil der starken Post-Pausen-Potenzierung unter SMP-114 trägt; dass die insbesondere durch SERCA2a-Hemmung infolge CaMKII-Inhibition verlängerte Relaxationszeit aber durchaus zur verringerten Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängenverkürzung beiträgt. Desweiteren könnte eine unter SMP-114

tendenziell verringerte Ausschüttungsfraction (*fractional release*) des Gesamt SR Ca^{2+} -Gehalts (3.6; 4.5) zu den geringeren Amplituden bei Fura-2 beitragen.

Auch in einigen bislang veröffentlichten Arbeiten zur CaMKII-Inhibition finden sich uneinheitliche Effekte auf Relaxationszeit, Transientenamplitude und Kontraktionskraft. Während KOHLHAAS et al. 2006 beispielsweise eine signifikante Verlängerung der rt80 unter KN-93 in Messungen in adenoviral CaMKII δ_{C} -transfizierten Kaninchenkardiomyozyten beschreiben, fanden SAG et al. 2009 keine Auswirkungen dieses CaMKII-Inhibitors auf die Relaxationskinetik. Im Modell für langfristige CaMKII-Inhibition der AC3-I Maus fanden ZHANG et al. 2005 eher positiv inotrope Auswirkungen, ebenso wie SOSSALLA et al. 2010 in humanen insuffizienten Herzmuskelstreifen-Experimenten mit kurzfristiger CaMKII-Inhibition durch KN-93. Dagegen stehen unter anderem Beobachtungen von DeSANTIAGO et al. 2002, die einen eher negativ inotropen Effekt von KN-93 an Wildtyp-Mäuseherzen beschrieben.

Während die Verlängerung der Relaxationszeit ins Bild einer akuten CaMKII-Inhibition durch SMP-114 passt, wirft der in CaMKII δ_{C} -transgenen Zellen aufgetretene negative Einfluss von SMP-114 auf Sarkomerlängenverkürzung und Transientenamplitude dennoch Fragen auf. Es könnte sein, dass SMP-114 mit 10 μM zu hoch dosiert ist und insbesondere insuffizientes CaMKII δ_{C} -transgenes Myokard, das an hohe CaMKII-Aktivitäten adaptiert ist, eine gewisse Rest-CaMKII-Aktivität benötigt. Diesbezüglich gilt es in Zukunft zu untersuchen, wie sich SMP-114 in anderen Konzentrationen auf diese Parameter auswirkt, zumal Effekte auf Zytokinausschüttung *in vitro* bereits für 3 μM SMP-114 u.a. von WESTRA et al. 2010 beschrieben wurden. In den Vorbereitungen zu dieser Arbeit wurden lediglich exemplarisch zwei Fura-2 Messungen mit einer anderen SMP-114-Dosis, 20 μM , durchgeführt, wobei sich niedrige Ca^{2+} -Amplituden und geringe Kontraktionen zeigten.

Die interessanten und teils kontroversen Ergebnisse einer akuten SMP-114 Wirkung in dieser Arbeit in Bezug auf unterschiedliche Messgrößen als Einzelaspekte der Herzinsuffizienz werfen die spannende Frage auf, welche Auswirkungen eine langfristige Therapie mit SMP-114 im Tiermodell hat.

4.5 SMP-114 zeigt keinen Effekt auf den Gesamt-Ca²⁺-Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums

Der SR Ca²⁺-Gehalt wurde durch Koffein-induzierte Transienten untersucht. Unter SMP-114 fanden sich keine Veränderungen des SR Ca²⁺-Gehalts – weder in Wildtyp- noch in CaMKII δ_C -transgenen Zellen.

Auch die fraktionelle Ausschüttung (*fractional release*) betreffend, also den Anteil der pro 1 Hz-Stimulation ausgeschütteten Ca²⁺-Ionen am Gesamt SR Gehalt an freien Ca²⁺-Ionen (vgl. 3.6), ergaben sich keine signifikanten Änderungen unter SMP-114, wobei die Mittelwerte jedoch in der Tendenz etwas unter denen der Normaltyroden-Gruppe lagen.

Der unveränderte SR Ca²⁺-Gehalt der Zellen unter SMP-114 ist zunächst einmal überraschend, da man angesichts des so deutlich reduzierten diastolischen Ca²⁺-Verlusts aus dem SR eine Zunahme des Gesamt-Ca²⁺-Gehalts hätte erwarten können. Tatsächlich hatten Untersuchungen von SOSSALLA et al. 2010 in humanen insuffizienten Muskelstreifen Hinweise auf einen vermehrten SR Ca²⁺-Gehalt unter dem CaMKII-Inhibitor KN-93 gefunden. Hingegen sahen GUO et al. 2012 in CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäusen mit Phospholamban-Knock-out trotz erhöhter Ca²⁺-Spark-Frequenz keine Änderung des SR Ca²⁺-Gehalts. SAG et al. 2009 beschrieben ein geringgradig kleineres *fractional release* unter KN-93.

Die fehlenden Änderungen des SR Ca²⁺-Gehalts, wie sie für einen CaMKII-Inhibitor eigentlich zu erwarten gewesen wären, könnte im Zusammenspiel der Ca²⁺-transportierenden Proteine begründet liegen. Insbesondere dürften verminderte CaMKII-Effekte am RyR2 eine Rolle spielen (verminderte Öffnungswahrscheinlichkeit durch verminderte Phosphorylierung der CaMKII-Stelle SER2814; vgl. u.a. RESPRESS et al. 2012, VAN OORT et al. 2010) Gleichzeitig fand sich in der vorliegenden Arbeit unter SMP-114 zumindest in CaMKII δ_C -transgenen Zellen eine verlängerte Relaxationszeit, die mutmaßlich auf die fehlende CaMKII-abhängige SERCA2a-Aktivierung durch Phospholamban-Phosphorylierung am THR17 zurückzuführen ist. Daraus leitet sich ab, dass gleichzeitig mit einem geringeren diastolischen Austritt von Ca²⁺-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum aber auch mit einem geringeren Rücktransport der Ca²⁺-Ionen ins SR durch die SERCA2a zu rechnen ist, welche sich hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf den SR Ca²⁺-Gehalt gegenseitig aufheben könnten. Da in der vorliegenden Arbeit lediglich die zellglobale Relaxation der Ca²⁺-Transienten

evaluiert wurde, kann keine quantitative Aussage über die Anteile von SERCA2a, NCX und anderen Wegen an der Elimination der zytosolischen Kalziumionen getroffen werden (vgl. 1.1.1). Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass sich die Effekte eines geringeren SR Ca^{2+} -Lecks und eines möglicherweise geringeren Ca^{2+} -Rücktransports in das sarkoplasmatische Retikulum gerade ausgleichen und es deswegen nicht zu einer Änderung des Gesamt SR Ca^{2+} -Gehalts bzw. der Koffein-Transienten-Amplituden durch SMP-114-Inkubation kommt.

4.6 Effekte der potenziellen CaMKII-Inhibitoren GPZ5851 und GPZ7505

Auch die Auswirkungen zweier weiterer potentieller CaMKII-Inhibitoren auf das diastolische Ca^{2+} -Leck und die elektromechanische Kopplung wurden untersucht.

GPZ5851 führte in den Messungen am Epifluoreszenz-Mikroskop in CaMKII δ_C -transgenen Zellen zu einer signifikant größeren prozentualen Sarkomerlängenverkürzung unter 1 Hz-Stimulation bei nicht veränderten Ca^{2+} -Transientenamplituden, diastolischen Fluoreszenzratios und Transienten-Relaxationszeiten. Signifikante Änderungen der Post-Pausen-Potenzierung von Transienten und Kontraktion sowie der Koffein-Transienten-Amplituden als Korrelat des Gesamt SR Ca^{2+} -Gehalts waren nicht festzustellen, wobei letztere sogar tendenziell vermindert waren.

In den Ca^{2+} -Spark-Messungen vermochte GPZ5851 die Ca^{2+} -Spark-Frequenz, bezogen auf alle gemessenen Zellen, gegenüber Normaltyrode tendenziell zu senken. Die Reduktion fiel damit jedoch wesentlich geringer aus als unter SMP-114.

Mit GPZ7505-inkubierte Zellen wiesen in den Fura-2-Messungen erheblich verlängerte Relaxationszeiten auf. Gleichzeitig fielen sowohl Ca^{2+} -Transientenamplitude als auch Sarkomerlängenverkürzung signifikant geringer aus als unter Normaltyrode und SMP-114. Darüber waren unter GPZ7505 signifikant geringere Post-Pausen-Potenzierungen von Transientenamplitude und Kontraktion zu beobachten und die Koffein-Amplituden-Messungen wiesen auf einen verringerten Gesamt SR Ca^{2+} -Gehalt hin.

Die Messungen am Konfokalmikroskop konnten nicht ausgewertet werden, weil mit GPZ7505 inkubierte Zellen reproduzierbar nach der ersten Messung, die mit der Fokussierung des Argon-Lasers auf die Zelle einherging, ein arrhythmisches Wabern der gesamten Zelle zeigten, in deren Folge diese ihre Integrität verlor und starb (vgl. 3.8.3).

Die Ergebnisse von GPZ5851 sind in Teilen durchaus vielversprechend und es erscheint lohnenswert, diese Substanz mit anderen Methoden weiter zu charakterisieren. Aufgrund des deutlich stärker ausgeprägten Effekts von SMP-114 auf die Ca^{2+} -Spark-Frequenz und Post-Pausen-Potenzierung blieb der Fokus dieser Arbeit dennoch auf SMP-114. Die Charakterisierung der Substanz GPZ7505 wurde nach den nicht auswertbaren Messungen am Konfokalmikroskop und den Ergebnissen aus der Epifluoreszenzmikroskopie, die ebenfalls nicht auf ein geringeres SR Ca^{2+} -Leck oder andere gegebenenfalls therapeutisch verwertbare Veränderungen hindeuteten, nicht weiter verfolgt. Der deutlich verminderte SR Ca^{2+} -Gehalt und die schlechte Post-Pausen-Potenzierung unter GPZ7505 könnten auf die drastisch reduzierte SERCA2a Funktion, die sich auch in den verlängerten Relaxationszeiten widerspiegelt, zurückzuführen sein – allerdings sind auch Interaktionen mit anderen Regulatoren des Ca^{2+} -Stoffwechsels nicht auszuschließen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Charakterisierung der Wirkungen auf das diastolische SR Ca^{2+} -Leck von isolierten Kardiomyozyten ergab, dass SMP-114 *in vitro* zu einer dramatischen Verringerung des Lecks und zu einer deutlichen Reduktion der SCR-Events führt. Dabei waren die Ca^{2+} -Spark-Größe und -Dauer allenfalls geringfügig vermindert, während Ca^{2+} -Spark-Frequenz und der Anteil sparkender Zellen drastisch reduziert waren und somit den größten Anteil zur Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks um über 50 % beitrugen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SMP-114 auch die zellglobale Ca^{2+} -Homöostase und Sarkomerlängenverkürzung verändert. Es verlängert die Transientenrelaxationszeit und verbessert die Post-Pausen-Potenzierung von Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängenverkürzung. Keine Effekte konnten dagegen auf den Gesamt SR Ca^{2+} -Gehalt nachgewiesen werden. Auch war keine positiv inotrope Wirkung von SMP-114 zu registrieren. Der größte Teil der beschriebenen Effekte war sowohl in Wildtyp-Zellen als auch in CaMKII δ _C-TG Mäusen nachweisbar. Interessanterweise gab es kaum Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass SMP-114 einen effektiven Verschluss des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks bei erhaltener systolischer Zell- und Kontraktionsfunktion zu bewirken vermag. Dies ist besonders vielversprechend, weil das diastolische Ca^{2+} -Leck nicht nur eine wichtige Rolle in der Entstehung der Herzinsuffizienz selbst sondern auch bei der Initiierung von ventrikulären Arrhythmien spielt. Darüber hinaus wird auch der Zusammenhang zwischen spontanen diastolischen Ca^{2+} -Freisetzungseignissen und dem Vorhofflimmern immer deutlicher.

Während die Ergebnisse das SR Ca^{2+} -Leck und Arrhythmie-Korrelate betreffend vielversprechend sind, werfen die fehlende positive Inotropie und der nicht vorhandene Effekt auf den SR Ca^{2+} -Gehalt Fragen auf. Hier gilt es, die Wirkungen mit anderen Methoden und in anderen Spezies, insbesondere im insuffizienten humanen Myokard, zu bestätigen. Darüber hinaus sollte versucht werden, Effekte von SMP-114 *in vivo* nachzuweisen, beispielsweise durch systemische Applikation im Mausmodell.

Sollten sich die insgesamt vielversprechenden Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigen, ergibt sich vor dem Hintergrund, dass SMP-114 schon in klinischen Phase II-Studien an menschlichen Probanden als sicher eingestuft wurde, die Hoffnung, in Zukunft möglicherweise eine neue Therapieoption für viele Millionen Herzinsuffizienz- und Vorhofflimmerpatienten entwickeln zu können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Anderson ME, Braun AP, Wu Yu, Lu T, Wu Yi, Schulman H, Sung RJ (1998): KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 996 – 1006

Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN (2001): Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res* 89, 997 – 1004

Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, Domanski M, Troutman C, Anderson J, Johnson G, McNulty SE, Clapp-Channing N, Davidson-Ray LD, Fraulo ES, Fishbein DP, Luceri RM, Ip JH (2005): Amiodarone or an Implantable Cardioverter-Defibrillator for Congestive Heart Failure. *N Engl J Med* 352, 225 – 237

Bers DM: Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. Second Edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande 2001

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

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

Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasová E, Moschella MC, Jayaraman T, Landers M, Ehrlich BE, Marks AR (1994): Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77, 513 – 523

Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF): Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz (Langfassung, Version 1.5). ÄZQ – Redaktion Nationale VersorgungsLeitlinien, Berlin 2012

Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, De Caterina R, De Sutter J, Goette A, Gorenek B, Heldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey JY, Ponikowski P, Rutten FH (2010): Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 32, 2369 – 2429

Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort RJ, Skapura DG, Li N, Santonastasi M, Müller FU, Schmitz W, Schotten U, Anderson ME, Valderrábano M, Dobrev D, Wehrens XH (2009): Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest* 119, 1940 – 1951

Chen Y, Escoubet B, Prunier F, Amour J, Simonides WS, Vivien B, Lenoir C, Heimburger M, Choqueux C, Gellen B, Riou B, Michel JB, Franz WM, Mercadier JJ (2004): Constitutive Cardiac Overexpression of Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Delays Myocardial Failure After Myocardial Infarction in Rats at a Cost of Increased Acute Arrhythmias. *Circulation* 109, 1898 – 1903

Currie S, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL (2003): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J* 377, 357 – 366

DeSantiago J, Maier LS, Bers DM (2002): Frequency-dependent Acceleration of Relaxation in the Heart Depends on CaMKII, but not Phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 34, 975 – 984

Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME (2008): A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133 462 - 474

Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM, Bers DM (2013): Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 502, 372 – 376

Farr MA, Basson CT (2004): Sparking the failing heart. *N Engl J Med* 351, 185 – 187

Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I (2000): Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 97 – 106

Guide for the care and use of Laboratory Animals (1996), NIH Publikationsnummer 85-23, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

Guo T, Zhang T, Ginsburg KS, Mishra S, Brown JH, Bers DM (2012): CaMKII δ_c Slows [Ca] $_i$ Decline in Cardiac Myocytes by Promoting Ca Sparks. *Biophys J* 102, 2461 – 2470

Harkins AB, Kurebayashi N, Baylor SM (1993): Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophys J* 65, 865 – 881

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

Hasenfuß G, Pieske B (2002): Calcium cycling in congestive heart failure. *J Moll Cell Cardiol* 34, 951 – 969

Hasenfuß G, Holubarsch C, Hermann HP, Astheimer K, Pieske B, Just H (1994): Influence of the force-frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with nonfailing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 15, 164 – 170

Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (1999): Identification and Expression of δ -Isoforms of the Multifunctional Ca $^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase in Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ Res* 84, 713 – 721

Hook SS, Means AR (2001): Ca(2+)/CaM-dependent kinases: From activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 471 – 505

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

IonOptix: Myocyte Calcium & Contractility Recording System (HyperSwitch Configuration), IonOptix LLC, Milton 2011, o.Verf.

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

Kohlhaas M: Die Bedeutung der subzellulären CaMKII δ -Überexpression auf den intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsel in Herzmuskelzellen. Math.-Nat. Diss. Göttingen 2006

Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM, Maier LS (2006): Increased Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak but Unaltered Contractility by Acute CaMKII Overexpression in Isolated Rabbit Cardiac Myocytes. *Circ Res* 98, 235 – 244

Korbmayer C, Greger R: Die Zelle als Grundbaustein; in: Physiologie, 5. Auflage; hrsg. v. Klinker R, Pape H-C, Silbernagel S; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005, 13 – 51

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

Li L, Chu G, Kranias EG, Bers D (1998): Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274, 1335 – 1347

Lip GY, Gibbs CR, Beevers DG (2000): ABC of heart failure: aetiology. *BMJ* 320, 104 – 107

Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN (2000): Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 4070 – 4075

Maier LS (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 (2006): Molekulare Pathogenese der Herzinsuffizienz. *Dtsch med Wochenschr* 131, 503 – 505

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

- Maier LS, Ziolo MT, Bossuyt J, Persechini A, Mestril R, Bers DM (2006): Dynamic changes in free Ca-calmodulin levels in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 41, 451 – 458
- Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier LS, Nguemo F, Menke S, Hausteiner M, Hescheler J, Hasenfuß G, Martin U (2008): Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118, 507 – 517
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitzer J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; ESC Committee for Practice Guidelines (2012): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur Heart J* 33, 1787 – 1847
- Muth C, Gensichen J, Butzlaff M: DEGAM Leitlinie Nr. 9: Herzinsuffizienz. Verlag omikron publishing, Düsseldorf 2006
- Neef S, Maier LS (2007): Remodeling of Excitation-contraction Coupling in the Heart: Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak as a Novel Therapeutic Approach. *Curr Heart Fail Rep* 4, 11 – 17
- 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, 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
- Packer DL, Prutkin JM, Hellkamp AS, Mitchell LB, Bernstein RC, Wood F, Boehmer JP, Carlson MD, Frantz RP, McNulty SE, Rogers JG, Anderson J, Johnson GW, Walsh MN, Poole JE, Mark DB, Lee KL, Bardy GH (2009): Impact of implantable cardioverter-defibrillator, amiodarone, and placebo on the mode of death in stable patients with heart failure: analysis from the sudden cardiac death in heart failure trial. *Circulation* 120, 2170 – 2176
- Packer M (1985): Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation* 72, 681 – 685
- Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skårdal K, Wisløff U, Wieland T, Ai X, Pogwizd SM, Dobrev D, Wehrens XH (2012): Role of RyR2 Phosphorylation at S2814 During Heart Failure Progression. *Circ Res* 110, 1474 – 1483
- Roger VL, Weston SA, Redfield MM, Hellermann-Homan JP, Killian J, Yawn BP, Jacobsen SJ (2004): Trends in Heart Failure Incidence and Survival in a Community-Based Population. *JAMA*. 292, 344 - 350
- Rokita A, Sag C, Maier LS (2011): Herzinsuffizienz Elektromechanische Kopplung bei Herzinsuffizienz und neue Therapieoptionen. *Herz* 36, 94 – 101

Sag CM: Die Bedeutung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) für die Erholung von Kontraktionskraft und Ca^{2+} -Transienten während der Azidose am Herzen. Med. Diss. Göttingen 2007

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

Sarma S, Li N, van Oort RJ, Reynolds C, Skapura DG, Wehrens XH (2010): Genetic inhibition of PKA phosphorylation of RyR2 prevents dystrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13165 – 13170

Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, Krumholz HM, Levy D, Mensah GA, Narula J, Shor ES, Young JB, Hong Y (2008): Prevention of Heart Failure A Scientific Statement From the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 117, 2544 – 2565

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

Sossalla S, Hasenfuß G, Maier LS (2008): Inhibition des späten Natriumeinstroms ($I_{\text{Na, late}}$) als neuartige kardioprotektive Therapieoption. *Kardiologie* 2008 (2), 142 – 148

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, El-Armouche A, Hasenfuß G, Maier LS (2010): Inhibition of Elevated Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Improves Contractility in Human Failing Myocardium. *Circ Res* 107, 1150 – 1161

Statistisches Bundesamt: Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) 2009. (Fachserie 12 Reihe 6.2.1); Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2011

Statistisches Bundesamt: Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Diagnosen, Prozeduren, Fallpauschalen und Case Mix der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern 2011. (Fachserie 12 Reihe 6.4); Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2012

Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland 2010. (Fachserie 12 Reihe 4); Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2012

Tada M, Yamada M, Kadoma M, Inui M and Ohmori F (1982): Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of Phospholamban. *Mol Cell Biochem* 46, 73-95

Tagashira S, Fukushima A: Combination Drug for Treating Autoimmune Disease. Publiziert von: United States Patent Application Publication. Pub. No. US2008/0255121 A1, 2008

Takada Y, Kaneko M, Tagashira R: Remedy for Rheumatoid Arthritis. Publiziert von: Europäisches Patentamt, München in Bulletin 2006/06, Veröffentlichungsnr. EP 1623709

The Molecular Probes® Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11. Auflage, Online Version Kapitel 19, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>, hrsg. von Johnson I und Spence MTZ, Molecular Probes® 2010, o. Verf., o. Verl., o. O.

van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, Wang Q, De Almeida AC, Skapura DG, Anderson ME, Bers DM, Wehrens XH (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, Wehrens XH, Dobrev D (2012): Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 125, 2059 - 2070

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

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

Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Rosemblyt N, D'Armiento JM, Napolitano C, Memmi M, Priori SG, Lederer WJ, Marks AR (2003): FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 113, 829 – 840

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, 61 – 70

Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR (2005): Ryanodine receptor-targeted antiarrhythmic therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1047, 366 – 375

Westra J, Brouwer E, Bouwman E, Doornbos-van der Meer B, Posthumus MD, van Leeuwen MA, Limburg PC, Ueda Y, Kallenberg CG (2009): Role for CaMKII Inhibition in Rheumatoid Arthritis Effects on HIF-1-Induced VEGF Production by Rheumatoid Synovial Fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1173, 706 – 711

Westra J, Brouwer E, van Roosmalen IA, Doornbos-van der Meer B, van Leeuwen MA, Posthumus MD, Kallenberg CG (2010): Expression and regulation of HIF-1alpha in macrophages under inflammatory conditions; significant reduction of VEGF by CaMKII inhibitor. *BMC Musculoskelet Disord* 11, 61 – 71

Wilhelm S: Confocal Laser Scanning Microscopy. Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, o. J.

Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE Jr, Thiel W, Guatimosim S, Song LS, Madu EC, Shah AN, Vishnivetskaya TA, Atkinson JB, Gurevich VV, Salama G, Lederer WJ, Colbran RJ, Anderson ME (2005): Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 11, 409 – 417

Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J Jr, Bers DM, Brown JH (2003): The δ C Isoform of CaMKII Is Activated in Cardiac Hypertrophy and Induces Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circ Res* 92, 912 – 909

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

DANKSAGUNG

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Lars S. Maier, und Dr. med. Stefan Neef, dem wissenschaftlichen Betreuer dieser Arbeit.

Auf ihre Anregung hin, den bislang in erster Linie bei rheumatologischen Erkrankungen erforschten CaMKII-Inhibitor hinsichtlich seiner Auswirkungen auf den Herzmuskel zu untersuchen, begann ich mit der Forschung für diese Arbeit. Dank ihrer großen Unterstützung bei der Entscheidung über die Wahl der Methoden und der Durchführung der Messungen wurde die vorliegende Arbeit erst möglich.

Ihre herausragende Expertise in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und Erfahrung in der Behandlung von Herzinsuffizienz-Patienten lieferten mir immer wieder neue Ansätze für die weitere Untersuchung und halfen, die Ergebnisse aus verschiedenen Perspektiven zu betrachten und in den wissenschaftlichen Kontext einzuordnen.

Danken möchte ich darüber hinaus allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Maier. Hervorheben möchte ich hier Herrn Timo Schulte und Herrn Thomas Sowa für ihre unermüdliche Unterstützung in der Isolation der Mäuse-Herzmuskelzellen und Hilfestellung bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche.

LEBENS LAUF

Am 17. Juli 1985 wurde ich, Christian Martin Mann, als Sohn von Dr. Klaus Mann und Susanne Mann in White Plains, New York, USA geboren.

Ich wuchs in Göttingen auf und besuchte von 1991 – 1995 die Wilhelm-Henneberg-Grundschule und anschließend die Orientierungsstufe Nord in Göttingen-Weende. Ab 1997 besuchte ich das Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen, das ich im Jahr 2004 mit dem Abitur mit Leistungsfächern Politik und Chemie abschloss.

Nach meinem Zivildienst im Goethe-Institut Göttingen begann ich im Wintersemester 2005/2006 das Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg im Breisgau. Nach erfolgreichem Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Sommersemester 2007 wechselte ich zum Wintersemester 2007/2008 für den klinischen Abschnitt des Studiums an die Georg-August-Universität Göttingen.

Im Sommersemester 2009 absolvierte ich ein Auslandssemester an der Università degli Studi di Siena in Italien.

Im Juli 2010 begann ich die Arbeit an meiner Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lars S. Maier an der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen, die ich auch nach der Approbation als Arzt nach dem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Mai 2012 fortsetzte.

Im August 2012 heiratete ich meine langjährige Freundin Maria Teresa Rosa in Rocca Bernarda, Italien. Im März 2015 wurde unser Sohn Aurelio geboren.

Meine berufliche Laufbahn begann ich als Unternehmensberater bei The Boston Consulting Group, wo meine Schwerpunkte in der Beratung von Unternehmen aus der pharmazeutischen Industrie und Erstellung von Analysen zur Gesundheitsökonomie und einer wertebezogenen Gesundheitsversorgung lagen. Im November 2013 begann ich die Arbeit in meiner aktuellen Position als Projektleiter Klinische Forschung bei der Novartis Pharma GmbH. Hier bin ich für die Konzeption, Organisation und deutschland-europaweite Umsetzung von klinischen Phase II-IV-Studien für Prüfmedikamente in den Therapiebereichen Rheumatologie und Muskelerkrankungen verantwortlich und globaler medizinischer Leiter einer klinischen Phase III Studie in axialer Spondylarthritis.