

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

---

**Einfluss der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen  
Proteinkinase II delta auf den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Strom –  
Untersuchungen anhand eines genetischen  
Knock-outs im Mausmodell**

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

vorgelegt von

**Victor Neuhaus**

aus Berlin

Göttingen 2015

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

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. L. Maier
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. B. Schwappach-Pignataro
3. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
II.1	Abbildungsverzeichnis.....	IX
II.2	Tabellenverzeichnis.....	X
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Herzinsuffizienz.....	1
1.2	Physiologie des Herzens: Die elektromechanische Kopplung.....	4
1.2.1	Das Aktionspotential und die Ca <sup>2+</sup> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung.....	4
1.2.2	Der Querbrückenzyklus.....	5
1.2.3	Die Relaxation.....	6
1.3	Der L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal.....	7
1.3.1	Einteilung und Vorkommen der verschiedenen Gruppen von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen.....	7
1.3.2	Aufbau und Struktur des L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanals.....	8
1.3.2.1	Die $\alpha_1$ -Untereinheit.....	8
1.3.2.2	Die $\beta$ -Untereinheit.....	9
1.3.2.3	Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit.....	9
1.3.3	Funktion des L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanals in den Myozyten.....	10
1.3.4	Modulation des L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanals.....	11
1.4	Die Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II.....	11
1.4.1	Struktur und Aufbau der Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II.....	12
1.4.2	Aktivierung der Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II.....	13
1.4.3	Inaktivierung und Inhibierung der Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II.....	13
1.4.4	Einfluss der Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II auf die elektromechanische Kopplung.....	14
1.4.5	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.....	15
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	16

## 2. Material und Methoden

2.1	Wildtyp-Versuchstiere.....	17
2.2	Generierung der CaMKII $\delta$ Knockout-Maus.....	17
2.3	Genotypisierung der CaMKII $\delta$ Knockout-Mäuse.....	18
2.4	Durchführung der TAC/Sham-Operation.....	18
2.5	Isolation der Myozyten.....	19
2.6	Kalziumaufbau.....	23
2.7	Erhebung der biometrischen Daten.....	23
2.8	Elektrophysiologische Messungen.....	24
2.8.1	Das Patch-Clamp-Setup.....	24
2.8.2	Vorbereitung der Messkammern und der Messanlage.....	25
2.8.3	Versuchsdurchführung.....	26
2.8.4	Versuchsprotokoll.....	27
2.9	Auswertung der Daten.....	28
2.10	Lösungen und Chemikalien.....	29

## 3. Ergebnisse

3.1	Biometrische Daten.....	34
3.1.1	Körpergewicht.....	34
3.1.2	Herzgewicht.....	35
3.1.3	Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis.....	35
3.2	Ca <sup>2+</sup> -Strom über den L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal.....	38
3.2.1	Einfluss der induzierten Hypertrophie auf den Ca <sup>2+</sup> -Strom über den L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal bei den 7 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren.....	38
3.2.2	Einfluss der akuten Inhibierung der CaMKII $\delta$ mittels AIP auf den Ca <sup>2+</sup> -Strom über den L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal bei den 7 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren.....	39
3.2.3	Einfluss der genetischen Inhibierung der CaMKII $\delta$ auf den Ca <sup>2+</sup> -Strom über den L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal bei den 7 Tage nach der Operation geopferten CaMKII $\delta$ Knockout-Versuchstieren.....	41
3.2.4	Einfluss der induzierten Hypertrophie auf den Ca <sup>2+</sup> -Strom über den L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal bei den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren.....	42
3.2.5	Einfluss der akuten Inhibierung der CaMKII $\delta$ mittels AIP auf den Ca <sup>2+</sup> -Strom über den L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal bei den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren.....	43

---

3.2.6	Vergleich des Einflusses der induzierten Hypertrophie auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Strom über den L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei den 7 und den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren.....	45
3.2.7	Vergleich des Einflusses der genetischen Inhibierung und der akuten Inhibierung der CaMKII $\delta$ auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Strom über den L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei den 7 Tage nach der Operation geopferten CaMKII $\delta$ Knockout- bzw. Wildtyp-Versuchstieren.....	46
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Herzhypertrophie bei Zustand nach transverser Aortenkonstriktion.....	47
4.2	Erhöhter $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei Zustand nach transverser Aortenkonstriktion.....	49
4.3	Normalisierung des $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal mittels AIP bzw. Generierung einer CaMKII $\delta$ Knockout-Maus.....	50
4.4	Ausblick und klinische Relevanz.....	52
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>55</b>



## I. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AID	$\alpha_1$ interaction domain
AIP	<i>autocamtide 2-related inhibitory peptide</i>
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
c	Konzentration
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ca <sup>2+</sup> /CaM	kalzifiziertes Calmodulin
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKII $\delta$	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II $\delta$
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cre-Enzym	<i>cyclisation recombination enzyme</i>
CsCl	Caesiumchlorid
CsOH	Caesiumhydroxid
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Drusen
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
G	Gauge
g	Gramm
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HG	Herzgewicht
HG/KG	Herzgewicht-Körpergewicht
HG/KG-Verhältnis	Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis
ICD	implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
K <sup>+</sup>	Kalium
KCL	Kaliumchlorid
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KG	Körpergewicht

Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
min	Minuten
mV	Millivolt
mMol	Millimol
ms	Millisekunde
MΩ	Megaohm
n	Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NCX	Na/Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
nM	Nanomol
n.s.	nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association
LTCC	L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal
p	p-Wert
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2a	Proteinphosphatase 2a
PP2c	Proteinphosphatase 2c
RyR	Ryanodinrezeptor
RyR2	Ryanodinrezeptor 2
SERCA	sarkoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SR	sarkoplasmatische Retikulum
Taurin	2-Aminoethansulfonsäure
T-Tubuli	transversale Tubuli
TAC	transvers aortic constriction
WHO	World Health Organisation
z	Anzahl der gemessenen Zellen



## II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### II.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1</b>	Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung, modifiziert nach BERS (2002)	7
<b>Abb. 1.2</b>	Aufbau und Struktur des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, modifiziert nach PITT et al. (2006)	10
<b>Abb. 1.3</b>	Struktur und Aufbau der CaMKII, modifiziert nach MAIER und BERS (2002)	12
<b>Abb. 1.4</b>	Einfluss der CaMKII auf die elektromechanische Kopplung, modifiziert nach MAIER und BERS (2007)	15
<b>Abb. 2.1</b>	Schematische Darstellung der TAC	19
<b>Abb. 2.2</b>	Schematische Darstellung der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage	22
<b>Abb. 2.3</b>	Schematische Darstellung des Patch-Clamp-Setup	25
<b>Abb. 2.4</b>	IV-Protokoll (-90mV)	27
<b>Abb. 2.5</b>	IV-Protokoll (-70mV)	28
<b>Abb. 3.1</b>	Vergleich des Herzgewicht/Körpergewicht- Verhältnisses innerhalb der Gruppe der 7 bzw. 35 Tage nach Operation geopfertem Wildtyp-Versuchstiere	36
<b>Abb. 3.2</b>	Vergleich des Herzgewicht/Körpergewicht- Verhältnisses der 7 und der 35 Tage nach Operation geopfertem Wildtyp-Versuchstiere nach transverser Aortenkonstriktion bzw. der Kontrollgruppe	37
<b>Abb. 3.3</b>	Vergleich des Herzgewicht/Körpergewicht- Verhältnisses der CaMKII $\delta$ -Knockout-Versuchstiere sowie der CaMKII $\delta$ -Knockout mit den Wildtyp-Versuchstieren nach transverser Aortenkonstriktion bzw. innerhalb der Kontrollgruppe	38
<b>Abb. 3.4</b>	Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 7 Tage nach der Operation geopfertem Wildtyp-Versuchstieren	39
<b>Abb. 3.5</b>	Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 7 Tage nach der Operation geopfertem Wildtyp-Versuchstiere mit und ohne AIP	40
<b>Abb. 3.6</b>	Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 7 Tage nach der Operation geopfertem CaMKII $\delta$ -Knockout- und Wildtyp-Versuchstieren	42
<b>Abb. 3.7</b>	Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 35 Tage nach der Operation geopfertem Wildtyp-Versuchstieren	43
<b>Abb. 3.8</b>	Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 35 Tage nach der Operation geopfertem Wildtyp-Versuchstiere mit und ohne AIP	44
<b>Abb. 3.9</b>	Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 7 und den 35 Tage nach transverser Aortenkonstriktion geopfertem Wildtyp-Versuchstieren	45

<b>Abb. 3.10</b>	Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 7 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstiere mit AIP und bei den 7 Tage nach der Operation geopferten CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstieren	46
------------------	---	----

## II.2 Tabellenverzeichnis

---

<b>Tab. 1.1</b>	Ergebnisse der Bestimmung des Körpergewichtes bei den Wildtyp-Versuchstieren	34
<b>Tab. 1.2</b>	Ergebnisse der Bestimmung des Körpergewichtes bei den CaMKII $\delta$ Knockout-Versuchstieren	35
<b>Tab. 1.3</b>	Ergebnisse der Bestimmung des Herzgewichtes bei den Wildtyp-Versuchstieren	35
<b>Tab. 1.4</b>	Ergebnisse der Bestimmung des Herzgewichtes bei den CaMKII $\delta$ Knockout-Versuchstieren	35

# 1. Einleitung

In der Einleitung werden zunächst das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz genauer betrachtet und anschließend grundlegende Abläufe der elektromechanischen Kopplung auf zellulärer Ebene erläutert. Darauf folgend werden sowohl der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) in ihrem Aufbau und in ihrer Funktion beschrieben. Zuletzt werden die Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit erläutert.

## 1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist laut Statistischem Bundesamt der häufigste Grund für eine stationäre Aufnahme in ein Krankenhaus in Deutschland (STATISTISCHES BUNDESAMT 2011). Des Weiteren ist die Herzinsuffizienz zu einer der kostenintensivsten chronischen Erkrankungen geworden, die einen Anteil von 1 bis 2% an den Krankheitskosten besitzt (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010b). Aufgrund des demographischen Wandels in Deutschland und der Abnahme der Sterblichkeit durch einen Myokardinfarkt, der häufigsten Ursache der Herzinsuffizienz (GOODWIN und OAKLEY 1972), kann von einer weiterhin steigenden Prävalenz und Inzidenz ausgegangen werden. Momentan liegt die Prävalenz der Herzinsuffizienz für die Gesamtbevölkerung in Deutschland bei 1% und für die Bevölkerung, die 80 Jahre oder älter ist, bei 10% (HOPPE et al. 2005; MC MURRAY und STEWART 2000).

In Deutschland steht die Herzinsuffizienz an dritter Stelle in Bezug auf die absolute Anzahl der Todesursachen (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010a) und das, obwohl die Therapie der Herzinsuffizienz in den letzten Jahren erheblich verbessert werden konnte. In diesem Zusammenhang sind  $\beta$ -Blocker (HJALMARSON et al. 2000; HOPPE et al. 2005; KRUM et al. 2003; PACKER et al. 1996), ACE-Hemmer (CLELAND et al. 1997; HOPPE et al. 2005), AT1-Antagonisten (COHN und TOGNONI 2001; GRANGER et al. 2003; HOPPE et al. 2005) und Aldosteronantagonisten (PITT et al. 1999; PITT et al. 2003; VARDENY et al. 2014; ZANNAD et al. 2011), aber auch die Einführung der implantierbaren Kardioverter-Defibrillatoren (ICD) (BARDY et al. 2005; CONOLLY et al. 2000; KUCK et al. 2000; MOSS et al. 1996; MOSS et al. 2002; THE ANTIARRHYTHMICS VERSUS IMPLANTABLE DEFIBRILLATORS INVESTIGATORS 1997) zu nennen, die das Überleben der Patienten signifikant verlängern wie in verschiedenen Studien bewiesen werden konnte. So wurde die signifikante Mortalitätssenkung durch einer Therapie mit  $\beta$ -Blockern in der COPERNICUS- (KRUM et al. 2003; PACKER et al. 1996), der MERIT-HF- (HJALMARSON et al. 2000) und der SENIORS-Studie (FLATHER et al. 2005) belegt. Die Wirkung von ACE-Hemmern auf die

Gesamtmortalität wurde in der CONSENSUS- (THE CONSENSUS TRIAL STUDY GROUP 1987) und der SOLVD-Studie (THE SOLVD INVESTIGATORS 1991) untersucht und auch hier wurde eine signifikante Senkung festgestellt. Die AT1-Antagonisten reduzieren die Mortalität ähnlich stark wie die ACE-Hemmer, was die ELITE II- (PITT et al. 2000), die CHARM- (GRANGER et al. 2003; PFEFFER et al. 2003) sowie die Val-HeFT-Studie (COHN und TOGNONI 2001) bewiesen. Eine signifikante Senkung der Mortalität durch Aldosteronantagonisten wurde in der EMPHASIS-HF-Studie (PITT et al. 2003; ZANNAD et al. 2011) sowie der RALES-Studie (PITT et al. 1999; VARDENY et al. 2014) nachgewiesen. In der AVID- (THE ANTIARRHYTHMICS VERSUS IMPLANTABLE DEFIBRILLATORS INVESTIGATORS 1997), der CASH- (KUCK et al. 2000), der CIDS- (CONOLLY et al. 2000), der MADIT-I- (MOSS et al. 1996), der MADIT-II- (MOSS et al. 2002) und der SCD-HeFT-Studie (BARDY et al. 2005) konnte gezeigt werden, dass die Implantierung eines Kardioverter-Defibrillators zu einer signifikanten Senkung der Mortalität führt. Nicht zuletzt aufgrund der verbesserten therapeutischen Mittel beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten, die an chronischer Herzinsuffizienz (NYHA II bis IV) leiden, 40 bis 60% (MC KEE et al. 1971; MC MURRAY und STEWART 2000). Der durch Herzinsuffizienz bedingte Tod tritt in den häufigsten Fällen durch Pumpversagen oder tachykarde Herzrhythmusstörungen ein.

Die Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung des Herzmuskels, bei der das Versagen der physiologischen Pumpfunktion des Herzmuskels zu einer Minderversorgung der peripheren Organe und Gewebe mit sauerstoffreichem Blut führt. Um die Ursachen einer Herzinsuffizienz verstehen zu können, muss zunächst der Begriff Kardiomyopathie definiert werden. Als Kardiomyopathie werden Erkrankungen des Herzmuskels bezeichnet, die nach der World Health Organization in fünf Hauptgruppen eingeteilt werden (RICHARDSON et al. 1996):

1. Die dilatative Kardiomyopathie, die charakterisiert ist als eine Störung der systolischen Pumpfunktion des Ventrikels mit Kardiomegalie sowie eine Störung der diastolischen Relaxation.
2. Die hypertrophische Kardiomyopathie, die entweder idiopathisch oder durch eine Nachlasterrhöhung bedingt ist und mit einer Zunahme des Durchmessers des Myokards einhergeht. Häodynamisch ist die hypertrophische Kardiomyopathie charakterisiert als eine diastolische Dehnbarkeitsstörung sowie eine eventuell vorliegende Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn durch das verdickte, interventrikuläre Septum.
3. Die restriktive Kardiomyopathie, die charakterisiert ist als eine diastolische Dehnbarkeitsstörung bei nicht hypertrophiertem Myokard, sondern beispielsweise im Rahmen einer Myokardfibrose.

4. Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie, die charakterisiert ist als eine Störung der rechtsventrikulären systolischen Pumpfunktion in Kombination mit ventrikulären Tachykardien.
5. Die nichtklassifizierbare Kardiomyopathie, die auf einer Reihe verschiedener Störungen beruht, die nicht den oben genannten Kardiomyopathien zugeordnet werden können.

Innerhalb der fünf Hauptgruppen der Kardiomyopathien definiert die WHO-Klassifikation spezifische Kardiomyopathien, die nach der zugrunde liegenden Ursache klassifiziert werden. Im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz sind hier besonders die ischämische und die hypertensive Kardiomyopathie hervorzuheben. Die ischämische Kardiomyopathie wird durch eine bestehende koronare Herzkrankheit oder erlittene Herzinfarkte, die hypertensive Kardiomyopathie durch eine arterielle Hypertonie bedingt.

Eine Herzinsuffizienz wird vor allem durch folgende Ursachen hervorgerufen:

1. Eine myokardiale Zellschädigung aufgrund ischämischer, zum Beispiel im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung oder entzündlicher Prozesse wie zum Beispiel eine Virusinfektion (BOWELS et al. 1989), eines Autoimmunprozesses (MAISCH et al. 1983) oder alkoholtoxischer Einflüsse (BRAUNWALD et al. 1989), die zunächst zu einer reduzierten Zellverkürzung und im späteren Verlauf zu einer Dilatation des Herzens (dilatative Kardiomyopathie) mit verminderter Pumpfunktion führen. Die ischämische Kardiomyopathie ist im Vergleich zur dilatativen Kardiomyopathie mit einem Anteil von 70% die häufigste Form der Kardiomyopathie (GOODWIN und OAKLEY 1972).
2. Eine chronische Druckbelastung des Herzens, zum Beispiel bedingt durch pulmonale oder arterielle Hypertonie oder eine stenosierte Herzklappe, die zunächst zu einer Hypertrophie des Herzens (hypertrophische Kardiomyopathie) und zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Dilatation (dilatative Kardiomyopathie) und Funktionsverlust des Herzens führt.
3. Eine chronische Volumenbelastung des Herzens, zum Beispiel aufgrund einer insuffizienten Herzklappe, führt ebenfalls zu einer Dilatation des Herzens (dilatative Kardiomyopathie).

Weiterhin kann zwischen einer systolischen und diastolischen Herzinsuffizienz unterschieden werden. Die systolische Herzinsuffizienz ist durch eine Reduktion der ventrikulären Ejektionsfraktion gekennzeichnet. Hingegen ist die diastolische Herzinsuffizienz durch klinische Symptome einer chronischen Herzinsuffizienz bei jedoch erhaltener systolischer Pumpfunktion der Ventrikel gekennzeichnet (HOPPE et al. 2005). Unabhängig von der Ursache der Herzinsuffizienz ähnelt sich das terminale Stadium der Herzinsuffizienz. Die Herzinsuffizienz wird klinisch nach den Kriterien der *New York Heart Association* in die

Stadien NYHA I bis NYHA IV eingeteilt. Dabei beschreibt das Stadium NYHA IV die dekompensierte, terminale Herzinsuffizienz, die durch Luftnot in Ruhe, starke Leistungsminderung, periphere Ödeme sowie pulmonale Stauung gekennzeichnet ist.

Unterschiedliche Veröffentlichungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass in der Dysregulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels der Myozyten sowie der elektromechanischen Kopplung eine wesentliche Ursache für die kontraktile Dysfunktion im Rahmen der Herzinsuffizienz besteht (GWATHMEY et al. 1987; HASENFUSS und PIESKE 2002; HASENFUSS et al. 1994; MAIER et al. 2003; MULIERI et al. 1992; ZHANG und BROWN 2004).

## 1.2 Physiologie des Herzens: Die elektromechanische Kopplung

Die Einführung in die Physiologie des Herzens beginnt mit der Darstellung der elektromechanischen Kopplung, die mit dem Eintreffen eines elektrischen Stimulus an der Membran der Myozyte beginnt und mit der Kontraktion der Myozyte endet. Die elektromechanische Kopplung umfasst alle für die Umwandlung dieses elektrischen Impulses in eine mechanische Kontraktion der Zelle notwendigen Prozesse. In diesem Zusammenhang werden im Folgenden das Aktionspotential, die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, der Querbrückenzyklus sowie die Relaxation beschrieben. Eine zentrale Rolle spielen hierbei Kalzium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) wie ebenfalls im Folgenden näher erläutert wird (RINGER 1883; RINGER und BUXTON 1885).

### 1.2.1 Das Aktionspotential und die $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung

Der elektrische Stimulus wird über Zell-Zell-Kontakte entweder von den Zellen des kardialen Reizleitungssystem auf die Myozyten oder von einer Myozyte auf die nächste übertragen und dann an der Membran der Myozyten, der sarkolemmalen Membran, in Form eines Aktionspotentials in die T-Tubuli, Invaginationen der sarkolemmalen Membran, weitergeleitet. Das in die T-Tubuli fortgeleitete Aktionspotential bedingt eine Depolarisation des Ruhemembranpotentials der sarkolemmalen Membran, das -90 mV beträgt, zu einem Membranpotential von +30 bis +50 mV (BERS 2001). Dabei führt der elektrische Stimulus zunächst zu einer geringfügigen Depolarisation, die jedoch, sobald sie ein Membranpotential von ca. -70 mV erreicht hat, dazu führt, dass sich spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle öffnen. Durch diese schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanäle strömen nun  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle und verursachen eine weitere Depolarisation der sarkolemmalen Membran bis hin zu einem Membranpotential von +30 bis +50 mV. Daraufhin öffnen sich die spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die für

den Kontraktionszyklus von eminent wichtiger Bedeutung sind und deshalb weiter unten genauer beschrieben werden. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bedingt zum einen die Plateau-Phase des Membranpotentials, während der das Membranpotential bei 0mV liegt, zum anderen fungiert das über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  als Trigger, der über den Ryanodinrezeptor (RyR) zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern der Myozyten, dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), führt (BASSANI 1993; DELBRIDGE et al. 1997). Bisher konnten drei Isoformen des Ryanodinrezeptors identifiziert werden. Dabei stellt der Ryanodinrezeptor 2 (RyR2) die im Herzen dominierende Isoform dar (INUI et al. 1987). Begünstigt wird diese  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (FABIATO 1985; FABIATO und FABIATO 1975) durch die funktionelle und räumliche Organisation von 10 bis 25 L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und 100 RyR2 im Bereich der T-Tubuli und des SR in Form von „Couplons“ (BERS und GUO 2005; ZALK et al. 2007). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR spielt beim Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca. 100 nM auf ca. 1  $\mu\text{M}$  die entscheidende Rolle (MAIER und BERS 2002). An die Plateau-Phase des Aktionspotentials schließt sich die Repolarisation an, die hauptsächlich durch auswärtsgerichtete  $\text{K}^+$ -Ströme verursacht wird (BERS 2001).

### 1.2.2 Der Querbrückenzyklus

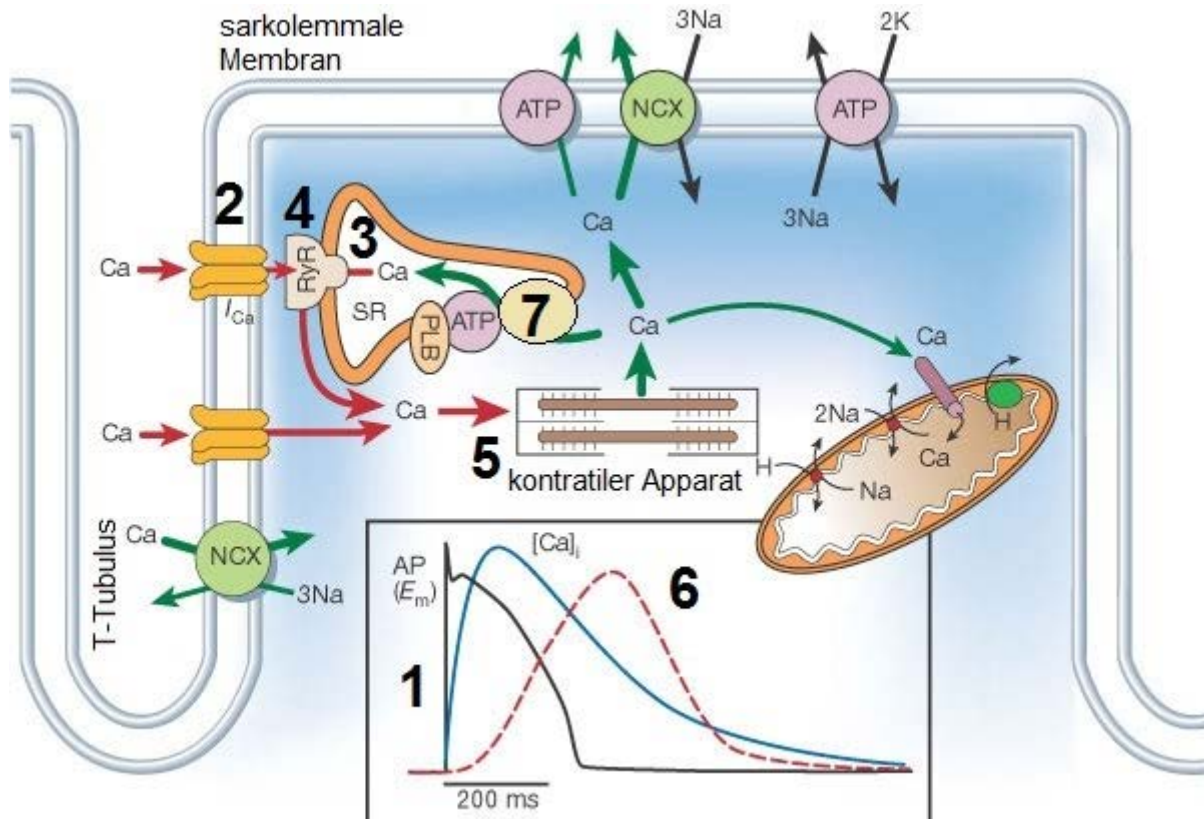
Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert den kontraktile Apparat, der aus Myosin und Aktinfilamenten besteht. Myosin ist ein aus zwei schweren und vier leichten Ketten bestehendes Motorprotein, das die chemische Energie des Adenosintriphosphats (ATP) nutzt, um sich an den Aktinfilamenten, die aus mehreren Aktinmonomeren bestehen, entlang zu bewegen. Die Bindung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C, das mit dem Aktinfilament assoziiert ist und zudem mit Troponin I, Troponin T und Tropomyosin einen Komplex bildet, bewirkt eine Konformationsänderung in diesem Komplex, die wiederum bedingt, dass das Tropomyosin nicht mehr die Myosinbindestelle des Aktinfilaments blockiert und es somit zu einer Bindung des Myosins an das Aktinfilament kommen kann. Zuvor bindet Myosin ein ATP und hydrolysiert dieses zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat, was eine Strukturumlagerung des Myosins (Umklappen aus der 45-Grad-Stellung in die 90-Grad-Stellung) bedingt. Jetzt kommt es zur Bindung des Myosins an das Aktinfilament. Es folgt der Kraftschlag, währenddessen das ADP und das Phosphat vom Myosin abdissoziieren und das Myosin aus einer 90-Grad-Stellung in eine 45-Grad-Stellung umspringt. Die Verschiebung des Aktinfilaments und des Myosins gegeneinander beträgt pro Kraftschlag 10nm. Nach der Ausführung des Kraftschlages wird ein weiteres ATP am Myosin gebunden, um die Bindung zwischen Myosin und Aktinfilament zu lösen, was auch als Weichmacherwirkung von ATP bezeichnet wird (BERS 2001). Der als Querbrückenzyklus

bezeichnete Kontraktionsvorgang (RAYMENT et al. 1993) kann erneut beginnen oder die Relaxation eingeleitet werden.

### 1.2.3 Die Relaxation

Die Relaxation der Myozyten erfordert die Senkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Aufgrund der sinkenden intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dissoziieren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von Troponin C ab und Tropomyosin blockiert wieder die Bindungsstellen der Aktinfilamente für Myosin. Die Senkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt mittels verschiedener Proteine: Die sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), deren dominante kardiale Isoform die SERCA2a ist, der sarkolemmale  $\text{Na}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und der mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter sind an der Elimination des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt. Der Anteil jedes einzelnen Proteins an der Eliminierung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  ist je nach Spezies unterschiedlich. Das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  wird während der Relaxation zum größten Teil über die SERCA2a in das SR und teilweise auch über den NCX aus der Myozyte hinausgepumpt (BERS 2001). Beim gesunden Menschen beträgt das Verhältnis des durch die SERCA2a und NCX eliminierten  $\text{Ca}^{2+}$  70% zu 30%, während dieses Verhältnis bei der Maus bei 90% zu 10% liegt (BERS 2002). Abgesehen von der Spezies ist auch die stimulierende Frequenz an dem Verhältnis beteiligt. Vor allem bei Kaninchen und Menschen nimmt der Anteil des durch die SERCA2a eliminierten  $\text{Ca}^{2+}$  bei höherer Grundfrequenz zu. Bei Herzinsuffizienz ist dies nur bedingt möglich (PIESKE et al. 1999). Die SERCA2a pumpt das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  unter Verbrauch von ATP in das SR, wobei ihre Funktion durch das räumlich assoziierte Protein Phospholamban moduliert werden kann. Der NCX tauscht ein intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion gegen drei extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Ionen aus. Dabei ist der elektrochemische Gradient der zwischen der intra- und der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration besteht, die treibende Kraft des Austausches. Nur ein geringer Teil des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  (ca. 2%) wird mittels der sarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporters eliminiert.





**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung, modifiziert nach BERS (2002).** Das Aktionspotential (1) führt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (2), das wiederum als Trigger für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR (3) über den RyR2 (4) dient. Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zur Aktivierung des kontraktiven Apparates (Myosin- und Aktinfilamente, (5) und es kommt zu einer Kontraktion (6). Um eine Relaxation herbeizuführen, muss das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  wieder eliminiert werden (grüne Pfeile). Eine zentrale Rolle spielt dabei die SERCA2a (7), die  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol in das SR (3) pumpt.

### 1.3 Der L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal

In diesem Abschnitt werden zunächst die Einteilung und das Vorkommen der verschiedenen Gruppen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und der Aufbau und die Struktur des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals erklärt, um daraufhin die Funktion des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in den Myozyten, die Modulation sowie die Assoziation mit dem Ryanodin-Rezeptor zu erläutern.

#### 1.3.1 Einteilung und Vorkommen der verschiedenen Gruppen von $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen

Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal gehört zu einer Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die in drei Gruppen eingeteilt werden können (NOWYCKY et al. 1985):

1. Die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zeichnen sich durch eine große Leitfähigkeit (*Large conductance*), eine lange Öffnungszeit (*Long lasting opening*) aus, öffnen erst bei

starken Depolarisationen (*Large depolarisation*) der Zellmembran und sie sind sensitiv gegenüber 1,4-Dihydropyridin. Deshalb werden sie auch als Dihydropyridin-Rezeptoren bezeichnet.

2. Die T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle besitzen im Vergleich dazu nur eine geringe Leitfähigkeit (*Tiny*), eine kurze Öffnungszeit (*Transient*), öffnen nur bei negativen Membranpotenzialen und sind nicht sensitiv gegenüber DHP.
3. Die N-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sind weder L- noch T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (*Neither*) und werden hauptsächlich in Neuronen exprimiert.

Des Weiteren werden noch P/Q- und R-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle unterschieden, die ebenfalls hauptsächlich in Neuronen exprimiert werden. Innerhalb der einzelnen Gruppen bestehen zudem große Unterschiede.

In Myozyten werden ausschließlich der L- und der T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal exprimiert, wobei in den Vorhöfen vor allem T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vorkommen, während in den Ventrikeln L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle deutlich überwiegen (Bers 2001). Die T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle spielen, da sie, wie oben bereits erwähnt, nur bei negativen Membranpotentialen geöffnet sind und nur über eine geringe Leitfähigkeit verfügen, für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während des Aktionspotentials (HESS 1988) eine vernachlässigbare Rolle.

### 1.3.2 Aufbau und Struktur des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals

Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der Myozyten ist ein Heterotetramer und besteht demzufolge aus mehreren Untereinheiten. In den folgenden Abschnitten werden die  $\alpha_1$ -Untereinheit, die  $\beta$ -Untereinheit sowie die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit beschrieben.

#### 1.3.2.1 Die $\alpha_1$ -Untereinheit

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit formt die Pore des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und ist somit essentiell für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum in den intrazellulären Raum. Im Herzen werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle anhand ihrer unterschiedlichen  $\alpha_1$ -Untereinheiten charakterisiert. Im Zusammenhang mit dem L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal sind zwei verschiedene Isoformen bekannt,  $\alpha_{1C}$  und  $\alpha_{1D}$ . An dieser Stelle wird nur auf die am häufigsten im Herzen vorkommende Isoform der  $\alpha_1$ -Untereinheit, die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit, eingegangen.

Die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit ist mit den anderen Untereinheiten fest assoziiert, jedoch nicht kovalent verbunden. Die anderen Untereinheiten modulieren die Eigenschaften der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit. Die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit beinhaltet vier Domänen, die jeweils aus sechs transmembranären Regionen bestehen sowie jeweils einen zytoplasmatischen C- bzw. N-Terminus. Der N-

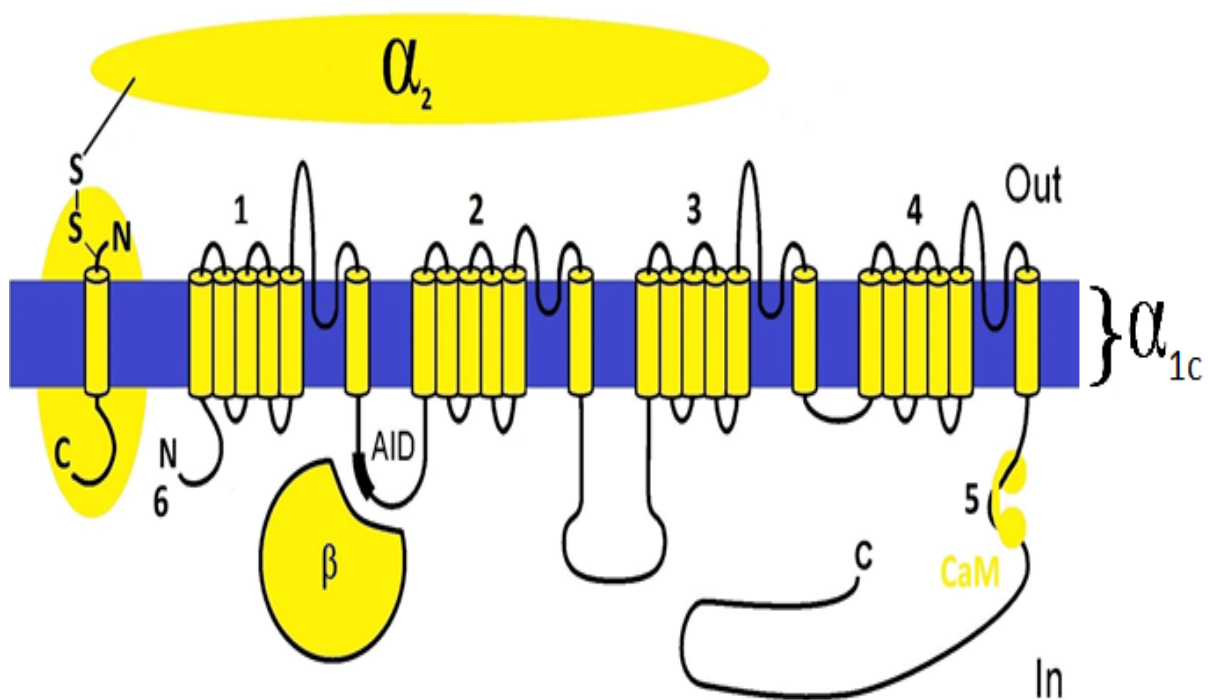
Terminus der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit wird u. a. von der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), auf die weiter unten näher eingegangen wird, phosphoryliert (HUDMON et al. 2005). Der C-Terminus wird sowohl von der CaMKII (HUDMON et al. 2005) als auch von der Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert (MITTERDORFER et al. 1996; DE JONGH et al. 1996), was jeweils den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom fördert, und beinhaltet zudem die Bindungsstelle des Calmodulin (CaM) (KIM et al. 2004), die die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vermittelt (PETERSON et al. 1999; ZUHLKE et al. 1999).

### 1.3.2.2 Die $\beta$ -Untereinheit

Die beiden dominierenden Formen der  $\beta$ -Untereinheit im Herzen sind die  $\beta_2$ -Untereinheit und die  $\beta_3$ -Untereinheit. Die  $\beta$ -Untereinheiten sind zytoplasmatisch und können unter anderem an die  $\alpha_1$ -*interaction domain* (AID), die sich im zytoplasmatischen *Linker* zwischen den Domänen I und II der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit befindet, binden und dadurch die Funktion des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals modulieren. Die CaMKII phosphoryliert die  $\beta_{2A}$ -Untereinheit, die häufigste  $\beta$ -Untereinheit im Herzen, und fördert dadurch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (GRUETER et al. 2006; GRUETER et al. 2008; ABIRIA und COLBRAN 2010; HULLIN et al. 2007; KOVAL et al. 2010). Wie oben bereits erwähnt gehen andere Arbeitsgruppen davon aus, dass das Substrat der CaMKII die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit ist (HUDMON et al. 2005) und dementsprechend ist nach wie vor umstritten, wie genau die CaMKII den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal beeinflusst. Auch die PKA kann die  $\beta_2$ -Untereinheit phosphorylieren und so den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal modulieren (BUNEMANN et al. 1999).

### 1.3.2.3 Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit

Die  $\alpha_2$ -Untereinheit befindet sich extrazellulär und die  $\delta$ -Untereinheit ist transmembranär. Die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit beeinflusst die Kanaldichte, das Ausmaß der Ladungsbewegung durch den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal sowie die Affinität von Rezeptorantagonisten der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit.



**Abb. 1.2: Aufbau und Struktur des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, modifiziert nach PITT et al. (2006).** In der Abbildung sind die verschiedenen Untereinheiten des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals dargestellt: Die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit, deren vier Domänen (1-4), C-Terminus samt CaM-Bindungsstelle (5) und N-Terminus (6) abgebildet sind, die  $\beta$ -Untereinheit und die AID, an die die  $\beta$ -Untereinheit bindet, sowie die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit, bestehend aus der extrazellulären  $\alpha_2$ -Untereinheit und der transmembranären  $\delta$ -Untereinheit.

### 1.3.3 Funktion des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in den Myozyten

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal wird durch die Depolarisation des Membranpotentials aktiviert. Die Inaktivierung erfolgt zum einen durch das sinkende Membranpotential und zum anderen durch die steigende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Da ein Großteil des  $\text{Ca}^{2+}$ , das während der Plateau-Phase ins Zytosol gelangt, aus dem SR stammt, wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR um 50% reduziert (BERS 2002). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann lokal, d.h. im zwischen der Membran der T-Tubuli und dem SR gelegenen Zytosol, während der Plateau-Phase ein Maximum von 50  $\mu\text{M}$  erreichen. Die steigende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hat also einen lokalen, reduzierenden Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal. Dieser Effekt wird durch Calmodulin (CaM) vermittelt, das nachdem es sich mit intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  assoziiert hat, an die kanalbildende  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bindet (PITT et al. 2001; HALLING et al. 2005).

### 1.3.4 Modulation des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals

Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal wird durch verschiedene Enzyme wie zum Beispiel Kinasen und Phosphatasen in seiner Funktion moduliert. Kinasen sind Enzyme, die Phosphatreste von Nukleosidtriphosphaten wie zum Beispiel ATP auf andere Moleküle übertragen. Phosphatasen hingegen spalten mittels Hydrolyse Phosphatreste von Molekülen ab.

1. Die Proteinkinase A phosphoryliert, nachdem sie selbst durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert wurde, den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, was einen verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Folge hat (BERS 2001; KAMP und HELL 2000; WANG et al. 2004).
2. Die CaMKII phosphoryliert sowohl die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit als auch die  $\beta_{2a}$ -Untereinheit des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals (HUDMON et al. 2005; GRUETER et al. 2006; HULLIN et al. 2007; ABIRIA und COLBRAN 2010), was ebenfalls zu einem verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt (ANDERSON et al. 1994; YUAN und BERS 1994; XIAO et al. 1994; DZHURA et al. 2000).
3. Die Proteinkinase G phosphoryliert den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, was zu einer Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms führt (JIANG et al. 2000).
4. Der Einfluss der Proteinkinase C auf den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ist nach wie vor umstritten, da sowohl ein fördernder Einfluss als auch ein inhibierender Einfluss nachgewiesen werden konnte (KAMP und HELL 2000).
5. Des Weiteren wird die Funktion des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals durch Calcineurin, eine Phosphatase, beeinflusst, was ebenfalls den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verstärkt (TANDAN et al. 2009).

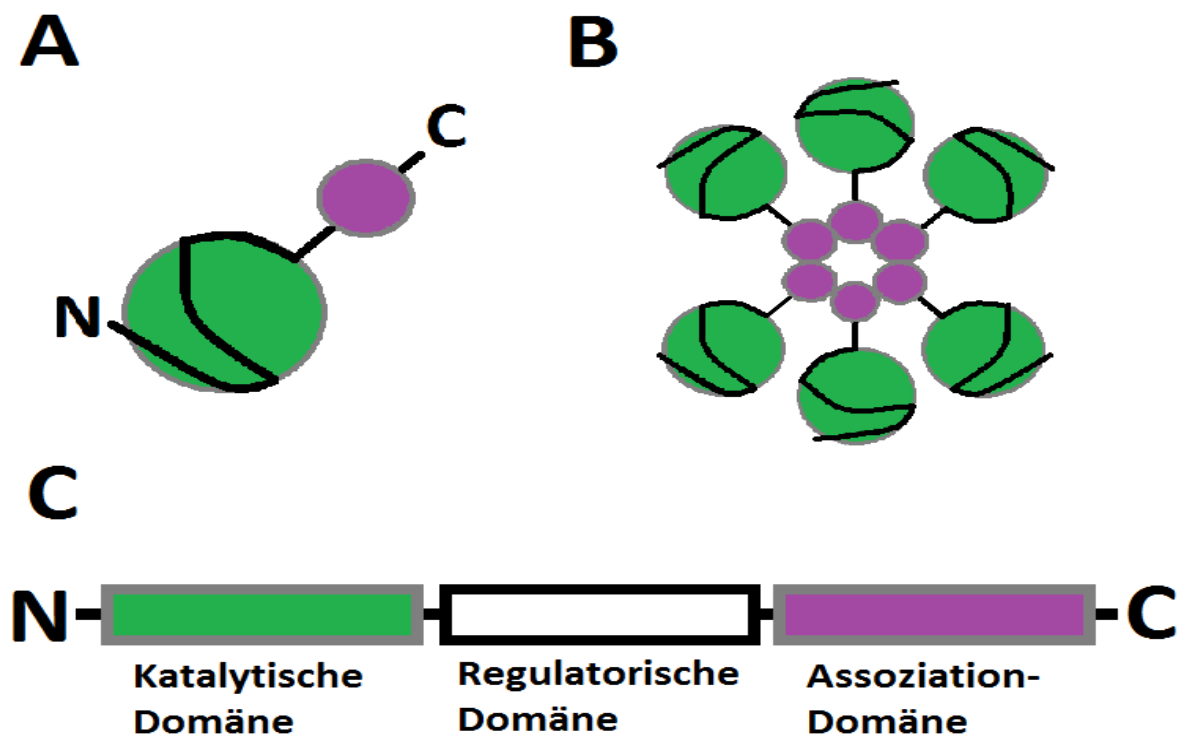
## 1.4 Die $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

Die Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMK) setzt sich zusammen aus der CaMK I, II und IV. Die CaMKII spielt bei der Regulation der elektromechanischen Kopplung in den kardialen Myozyten eine entscheidende Rolle. Bei der CaMKII handelt es sich um eine multifunktionelle Serin/Threonin-Proteinkinase (BRAUN und SCHULMAN 1995). Es sind vier Isoformen der CaMKII,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , bekannt, die jeweils von verschiedenen Genen kodiert werden. In den kardialen Myozyten werden die ubiquitär vorkommende CaMKII $\gamma$  sowie die CaMKII $\delta$  exprimiert, wobei die CaMKII $\delta$  die vorherrschende Isoform ist (EDMAN und SCHULMAN 1994; MAIER und BERS 2002; TOBIMATSU und FUJISAWA 1989). Von der CaMKII $\delta$  existieren zwei Splicevarianten: Die CaMKII $\delta_C$  und die CaMKII $\delta_B$  (EDMAN und SCHULMAN 1994). Während die CaMKII $\delta_B$

bedingt durch eine zusätzliche Kernlokalisierungssequenz überwiegend im Zellkern vorkommt, befindet sich die CaMKII $\delta_c$  im Zytosol (SRINIVASAN et al. 1994; ZHANG et al. 2002; ZHANG und BROWN 2004).

#### 1.4.1 Struktur und Aufbau der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II

Die CaMKII ist ein Holoenzym, das aus 12 Monomeren besteht. Dabei ist das Holoenzym in Form von zwei aufeinander gestapelten Ringen, die jeweils sechs Monomere enthalten, aufgebaut. Jedes der 12 Monomere beinhaltet eine aminoterminal katalytische Domäne, eine regulatorische Domäne und eine carboxyterminale Domäne, die für die Oligomerisation des Holoenzym von Bedeutung ist (MAIER und BERS 2002). Innerhalb der regulatorischen Domäne überlappen sich eine autoinhibitorische Region und eine Bindungsregion für CaM.



**Abb. 1.3: Struktur und Aufbau der CaMKII, modifiziert nach MAIER und BERS (2002).** **A** Struktur eines CaMKII-Monomeres (katalytische Domäne blau, regulatorische Domäne grau und Assoziations-Domäne grün) **B** Struktur eines aus sechs Monomeren bestehendem CaMKII-Ringes **C** Schematischer Aufbau eines CaMKII-Monomeres

### 1.4.2 Aktivierung der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II

Unter basalen Bedingungen wird die katalytische Domäne von der autoinhibitorischen Region der regulatorischen Domäne blockiert, was zu einer submaximalen Aktivität der katalytischen Region und somit des gesamten Enzyms führt.

Eine steigende intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, wie zum Beispiel während der Systole, wird von der CaMKII indirekt registriert, indem CaM zunächst Ca<sup>2+</sup> und dann an die Bindungsregion für CaM innerhalb der regulatorischen Domäne bindet. Das führt dazu, dass die katalytische Domäne nicht mehr von der autoinhibitorischen Region der regulatorischen Domäne blockiert wird. Sobald das kalzifizierte CaM (Ca<sup>2+</sup>/CaM) sich wieder von der regulatorischen Domäne entfernt, wird die katalytische Domäne wieder von der autoinhibitorischen Region der regulatorischen Domäne blockiert.

Wenn die Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und dementsprechend auch die Konzentration des Ca<sup>2+</sup>/CaM länger anhält oder mit einer höheren Frequenz auftritt, dann führt die Autophosphorylierung der autoinhibitorischen Region an Threonin 286 bzw. Threonin 287 zu einer höheren Affinität der CaMKII gegenüber Ca/CaM und gleichzeitig zu einer Ca<sup>2+</sup>/CaM-unabhängigen Aktivität der CaMKII (MEYER et al. 1992; ZHANG und BROWN 2004). Aufgrund dieses Mechanismus besitzt die CaMKII auch nach Absinken der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration noch eine Aktivität von 20 bis 80% (LAI et al. 1986; LOU et al. 1986; SCHWORER et al. 1986). Weitere Mechanismen, die zu einer Ca<sup>2+</sup>/CaM-unabhängigen Aktivität der CaMKII führen sind die Oxidation zweier Methionin-Reste (Methionin 281 und Methionin 282), die in der regulatorischen Domäne lokalisiert sind (ERICKSON et al. 2008), sowie die Glykosilierung der CaMKII an Serin-279 (ERICKSON et al. 2013).

### 1.4.3 Inaktivierung und Inhibierung der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II

Eine Inaktivierung der CaMKII erfolgt durch Dephosphorylierung. Die Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2C können die CaMKII dephosphorylieren (ZHANG und BROWN 2004).

Die pharmakologische Inhibierung ist unter anderem mit *autocamide 2-related inhibitory peptide* (AIP), das in dieser Arbeit zu diesem Zweck verwendet wurde, möglich. Beim AIP handelt es sich um ein synthetisches Peptid, das die CaMKII nicht-kompetitiv hemmt, d. h. es konkurriert nicht mit dem Ca<sup>2+</sup>/CaM um dessen Bindungsregion in der regulatorischen Domäne. Wohingegen das KN-93, ein weiterer Inhibitor der CaMKII, ein kompetitiver Inhibitor ist. Dabei ist das AIP ein potenterer Inhibitor der CaMKII als zum Beispiel KN-93

und inhibiert die CaMKII bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  effektiv. AIP weist zudem keine Nebeneffekte auf andere Proteinkinasen auf (ISHIDA et al. 1995).

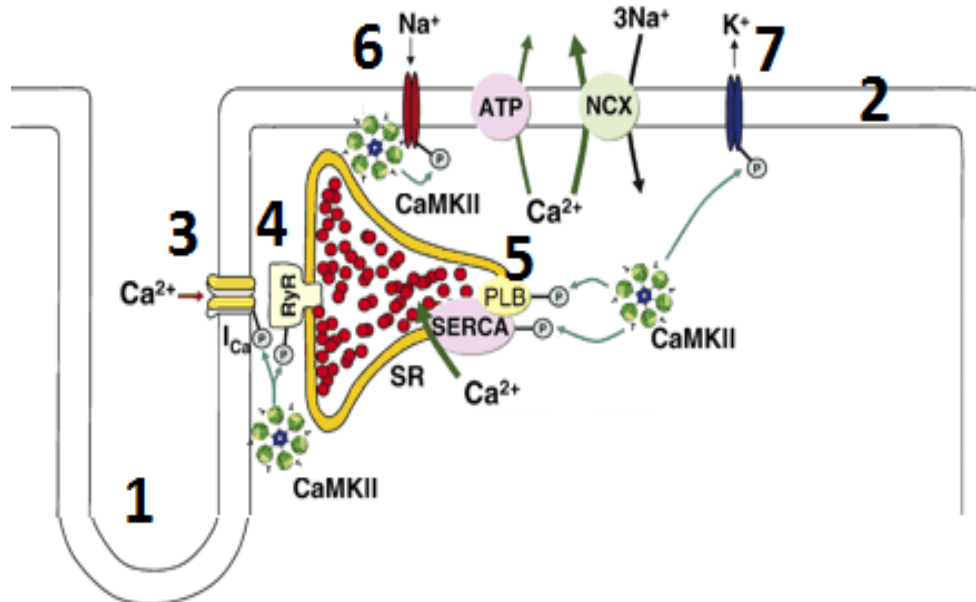
#### **1.4.4 Einfluss der $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II auf die elektromechanische Kopplung**

Die CaMKII kann die Funktion einiger wichtiger Proteine modulieren, indem sie diese phosphoryliert. U. a. phosphoryliert die CaMKII Phospholamban (PLB) (DAVIS et al. 1983; LE PEUCH et al. 1980), den RyR2 (HAIN et al. 1995; WITCHER et al. 1991) sowie Ionenkanäle wie den  $\text{Na}^+$ - (WAGNER et al. 2006), den  $\text{K}^+$ - (WAGNER et al. 2009) und den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (DZHURA et al. 2000).

An dieser Stelle soll vor allem auf den Einfluss der CaMKII auf die am  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel der Myozyten beteiligten Proteine wie den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, den RyR2, das PLB als auch die SERCA2a eingegangen werden.

Die Phosphorylierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bewirkt eine Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms, der wiederum einen stärkeren Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sowie eine Verlängerung des Aktionspotentials zur Folge hat (MAIER et al. 2003). Die Phosphorylierung des RyR2 an der Aminosäure Serin 2814 fördert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Austritt aus dem SR während der Systole aber auch der Diastole (AI et al. 2005; KOHLHAAS et al. 2006; MAIER et al. 2003; NEEF et al. 2010; BERS und GRANDI 2009; WEHRENS et al. 2004; RODRIGUEZ et al. 2003; LI et al. 1997; GUO et al. 2006; YANG et al. 2007). Durch den Einfluss der CaMKII auf PLB, ebenfalls durch eine Phosphorylierung, wird der inhibierende Einfluss des PLB auf die SERCA2a reduziert und deren Aktivität erhöht (LE PEUCH et al. 1979).





**Abb. 1.4: Einfluss der CaMKII auf die elektromechanische Kopplung, modifiziert nach MAIER und BERS 2007.** Durch Phosphorylierung beeinflusst die CaMKII die Funktion und Aktivität des T-Tubulus (1), sarkolemmale Membran (2), L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (3), des RyR2 (4), PLB und die SERCA2a (5) sowie den  $\text{Na}^+$ - (6) und den  $\text{K}^+$ -Kanal (7).

#### 1.4.5 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels und der elektromechanischen Kopplung in den Myozyten sind entscheidende Ursachen für die Entstehung der Herzinsuffizienz.

Es konnte in terminal insuffizienten Myozyten eine inverse bzw. negative Kraft-Frequenz-Beziehung nachgewiesen werden (GWATHMEY et al. 1987; HASENFUSS und PIESKE 2002; MULIERI et al. 1992; PIESKE et al. 1995). Als Ursache der inversen bzw. negativen Kraft-Frequenz-Beziehung wurden eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR vor einer Kontraktion (so genannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten) und eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme des SR zuzüglich eines daraus resultierenden reduzierten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes ermittelt (PIESKE et al. 1999; PIESKE et al. 1995). Diese Störungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels und der elektromechanischen Kopplung werden durch eine verminderte Expression und Aktivität der SERCA2a verursacht (HASENFUSS et al. 1994; MERCADIER et al. 1990; STUDER et al. 1994). Gleichzeitig ist die Expression des NCX sowie dessen Aktivität gesteigert (REINECKE et al. 1996; STUDER et al. 1994). Insgesamt kommt es zu einer Überladung des Zytosols mit  $\text{Ca}^{2+}$ , während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR aufgrund der verminderten Aufnahme abnimmt.

Weiterhin wird die Funktion des Herzens im Rahmen der Herzinsuffizienz durch die Abnahme der Dichte der  $\beta$ -Rezeptoren (BRISTOW und GINSBURG 1986) negativ beeinflusst.

Die CaMKII im Allgemeinen und die oben bereits beschriebenen Einflüsse der CaMKII auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel und die elektromechanische Kopplung werden mit einigen der im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz identifizierten Pathomechanismen in Verbindung gebracht. So konnte interessanterweise in den kardialen Myozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine erhöhte Expression und Aktivität der CaMKII $\delta$  nachgewiesen werden (HOCH et al. 1999; KIRCHHEFER et al. 1999). Zudem konnte in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, dass transgene Versuchstiere, die entweder die CaMKII $\delta_b$  (ZHANG et al. 2002) oder die CaMKII $\delta_c$  (MAIER et al. 2003; ZHANG et al. 2003) überexprimieren, eine Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz entwickeln.

Die CaMKII kann durch ihren Einfluss auf Proteine, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind, die Entstehung von Torsade-de-pointes-Tachykardien (SAG et al. 2009; WU et al. 2002) sowie die Entwicklung einer kontraktile Dysfunktion begünstigen (AL et al. 2005; MAIER et al. 2003; SHANNON et al. 2003; ZHANG et al. 2003).

Des Weiteren konnte auch ein Einfluss der CaMKII auf die Genexpression in Myozyten bewiesen werden (ZHANG et al. 2007; BACKS et al. 2009; ZHANG et al. 2002).

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden folgende Fragen in Bezug auf den Einfluss der CaMKII auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel der Myozyten bearbeitet:

1. Kann trotz einer genetischen Ausschaltung der CaMKII $\delta$  eine Hypertrophie durch Nachlasterhöhung induziert werden?
2. Wird die Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal sowohl sieben als auch 35 Tage nach der Induktion einer nachlastbedingten Hypertrophie durch einen direkten Einfluss der CaMKII verursacht?
3. Kann die Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal sowohl sieben als auch 35 Tage nach der Induktion einer Hypertrophie durch Inhibition der CaMKII mittels AIP oder mit Hilfe einer genetischen Ausschaltung der CaMKII normalisiert werden?
4. Wie verhält sich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal sieben gegenüber 35 Tage nach der Induktion einer nachlastinduzierten Hypertrophie?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Wildtyp-Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden weibliche C57BL/6J Wildtyp-Mäuse verwendet, die zum Zeitpunkt der Operation acht Wochen alt waren.

### 2.2 Generierung der CaMKII $\delta$ Knockout-Maus

Die Generierung der CaMKII $\delta$ -Knockout-Maus erfolgte in den Laboren von Dr. Eric N. Olson (Houston, Texas, USA) und von Dr. Johannes Backs (Heidelberg, Deutschland), die die Mäuse dann freundlicherweise u. a. für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stellten.

Die CaMKII $\delta$ -Knockout-Maus wurde durch das Cre-LoxP-Verfahren generiert. Das Cre-LoxP-Verfahren ist eine Technik, die es ermöglicht einzelne DNA-Sequenzen in lebenden Organismen zu entfernen. Dabei können spezifische Gewebe- oder Zellarten genetisch modifiziert werden, während die restlichen Zellen des Organismus von dieser genetischen Modifizierung unbeeinflusst bleiben.

Das Verfahren ist benannt nach dem Cre-Enzym sowie den LoxP-Stellen. Das Cre-Enzym gehört zur Familie der Rekombinasen, die die Spaltung und anschließende Wiederverknüpfung von DNA zwischen zwei spezifischen DNA-Sequenzen katalysieren. Um eine DNA-Sequenz zu entfernen, muss der entsprechende Abschnitt der DNA von zwei spezifischen DNA-Sequenzen, den LoxP-Stellen, flankiert sein, die von dem Cre-Enzym erkannt werden, das dann die DNA-Sequenz zwischen den beiden LoxP-Stellen entfernt. Die DNA wird anschließend wieder zusammengefügt, dieser Vorgang wird von einer Ligase katalysiert. Bei Ligasen handelt es sich um Enzyme, die unter Verbrauch von Energie, die in Form von zum Beispiel Nukleosidtriphosphaten bereitgestellt wird, zwei Moleküle durch eine chemische Bindung miteinander verknüpfen.

Zur Generierung der CaMKII $\delta$ -Knockout-Maus wurde eine LoxP-tragende-Maus generiert, in der die Exone 1 und 2 des für die CaMKII $\delta$  kodierenden Gens von LoxP-Stellen flankiert wurden. Ein Exon, ein Abschnitt des gesamten Gens, wird im Rahmen der Proteinbiosynthese exprimiert, während die Introns, ebenfalls Abschnitte des Gens, nicht exprimiert werden. Die Exone 1 und 2 kodieren einen Teil der katalytischen Domäne der

CaMKII $\delta$ . U. a. kodieren sie die für die Funktion der CaMKII $\delta$  essentiellen ATP-Bindungsstelle.

Die LoxP-tragende-Maus wurde mit einer Cre-tragenden-Maus, die das Cre-Enzym exprimiert, gekreuzt und die Deletion des oben beschriebene Abschnitts im Gen der CaMKII $\delta$  erfolgte mittels Cre-Enzym (BACKS et al. 2009).

### **2.3 Genotypisierung der CaMKII $\delta$ Knockout-Mäuse**

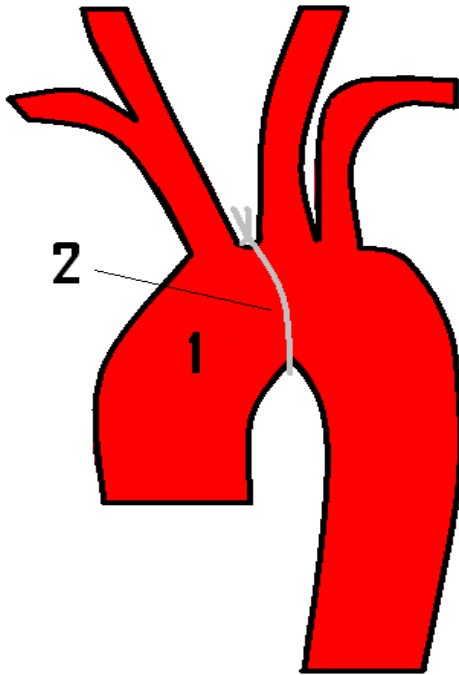
Zur Überprüfung des Knockouts der CaMKII $\delta$  erfolgte eine Genotypisierung im Labor von Prof. Dr. med. Lars Maier anhand von aus den Schwanzspitzen der jeweiligen Mäuse isolierter DNA. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde unter der Verwendung des TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt, um diejenigen Abschnitte der DNA, die für die CaMKII $\delta$  kodieren, zu vervielfältigen. Anschließend wurde die Genotypisierung mit einer Gelelektrophorese der aus der Polymerase-Kettenreaktion hervorgegangenen DNA-Abschnitte abgeschlossen.

### **2.4 Durchführung der TAC/Sham-Operation**

Zur Vorbereitung der Mäuse auf die Operation wurde ihnen drei Tage vorher Metamizol (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) als Schmerzmedikation im Trinkwasser in einer Dosierung von 200 mg/kg KG verabreicht.

Eine halbe Stunde vor der Operation wurde den Mäusen Buprenorphin (Reckitt Benckiser GmbH, Mannheim, Deutschland) in einer Dosierung von 0,1 mg/kg KG gespritzt. Während der eigentlichen Operation wurde eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Abbott GmbH und Co. KG, Wiesbaden, Deutschland), das in einer Gaskonzentration von 5 % verabreicht wurde, durchgeführt.

Um den Aortenbogen darstellen zu können, wurde zunächst im Bereich der Kehle ein Querschnitt gesetzt, im eröffneten Situs die Schilddrüse präpariert und zur Seite geschoben. Als nächstes wurde die infrahyale Muskulatur quer durchgeschnitten und mit einer dafür geeigneten Schere das Brustbein durchtrennt. Jetzt konnte ein Haken um den Aortenbogen herumgeführt und durch den entstandenen künstlichen Kanal ein Faden um den Aortenbogen gezogen werden. Eine handelsübliche 27G (Gauge)-Kanüle wurde mit Hilfe dieses Fadens an den Aortenbogen gebunden und nachdem die 27G-Kanüle wieder entfernt worden war, wurde der Operationssitus wieder verschlossen.



**Abb. 2.1 Schematische Darstellung der TAC.** (1) Aortenbogen; (2) der die Aorta konstringierende Faden, der im Rahmen der Operation angelegt wurde

Die SHAM-Operation wurde im Sinne einer Kontrolloperation auf dieselbe Art und Weise durchgeführt, außer, dass kein Faden um die Aorta gezogen wurde.

In den folgenden sieben Tagen erhielten die operierten Mäuse täglich im Trinkwasser 200 mg/kg KG Metamizol zur Therapie der durch die Operation verursachten Schmerzen.

Nach sieben Tagen wurden speziell diejenigen Mäuse echokardiographisch untersucht, die einer TAC-Operation unterzogen worden waren, um festzustellen, ob die Operation zu einer Druckbelastung und daraus folgender Hypertrophie des Herzens geführt hatte.

## 2.5 Isolation der Myozyten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt. Im Folgenden wird die Isolierung der Kardiomyozyten aus den Mäuseherzen im Detail beschrieben. Die Isolation wurde auf dieselbe Art und Weise durchgeführt wie sie auch schon in anderen Publikationen aus dem Labor Prof. Dr. L. Maier

zur Anwendung kam (MAIER et al. 2003; KOHLHAAS et al. 2006; WAGNER et al. 2006; TOISCHER et al. 2010).

Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung der Niedersächsischen Tierschutzbehörde (Tierversuchsanzeigen Mai 2003 und August 2006, für die „Tötungen von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß § 4 TierSchG, Aktenzeichen T 9.02 und T 15.06, Bezirksregierung Braunschweig; Anzeigende: Dr. Harald Kögler für T 9.02 und Prof. Dr. L. S. Maier für T 15.06) und der örtlichen Tierschutzkommission der Landesbehörde in Oldenburg (LAVES) (Aktenzeichen Az 33.9.42502-04/088/06, Bezirksregierung Braunschweig, Anzeigender Prof. Dr. Lars S. Maier) sowie in Übereinstimmung mit dem *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996) durchgeführt.

Zunächst wurde die Isolation der Myozyten vorbereitet: Dazu wurde die modifizierte Langendorff-Perfusionsanlage gereinigt und dann mit Isolationstyrode gespült. Das Wasserbad der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage wurde eingeschaltet, damit es sich auf 36,5 Grad Celsius erwärmen konnte. Drei Petrischalen wurden jeweils mit Isolationstyrode gefüllt und auf einer Eisplatte gekühlt. Diese Eisplatte wiederum wurde unter ein Binokular gestellt. Eine stumpfe 18G Kanüle wurde auf eine handelsübliche Insulinspritze gesteckt, die mit Isolationstyrode gefüllt wurde, und so fixiert, dass die Kanülenspitze unter dem Binokular zu sehen war. Ein 6 cm langes Stück Faden, Prolene 3.0 oder 4.0 (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland), wurde zu einem doppelten Kreuzknoten gelegt und über die Kanüle gezogen. Jetzt wurde noch die Langendorff-Perfusionsanlage zur Hälfte mit Isolationstyrode gefüllt, so dass zu Beginn des enzymatischen Verdau das Herz zunächst mit Isolationstyrode gespült wurde, und die andere Hälfte mit Enzymlösung gefüllt, die dann nach der Isolationstyrode durch die Koronarien gespült wurde, um das Herz enzymatisch zu verdauen.

Waren diese Vorbereitungen getroffen, wurde die Maus mit 800 µl Forene 100% (Abbott GmbH und Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) in einem luftdichten Exsikkator betäubt. Als Indikator für eine ausreichende Narkotisierung der Maus diente deren Atemfrequenz. Gewartet wurde, bis die Maus regungslos blieb und die Atemfrequenz der Maus deutlich langsamer geworden war. Dann wurde die Maus zügig aus dem Exsikkator genommen und umgehend auf einer festen Unterlage mit Hilfe eines Widerlagers das Genick gebrochen und somit die Maus getötet. Anschließend wurde die Maus gewogen, damit zu einem späteren Zeitpunkt das Verhältnis des Herzgewichtes zum Körpergewicht bestimmt werden konnte (siehe 2.7 Erhebung der biometrischen Daten).

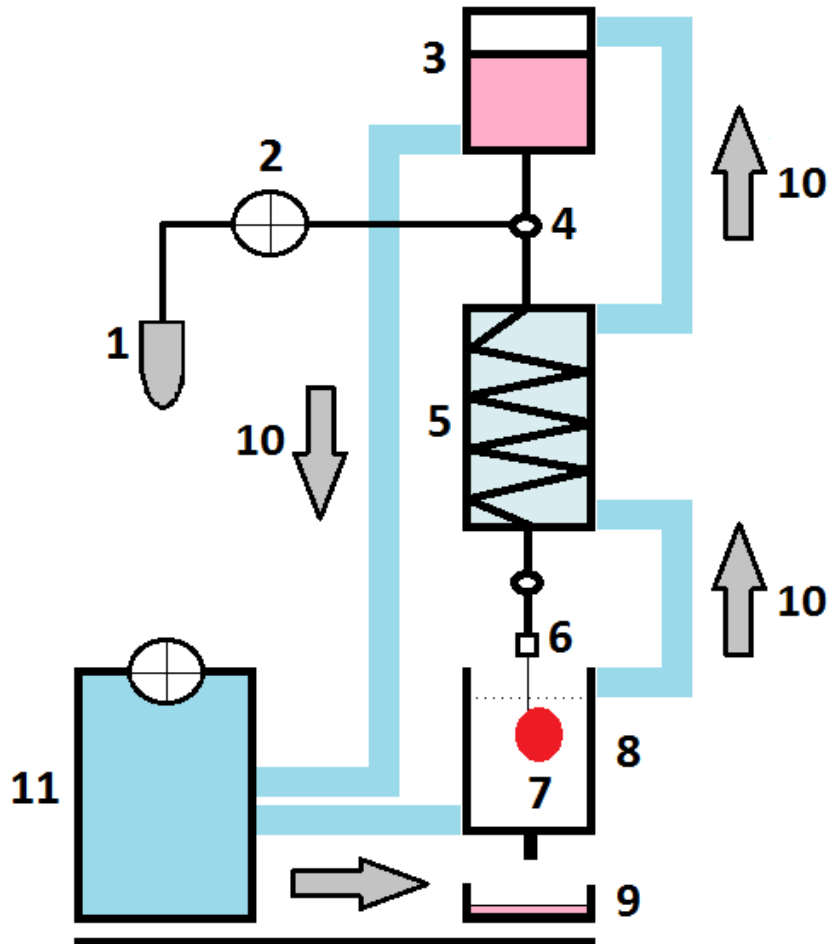
Danach wurde die Bauchdecke mit einer chirurgischen Pinzette angehoben und mit einer dafür geeigneten Schere eröffnet. Die Schnittführung wurde in Richtung der beiden

Vorderläufe konusartig bis zur unteren Thorxappertur in der vorderen Axillarlinie fortgeführt. Als nächstes wurde der Processus xyloideus des Sternums mit einer chirurgischen Pinzette fixiert und das Zwerchfell mit Hilfe einer Schere vorsichtig durchtrennt. Das Herz wurde nun mit Hilfe einer gebogenen Pinzette an der Herzbasis gefasst und mit einer Schere der Gefäßbaum oberhalb der gebogenen Pinzette durchtrennt. Das Herz wurde umgehend in eine der gekühlten und mit Isolationstyrode gefüllten Petrischalen, die unter dem Binokular stand, gelegt, auf möglicherweise verbliebenes Lungengewebe inspiziert und vorsichtig komprimiert, um verbliebenes Blut aus dem Herzen zu waschen. An diesem Punkt wurde das Herz in einer der anderen vorbereiteten Petrischalen, die zuvor gewogen wurde, gelegt und anschließend gewogen, damit später die Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisse bestimmt werden konnten (siehe Abschnitt 2.7 Erhebung der biometrischen Daten).

Im Anschluss wurde das Herz in die unter dem Binokular stehende Petrischale gegeben und die Aorta ascendens mit Hilfe des Mikropräparationsbestecks auf die Kanüle gezogen. Dort wurde die Aorta ascendens durch den Faden und zusätzlich noch durch eine Gefäßklemme fixiert. War die Kanülierung erfolgreich, d. h. die Kanüle lag vor der Aortenklappe, dann konnten die Koronarien mit Isolationstyrode gespült werden und deren Farbe änderte sich von anfangs rot zu gelblich-transparent. Daraufhin wurde die Kanüle von der Spritze abgelöst und die Kanüle samt fixiertem Herzen in die modifizierte Langendorff-Perfusionsanlage eingesetzt. Der schematische Aufbau der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage ist in Abbildung 2.1 zu sehen.

In der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage wurde das Herz 5 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 3 ml/min mit kalziumfreier Isolationstyrode gespült.

Die kalziumfreie Isolationstyrode sorgte zum einen dafür, dass die Koronarien gespült und mögliche Thromben hinausgespült wurden, zum anderen, dass der Energieverbrauch der Herzmuskelzellen auf ein Minimum reduziert wurde. Das führt dazu, dass die Zellen weniger ATP verbrauchen, die Stoffwechselaktivität gering ist und die Zellen somit länger und unbeschadeter überleben.



**Abb. 2.2 Schematische Darstellung der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage modifiziert nach ROKITA 2008.** (1) Zentrifugenröhrchen mit Enzymlösung; (2) Rollenumwälzpumpe; (3) Reaktionsgefäß mit Temperiermantel, das mit Isolationstyrode gefüllt ist; (4) Drei-Wege-Hahn; (5) Schlangenkühler; (6) Kanüle; (7) Herz der getöteten Maus; (8) Reaktionsgefäß mit Temperiermantel, das während des enzymatischen Verdauungsvorgang mit Parafilm bedeckt; (9) Petrischale, die während des Verdau etwas Enzymlösung auffängt; (10) Schlauchleitung der Warmwasserzirkulation; (11) Gerät zur Erwärmung des zirkulierenden Wassers

Die jetzt folgende Perfusion mit der Enzymlösung geschah ebenfalls bei einer Geschwindigkeit von 3 ml/min. Die Enzymlösung enthielt u. a. Liberase TM (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und Trypsin (Life Technologies, Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika) (siehe Abschnitt 2.8 Lösungen und Chemikalien), welche das kollagene Bindegewebe des Herzens und den zellulären Verband der Zellen enzymatisch auflösten. Die Perfusion mit Isolationstyrode und Enzymlösung geschah bei 36,5 Grad Celsius.

Die Dauer der Perfusion mit Enzymlösung musste dabei der Größe und dem Gewicht des Herzens angepasst werden. Bei den TAC-Versuchstieren wurden die Herzen je nach Größe



und Gewicht 7 bis 15 Minuten enzymatisch verdaut, wohingegen die Herzen der SHAM-Versuchstiere 7 bis 10 Minuten enzymatisch verdaut wurden.

Während des Verdaus wurde eine Petrischale mit 2,5 ml Enzymlösung gefüllt. Nach Abschluss des Verdaus wurde das Herz durch einen Schnitt in der Vorhofebene von der Kanüle abgetrennt und in die mit 2,5 ml Enzymlösung gefüllte Petrischale gegeben. Die Ventrikel wurden noch zusätzlich mechanisch zerkleinert und anschließend 2,5 ml *Myozyte stopping buffer* (10% BCS) hinzugegeben, der den Verdauvorgang beendete. Die gesamte Zelllösung wurde anschließend durch eine Nylongaze (Porengröße 200 µm) in ein 50-ml-Röhrchen gekippt. In dem 50-ml-Röhrchen befanden sich nun ausschließlich gelöste Zellen. Schließlich wurde die Zelllösung in ein 15-ml-Röhrchen umgefüllt und mit dem Kalziumaufbau begonnen.

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Chemikalien ist im Abschnitt 2.8 Lösungen und Chemikalien beschrieben.

## 2.6 Kalziumaufbau

Vor dem Kalziumaufbau wurden vier 15-ml-Röhrchen mit unterschiedlich konzentrierten Kalziumlösungen gefüllt, das erste mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $c = 0,1$  mmol/l, das zweite mit  $c = 0,2$  mmol/l, das dritte mit  $c = 0,4$  mmol/l und das vierte mit  $c = 0,8$  mmol/l.

Der Kalziumaufbau begann, nachdem man aus dem 15-ml-Röhrchen, in das die Zelllösung gegeben wurde, nach sieben Minuten Sedimentationsphase den Überstand entfernt hatte. Es wurden 5 ml der angesetzten Kalziumlösung ( $c = 0,1$  mmol/l) vorsichtig auf das Zellpellet geschüttet. Danach wurden die Zellen durch vorsichtiges Schwänken des Röhrchens resuspendiert und anschließend ließ man die Zellen erneut sieben Minuten sedimentieren.

Daraufhin wurde dieser Schritt noch dreimal mit den oben genannten Kalziumlösungen wiederholt, wobei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in jedem Schritt erhöht wurde.

Nach dem vierten und letzten Schritt wurden die Zellen ohne Sedimentationsphase auf die vorbereiteten Messkammern (siehe 2.8.2 Vorbereitung der Messkammern und der Messanlage) gegeben.

## 2.7 Erhebung der biometrischen Daten

Bei jeder Maus, deren Herzzellen isoliert wurden, wurden vor der Isolation sowohl das Körper- als auch das Herzgewicht bestimmt. Dazu wurde die Maus kurz nach der Tötung und noch vor der Explantierung des Herzens gewogen und das Körpergewicht notiert. Das Herz wurde nach der Entfernung aus dem Thorax in einer Petrischale, deren Gewicht mitsamt der enthaltenen Isolationstyrode vorher bestimmt worden war, gewogen und anschließend das vorher bestimmte Gewicht der Petrischale abgezogen.

Aus den so erhobenen Daten wurde nach der Formel:  $\text{Herzgewicht}/\text{Körpergewicht (mg/g)}$  das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis errechnet, das ein geeignetes Maß für die Untersuchung der Herzhypertrophie ist.

## **2.8 Elektrophysiologische Messungen**

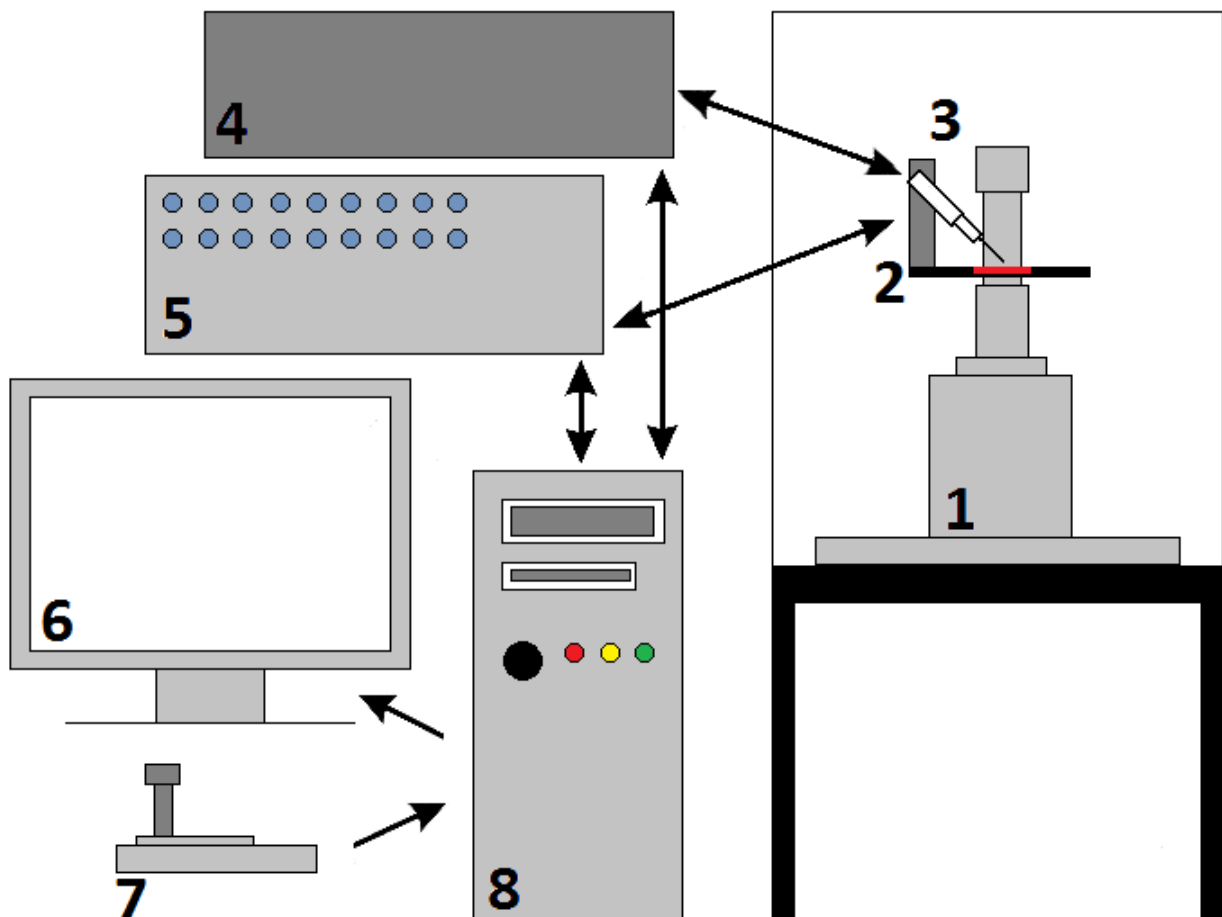
Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden mittels der Patch-Clamp-Technik gemessen. Im Folgenden werden das dafür notwendige Setup sowie die Durchführung der Messungen näher beschrieben.

Die Patch-Clamp-Technik ist eine elektrophysiologische Messmethode, die zur Messung von Ionenströmen, die durch entsprechende Kanäle in der Zellmembran fließen, dient. Diese Technik wurde erstmals von Erwin Neher und Bert Sakmann 1976 beschrieben.

### **2.8.1 Das Patch-Clamp-Setup**

Zur Durchführung von Patch-Clamp-Messungen werden benötigt: ein Faraday'scher Käfig, der den Messplatz gegenüber elektromagnetischen Schwingungen abschirmt, die ansonsten die Messungen stören könnten, ein schwingungsgedämpfter Tisch (Technical Manufacturing Corporation, Peabody, USA), der verhindern soll, dass sich die Pipette aufgrund von äußeren Einflüssen bewegt, ein inverses Mikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland), es dient der Darstellung der Zellen und erlaubt, da sich das Objektiv des Mikroskops unterhalb der Messkammer befindet, die Verwendung eines Mikromanipulators, der zur Positionierung der Pipetten eingesetzt wird und mit der Steuerungseinheit MIM4 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) sowie über den Computer gesteuert wird, ein Pipettenhalter mit Vorverstärker, der die von der Elektrode, dem sich in der Pipette befindenden chlorierten Silberdraht und der Erdung, der Badelektrode, gemessenen Signale empfängt und bereits anpasst, damit der EPC-10 Verstärker, der Haupt- oder Nachverstärker, in dem für ihn optimalen Bereich arbeiten kann. Der Haupt- oder

Nachverstärker verstärkt die vom Vorverstärker kommenden Signale nochmals und filtert diese außerdem noch. Des Weiteren erfüllt er die Funktion des analog-zu-digital und digital-zu-analog (AD/DA) -Wandlers und der Steuerungs- und Stimulationseinheit, die mit Hilfe des Computers bedient wird. Zusätzlich wird noch ein Pipettenpuller (Zeitz Instruments, Martinsried, Deutschland) benötigt, der aus Glaskapillaren (World Precision Instruments Inc., Sarasota, Florida, USA), die einen Innendurchmesser von 1,12 mm und einen Außendurchmesser von 1,5 mm haben, die Pipetten anfertigt.



**Abb. 2.3 Schematische Darstellung des Patch-Clamp-Setup.** (1) inverses Mikroskop; (2) Mikromanipulator; (3) Pipettenhalten mit Vorverstärker; (4) Steuereinheit des Mikromanipulators MIM 4; (5) Haupt/Nachverstärker; (6) Bildschirm; (7) Joystick zur manuellen Steuerung des Mikromanipulators; (8) Computer

### 2.8.2 Vorbereitung der Messkammern und der Messanlage

Im Rahmen der Vorbereitungen für die Patch-Clamp-Messungen wurden zunächst die benötigten Messkammern vorbereitet. Diese Messkammern waren Spezialanfertigungen und bestanden aus einem Kunststoffrahmen und einem Glasboden. Die Messkammern mussten vorher gründlich gereinigt und anschließend laminiert werden. Das Laminin (Sigma-Aldrichs, St. Louis, Missouri, USA) wurde, nachdem die Kammer gereinigt worden war und wieder vollständig getrocknet war, mit einer Pipette auf die Messkammer aufgetragen. Dafür wurden 1,5 µl Laminin benötigt. Das aufgetragene Laminin musste ca. 10 Minuten antrocknen, bevor die Zelllösung nach abgeschlossenem Kalziumaufbau hinzugefügt werden konnte.

Nachdem die Zelllösung auf die Messkammer gegeben wurde, brauchten die Zellen etwa 15 Minuten, um in den Messkammern zu sedimentieren und aufgrund der adhäsiven Eigenschaften des Laminin am Glasboden zu fixieren.

Für die weitere Vorbereitung der Patch-Clamp-Messungen mussten eine Pipettenlösung, die in die einzelnen Pipetten gegeben wurde, und eine Badlösung, die auf die Zellen in der Messkammer gegeben wurde, angesetzt werden (siehe 2.10 Lösungen und Chemikalien).

Nachdem die 15 Minuten abgelaufen waren, wurden die Messkammern in das Patch-Clamp-Setup montiert, die Badelektrode in der Messkammer platziert sowie die Kalziumlösung durch die Badlösung ausgetauscht.

### 2.8.3 Versuchsdurchführung

In die vor jeder Messung neu angefertigten Pipetten wurde die Pipettenlösung (siehe 2.10 Lösungen und Chemikalien), in der entweder der CaMKII-Inhibitor *autocamtide 2-related inhibitory peptide* (AIP) oder kein AIP gelöst war, gegeben. Die Pipetten hatten einen Eigenwiderstand von 2 bis 3 MΩ. Die Pipetten wurden dann über den chlorierten Silberdraht und in den Pipettenhalter geschoben. Zuletzt wurde ein leichter Überdruck in der Pipette erzeugt, um einer Verschmutzung der Pipette vorzubeugen.

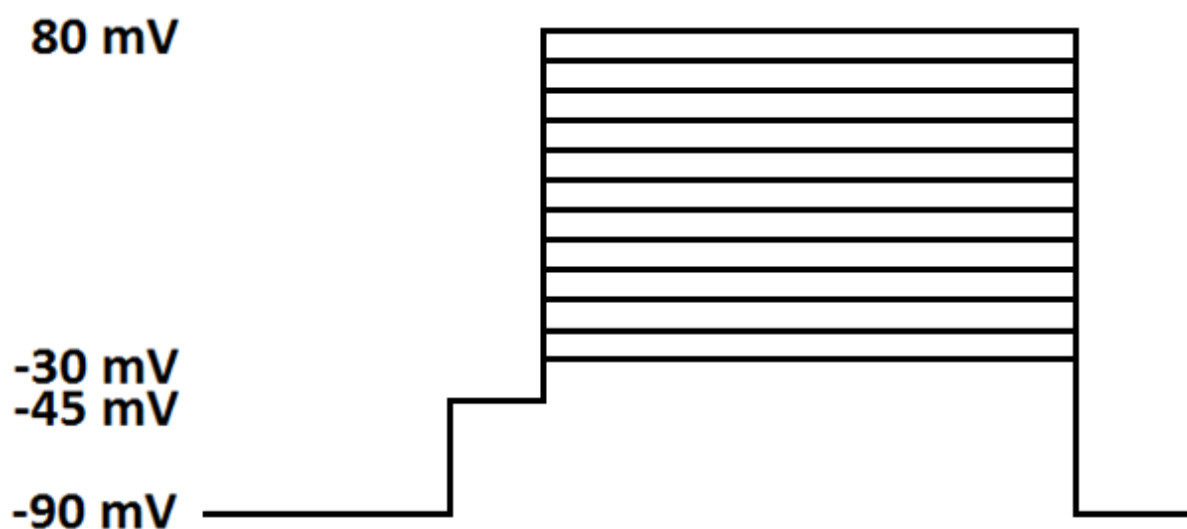
Daraufhin wurde eine geeignete Zelle ausgesucht. Dabei wurde auf eine gut erkennbare Sarkomerstreifung und eventuelle intrazelluläre Verklumpungen geachtet, die ein Zeichen für den einsetzenden Zelltod sind. Anschließend wurde die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators an diese Zelle herangefahren, um den Zustand eines *gigaseal*, d. h. einer elektrisch dichten Verbindung zwischen Pipette und Membran, zu erzeugen. Durch das Anlegen eines Unterdrucks am Ende der Pipette wurde nun der unter der Pipette liegende Membranabschnitt (*patch*) geöffnet und somit die *whole-cell*-Konfiguration erreicht, während das *gigaseal* intakt blieb. Nun musste eine Wartezeit von 10 Minuten eingehalten werden, damit die Pipettelösung in die Zelle gelangen und das AIP seine pharmakologische Wirkung

entfalten konnte bzw. bis gleiche Bedingungen hergestellt waren. Nachdem das Membranpotential auf -70 mV bzw. -90 mV depolarisiert worden war, wurden die Messungen durchgeführt.

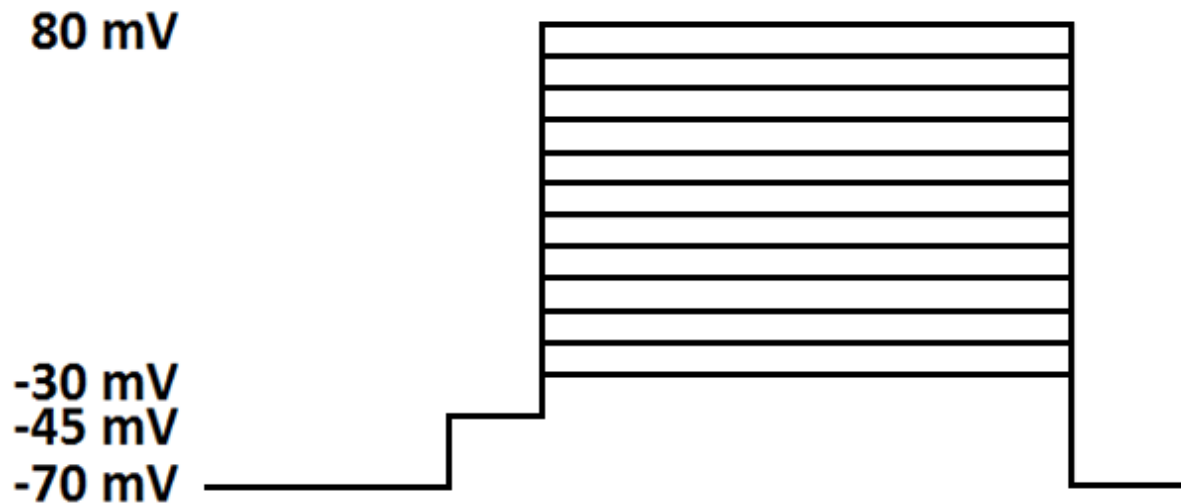
#### 2.8.4 Versuchsprotokoll

Für die Messungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in Abhängigkeit der vorgegebenen Membranspannung wurde folgendes Protokoll verwendet (siehe Abbildung 2.4 sowie 2.5). Dabei wurde das Protokoll entweder bei einem Ausgangsmembranpotential von -70 mV oder -90 mV angewandt.

Das Membranpotential wurde für 50 ms auf -90 mV bzw. -70 mV depolarisiert, danach wurden das Membranpotential für 50 ms auf -45 mV eingestellt, um die  $\text{Na}^+$ -Kanäle, die ansonsten die Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal stören würden, zu inaktivieren. Anschließend wurde der eigentliche Messpuls von -30 mV für 200 ms angewandt. Nach diesem Messpuls wurde die Membran wieder für 50 ms auf -90 mV bzw. -70 mV depolarisiert. Es folgten elf Wiederholungen des Potokolls, bei denen jeweils der Messpuls um 10 mV gesteigert wurde, so dass im Gesamtprotokoll die entsprechenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in Abhängigkeit vom angelegten Spannungsbereich zwischen -30 mV und 80 mV gemessen wurden.



**Abb. 2.4** Versuchsprotokoll zur Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal mit einem Ausgangsmembranpotential von -90 mV.



**Abb. 2.5** Versuchsprotokoll zur Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal mit einem Ausgangsmembranpotential von -70 mV.

## 2.9 Auswertung der Daten

Die gemessenen Daten wurden im Computerprogramm Patchmaster 2.0 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet, in Form von Text-Dateien gespeichert und anschließend zur weiteren Bearbeitung in Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) eingefügt und ausgewertet. Die statistischen Untersuchungen der Ergebnisse der Bestimmung des Körpergewichts, des Herzgewichts und des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses bzw. die Ergebnisse der Patch-Clamp-Messungen wurden anhand des zweiseitigen Student's t-Test bzw. der 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% ( $p$  kleiner 0,05) wurde als signifikant angesehen. Die im Ergebnisteil dieser Arbeit zu findenden Abbildungen wurden mit dem Programm SigmaPlot Version 10.0 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) erstellt.

## 2.10 Lösungen und Chemikalien

### Isolationspuffer 10x Stock

NaCl (Roth 3957.1)	65,99 g
KCl (Sigma-Aldrich P9333)	3,51 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck 4873)	0,8166 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O (Merck 6580)	1,0679 g
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich 63140)	2,9580 g
Phenol-red (Sigma-Aldrich P5530)	0,1204 g
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma-Aldrich S6297)	10,08 g
KHCO <sub>3</sub> (Sigma-Aldrich P9144)	10,10 g
HEPES (Roth 9105.4)	23,83 g
Taurin (Sigma-Aldrich T0625)	37,53 g

Der Isolationspuffer 10x Stock wird steril filtriert.

### Isolationspuffer 1x Stock

Isolationspuffer 10x Stock	100 ml
doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O	900 ml

### Isolationstyrode

Isolationspuffer 1x Stock	980 ml
BDM (Stock) (Sigma-Aldrich B0753)	20 ml
Glucose (Roth X997.2)	0,9911 g

Der pH-Wert der Isolationstyrode wird bei einer Temperatur von 36,5 Grad Celsius auf einen Wert von 7,42 eingestellt.

**Enzymlösung**

Isolationstyrode	20	ml
Liberase TM (Roche 0591127001)	300	µl
Trypsin 10-fach (Gibco 15090)	111,2	µl
CaCl <sub>2</sub> einer 10 mM-Stammlösung (Sigma-Aldrich 21115)	25	µl

**Myozyte stopping buffer 1 (10% BCS)**

Isolationstyrode	2,2	ml
Bovine calf serum (BCS)	0,25	ml
CaCl <sub>2</sub> einer 10 mM-Stammlösung (Sigma-Aldrich 21115)	3,125	µl

**Myozyte stopping buffer 2 (5% BCS)**

Isolationstyrode	23,75	ml
Bovine calf serum (BCS)	1,25	ml

**Calciumlösung (c = 0,1 mmol/l)**

CaCl <sub>2</sub> einer 10 mM-Stammlösung (Sigma-Aldrich 21115)	5	µl
Myozyte stopping buffer 2 (5% BCS)	5	ml

**Calciumlösung (c = 0,2 mmol/l)**

CaCl <sub>2</sub> einer 100 mM-Stammlösung (Sigma-Aldrich 21115)	10	µl
Myozyte stopping buffer 2 (5% BCS)	5	ml



**Calciumlösung (c = 0,4 mmol/l)**

CaCl <sub>2</sub> einer 100 mM-Stammlösung (Sigma-Aldrich 21115)	20	μl
Myozyte stopping buffer 2 (5% BCS)	5	ml

**Calciumlösung (c = 0,8 mmol/l)**

CaCl <sub>2</sub> einer 100 mM-Stammlösung (Sigma-Aldrich 21115)	80	μl
Myozyte stopping buffer 2 (5% BCS)	10	ml

**Badlösung 10x (500ml)**

NaCl (Roth 3957.1)	40,908 g
CsCl (Sigma-Aldrich C3032)	3,367 g
MgCl <sub>2</sub> (Merck 8.14733.0100)	0,476 g
HEPES (Roth 9105.4)	5,958 g

Die Substanzen werden in 500 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert der Badlösung 10x wird bei Raumtemperatur mittels NaOH auf 7 eingestellt. Glukose wird erst nach der Verdünnung auf Badlösung 1x hinzugefügt.

**Badlösung 1x (500ml)**

Badlösung 10x	50	ml
bidestilliertes Wasser	450	ml
Glukose (Roth X997.2)	900	mg

Der pH-Wert der Badlösung 1x wird bei Raumtemperatur mittels NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Badlösung wird nun bei einer Temperatur von -4 Grad Celsius gelagert.  $\text{CaCl}_2$  wird erst kurz vor der Messung hinzugegeben.

**Pipettenlösung ohne Aip (50 ml)**

CsCl (Sigma-Aldrich C3032)	883	mg
BAPTA 4Cs (invitrogen B1212)	251	mg
DiBr BAPTA (invitrogen D1211)	39,3	mg
Mg-ATP (Sigma-Aldrich A9187)	126	mg
HEPES (Roth 9105.4)	238	mg
$\text{CaCl}_2$ (Merck 2382)	11	mg

Die aufgelisteten Substanzen werden in 50 ml bidestilliertem Wasser gelöst und anschließend wird mit Hilfe von CsOH ein pH-Wert von 7,2 eingestellt. Die Pipettenlösung wird bei -20 Grad Celsius gelagert.

**Pipettenlösung mit Aip (33,3 ml)**

CsCl (Sigma-Aldrich C3032)	588,7 mg
BAPTA 4Cs (invitrogen B1212)	167,2 mg
DiBr BAPTA (invitrogen D1211)	26,2 mg
Mg-ATP (Sigma-Aldrich A9187)	84,4 mg
HEPES (Roth 9105.4)	158,7 mg
CaCl <sub>2</sub> (Merck 2382)	7,3 mg
AIP (Sigma-Aldrich A4308)	1 mg

Die Substanzen wurden ebenfalls in bidestilliertem Wasser (33,3 ml) gelöst und anschließend wurde der pH-Wert mit CsOH auf 7,2 eingestellt. Die Pipettenlösung wird jetzt bei -20 Grad Celsius gelagert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Biometrische Daten

Die biometrischen Daten wurden wie oben erwähnt (siehe 2.5 Isolation der Myozyten) gewonnen.

Allgemein wurden zwei Gruppen unterschieden, zum einen die Gruppe der Versuchstiere, die sieben Tage nach der Operation geopfert wurde, und zum anderen die Gruppe, die 35 Tage nach der Operation geopfert wurde. Innerhalb dieser beiden Gruppen wurde nochmals zwischen den Wildtypen und den genetisch veränderten Versuchstieren unterschieden. Alle aufgeführten Gruppen wurden später auch für die Patch-Clamp-Messungen verwendet. Dabei zeigten alle in den Experimenten verwendeten TAC-Versuchstiere nach der Operation deutliche Zeichen einer Herzhypertrophie im Vergleich zur Kontrollgruppe der Sham-Versuchstiere. Um das Ausmaß der Herzhypertrophie zu bestimmen, wurde das Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis ermittelt (siehe 2.7 Erhebung der biometrischen Daten).

#### 3.1.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde wie im Abschnitt 2.5 Isolation der Myozyten beschrieben bei allen geopferten Versuchstieren bestimmt.

Versuchstiere	Sham	TAC	T-TEST
7d-post-OP Wildtyp	18,74 ± 0,42 (n=16)	18,3 ± 0,48 (n=16)	p=0,53; n. s.
35d-post-OP Wildtyp	21,2 ± 0,33 (n=27)	20,9 ± 0,31 (n=25)	p=0,44; n. s.
t-TEST	p<0,05; signifikant	p<0,05; signifikant	

**Tab. 1.1. Ergebnisse der Bestimmung des Körpergewichtes bei den Wildtyp-Versuchstieren.** Die Werte sind in (g) angegeben.

Versuchstiere	Sham	TAC	T-Test
7d-post-OP CaMKII $\delta$ -Knockout	23,58 $\pm$ 1,14 (n=9)	21,86 $\pm$ 0,97 (n=11)	p=0,26; n. s.

**Tab. 1.2 Ergebnisse der Bestimmung des Körpergewichtes bei den CaMKII $\delta$  Knockout Versuchstieren.** Die Werte sind in [g] angegeben.

### 3.1.2 Herzgewicht

Das Herzgewicht wurde wie im Abschnitt 2.5 Isolation der Myozyten beschrieben bei allen geopferten Versuchstieren bestimmt.

Versuchstiere	Sham	TAC	T-Test
7d-post-OP Wildtyp	139,31 $\pm$ 2,34 (n=16)	164,93 $\pm$ 5,66 (n=16)	p<0,05; signifikant
35d-post-OP Wildtyp	161,9 $\pm$ 4 (n=27)	270,9 $\pm$ 12 (n=25)	p<0,05; signifikant
t-Test	p<0,05;signifikant	p<0,05; signifikant	

**Tab. 1.3 Ergebnisse der Bestimmung des Herzgewichtes bei den Wildtyp-Versuchstieren.** Die Werte sind in [mg] angegeben.

Versuchstiere	Sham	TAC	T-Test
7d-post-OP CaMKII $\delta$ -Knockout	183 $\pm$ 11,9 (n=9)	217,09 $\pm$ 11,9 (n=11)	p=0,06; n. s.

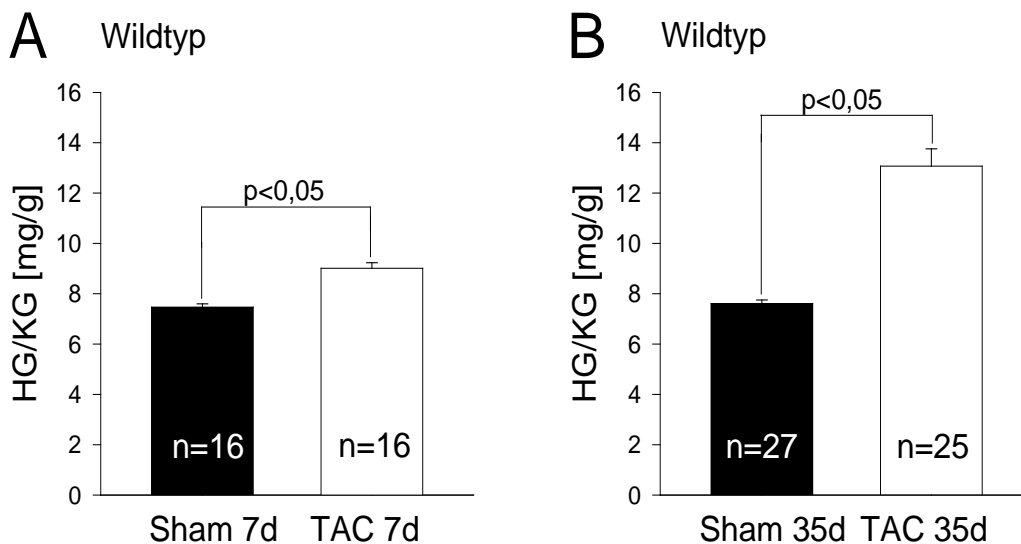
**Tab. 1.4 Ergebnisse der Bestimmung des Herzgewichtes bei den CaMKII $\delta$  Knockout-Versuchstieren.** Die Werte sind in [mg] angegeben.

### 3.1.3 Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis

Das Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG-Verhältnis) [mg/g] der Wildtyp-TAC-Versuchstiere, die sieben Tage nach der Operation geopfert wurden, war deutlich höher als das HG/KG-Verhältnis der Wildtyp-Sham-Versuchstiere, die ebenfalls sieben Tage nach der Operation geopfert wurden (Abb. 3.1 A). Bei den Wildtyp-TAC-Versuchstieren betrug das HG/KG-Verhältnis 9,01  $\pm$  0,22 (n=16). Im Unterschied wozu die Wildtyp-Sham-Versuchstiere ein HG/KG-Verhältnis von durchschnittlich 7,46  $\pm$  0,13 (n=16) hatten. Vergleicht man die

beiden Gruppen miteinander, dann stellt man fest, dass das HG/KG-Verhältnis der Gruppe der Wildtyp-TAC-Versuchstiere signifikant ( $p < 0,05$ ) größer ist als das der Wildtyp-Sham-Versuchstiere.

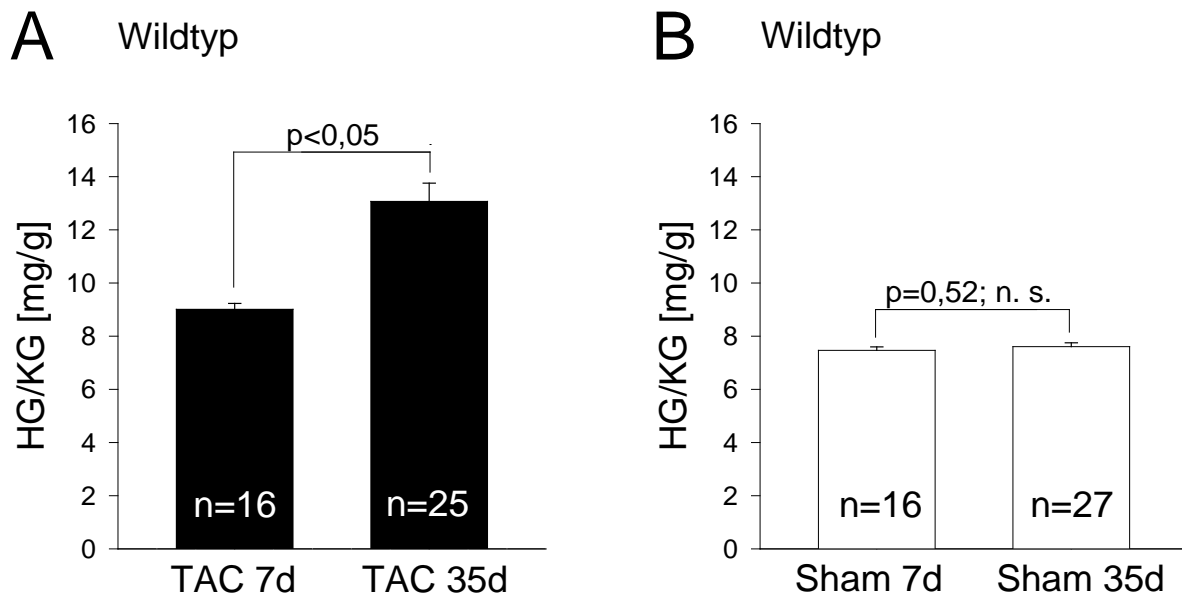
In der Gruppe der 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstiere zeigte sich in der Gruppe der TAC-Versuchstiere ein massiv erhöhtes HG/KG-Verhältnis (Abb. 3.1 B). Bei den TAC-Versuchstieren lag das HG/KG-Verhältnis bei  $13,07 \pm 0,68$  ( $n=25$ ), während es bei den Sham-Versuchstieren bei  $7,6 \pm 0,14$  ( $n=27$ ) lag. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war auch hier signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.1 Vergleich des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses innerhalb der Gruppe der 7 bzw. 35 Tage nach Operation geopferten Wildtyp-Versuchstiere.**

Zusätzlich wurden die Unterschiede bezüglich des HG/KG-Verhältnisses zwischen den sieben Tage und den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC- bzw. Sham-Versuchstieren untersucht (Abb. 3.2).

Das HG/KG-Verhältnis der 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC-Versuchstiere war signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als dasjenige der sieben Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC-Versuchstiere. Innerhalb der Gruppe der Wildtyp-Sham-Versuchstiere bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,52$ ) zwischen dem HG/KG-Verhältnis der sieben Tage und der 35 Tage nach der Operation geopferten Versuchstiere.

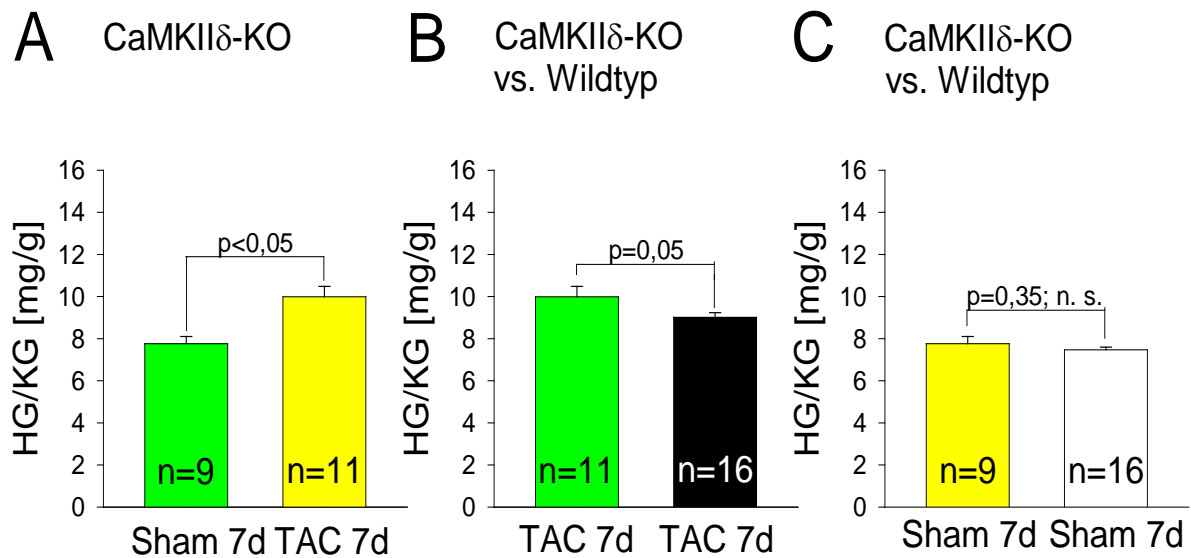


**Abb. 3.2 Vergleich des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses der 7 und der 35 Tage nach Operation geopfertem Wildtyp-Versuchstiere nach transverser Aortenkonstriktion bzw. der Kontrollgruppe.**

Zuletzt wurden die Unterschiede des HG/KG-Verhältnisses innerhalb der Gruppe der CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstiere und im Vergleich mit den ebenfalls sieben Tage nach der Operation geopfertem Wildtyp-Versuchstieren untersucht (Abb. 3.3).

In der Gruppe der CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstiere war das HG/KG-Verhältnis der TAC-Versuchstiere ebenfalls höher als das der Sham-Versuchstiere. Bei den TAC-Versuchstieren betrug das HG/KG-Verhältnis  $9,98 \pm 0,49$  ( $n=11$ ) und bei den Sham-Versuchstieren betrug es  $7,75 \pm 0,34$  ( $n=9$ ). Dieser Unterschied war auch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Sowohl der Unterschied zwischen den CaMKII $\delta$ -Knockout TAC- und Sham-Versuchstieren war signifikant ( $p < 0,05$ ) als auch der Unterschied zwischen den CaMKII $\delta$ -Knockout TAC- und den Wildtyp-TAC-Versuchstieren (grenzwertig signifikant mit  $p = 0,05$ ). Wohingegen der Unterschied zwischen den CaMKII $\delta$ -Knockout Sham-Versuchstieren und den Wildtyp-Sham-Versuchstieren nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) war.



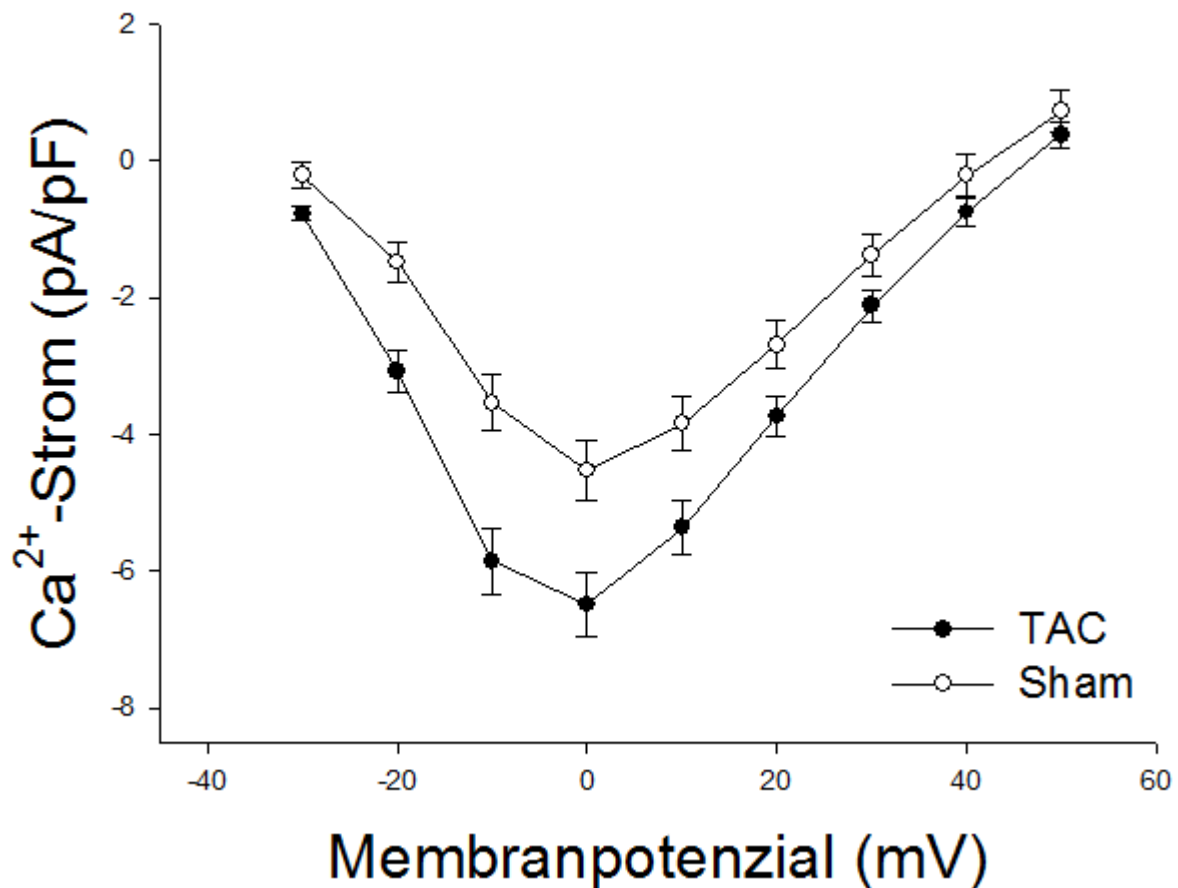
**Abb. 3.3** Vergleich des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses der CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstiere sowie der CaMKII $\delta$ -Knockout mit den Wildtyp-Versuchstieren nach transverser Aortenkonstriktion bzw. innerhalb der Kontrollgruppe.

## 3.2 Ca<sup>2+</sup>-Strom über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal

### 3.2.1 Einfluss der induzierten Hypertrophie auf den Ca<sup>2+</sup>-Strom über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal bei den 7 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren

Zunächst wurde die Gruppe der Wildtyp-Versuchstiere, die sieben Tage nach der Operation geopfert wurden, gemessen (Abb. 3.4). Die Amplitude des Ca<sup>2+</sup>-Stroms war bei den Myozyten der Wildtyp-TAC-Versuchstiere deutlich erhöht im Vergleich zu den Myozyten der Wildtyp-Sham-Versuchstiere. Die statistischen Untersuchungen mittels 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben einen signifikanten Unterschied der beiden untersuchten Gruppen (p < 0,05).



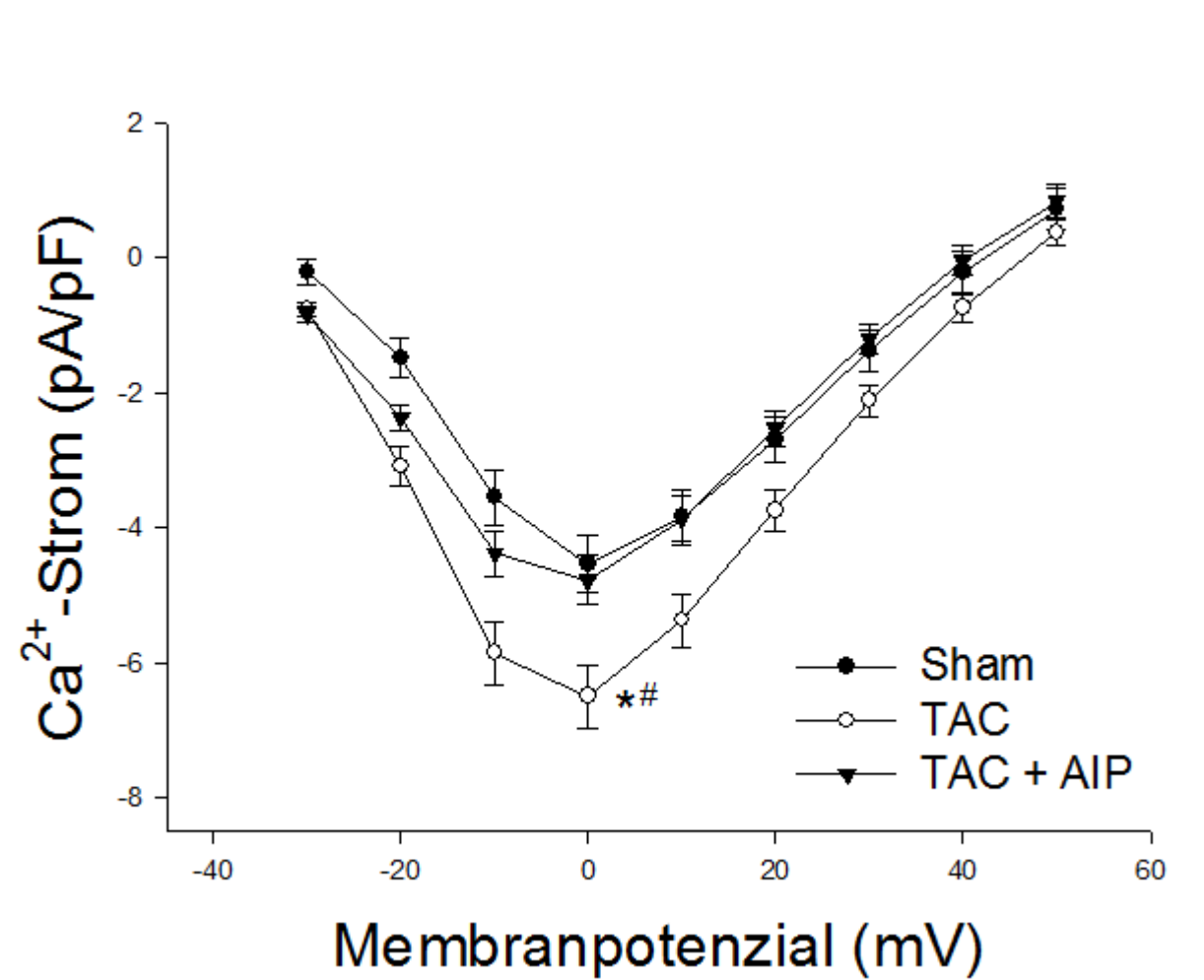


**Abb. 3.4 Strom-Spannungsverhältnisses des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 7 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der Wildtyp TAC- ( $n=6$ ,  $z=13$ ) und der Wildtyp-Sham-Versuchstiere ( $n=6$ ,  $z=11$ ), die sieben Tage nach der Operation geopfert wurden. Statistische Untersuchungen mittels 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben einen signifikanten Unterschied ( $p<0,05$ ).

### 3.2.2 Einfluss der akuten Inhibierung der CaMKII $\delta$ mittels AIP auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Strom über den L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei den 7 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren

Anschließend wurde die Gruppe der sieben Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC- und Wildtyp-Sham-Versuchstiere mit dem Inhibitor der CaMKII $\delta$ , dem AIP, gemessen. Die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der Wildtyp-TAC- und der der Wildtyp-Sham-Versuchstiere war unter dem Einfluss von AIP gleichwertig. Die statistischen Untersuchungen mittels 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen ( $p=0,59$ ).

Beim Vergleich der gemessenen Werte des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei den sieben Tage nach der Operation geopferte Wildtyp-TAC- und Wildtyp-Sham-Versuchstieren sowie den sieben Tage nach der Operation geopferte Wildtyp-TAC-Versuchstieren, deren Myozyten mit AIP gemessen wurden, (Abb. 3.5) wurde anhand der 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ein signifikanter Unterschied der Gruppen der Wildtyp-TAC-Versuchstiere, deren Myozyten mit bzw. ohne AIP gemessen wurden, festgestellt ( $p < 0,05$ ). Hingegen bestand zwischen Gruppen der Wildtyp-TAC-Versuchstiere, deren Myozyten mit AIP gemessen wurden, und den Wildtyp-Sham-Versuchstieren kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,55$ ).

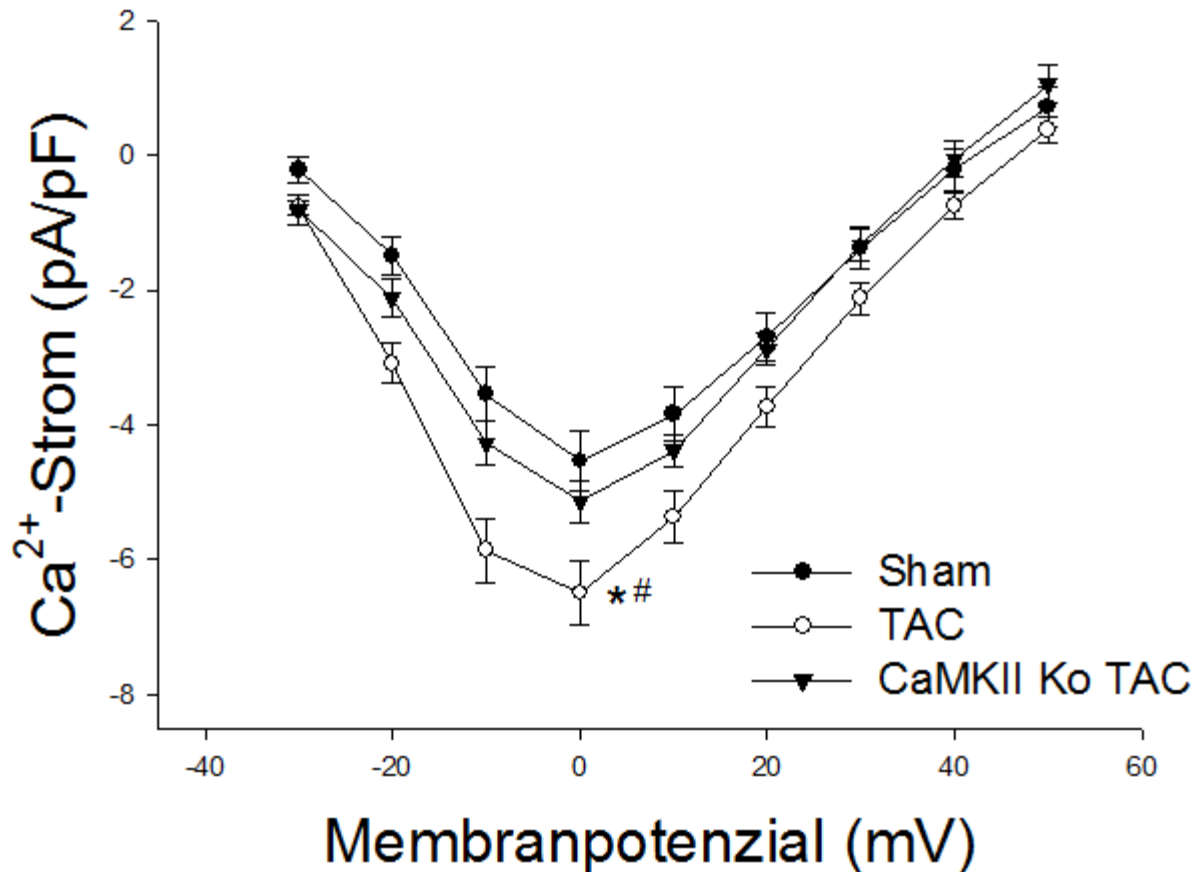


**Abb. 3.5 Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 7 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren mit und ohne AIP.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der sieben Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC- ( $n=6$ ,  $z=13$ ), Wildtyp-Sham- ( $n=6$ ,  $z=11$ ) sowie derjenigen Wildtyp-TAC-Versuchstiere ( $n=7$ ,  $z=16$ ), deren Myozyten mit AIP gemessen wurden. Statistische Untersuchungen mittels 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Wildtyp-TAC- und der Wildtyp-Sham-Versuchstiere (\*) sowie der Wildtyp-TAC-Versuchstiere, deren Myozyten mit bzw. ohne AIP gemessen wurden (#).

### **3.2.3 Einfluss der genetischen Inhibierung der CaMKII $\delta$ auf den Ca<sup>2+</sup>-Strom über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal bei den 7 Tage nach der Operation geopferten CaMKII $\delta$ -Knockout-Versuchstieren**

Die Amplitude des Ca<sup>2+</sup>-Stroms über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal bei den CaMKII $\delta$ -Knockout-TAC-Versuchstieren, die sieben Tage nach der Operation geopfert wurden, unterschied sich nicht von der Amplitude bei den CaMKII $\delta$ -Knockout-Sham-Versuchstieren, die sieben Tage nach der Operation geopfert wurden. Anhand der 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen wurde kein signifikanter Unterschied der Gruppen festgestellt ( $p=0,4$ ).

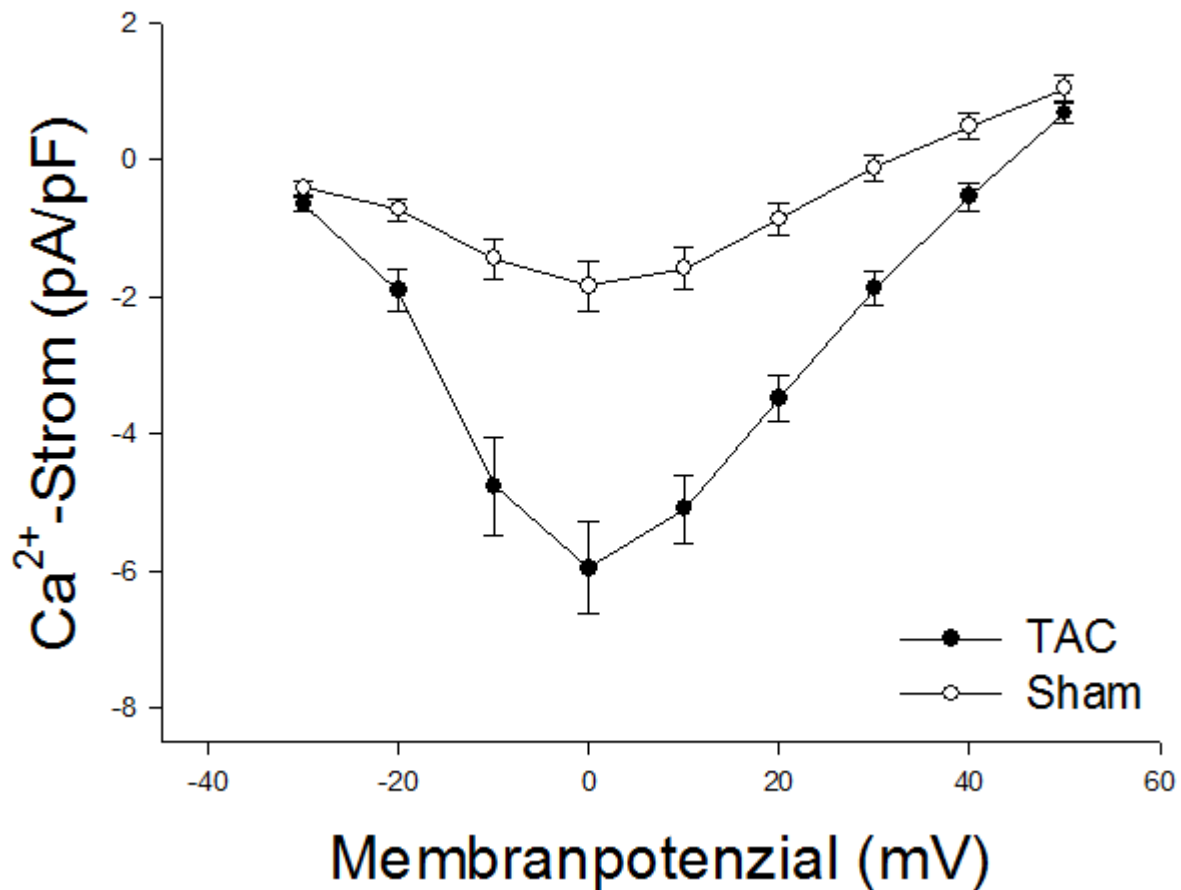
Beim Vergleich der gemessenen Werte des Ca<sup>2+</sup>-Stroms über den L-Typ Ca-Kanal bei den sieben Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC- und Wildtyp-Sham-Versuchstieren sowie den sieben Tage nach der Operation geopferten CaMKII $\delta$ -Knockout TAC-Versuchstieren (Abb. 3.6) zeigte sich anhand der 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ein signifikanter Unterschied ( $p<0,05$ ) der Gruppen der Wildtyp-TAC-Versuchstiere und der CaMKII $\delta$ -Knockout-TAC-Versuchstiere. Hingegen wurde anhand der 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen kein signifikanter Unterschied ( $p=0,1$ ) der CaMKII $\delta$ -Knockout-TAC-Versuchstiere und den Wildtyp-Sham-Versuchstieren festgestellt.



**Abb. 3.6 Strom-Spannungsverhältnisses des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 7 Tage nach der Operation geopferten CaMKII $\delta$ -Knockout- und Wildtyp-Versuchstiere.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der sieben Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC- ( $n=6$ ,  $z=13$ ), Wildtyp-Sham- ( $n=6$ ,  $z=11$ ) sowie der CaMKII $\delta$ -Knockout TAC-Versuchstiere ( $n=8$ ,  $z=24$ ). Statistische Untersuchungen mittels 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben einen signifikanten Unterschied ( $p<0,05$ ) der Wildtyp-TAC- und der Wildtyp-Sham-Versuchstiere (\*) sowie der Wildtyp-TAC-Versuchstiere und der CaMKII $\delta$ -Knockout TAC-Versuchstiere (#).

### 3.2.4 Einfluss der induzierten Hypertrophie auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Strom über den L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren

Die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms, die bei den Myozyten der Wildtyp-TAC-Versuchstiere gemessen wurde, die 35 Tage nach der Operation geopfert wurden, war deutlich größer als die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms bei den Wildtyp-Sham-Versuchstieren, die 35 Tage nach der Operation geopfert wurden (Abb. 3.7). Statistische Untersuchungen mittels des 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben für die Gruppen einen signifikanten Unterschied ( $p<0,05$ ).

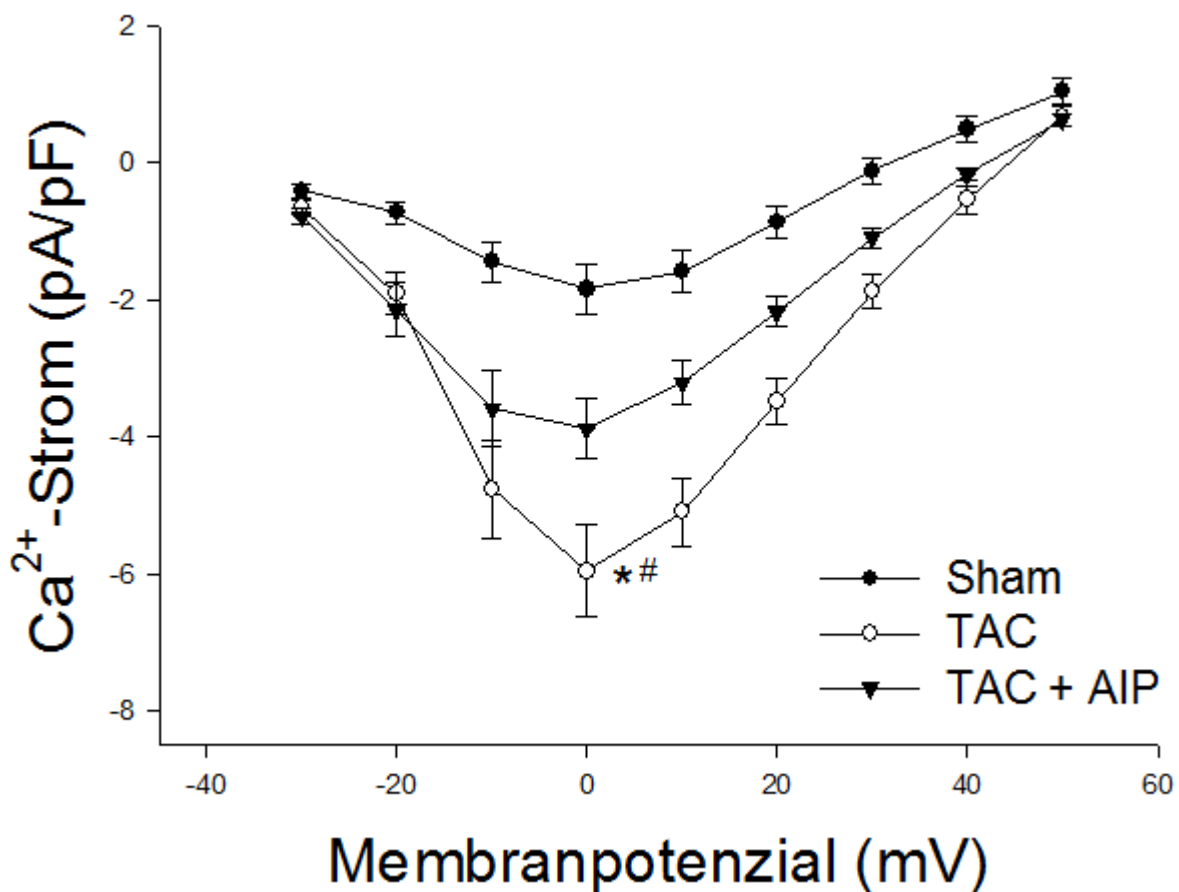


**Abb. 3.7 Strom-Spannungsverhältnisses des L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanals bei den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des Ca<sup>2+</sup>-Stroms über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal der Wildtyp-TAC- (n=5, z=9) und der Wildtyp-Sham-Versuchstiere (n=5, z=10), die 35 Tage nach der Operation geopfert wurden. Statistische Untersuchungen mittels 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben einen signifikanten Unterschied (p<0,05).

### 3.2.5 Einfluss der akuten Inhibierung der CaMKII $\delta$ mittels AIP auf den Ca<sup>2+</sup>-Strom über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal bei den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren

Die Amplitude des Ca<sup>2+</sup>-Stroms, die bei den Myozyten der Wildtyp-TAC-Versuchstiere gemessen wurde, die 35 Tage nach der Operation geopfert wurden und deren Myozyten mit AIP gemessen wurden, unterschied sich nicht von der Amplitude des Ca<sup>2+</sup>-Stroms, der bei den Myozyten der Wildtyp-Sham-Versuchstiere gemessen wurde, die 35 Tage nach der Operation geopfert wurden und deren Myozyten mit AIP gemessen wurden. Statistische Untersuchungen mittels des 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben für die Gruppen keinen signifikanten Unterschied (p=0,9).

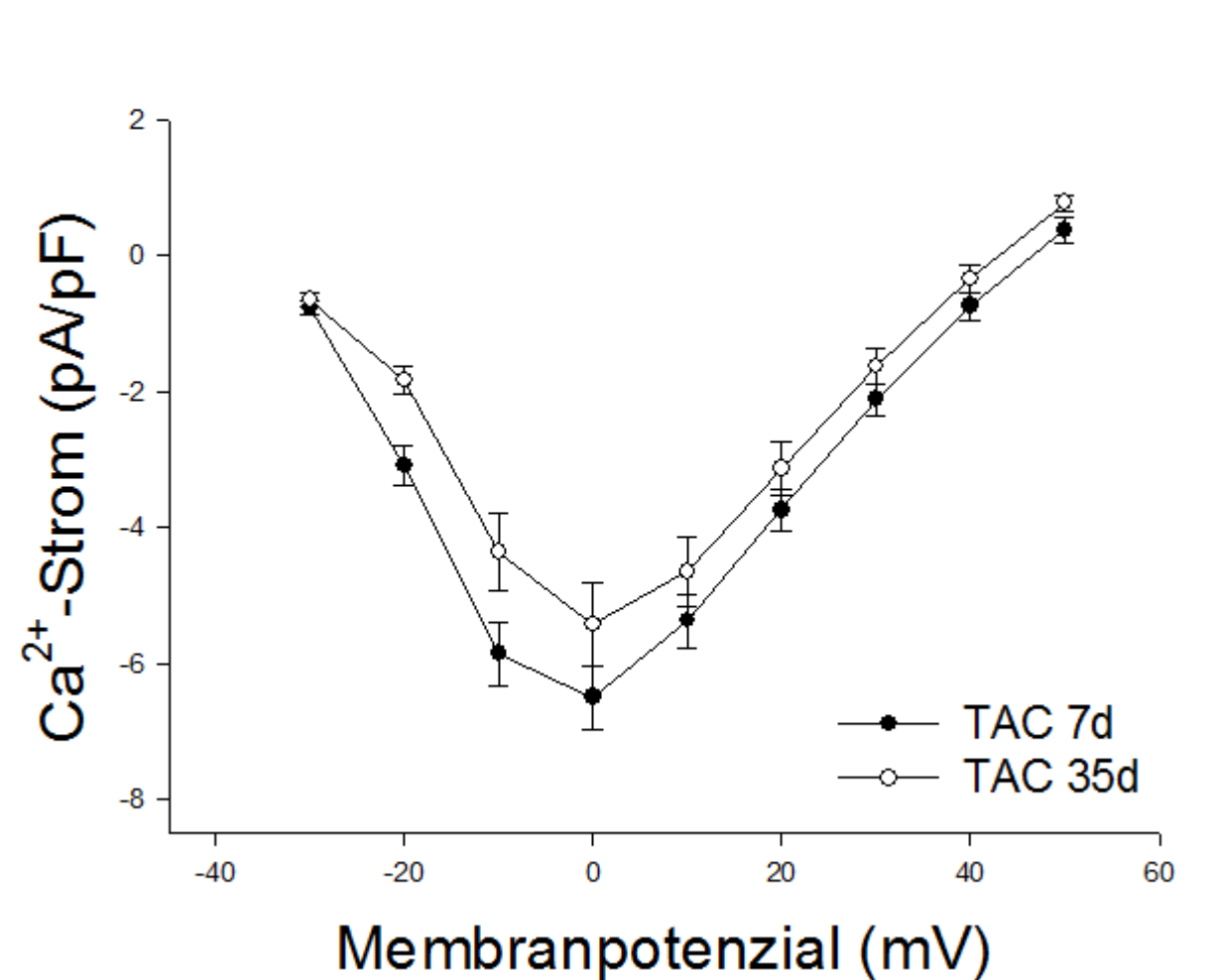
Beim Vergleich der gemessenen Werte des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den L-Typ Ca-Kanal bei den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC- und Wildtyp-Sham-Versuchstieren sowie den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC-Versuchstieren, deren Myozyten mit AIP gemessen wurden (Abb. 3.8), zeigte sich anhand der 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Gruppen der Wildtyp-TAC-Versuchstiere, deren Myozyten ohne AIP gemessen wurden, gegenüber denen der Wildtyp-TAC-Versuchstiere, deren Myozyten mit AIP gemessen wurde. Ebenso bestand zwischen den Gruppen der Wildtyp-TAC-Versuchstiere, deren Myozyten mit AIP gemessen wurden, und den Wildtyp-Sham-Versuchstieren ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.8 Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren mit und ohne AIP.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC- ( $n=5$ ,  $z=9$ ), Wildtyp-Sham- ( $n=5$ ,  $z=10$ ) sowie derjenigen Wildtyp-TAC-Versuchstiere ( $n=8$ ,  $z=18$ ), deren Myozyten mit AIP gemessen wurden. Statistische Untersuchungen mittels 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Wildtyp-TAC- und der Wildtyp-Sham-Versuchstiere (\*) sowie der Wildtyp-TAC-Versuchstiere, deren Myozyten mit bzw. ohne AIP gemessen wurden (#).

### 3.2.6 Vergleich des Einflusses der induzierten Hypertrophie auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Strom über den L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei den 7 Tage und den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren

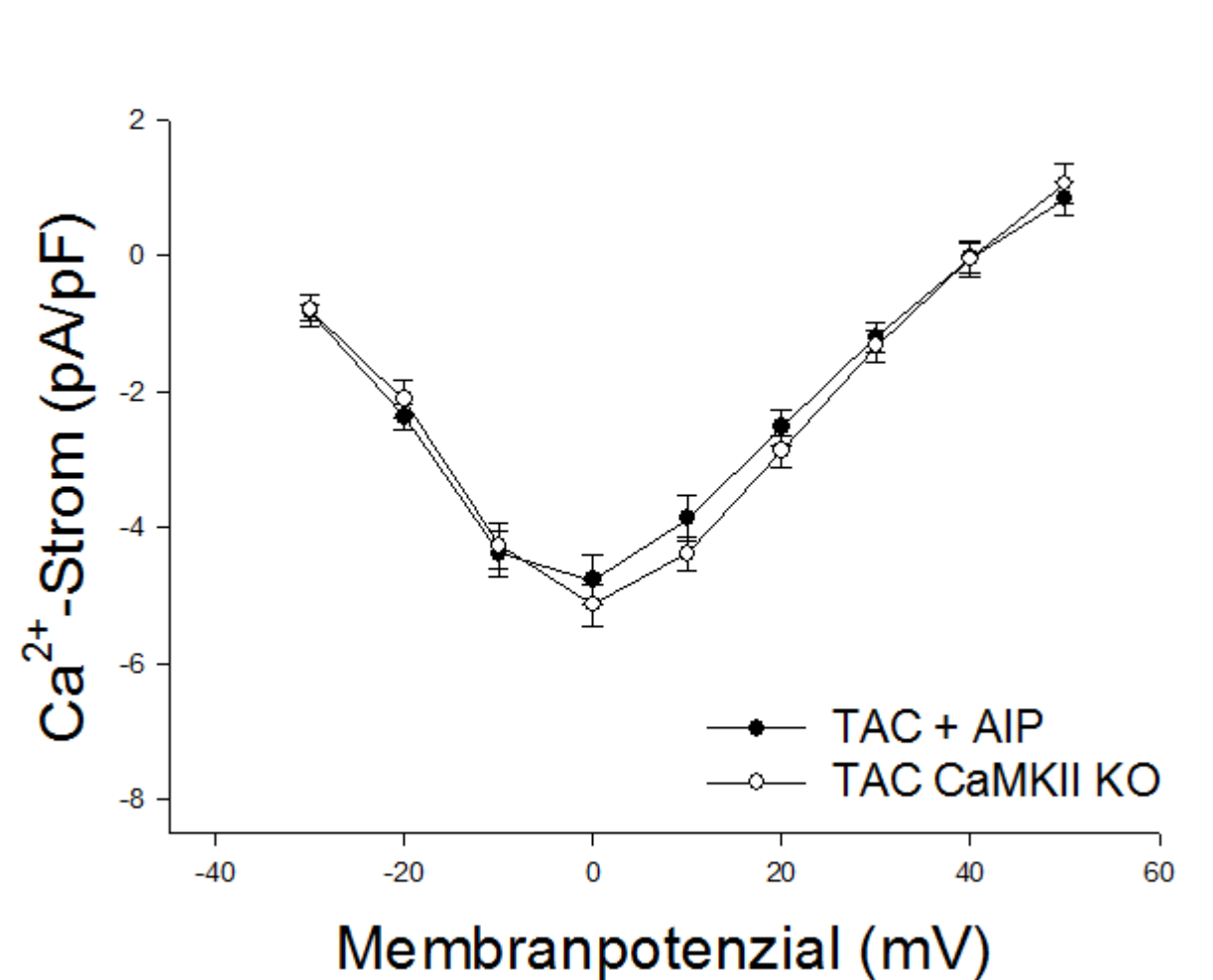
Beim Vergleich der gemessenen Werte des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den L-Typ Ca-Kanal bei den 7 Tage und den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC-Versuchstieren zeigten statistische Untersuchungen mittels des 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen einen signifikanten Unterschied ( $p=0,26$ ).



**Abb. 3.9 Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei den 7 und den 35 Tage nach transverser Aortenkonstriktion geopferten Wildtyp-Versuchstieren.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der 7 Tage ( $n=6$ ,  $z=13$ ) und der 35 Tage ( $n=5$ ,  $z=9$ ) nach transverser Aortenkonstriktion geopferten Wildtyp-TAC-Versuchstiere. Statistische Untersuchungen mittels 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied.

### 3.2.7 Vergleich des Einflusses der genetischen Inhibierung und der akuten Inhibierung der CaMKII $\delta$ auf den Ca<sup>2+</sup>-Strom über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal bei den 7 Tage nach der Operation geopferten CaMKII $\delta$ Knockout- bzw. Wildtyp-Versuchstieren

Der Vergleich der gemessenen Werte des Ca<sup>2+</sup>-Stroms über den L-Typ Ca-Kanal bei den sieben Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC-Versuchstieren, deren Myozyten mit AIP gemessen wurden und der sieben Tage nach der Operation geopferten CaMKII $\delta$ -Knockout TAC-Versuchstiere (Abb. 3.10) zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,79$ ) der Gruppen anhand des 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen.



**Abb. 3.10 Strom-Spannungsverhältnis des L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanals bei den 7 Tage nach Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren mit AIP und bei den 7 Tage nach Operation geopferten CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstieren.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Amplitudenbestimmung des Ca<sup>2+</sup>-Stroms über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal der sieben Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-TAC-Versuchstier, deren Myozyten mit AIP gemessen wurde, ( $n=7$ ,  $z=11$ ) sowie der sieben Tage nach der Operation geopferten CaMKII $\delta$ -Knockout TAC-Versuchstiere ( $n=8$ ,  $z=24$ ). Statistische Untersuchungen mittels 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,79$ ).



## 4. Diskussion

Die CaMKII spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung einer Hypertrophie sowie einer Insuffizienz des Herzens. In diesem Zusammenhang beeinflusst die CaMKII zahlreiche Proteine, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind, wie zum Beispiel den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal.

Die vorliegende Dissertation zeigt erstmalig, dass die Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei der nachlastinduzierten Herzhypertrophie durch die Inhibition der CaMKII mittels *autocamtide 2 related peptide* (AIP) sowie durch fehlende Expression der CaMKII $\delta_c$  in Kardiomyozyten genetisch veränderter Versuchstiere normalisiert werden kann. Die Ergebnisse suggerieren, dass eine verlängerte sowie häufigere Öffnung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals durch Phosphorylierung der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit an Ser-1512 und Ser-1570 und der  $\beta_{2a}$ -Untereinheit an Thr-498 durch die CaMKII bedingt wird. Somit trägt die CaMKII entscheidend zur veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Kardiomyozyten, einer Verlängerung des Aktionspotentials sowie der Entstehung lebensbedrohlicher Arrhythmien bei Herzinsuffizienz bei.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund der bislang veröffentlichten Daten zum Themenkreis der CaMKII diskutiert.

### 4.1 Herzhypertrophie bei Zustand nach transverser Aortenkonstriktion

Die transverse Aortenkonstriktion ist ein anerkanntes Modell zur Induktion einer nachlastinduzierten Herzhypertrophie. Mehrere Arbeitsgruppen konnten nach transverser Aortenkonstriktion sowohl eine signifikante Hypertrophie des Herzens als auch Zeichen eines damit einhergehenden beginnenden Herzversagens nachweisen. TOISCHER et al. (2010) wiesen eine Hypertrophie des Herzens durch Nachlasterhöhung mittels transverser Aortenkonstriktion bei Wildtyp-Versuchstieren sieben Tage nach der Operation anhand des Verhältnisses des linksventrikulären Gewichts zur Länge der Tibia und deren damit verbunden schwerwiegenden linksventrikuläre Dysfunktion nach. Auch LING et al. (2009) wiesen sowohl zwei Wochen als auch sechs Wochen nach transverser Aortenkonstriktion anhand eines erhöhten Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses eine signifikante Hypertrophie des Herzens, zusätzliche Dysfunktion der Ventrikel sowie zunehmende kardiale Fibrose nach.

Im Tiermodell mit CaMKII $\delta$ -Knockout-Versuchstieren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Ergebnisse erzielt: BACKS et al. (2009) zeigten, dass sich

drei Wochen nach transverser Aortenkonstriktion keine signifikante Hypertrophie des Herzens in Abwesenheit der CaMKII $\delta$  entwickelt. Hingegen konnten TOISCHER et al. (2010) sieben Tage nach transverser Aortenkonstriktion eine signifikant vermehrte perivaskuläre Fibrose bei CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. LING et al. (2009) zeigten zwei Wochen nach transverser Aortenkonstriktion eine signifikante Hypertrophie des Herzens sowie eine Expression, der für die Entwicklung einer Hypertrophie entscheidenden Gene, bei CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstieren. Jedoch bestand nach sechs Wochen kein signifikanter Unterschied des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses in der Gruppe der CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstiere.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine signifikante Hypertrophie des Herzens anhand des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses sowohl sieben als auch 35 Tage nach transverser Aortenkonstriktion, wobei das Maß der Hypertrophie 35 Tage nach Operation signifikant größer ist als sieben Tage nach Operation. In der Gruppe der Versuchstiere, in denen die CaMKII $\delta$  nicht exprimiert wurde, zeigten die biometrischen Daten eine Woche nach transverser Aortenkonstriktion eine signifikante Hypertrophie der Herzen.

Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass Versuchstiere auf eine Nachlast-induzierte Herzhypertrophie mittels transverser Aortenkonstriktion mit einer Aktivierung der Splicevarianten CaMKII $\delta_b$  und CaMKII $\delta_c$  reagieren (COLOMER et al. 2003, TOISCHER et al. 2010, ZHANG et al. 2003). Im umgekehrten Szenario führt die Überexpression der CaMKII $\delta_c$  im transgenen Mausmodell über Veränderungen in der elektromechanischen Kopplung zu einer massiven kardialen Hypertrophie und zu einer dilatativen Kardiomyopathie (MAIER et al. 2003, ZHANG et al. 2003). Es ist demzufolge eindeutig, dass der CaMKII eine essentielle Rolle bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie und schließlich einer Herzinsuffizienz zukommt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass sich im Tiermodell mittels Nachlasterrhöhung eine Hypertrophie des Herzens auch in Abwesenheit der CaMKII $\delta$  induzieren lässt. Natürlich spiegeln die Daten nur die frühe Phase der Entwicklung einer Hypertrophie wider, da sie bereits sieben Tage nach transverser Aortenkonstriktion erhoben worden sind. Trotzdem muss die Signaltransduktion in diesem Fall auf einem anderen Weg geschehen. Als Alternativen kommen zum Beispiel die CaMKII $\gamma$  und die Proteinkinase D in Frage. Beide weisen eine vermehrte Expression bzw. Aktivität nach Nachlasterrhöhung auf und könnten das hypertrophe Wachstum des Herzens bedingen (COLOMER et al. 2003; VEGA et al. 2004; BOSSUYT et al. 2008; HARRISON et al. 2006). Der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt. Zusätzlich haben die Stärke der aortalen Zügelung sowie das Alter und das Geschlecht der Mäuse (und damit die Größe der Aorta) einen großen Einfluss auf die Ausprägung der kardialen Hypertrophie, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Arbeitsgruppen vermindern könnte.

Insgesamt zeigen jedoch längerandauernde Versuche mit CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstieren (BACKS et al. 2009; LING et al. 2009), dass die CaMKII $\delta$  eine essentielle Rolle bei der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und ventrikulärer Dysfunktion bis hin zum Herzversagen spielt, da drei bzw. sechs Wochen nach Nachlasterhöhung CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstiere keine signifikante Hypertrophie des Herzens, verminderte Zeichen einer kardialen Dekompensation und schließlich geringere Sterberate aufweisen

## 4.2 Erhöhter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal bei Zustand nach transverser Aortenkonstriktion

Die Nachlasterhöhung durch transverse Aortenkonstriktion führte bei den Wildtyp-Versuchstieren zu einer signifikanten Erhöhung der Amplitude des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal. Diese Ergebnisse fanden sich sowohl bei den sieben Tage als auch bei den 35 Tage nach transverser Aortenkonstriktion geopferten Wildtyp-Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch WANG et al. (2008) stellten in einem ähnlichen Tiermodell eine Erhöhung der Amplitude des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal mittels Nachlasterhöhung fest.

Zudem zeigte sich, dass der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal nach transverser Aortenkonstriktion bei den 7 und den 35 Tage nach der Operation geopferten Wildtyp-Versuchstieren nicht signifikant unterschiedlich war. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal bereits 7 Tage nach transverser Aortenkonstriktion ein Maximum erreicht. WANG et al. (2008) konnten keine Verstärkung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms durch intrazelluläre Dialyse aktiver CaMKII bei Zustand nach transverser Aortenkonstriktion erzeugen.

Der Einfluss der CaMKII auf den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal wird über die Phosphorylierung der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit an Ser-1512 und Ser-1570 (BLAICH et al. 2010, HUDMON et al. 2005) und der  $\beta_{2a}$ -Untereinheit an Thr-498 vermittelt (ABIRIA und COLBRAN 2010, GRUETER et al. 2006; GRUETER et al. 2008; HULLIN et al. 2007; KOVAL et al. 2010). Nicht nachgewiesen werden konnte, dass durch Nachlasterhöhung bei transverser Aortenkonstriktion die Expression des L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanals dahingehend beeinflusst wird, dass mehr Kanalproteine in der Zellmembran zu finden sind (WANG et al. 2008). Somit könnte bereits 7 Tage nach der Operation die gesamte Anzahl der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle durch die CaMKII phosphoryliert und somit der maximale Effekt auf den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom erreicht worden sein.

Denkbar wäre jedoch auch, dass der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal 35 Tage nach transverser Aortenkonstriktion größer ist als sieben Tage nach der Operation, da auch

das Ausmaß der Hypertrophie 35 Tage nach transverser Aortenkonstriktion signifikant höher ist als 7 Tage nach Operation. Interessanterweise ist die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei den Wildtyp-Versuchstieren, die 35 Tage nach transverser Aortenkonstriktion untersucht wurden, geringfügig niedriger als bei den sieben Tage nach Operation untersuchten Wildtyp-Versuchstieren. Diese Tatsache könnte daraufhin hindeuten, dass der bereits nach sieben Tagen verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom eine Art frühen Kompensationsmechanismus zur erhöhten Nachlast darstellt und wiederum an Bedeutung verliert, wenn im Verlauf die Hypertrophie weiter zunimmt. Diese interessante Beobachtung bedürfte zur Klärung jedoch weiterer Experimente, die jenseits des Fokus der aktuellen Arbeit liegen.

#### **4.3 Normalisierung des $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal mittels AIP bzw. Generierung einer CaMKII $\delta$ Knockout-Maus**

In der Gruppe der sieben Tage nach transverser Aortenkonstriktion geopferten Wildtyp-Versuchstiere konnte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch Inhibition der CaMKII $\delta$  mittels AIP normalisiert, das heißt auf das Niveau der Kontrollgruppe gesenkt werden. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Wang et al. (2008) für die akute Inhibition der CaMKII $\delta$  in einem vergleichbaren Mausmodell.

In der Gruppe der 35 Tage nach transverser Aortenkonstriktion geopferten Wildtyp-Versuchstiere konnte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch Anwendung des AIP nicht vollends auf das Niveau der Kontrollgruppe gesenkt werden. Jedoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Wildtyp-Versuchstieren, die ohne AIP gemessen wurden und ebenfalls einer transversen Aortenkonstriktion unterzogen wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch in der Gruppe der 35 Tage nach transverser Aortenkonstriktion eine signifikante Senkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch AIP erreicht wurde.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch AIP nicht vollends auf das Niveau der Kontrollgruppe gesenkt werden konnte, sind weitere Einflüsse auf den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal neben der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit an Ser-1512 und Ser-1570 (BLAICH et al. 2010; HUDMON et al. 2005) und der  $\beta_{2a}$ -Untereinheit an Thr-498 (ABIRIA und COLBRAN 2010; GRUETER et al. 2006; GRUETER et al. 2008; HULLIN et al. 2007; KOVAL et al. 2010), beispielsweise durch die Proteinkinase A. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase A die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal an Ser-1928 (MITTERDOERFER et al. 1996; DE JONGH et al. 1996) bzw. Ser-1700 und Ser-1704 (FULLER et al. 2010) sowie die  $\beta_2$ -Untereinheit des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal an Ser-459, Ser-478, Ser-479 und Ser-296 (BÜNEMANN et al. 1999;

GERHARDSTEIN et al. 1999; HAASE et al. 1996; PANKONIEN et al. 2012) phosphoryliert. Jedoch ist lediglich sicher, dass die  $\beta$ -adrenerge Stimulation die PKA aktiviert und gleichzeitig zu einer häufigeren und längeren Öffnung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals führt sowie dass die Proteinkinase A den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal an mehreren Stellen phosphoryliert. Der Nachweis des exakten Signaltransduktionsweges und der Nachweis, dass die Phosphorylierung der  $\alpha_{1c}$ - und der  $\beta_2$ -Untereinheit durch die Proteinkinase A den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verstärkt, fehlt.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms zum einen durch Phosphorylierung der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit und der  $\beta_{2a}$ -Untereinheit durch die CaMKII, zum anderen durch eine vermehrte Expression des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals zustande kommt. Diese Möglichkeit ist jedoch unwahrscheinlich, weil von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden konnte, dass es im Rahmen einer Nachlasterhöhung und Induktion einer Herzinsuffizienz nicht zu einer vermehrten Expression des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals kommt (WANG et al. 2008).

Insgesamt indizieren diese Ergebnisse, dass die Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch die CaMKII $\delta$  verursacht wird, da der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch die Inhibition der CaMKII $\delta$  normalisiert werden kann. Weiterhin zeigt die akute Inhibition der CaMKII mittels AIP und die damit verbundene Normalisierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms, dass der erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch Phosphorylierung der  $\beta_{2A}$ - bzw.  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals durch die CaMKII $\delta$  hervorgerufen wird. Zusätzlich schließen die Ergebnisse eine vermehrte Expression des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals im Rahmen der Herzinsuffizienz aus, da eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in diesem Fall nicht akut sowie vollständig durch die Inhibition der CaMKII mittels AIP normalisiert werden könnte.

Die genetische Inhibierung der CaMKII $\delta c$  hatte ebenfalls eine Normalisierung der Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal auf das Niveau der Kontrollgruppe zur Folge. Diese Ergebnisse bekräftigen, dass die verstärkte Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal unter den im Mausmodell erzeugten Bedingungen hauptsächlich durch die Phosphorylierung der  $\beta_{2A}$ - bzw.  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals durch die CaMKII $\delta c$  hervorgerufen wird. Zusätzlich verdeutlichen die Ergebnisse, dass bei fehlender Expression der CaMKII $\delta c$  und Herzinsuffizienz kein weiterer Einfluss auf den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal seitens eines anderen Proteins oder gar eines gesamten Signaltransduktionsweges besteht, da sich in diesem Fall eine Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms eingestellt hätte.

Des Weiteren konnte keine Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms bei der Kontrollgruppe der Wildtyp- und der CaMKII-Knockout-Versuchstiere festgestellt werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von XU et al. (2010), die eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bei CaMKII-Knockout-Versuchstieren feststellten.

Zusätzlich wurde festgestellt, dass zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei den sieben Tage nach transverser Aortenkonstriktion gemessenen CaMKII $\delta$ -Knockout Versuchstieren und mit AIP gemessenen Wildtyp-Versuchstieren kein signifikanter Unterschied besteht, was die vollständige Inhibierung der CaMKII durch das AIP in den Wildtyp-Versuchstieren verdeutlicht.

#### 4.4 Ausblick und klinische Relevanz

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den kardialen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ist ein wichtiger Bestandteil der elektromechanische Kopplung und spielt eine Rolle bei der Entstehung von Arrhythmien, wenn es zu einer dauerhaften Aktivierung durch die CaMKII im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt.

Die CaMKII moduliert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch Phosphorylierung der  $\alpha_{1c}$ - und  $\beta_{2A}$ -Untereinheit und bewirkt dadurch eine erhöhte Amplitude und wie WANG et al. (2008) zeigten, eine verzögerte Inaktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms. Insgesamt führt dies zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle und zur Verlängerung des Aktionspotentials (TOISCHER et al. 2010), was als ein proarrhythmogener Mechanismus etabliert ist. TOISCHER et al. (2010) konnten zeigen, dass es in der nachlastinduzierten Herzhypertrophie zur Aktionspotentialverlängerung kommt, welche interessanterweise analog zur vorliegenden Arbeit durch CaMKII-Inhibition normalisiert werden konnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen somit darauf hin, dass es der CaMKII-regulierte L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sein könnte, der maßgeblich zur Aktionspotentialverlängerung beiträgt. Dieser Mechanismus könnte möglicherweise ein neuer Ansatz zur Arrhythmitherapie sein, insbesondere bei Patienten, die eine erhöhte Nachlast haben, zum Beispiel durch den arteriellen Hypertonus oder die Aortenstenose.

Eine intrazelluläre Calcium-Überladung und damit verbundene Neigung zu spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Reticulum führen zu Nachdepolarisationen. Zudem können verzögerte Nachdepolarisation durch Inhibition der CaMKII verhindert werden (WU et al 1999a).

WU et al. (2002) wiesen die Entstehung von frühen Nachdepolarisationen durch CaMKII-abhängige Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in einem transgenen Tiermodell mit Überexpression der CaMKII und damit verbundener kardialer Hypertrophie nach. Diese Tierversuche wiesen eine Neigung zu ventrikulären Arrhythmien auf. ANDERSON et al. (1998) sowie WU et al. (1999b) zeigten, dass frühe Nachdepolarisationen durch Inhibition der CaMKII verhindert werden konnten. Insgesamt wirken sowohl frühe Nachdepolarisationen als auch verzögerte Nachdepolarisationen proarrhythmogen.

Anhand dieser Ausführungen zeigt sich, dass die Inhibition der CaMKII ein vielversprechender Ansatz in der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz ist. In dieser Dissertation konnte erarbeitet werden, dass die Inhibition der CaMKII zu einer Normalisierung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms über den L-Typ Ca-Kanal führt sowie dass die akute Inhibition mittels AIP gleichwertig ist wie die fehlende Expression der CaMKII. Somit kann im Tiermodell eine vollständige und wirksame Inhibition der CaMKII pharmakologisch erreicht werden.

## 5. Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren nahm die Bedeutung der Herzinsuffizienz aufgrund ihrer beträchtlichen epidemiologischen Relevanz als auch der für das Gesundheitssystem entstehenden Kosten erheblich zu. Durch intensive Forschung stellte sich mehr und mehr heraus, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II bei Herzinsuffizienz sowohl in ihrer Aktivität als auch ihrer Expression erhöht ist. Die bedeutende Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II in der Herzinsuffizienz gilt als gesichert, wobei ihre funktionelle Rolle noch nicht abschließend geklärt ist.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass durch transverser Aortenkonstriktion eine Hypertrophie des Herzens induziert werden kann und es zu einer Verstärkung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms kommt.

Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl durch akute Inhibition mittels AIP als auch durch Generierung eines genetischen Knockouts die Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in die Zelle auf das Kontrollniveau gesenkt werden kann. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal entscheidend durch die CaMKII vermittelt wird.

Zusammenfassend erscheint die Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II bei Herzinsuffizienz als eine vielversprechende pharmakologische Therapieoption und weiterführende Forschung lohnenswert.



## 6. Literaturverzeichnis

Abiria SA, Colbran RJ (2010): CaMKII associates with CaV1.2 L-type calcium channels via selected beta subunits to enhance regulatory phosphorylation. *J Neurochem* 112, 150-161

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ Res* 97, 1314-1322

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

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

Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, Grueter CE, Qi X, Richardson JA, Hill JA, Katus HA, Bassel-Duby R, Maier LS, Olson EN (2009): The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Sci USA* 106, 2342-2347

Bardy GH, Lee KL, Mark DB (2005): Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med* 352, 225-237

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1993): Twitch-dependent SR Ca<sup>2+</sup> accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 265, C533-540

Bers DM: Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001

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

Bers DM, Guo T (2005): Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1047, 86-98

- Bers DM, Grandi E (2009): Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 54, 180-187
- Blaich A, Welling A, Fischer S, Wegener JW, Köstner K, Hofmann F, Moosmang S (2010): Facilitation of murine cardiac L-type Ca(v)1.2 channel is modulated by calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 10285-10289
- Bossuyt J, Helmstadter K, Wu X, Clements-Jewery H, Haworth RS, Avkiran M, Marin JL, Pogwizd SM, Bers DM (2008): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I $\delta$  and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure. *Circ Res* 102, 695-702
- Bowels NE, Rose MI, Taylor P, Banner NR, Morgan-Carpner P, Cunningham L, Archard LC und Yacoub MH (1989): End-stage dilated cardiomyopathy: Persistence of enterovirus RNA in myocardium at cardiac transplantation and lack of immune response. *Circulation* 80, 1128-1136
- Braun AP, Schulman H (1995): The multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 57, 417-445
- Braunwald E, Chobanian A, Colton T, Eydahl R, Harrington J, Kazemi H, Mayer R, McIntosh K, Natham D, Raisz L, Rothman K und Ryan T (1989): Alcoholic myopathy and cardiomyopathy. *N Engl J Med* 320, 458-459
- Bristow MR, Ginsburg R (1986):  $\beta$ 2 receptors on myocardial cells in human ventricular myocardium. *Am J Cardiol* 57, 3F-6F
- Bünemann M, Gerhardstein BL, Gao T, Hosey MM (1999): Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *J Biol Chem* 274, 33851-33854
- Cleland JG, Erhardt L, Murray G, Hall AS, Ball SG (1997): Effect of ramipril on morbidity and mode of death among survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. A report from the AIRE Study Investigators. *Eur Heart J* 18, 41-51

Cohn JN, Tognoni G (2001): A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 345, 1667-1675

Colomer JM, Mao L, Rockman HA, Means AR (2003): Pressure overload selectively up-regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol* 17, 183-192

Davis BA, Schwartz A, Samaha FJ, Kranias EG (1983): Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 258, 13587-13591

Conolly SJ, Gent M, Roberts RS, Dorian P, Roy D, Sheldon RS, Mitchell LB, Green MS, Klein GJ, O'Brien B (2000): Canadian implantable defibrillator study: a randomized trial of the implantable cardioverter defibrillator against amiodarone. *Circulation* 101, 1297-1302

De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M, Catterall WA (1996): Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* 35, 10392-10402

Delbridge LM, Satoh H, Yuan W, Bassani JW, Qi M, Ginsburg KS, Samarel AM, Bers DM (1997): Cardiac myocyte volume, Ca<sup>2+</sup> fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol* 272, H2425-2435

Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balsler J, Anderson ME (2000): Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of the L-type calcium channels. *Nature Cell Biology* 2, 173-177

Edman CF, Schulman H (1994): Identification and characterization of  $\delta$ B-CaM kinase and delta  $\delta$ C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1221, 89-101

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 CW, Ripplinger CM, Bers DM (2013): Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 502, 372-376

Fabiato A (1985): Simulated calcium current can both cause Ca<sup>2+</sup> loading in and trigger Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85, 291-320

Fabiato A, Fabiato F (1975): Contractions induced by a Ca<sup>2+</sup>-triggered release of Ca<sup>2+</sup> from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249, 469-495

Flather MD, Shibata MC, Coats AJ, Van Veldhuisen DJ, Parkhomenko A, Borbola J, Cohen-Solal A, Dumitrascu D, Ferrari R, Lechat P, Soler-Soler J, Tavazzi L, Spinarova L, Toman J, Böhm M, Anker SD, Thompson SG, Poole-Wilson PA; SENIORS Investigators (2005): Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J* 26(3): 215-225

Fuller MD, Emrick MA, Sadilek M, Scheuer T, Catterall WA (2010): Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci Signal* 3, ra70

Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM (1999): Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* 38; 10361-10370

Goodwin JF, Oakley CM (1972): The cardiomyopathies. *Br Heart J*. 34(6), 545-52

Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Pfeffer MA, Swedberg K (2003): Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet* 362, 772-776

Grueter CE, Abiria SA, Dzhura I, Wu Y, Ham AJ, Mohler PJ, Anderson ME, Colbran RJ (2006): L-type Ca<sup>2+</sup> channel facilitation mediated by phosphorylation of the  $\beta$ -subunit by CaMKII. *Mol Cell* 23, 641-650

Grueter CE, Abiria SA, Wu Y, Anderson ME, Colbran RJ (2008): Differential regulated interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with isoforms of voltage-gated calcium channel beta subunits. *Biochemistry* 47, 1760-1767

Guo T, Zhang T, Mestral R und Bers DM (2006): Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 99, 398-406

Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP (1987): Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61, 70-76

Haase H, Bartel S, Karczewski P, Morano I, Krause EG (1996): In-vivo phosphorylation of the cardiac L-type calcium channel beta-subunit in response to catecholamines. *Mol Cell Biochem* 163-164, 99-106

Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995): Phosphorylation modulates the function of the Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem* 270, 2074-2081

Halling DB, Racena-Parks P, Hamilton SL (2005): Regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels by calmodulin. *Sci STKE* 2005, re15

Harrison BC, Kim MS, van Rooij E, Plato CF, Papst PJ, Vega RB, McAnally JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN, McKinsey TA (2006): Regulation of cardiac stress signaling by protein kinase d1. *Mol Cell Biol* 26, 3875-3888

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H und Drexler H (1994) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in failing and nonfailing human myocardium, *Circ Res* 75, 434-442

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

Hess P (1988): Elementary properties of cardiac calcium channels: A brief review. *Can J Physiol Pharmacol* 66, 1218-1223

Hjalmarson A, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjekshus J, Wikstrand J, El Allaf D, Vitovec J, Aldershvile J (2000): Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *JAMA* 283, 1295-1302

Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (1999): Identification and expression of  $\delta$ -isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 84, 713-721

Hoppe U, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer H, Osterspey A, Schmaltz A, Erdmann E, in Zusammenarbeit mit der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft (2005): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* 94, 488–509

Hudmon A, Schulmann H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS (2005): CaMKII tethers to L-type Ca<sup>2+</sup> channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca<sup>2+</sup> signals for facilitation. *J Cell Biol* 171, 537-547

Hullin R, Matthes J, von Vietinghoff S, Bodi I, Rubio M, D'Souza K, Friedrich Khan I, Rottländer D, Hoppe UC, Mohacsi P, Schmitteckert E, Gilsbach R, Bünemann M, Hein L, Schwartz A, Herzig S (2007): Increased expression of the auxiliary beta(2)-subunit of ventricular L-type Ca(2)<sup>+</sup> channels leads to single-channel activity characteristic of heart failure. *PLoS One* 3, e292

Inui M, Saito A, Fleischer S (1987): Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem* 262, 15637-15642

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

Ishida A, Shigeri Y, Tatsu Y, Uegaki K, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Yumoto N, Fujisawa H (1998): Critical amino acid residues of AIP, a highly specific inhibitory peptide of calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett* 427, 115-118

Jiang LH, Gawler DJ, Hodson N, Milligan CJ, Pearson HA, Porter V (2000): Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275, 6135-6143

Kamp TJ, Hell JW (2000): Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 87, 1095-1102

Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS (2004): Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 41, 745-754

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42, 254-261

Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM (2006): Increased sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 98, 235-244

Koval OM, Guan X, Wu Y, Joiner ML, Gao Z, Chen B, Grumbach IM, Luczak ED, Colbran RJ, Song LS, Hund TJ, Mohler PJ, Anderson ME (2010): CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 4996-5000

Krum H, Roecker EB, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Coats AJ, Katus HA, Fowler MB, Packer M (2003): Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS Study. *JAMA* 289, 712-718

Kuck KH, Cappato R, Siebels J, Ruppel R (2000): Randomized comparison of antiarrhythmic drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from cardiac arrest: the Cardiac Arrest Study Hamburg. *Circulation* 102, 748-754

Lai Y, Nairn AC, Greengard P (1986): Autophosphorylation reversibly regulates the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependence of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4253-4257

Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG (1979): Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry* 18, 5150-5157

Le Peuch CJ, Le Peuch DA, Demaille JG (1980): Phospholamban, activator of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump. Physicochemical properties and diagonal purification. *Biochemistry* 19, 3368-3373

Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H (1986): Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 9497-9501

Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM (1997): The effect of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol* 501 (Pt 1), 17-31

Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chen J, Bers D, Brown JH (2009): Requirement for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J clin Invest* 119, 1230-1240

Maier LS, Bers DM (2002): Ca<sup>2+</sup>, calmodulin, and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939

Maier LS, Bers DM (2007): Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73, 631-640

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res* 92, 904-911

Maisch B, Deeg P, Liebau G und Kochsiek K (1983): Diagnostic relevance of humoral and cytotoxic immune reactions in primary and secondary dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 52, 1072-1078

Mc Kee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB (1971): The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med* 285, 1441-1446



Mc Murray JJ, Stewart S (2000): Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83, 596-602

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990): Altered sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 85, 305-309

Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H (1992): Calmodulin trapping by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256, 1199-1202

Mitterdorfer J, Froschmayr M, Grabner M, Moebius FF, Glossmann H, Striessnig J (1996): Identification of PK-A phosphorylation sites in the carboxyl terminus of L-type calcium channel alpha 1 subunits. *Biochemistry* 35, 9400-9406

Moss AJ, Hall WJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Klein H, Levine JH, Saksena S, Waldo AL, Wilber D, Brown MW, Heo M (1996): Improved survival with an implanted defibrillator in patients with coronary disease at high risk for ventricular arrhythmia. Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial Investigators. *N Engl J Med* 335, 1933-1940

Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML; Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial II Investigators (2002): Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med* 346, 877-883

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

Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schondube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010): CaMKII-dependent diastolic SR-Ca<sup>2+</sup>-leak and elevated diastolic Ca<sup>2+</sup> levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 106, 1134-1144

Nowycky MC, Fox AP und Tsien RW (1985): Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440-443

Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH (1996): The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 334, 1349-1355

Pankonien I, Otto A, Dascal N, Morano I, Haase H (2012): Ahnak1 interaction is affected by phosphorylation of Ser-296 on Cav $\beta_2$ . *Biochem Biophys Res Commun* 421, 184-189

Peterson BZ, Demaria CD und Yue DT (1999): Calmodulin is the sensor for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22, 549-558

Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S; CHARM Investigators and Committees (2003): Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 362, 759–766

Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations in intracellular Ca<sup>2+</sup> handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 1169-1178

Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G (1999): Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 85, 38-46

Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J (1999): The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341, 709-717

Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Maritnez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klinger GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B (2000): Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomized trial – the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 335, 1582-1587

Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M, Eplerenone Post-Acute Myocardial infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators (2003): Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348, 1309-1321

Pitt GS, Dun W, Boyden PA (2006): Remodeled cardiac calcium channels. *J Mol Cell Cardiol* 41, 373-388

Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA (1993): Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261, 58-65

Reinecke H, Studer R, Vetter R, Holtz J, Drexler H (1996): Cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 31, 48-54

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P (1996): Report of the 1995 World Health Organisation/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93, 841-842

Ringer S (1883): A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* 4, 29-42

Ringer S, Buxton DW (1885): Concerning the Action of small quantities of Calcium, Sodium, and Potassium Salts upon the Vitality and Function of Contractile Tissue and the Cuticular Cells of Fishes. *J Physiol* 6, 154-161

Rodriguez P, Bhogal MS, Colyer J (2003): Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *J Biol Chem* 278, 38593-38600

Sag CM, 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

Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR (1986): Reversible generation of a Ca<sup>2+</sup>-independent form of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem* 261, 8581-8584

Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM (2003): Elevated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circ Res* 93, 592-594

Srinivasan M, Edman CF, Schulman H (1994): Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol* 126, 839-852

Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland. Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen, Fachserie 12, Reihe 4, Wiesbaden 2010a

Statistisches Bundesamt: Gesundheits- und Krankheitskosten 2002, 2004, 2006 und 2008, Fachserie 12, Reihe 7.2, Wiesbaden 2010b

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

Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75, 443-453

Tandan S, Wang Y, Wang TT, Jiang N, Hall DD, Hell JW, Luo X, Rothermel BA, Hill JA (2009): Physical and functional interaction between calcineurin and the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Circ Res* 105, 51-60

The Antiarrhythmics versus Implantable defibrillators investigators (1997): A comparison of antiarrhythmic drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from nearfatal ventricular arrhythmia. *N Engl J Med* 337, 1576-1583

The Consensus Trial Study Group (1987): Effects of Enalapril on mortality in severe congestive heart failure. *N Engl J Med* u, 1429-1435

The SOLVD Investigators (1991): Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 325, 293-302

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

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

Vardeny O, Claggett B, Anand I, Rossignol P, Desai AS, Zannad F, Pitt B, Solomon SD; Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) Investigators (2014): Incidence, predictors and outcomes related to hypo- and hyperkalemia in patients with severe heart failure treated with a mineralocorticoid receptor antagonist. *Circ Heart Fail* 7, 573-579

Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN, McKinsey TA (2004): Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol* 24, 8374-8385

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH (2006): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> 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 (2009): Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 285-294

Wang Y, Tandan S, Cheng J, Yang C, Nguyen L, Suqianto J, Johnstone JL, Sun Y, Hill JA (2008): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent remodeling of Ca<sup>2+</sup> current in pressure overload heart failure. *J Biol Chem* 283, 25524-25532

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, 61-70

- Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR (1991): Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates Ca<sup>2+</sup> channel activity. *J Biol Chem* 266, 11144-11152
- Wu Y, Roden DM, Anderson ME (1999a): Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res* 84, 906-912
- Wu Y, MacMillan LB, McNeill RB, Colbran RJ, Anderson ME (1999b): CaM kinase augments cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. *Am J Physiol* 276, H2168-2178
- Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, Anderson ME (2002): Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106, 1288-1293
- Xiao RP, Cheng H, Lederer WJ, Suzuki T und Lakatta EG (1994): Dual regulation of Ca/calmodulin kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9659-9663
- Xu L, Lai D, Cheng J, Lim HJ, Keskanokwong T, Backs J, Olson EN, Wang Y (2010): Alterations of L-type calcium current and cardiac function in CaMKII $\{\delta\}$  knockout mice. *Circ Res* 107, 398-407
- Yang D, Zhu WZ, Xiao B, Brochet DX, Chen SR, Lakatta EG, Xiao RP, Cheng H (2007): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of ryanodine receptors suppresses Ca<sup>2+</sup>-sparks and Ca<sup>2+</sup> waves in cardiac myocytes. *Circ Res* 100, 399-407
- Yuan W und Bers DM (1994): Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin dependent protein kinase. *Am J Physiol* 267, H982-H993
- Yue DT, Herzig S, Marban E (1990): Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 753-757

- Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007): Modulation of the ryanodine receptor and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Annu Rev Biochem* 76, 367-385
- Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B, EMPHASIS-HF Study Group (2011): Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 364, 11-22
- Zhang T, Brown JH (2004): Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63, 476-486
- Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H (2002): The cardiac-specific nuclear  $\delta$ B isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277, 1261-1267
- Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH (2003): The  $\delta$ C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912-919
- 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 $\delta$  isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J Biol Chem* 282, 35078-35087
- Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H (1999): Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399, 159-162

---

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Daniela, die mich fortwährend angetrieben und mit Rat und Tat unterstützt hat.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Lars Maier, der für jeden seiner Doktoranden immer ein offenes Ohr hatte und jeden einzelnen in seiner forscherschen Tätigkeit unterstützt hat.

Außerdem möchte ich Timo Schulte und Thomas Sowa für die Zusammenarbeit und ihre Unterstützung meiner experimentellen Arbeiten danken.



---

## **Lebenslauf**

Am 18. März 1986 wurde ich als Kind der Rechtsanwältin Marion Strater-Neuhaus und des Kaufmanns Klaus Neuhaus in Berlin-Spandau geboren.

Nach dem Besuch der Judith-Kerr-Grundschule in Berlin-Schmargendorf (1992-1996) ging ich auf das Evangelische Gymnasium zum Grauen Kloster in Berlin-Wilmersdorf. Im Juni 2005 schloss ich meine schulische Laufbahn mit dem Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife ab.

Von August 2005 bis April 2006 leistete ich meinen Zivildienst in der Abteilung für Infektiologie und Pneumologie der Charité in Berlin.

Anschließend begann ich zum Sommersemester 2006 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Am 18. März 2008 schloss ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung erfolgreich ab. Zum Wintersemester 2009/2010 begann ich mit meiner experimentellen Doktorarbeit im Labor von Herrn Prof. Dr. Maier. Am 22.11.2012 schloss ich den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung erfolgreich ab.

Seit Juli 2013 arbeite ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Radiologische Diagnostik der Uniklinik Köln.