

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

**Die Rolle der Serin/Threonin-
Phosphatasen bei der Dysregulation des
Calcium-Stoffwechsels in der
menschlichen Herzerkrankung**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Jörg Eiringhaus

aus

Speyer

Göttingen 2018

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

Referent/in Prof. Dr. med. S. T. Sossalla

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. N. Voigt

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 16.01.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle der Serin/Threonin-Phosphatasen bei der Dysregulation des Calcium-Stoffwechsels in der menschlichen Herzerkrankung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 15.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz.....	1
1.2 Die Physiologie der myokardialen Kontraktion	2
1.2.1 Die elektromechanische Kopplung.....	2
1.2.2 Der Querbrückenzyklus	3
1.2.3 Die Relaxation.....	4
1.3 Kardiale Ryanodinrezeptoren (RyR2)	5
1.4 Kardiale Proteinkinasen.....	5
1.4.1 Proteinkinase A (PKA).....	6
1.4.2 Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)	7
1.5 Kardiale Serin/Threonin-Phosphatasen (PP)	9
1.5.1 Protein-Phosphatase 1 (PP1).....	10
1.5.2 Protein-Phosphatase 2A (PP2A).....	11
1.5.3 Protein-Phosphatase 2B (PP2B, Calcineurin).....	11
1.6 Pathophysiologische Grundlagen des Ca ²⁺ -Stoffwechsels in der Herzinsuffizienz	12
1.7 Pathophysiologische Grundlagen der Arrhythmieentstehung	17
1.8 Pharmakologische Ansatzpunkte zur Modulation der Protein-Phosphatase 1 (PP1)- Aktivität.....	19
1.8.1 Pharmakologische Ansatzpunkte zur Inhibition der Protein-Phosphatase 1 (PP1).....	19
1.8.2 Pharmakologische Ansatzpunkte zur Aktivierung der Protein-Phosphatase 1 (PP1)...	21
1.9 Zielsetzungen und Fragestellungen der Dissertation.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Probengewinnung von humanem Ventrikelmyokard.....	24
2.2 Isolation humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten.....	25
2.2.1 Lösungen und Substanzen	25
2.2.2 Isolationsprotokoll	25
2.3 Lösungen für die intrazellulären Ca ²⁺ -Messungen mittels Konfokal- und Epifluoreszenzmikroskopie	27
2.3.1 HEPES-Tyrode (N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	27
2.3.2 Fluo-3 AM	28
2.3.3 Fura-2 AM	28
2.3.4 Koffein-Tyrode.....	29

2.4	Ca ²⁺ -Fluoreszenzfarbstoffe.....	29
2.4.1	Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM.....	29
2.4.2	Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM.....	31
2.5	Konfokalmikroskopie.....	34
2.5.1	Grundlagen der Konfokalmikroskopie.....	34
2.5.2	Versuchsprotokoll zur Messung von Ca ²⁺ -Sparks.....	37
2.5.3	Datengenerierung und Datenauswertung der Messungen von Ca ²⁺ -Sparks.....	38
2.5.4	Versuchsprotokoll zur Zellpenetrationstestung des 5-Carboxy-Fluorescein(FAM)-gebundenen Peptides PDP3.....	39
2.5.5	Datengenerierung und Datenauswertung der Zellpenetrationstestung des 5-Carboxy-Fluorescein(FAM)-gebundenen Peptides PDP3.....	40
2.6	Epifluoreszenzmikroskopie.....	40
2.6.1	Grundlagen der Epifluoreszenzmikroskopie.....	40
2.6.2	Versuchsprotokoll zur Messung von systolischen sowie Koffein-induzierten Ca ²⁺ -Transienten.....	42
2.6.3	Datengenerierung und Datenauswertung der Messungen von systolischen sowie Koffein-induzierten Ca ²⁺ -Transienten.....	44
2.7	Pharmakologische Substanzen.....	45
2.7.1	Okadaic Acid (OA).....	45
2.7.2	PP1-Disrupting Peptides 3/3m (PDP3/3m).....	45
2.7.3	Isoproterenol (DL-Isoproterenol-Hydrochlorid).....	46
2.7.4	Dimethylsulfoxid (DMSO).....	47
2.8	Statistische Datenauswertung.....	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Klinische Daten der verwendeten humanen Herzen.....	49
3.2	Ca ²⁺ -Homöostase in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz.....	50
3.2.1	Diastolisches SR-Ca ²⁺ -Leck.....	50
3.2.2	Systolische Ca ²⁺ -Freisetzung und SR-Ca ²⁺ -Gehalt.....	51
3.3	Auswirkungen der PP1- und PP2A-Inhibition auf das diastolische SR-Ca ²⁺ -Leck und die Frequenz arrhythmischer Ereignisse in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz.....	53
3.3.1	Diastolisches SR-Ca ²⁺ -Leck in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF.....	53
3.3.2	Diastolisches SR-Ca ²⁺ -Leck in der terminalen Herzinsuffizienz.....	54
3.4	Auswirkungen der PP1- und PP2A-Inhibition auf die systolische Ca ²⁺ -Freisetzung und den SR-Ca ²⁺ -Gehalt in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz.....	56
3.4.1	Systolische Ca ²⁺ -Freisetzung und SR-Ca ²⁺ -Gehalt in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF.....	56
3.4.2	Systolische Ca ²⁺ -Freisetzung und SR-Ca ²⁺ -Gehalt in der terminalen Herzinsuffizienz.....	57
3.5	Zellpenetrationstestung des PP1-aktivierenden 5-Carboxy-Fluorescein(FAM)-gebundenen Peptides PDP3.....	58
3.6	Auswirkungen der PP1-Aktivierung auf das diastolische SR-Ca ²⁺ -Leck und die Frequenz arrhythmischer Ereignisse in der terminalen Herzinsuffizienz.....	59

3.7	Auswirkungen der PP1-Aktivierung auf die systolische Ca^{2+} -Freisetzung und den SR- Ca^{2+} -Gehalt in der terminalen Herzinsuffizienz.....	62
4	Diskussion	63
4.1	Vergleich des Ca^{2+} -Stoffwechsels in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz	63
4.2	Auswirkungen der PP1- und PP2A-Inhibition auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz.....	65
4.3	Auswirkungen der PP1-Aktivierung auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel in der terminalen Herzinsuffizienz.....	70
4.4	Limitationen der Arbeit.....	73
4.5	Ausblick und klinische Relevanz.....	74
5	Zusammenfassung/Summary	76
6	Literaturverzeichnis	78
7	Publikationsverzeichnis	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise von Proteinkinasen und Serin/Threonin-Phosphatasen.....	6
Abbildung 3: Schematische Abbildung der Funktionsweise der Ca ²⁺ -/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII)	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zusammensetzung von A: PP1, B: PP2A und C: PP2B (Calcineurin)	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Regulation der elektromechanischen Kopplung durch Proteinkinasen und PP in A: gesundem Myokard und B: der Herzinsuffizienz	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung A: der Dysregulation der elektromechanischen Kopplung im Rahmen der Arrhythmieentstehung. B: des Einflusses des späten Na ⁺ -Stroms (I _{Na,late}) auf die Aktionspotenzialdauer (APD), die CaMKII-Aktivität, das diastolische SR-Ca ²⁺ -Leck sowie die durch diese Parameter induzierte Entstehung früher und später Nachdepolarisationen	18
Abbildung 7: Pharmakologische Ansatzpunkte zur Inhibition der Protein-Phosphatase 1 (PP1).....	21
Abbildung 8: Pharmakologische Ansatzpunkte zur Aktivierung der Protein-Phosphatase 1 (PP1).....	22
Abbildung 9: Fotografie einer frisch isolierten humanen linksventrikulären Kardiomyozyte ...	26
Abbildung 10: Darstellung der A: Fluo-3 AM-Strukturformel sowie des B: Fluoreszenz Exzitations- und Emissionsspektrums von Fluo-3 AM im Ca ²⁺ -gebundenen Zustand.....	30
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips des nicht-ratiometrischen Ca ²⁺ -Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-3 AM	31
Abbildung 12: Darstellung der A: Fura-2 AM-Strukturformel sowie des B: Fluoreszenz Exzitations- und Emissionsspektrums von Fura-2 AM im Ca ²⁺ -ungebundenen und Ca ²⁺ -gebundenen Zustand.....	32
Abbildung 13: Strahlengang der Konfokalmikroskopie.....	36
Abbildung 14: Versuchsaufbau der Konfokalmikroskopie	38
Abbildung 15: Strahlengang in der Epifluoreszenzmikroskopie.....	42
Abbildung 16: Versuchsaufbau der Epifluoreszenzmikroskopie.....	44
Abbildung 17: Okadaic Acid-Strukturformel.....	45
Abbildung 18: Vergleich des diastolischen SR-Ca ²⁺ -Lecks in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF (Hy) und der terminalen Herzinsuffizienz (HF) mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM)	50
Abbildung 19: Vergleich der systolischen Ca ²⁺ -Freisetzungskinetik sowie des SR-Ca ²⁺ -Gehaltes in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF (Hy) und der terminalen Herzinsuffizienz (HF) mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Fura-2 AM)	52
Abbildung 20: Analyse des diastolischen SR-Ca ²⁺ -Lecks unter PP1- und PP2A-Inhibition mittels 100 nmol/l Okadaic Acid (OA) in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM) ...	53
Abbildung 21: Analyse des diastolischen SR-Ca ²⁺ -Lecks unter PP1- und PP2A-Inhibition mittels 100 nmol/l Okadaic Acid (OA) in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM).....	55
Abbildung 22: Analyse der systolischen Ca ²⁺ -Freisetzung sowie des SR-Ca ²⁺ -Gehaltes unter PP1- und PP2A-Inhibition mittels 100 nmol/l Okadaic Acid (OA) in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Fura-2 AM)	57

Abbildung 23: Analyse der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung sowie des SR- Ca^{2+} -Gehaltes unter PP1- und PP2A-Inhibition mittels 100 nmol/l Okadaic Acid (OA) in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Fura-2 AM).	58
Abbildung 24: Nachweis der zellulären Permeabilität des selektiven PP1-Aktivators PP1-Disrupting Peptide 3 (PDP3) anhand konfokalmikroskopischer Messungen der Fluoreszenzintensität der 5-Carboxy-Fluorescein(FAM)-gebundenen Form des Peptids (FAM-PDP3) in humanen frisch isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten	59
Abbildung 25: Analyse des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks unter Einfluss des inaktiven Peptides PDP3m in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM)	60
Abbildung 26: Analyse des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks unter PP1-Aktivierung mittels 25 $\mu\text{mol/l}$ PDP3 in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM)	61
Abbildung 27: Analyse der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung sowie des SR- Ca^{2+} -Gehaltes unter PP1-Aktivierung mittels 25 $\mu\text{mol/l}$ PDP3 in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Fura-2 AM)	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Isolationslösungen.....	25
Tabelle 2: HEPES-Tyrode	27
Tabelle 3: Versuchs-Tyrodten.....	27
Tabelle 4: Fluo-3 AM.....	28
Tabelle 5: Fura-2 AM.....	28
Tabelle 6: Koffein-Tyrode.....	29
Tabelle 7: Beschreibung der mathematischen Parameter aus Formel 3 (modifiziert nach Gryniewicz et al. 1985; Kohlhaas 2007)	33
Tabelle 8: Konfokalmikroskopie-Parameter	39
Tabelle 9: Epifluoreszenz-Parameter.....	44
Tabelle 10: Aminosäuresequenzen von PDP3/3m (Chatterjee et al. 2012).....	46
Tabelle 11: Tyrode (angesetzt mit 1.000 ml ddH ₂ O) bei pH-Wert 7,54 bei RT zur Herstellung der Isoproterenol-Lösung.....	47
Tabelle 12: ASC-Tyrode (angesetzt mit 1.000 ml der Tyrode) zur Herstellung der Isoproterenol-Lösung.....	47
Tabelle 13: 1 mmol/l DL-Isoproterenol-Hydrochlorid	47
Tabelle 14: Zusammenstellung klinischer Daten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Herzen.....	49

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym = <i>angiotensin-converting enzyme</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Ampl.	Amplitude
APD	Aktionspotenzialdauer
arr.	arrhythmisch
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten, Sartane
ATP	Adenosintriphosphat
AVA	Aortenklappenöffnungsfläche = <i>aortic valve area</i>
bl	Baseline
Bpa	L-4-Benzophenylalanin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKII δ	prädominante kardiale Isoform der Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaSpF	Ca ²⁺ -Spark-Frequenz
cMBP-C	kardiales Myosin-bindendes-Protein-C
DAD	späte Nachdepolarisationen = <i>delayed afterdepolarizations</i>
DCM	dilatative Kardiomyopathie
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptoren, spannungsabhängige L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAD	frühe Nachdepolarisationen = <i>early afterdepolarizations</i>
EF	ventrikuläre Ejektionsfraktion
FAM	5-Carboxy-Fluorescein
FAM-PDP3	5-Carboxy-Fluorescein-PDP3
FKBP12.6	FK506-Bindeprotein 12.6, Calstabin 2
HCl	Salzsäure, Chlorwasserstoffsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HF	terminale Herzinsuffizienz
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpleistung = <i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
HFrEF	Herzinsuffizienz mit verminderter ventrikulärer Ejektionsfraktion = <i>heart failure with reduced ejection fraction</i>
HSP20	Hitzeschockprotein 20
Hy	kardiale Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF
I1	endogener PP1-Inhibitor-1
I2	endogener PP1-Inhibitor-2
ICM	ischämische Herzerkrankung
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzerkrankung
LVAD	linksventrikuläres Unterstützungssystem = <i>left ventricular assist device</i>
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
mAKAP	muskelspezifisches Ankerprotein der Proteinkinase A

Max Flux	maximal detektierter Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR
MgCl_2	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OA	Okadasäure = <i>Okadaic Acid</i>
PDE	Phosphodiesterasen
PDP3	<i>PP1-Disrupting Peptide 3</i>
PDP3m	<i>PP1-Disrupting Peptide 3m</i> (inaktives Kontrollpeptid)
PIP	mit der PP1 interagierende Proteine = <i>Phosphatase-Interacting-Proteins</i>
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
P_{mean}	Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe
PP	Serin/Threonin-Phosphatasen
PP1	Protein-Phosphatase 1
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PP2B	Protein-Phosphatase 2B, Calcineurin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RVxF-Motiv	Bindungsmotiv der PIPs für die PP1, einbuchstabiger Aminosäuren-Code, x= jede beliebige Aminosäure
RyR2	Ryanodin-Rezeptoren vom kardialen Subtyp
S.E.M./SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA2a	kardiale sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
t to bl 50 %/RT50	halbmaximale Eliminationszeit

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz beschreibt eine Erkrankung des Herzens, bei der es pathophysiologisch zu einer Unfähigkeit des Herzmuskels kommt, ein für die Durchblutung peripherer Organe ausreichendes Herzzeitvolumen in einer entsprechenden Situation aufrecht zu erhalten (Dickstein et al. 2008). Dabei wird die Herzinsuffizienz in den aktuellen europäischen Leitlinien als komplexes Syndrom unterschiedlichster Genese beschrieben, welches von einer strukturellen oder funktionellen Störung der Herzfunktion ausgeht und die Fähigkeit der Ventrikel beeinträchtigt, Blut aufzunehmen oder in den Körperkreislauf auszuwerfen (Ponikowski et al. 2016). Folglich wird durch die Einschränkung der Pumpfunktion des Herzens das Sauerstoffangebot für den Gewebestoffwechsel limitiert. Hauptursache der Herzinsuffizienz ist die ischämische Herzerkrankung (ICM), welche im Rahmen einer Koronaren Herzerkrankung (KHK) auftritt, sowie die dilatative Kardiomyopathie (DCM). Weitere Ursachen können persistierende Druckbelastungen des Herzens durch eine erhöhte Nachlast, im Sinne eines arteriellen Hypertonus, oder Herzklappenerkrankungen, wie die Aortenklappenstenose, darstellen. Hierbei kommt es zunächst im Rahmen physiologischer Anpassungsreaktionen zu einer konzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels, bevor im Endstadium meist eine Dilatation eintritt. Des Weiteren können auch persistierende Volumenbelastungen des Herzens durch eine erhöhte Vorlast, beispielsweise im Rahmen von Herzklappeninsuffizienzen, durch die dabei auftretenden Pendelvolumina zu einer exzentrischen Dilatation der Ventrikel und somit zur Herzinsuffizienz führen.

Anhand der kardialen Pumpfunktion ist eine Unterscheidung der Herzinsuffizienz in eine systolische Herzinsuffizienz mit verminderter ventrikulärer Ejektionsfraktion (EF, sog. HFrEF) und eine diastolische Herzinsuffizienz mit erhaltener ventrikulärer Ejektionsfraktion (sog. HFpEF) möglich (Hoppe et al. 2005). Eine Einteilung der Herzinsuffizienz anhand der klinischen Ausprägung der Erkrankung kann durch die Klassifikation der New York Heart Association erfolgen (Stadien: NYHA I-IV) (Hunt et al. 2002; Ponikowski et al. 2016). Dabei kommt es je nach Ausprägung der Erkrankung bereits in Ruhe oder erst unter Belastung zu typischen Symptomen wie Dyspnoe, Abgeschlagenheit oder kardial bedingten Ödemen. Neben der Verminderung der ventrikulären Ejektionsfraktion und der daraus resultierenden eingeschränkten kardialen Pumpleistung stellt auch das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien einen typischen Aspekt der Herzinsuffizienz dar, welcher sich ebenfalls negativ auf die Prognose der Erkrankung auswirkt (McMurray et al. 2012) und im Rahmen dieser Arbeit tiefergehend untersucht werden soll.

Epidemiologisch stellt die Herzinsuffizienz mit einer Gesamtprävalenz von 1-2 % in der erwachsenen Population von Industrieländern eine häufige Erkrankung dar (McMurray et al. 2012). Die Prävalenz der Herzinsuffizienz ist dabei altersabhängig, sodass bei den 40-55-Jährigen lediglich <1 %, bei den über 80-Jährigen >10 % der Population betroffen sind (Mosterd und Hoes 2007). Bei einer in den letzten Jahren konstant bleibenden Inzidenz ist die Zunahme der Prävalenz der Herzinsuffizienz im Alter auf eine Überlebenszeitverlängerung der betroffenen Patienten zurückzuführen, welche unter anderem durch eine verbesserte medizinische Patientenversorgung zu erklären ist (Roger 2010). Da die Herzinsuffizienz inzwischen den häufigsten Grund für Krankenhauseinweisungen bei Patienten über 65 Jahren darstellt, gewinnt die Erkrankung auch immer mehr an sozioökonomischer Bedeutung (Hunt et al. 2002). Bei einem Geschlechterverhältnis von 3:2 sind insgesamt erheblich mehr Männer von der Erkrankung betroffen (Hunt et al. 2002).

In den vergangenen Jahrzehnten konnte mittels Grundlagenforschung gezeigt werden, dass die Entwicklung der Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene unter anderem auf Fehlregulationen des zellulären Calcium (Ca^{2+})-Stoffwechsels zurückzuführen ist (Bers 2001; Hasenfuss und Pieske 2002). Diese manifestieren sich als Veränderungen im Ablauf der elektromechanischen Kopplung und sind als eine elementare Ursache der kontraktiven Dysfunktion sowie der Entstehung von Arrhythmien anzusehen.

1.2 Die Physiologie der myokardialen Kontraktion

1.2.1 Die elektromechanische Kopplung

Die Erregung der ventrikulären Kardiomyozyte hat physiologischerweise ihren Ursprung in dem vom Sinusknoten im Vorhof generierten Aktionspotenzial, welches über das Erregungsleitungssystem des Herzens in das Arbeitsmyokard geleitet wird. Die elektromechanische Kopplung beschreibt dabei den Prozess der Umwandlung der elektrischen Erregung des Aktionspotenzials in die anschließende mechanische Kontraktion der Kardiomyozyte, welche sich an den kontraktiven Strukturen der Zelle abspielt. Grundlage einer regelrechten Abfolge von Kontraktion und Relaxation ist folglich ein synchronisierter Ablauf der elektromechanischen Kopplung, sprich eine kontrollierte Freisetzung von Ca^{2+} in das Zytosol in der Systole sowie eine effektive Ca^{2+} -Elimination in der Diastole (Fischer et al. 2011). Eine graphische Veranschaulichung dieser Mechanismen findet sich in Abbildung 1.

Der elektrische Stimulus des Aktionspotenzials (Abbildung 1, 1), dessen Aufstrich durch die Öffnung schneller Na^+ -Kanäle generiert wird, erreicht die Kardiomyozyte über die transversalen (T)-Tubuli des Sarkolemms (Abbildung 1, 2). In diese Invaginationen der Membran wird das Aktionspotenzial fortgeleitet und führt zu einer Depolarisation der Zellmembran. Das Ruhemembranpotenzial von -80 mV ändert sich dabei auf +30 mV (Bers 2002). Diese Depolarisation des Sarkolemms führt wiederum zur Öffnung einwärtsgerichteter, spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridin-Rezeptoren, DHP, Abbildung 1, 3).

Durch diese Rezeptoren dringt Ca^{2+} entlang seines elektrochemischen Gradienten in das Zellinnere ein (I_{Ca} , Abbildung 1, 4) und triggert durch Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen, den sog. Ryanodin-Rezeptoren (RyR2, Abbildung 1, 5) des intrazellulären Ca^{2+} -Speichers, des sog. sarkoplasmatischen Retikulums (SR) (Bassani et al. 1993; Delbridge et al. 1997), eine zusätzliche Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR (Abbildung 1, 6). Dieser Vorgang wird als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bezeichnet (Fabiato 1983, 1985; Fabiato und Fabiato 1975) und durch die räumliche Assoziation von 10-25 sarkolemmalen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen in den T-Tubuli mit etwa 100 in sog. *Clustern* (= räumliche Ansammlung) angeordneten RyR2 am SR ermöglicht (Bers und Guo 2005; Franzini-Armstrong et al. 1999; Zalk et al. 2007). In der Folge kommt es zum Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von ca. 100 nmol/l auf ca. 1 $\mu\text{mol/l}$ (Abbildung 1, rote Pfeile). Die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen induzieren nun durch Bindung an Troponin C an den Myofilamenten (Abbildung 1, 7) den Querbrückenzyklus und damit die mechanische Kontraktion der Kardiomyozyte (Abbildung 1, 8) (Bers 2002). Im Rahmen der Relaxation wird die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration über die SR- Ca^{2+} -AT-Pase (SERCA2a, Abbildung 1, 9), den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX, Abbildung 1, 10), die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase (Abbildung 1, 11) sowie mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter (Abbildung 1, 12) wieder auf die Ausgangswerte abgesenkt (Abbildung 1, grüne Pfeile).

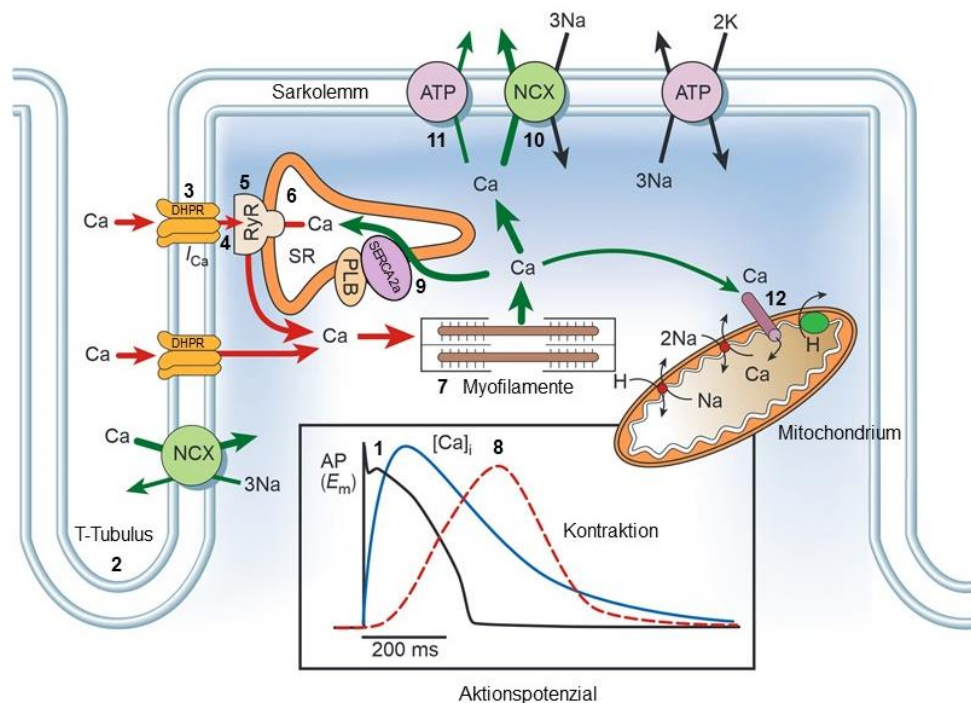


Abbildung 1: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung (modifiziert nach Donald M. Bers 2002 mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd.)

1.2.2 Der Querbrückenzyklus

Die am Ende des Prozesses der elektromechanischen Kopplung beschriebene Bindung des Ca^{2+} an Troponin C bewirkt durch Wechselwirkung mit Troponin I eine konsekutive

Freilegung der Bindestellen für die Myosinköpfechen an den Aktin-Filamenten und führt damit zur Initiation des Querbrückenzyklus (Rayment et al. 1993). Dieser ermöglicht im Rahmen der Kontraktion der Kardiomyozyte eine koordinierte Verschiebung der kontraktile Myofilamente Aktin und Myosin mittels des Gleitfilamentmechanismus (Huxley 1969). Die Bereitstellung der hierzu benötigten Energie erfolgt durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP). Hierdurch wird das sich in einer 90°-Stellung befindliche Myosinköpfechen nach Bindung an Aktin in eine 45°-Stellung umgeklappt, sodass durch diese Konformationsänderung eine Art Kraftschlag ausgeführt wird. Dieser erfolgt nach vollständiger Dissoziation von Adenosindiphosphat (ADP) und dem abgespaltenen Phosphat-Ion durch eine Verschiebung der sich überlappenden Anteile der Myofilamente Aktin und Myosin. Es resultiert eine mikroskopisch sichtbare Verkürzung der Sarkomere, welche sich makroskopisch in einer entsprechenden Kontraktion des Gewebeverbands widerspiegelt. Die anschließende Relaxation findet auf zellulärer Ebene durch die Auflösung der hochaffinen Bindung zwischen Aktin und Myosin statt und wird erst durch eine erneute ATP-Bindung an das Myosinköpfechen sowie den Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ermöglicht (Bers 2002).

1.2.3 Die Relaxation

Die diastolische Relaxation der Kardiomyozyte erfordert, gegensätzlich zur Kontraktion, einen Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Dieser ermöglicht eine Abdissoziation der Ca^{2+} -Ionen vom Troponin C und verhindert somit eine erneute Initiation des Querbrückenzyklus. Die zytosolische Ca^{2+} -Elimination wird dabei durch vier Transportproteine realisiert, deren Anteil an der Elimination je nach Spezies variiert (Bers 2002). Da sich diese Arbeit ausschließlich mit humanem Myokard auseinandersetzt, werden hier die Relaxationsvorgänge in der humanen Kardiomyozyte dargestellt. Die dort eine Rolle spielenden Transportproteine sind 1) die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA), deren kardial dominierende Isoform die SERCA2a darstellt, 2) der sekundär aktive sarkolemmale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), 3) die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase, sowie 4) mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter (Bers 2002). Die SERCA2a trägt mit ~70 % der zytosolischen Ca^{2+} -Elimination den größten Anteil zur Senkung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bei, wobei sie das Ca^{2+} aus dem Zytosol unter ATP-Verbrauch zurück in das SR befördert. Eine Modulation der SERCA2a-Aktivität kann durch Phospholamban (PLB) erfolgen, dessen inhibitorische Wirkung auf die SERCA2a von seinem Phosphorylierungszustand abhängt. Dabei inhibiert PLB die Aktivität der SERCA2a lediglich im unphosphorylierten Zustand. Die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) an Position Serin 16, als auch durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII δ) an Position Threonin 17 bewirken folglich eine Aktivitätssteigerung der SERCA2a (Mattiuzzi und Kranias 2011; Vittone et al. 2008). Der NCX transportiert ~28 % des Ca^{2+} nach extrazellulär. Dabei arbeitet der NCX unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich im sog. Vorwärtsmodus, in welchem ein Ca^{2+} -Ion im Austausch gegen drei Na^+ -Ionen nach extrazellulär transportiert wird. Lediglich ~2 % der Ca^{2+} -Elimination fallen

auf die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase sowie mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter (Bers 2002). Eine graphische Veranschaulichung dieser Prozesse findet sich in Abbildung 1.

1.3 Kardiale Ryanodinrezeptoren (RyR2)

Kardiale Ryanodinrezeptoren (RyR2) sind Ca^{2+} -Kanäle, die sich an der terminalen Zisterne des SR befinden und Ca^{2+} -getriggert zu einer Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR führen (Inui et al. 1987), was wiederum einen wichtigen Mechanismus im Rahmen der elektromechanischen Kopplung darstellt. Im Jahr 1993 beschrieben Cheng et al. zuerst die sog. *SR- Ca^{2+} -Sparks* (= Ca^{2+} -Funken), als spontane Ca^{2+} -Freisetzungsereignisse geclusterter RyR2 (Cheng et al. 1993; Guatimosim et al. 2002). Von den drei bislang identifizierten Isoformen von Ryanodinrezeptoren, stellt der RyR2 die kardial dominierende Isoform dar (Inui et al. 1987). Der RyR2-Komplex besteht physiologischerweise aus dem eigentlichen Kanalprotein (Homotetramer-Komplex, ~ 2200 kDa) und einer Pore, welche zwischen den vier ~ 565 kDa großen Untereinheiten liegt (Ma et al. 2004; Zalk et al. 2007). Die genaue Zusammensetzung der RyR2 in Bezug auf die Anzahl und Anordnung der Transmembraneinheiten (vermutlich 4-6) wird noch erforscht (Ma et al. 2004; Zalk et al. 2015). Dabei enthält der RyR2 zwei funktionelle Domänen: 1) die kleine Carboxyl(C)-terminale hydrophobe Domäne, sowie 2) eine große Amino(N)-terminale zytoplasmatische Domäne, welche Kanalregulationsstellen beinhaltet und am Aufbau eines großen regulatorischen Signalkomplexes beteiligt ist (Ma et al. 2004). Dazu zählen unter anderem auch Calstabin 2 (FK506-Bindeprotein 12.6 = FKBP12.6), das muskelspezifische Ankerprotein der Proteinkinase A (mAKAP) sowie die Protein-Phosphatasen (PP) PP1 und PP2A (Marx et al. 2000; Zalk et al. 2007; Zhao et al. 1998). Zudem können weitere Interaktionen am RyR2 mit einem Komplex aus Tiradin, Junctionin und Calsequestrin sowie Sorcin und Calmodulin erfolgen (Bers 2004). Außerdem unterliegen die RyR2 zahlreichen Regulationen durch die Proteinkinase A (PKA) sowie durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII δ), welche durch Phosphorylierungen spezifischer Bindungsstellen die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 modulieren können (Hain et al. 1995; Marx et al. 2000; Valdivia et al. 1995; Wehrens et al. 2004; Witcher et al. 1991). Insgesamt wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 folglich unter anderem von einem sensiblen System aus Proteinkinasen und Serin/Threonin-Phosphatasen reguliert, welches im Übergang zur Herzinsuffizienz aus dem physiologischen Gleichgewicht gerät. Eine genauere Betrachtung dieser Mechanismen und der daran beteiligten Enzyme erfolgt in den folgenden Kapiteln.

1.4 Kardiale Proteinkinasen

Proteinkinasen sind Enzyme, welche den Transfer einer Phosphatgruppe von einem Donor (meist ATP) auf eine Hydroxyl(OH)-Gruppe einer Aminosäureseitenkette katalysieren. Die reversible Phosphorylierung von Zielproteinen durch Serin/Threonin-Proteinkinasen ist da-

bei ein wichtiger Mechanismus zur Regulation multipler zellulärer Funktionen, wie unter anderem des Ca^{2+} -Stoffwechsels in der humanen Kardiomyozyte (Katz et al. 1975). Insgesamt unterliegt etwa die Hälfte aller menschlichen Proteine einer reversiblen Phosphorylierung (Hornbeck et al. 2012). Dabei wird der Phosphorylierungsstatus der Zielproteine durch die Menge und Aktivität der Proteinkinasen sowie deren funktionellen Gegenspielern, den Serin/Threonin-Phosphatasen, reguliert, welche im Rahmen der Dephosphorylierung die entsprechende Phosphatgruppe mittels Hydrolysisierung wieder abspalten. Es resultiert physiologischerweise ein fein reguliertes Gleichgewicht aus phosphorylierten und dephosphorylierten Zielproteinen, welches bei bestimmten Erkrankungen, wie der Herzinsuffizienz, verloren geht und zu Dysregulationen der abhängigen Stoffwechselwege, wie der Ca^{2+} -Homöostase in der Kardiomyozyte, führt. Die Funktionsweise der Proteinkinasen und Serin/Threonin-Phosphatasen ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

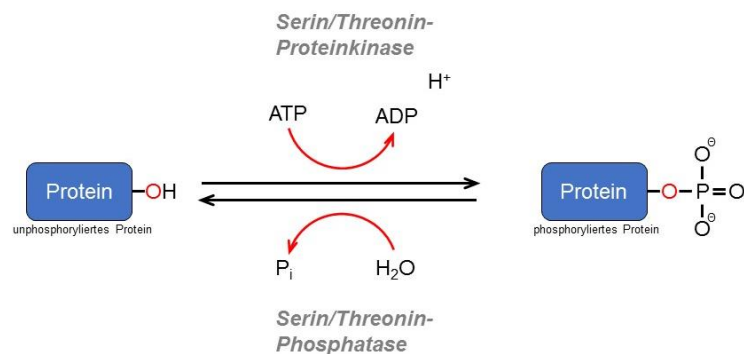


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise von Proteinkinasen und Serin/Threonin-Phosphatasen

In den folgenden Unterkapiteln werden die Struktur sowie die physiologischen Funktionen der wichtigsten kardialen Proteinkinasen besprochen. Eine detaillierte Betrachtung des Beitrags der Proteinkinasen an der Entwicklung der Herzinsuffizienz erfolgt in Kapitel 1.6.

1.4.1 Proteinkinase A (PKA)

Die Proteinkinase A (PKA) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, welche als inaktives PKA-Tetramer aus einem Komplex aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten besteht. Durch Bindung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) an die regulatorische Untereinheit kommt es zur Abdissoziation der beiden katalytischen Untereinheiten, welche als Monomere freigesetzt werden und mittels Phosphorylierung von Zielproteinen als Schlüsselenzyme verschiedener Stoffwechselwege fungieren (Hanks et al. 1988; Taylor et al. 2013). In der humanen Kardiomyozyte ist die PKA unter anderem in den physiologischen Ablauf der β_1 -adrenergen Signalkaskade nach Stimulation des sympathischen Nervensystems eingebunden (Benkusky et al. 2007; Bers 2002; Eisner et al. 2009). In diesem Rahmen moduliert die PKA über eine Phosphorylierung der RyR2 sowie der L-Typ-

Ca²⁺-Kanäle auf positive Weise die Kontraktionskraft (positive Inotropie) sowie über Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) an Position Serin 16 und Troponin I an Position Serin 23/24 die Relaxationskinetik der Kardiomyozyte (positive Lusitropie) (Bers 2002; Cole und Perry 1975; Eisner et al. 2009; Kentish et al. 2001; Kranias 1985).

1.4.2 Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) stellt als Serin/Threonin-Proteinkinase ein weiteres wichtiges Enzym in der Regulation des kardialen Ca²⁺-Stoffwechsels dar (Braun und Schulman 1995). Dabei existieren vier Isoformen der CaMKII: α , β , γ und δ (Maier und Bers 2002). Die prädominante Isoform im Herzen ist die CaMKII δ , deren Spleisvarianten δ_B im Nukleus und δ_C im Zytoplasma der Kardiomyozyte vorkommen (Edman und Schulman 1994; Maier und Bers 2007; Srinivasan et al. 1994; Tobimatsu und Fujisawa 1989). Durch eine Zusammenlagerung von 6-12 CaMKII-Monomeren entsteht das ringförmige, funktionell aktive Holoenzym der CaMKII (Maier und Bers 2007). Einzelne Monomere bestehen dabei aus einer Amino(N)-terminalen Domäne mit katalytischer Funktion, einem zentralen regulatorischen Bereich, der eine teilweise überlappende Autoinhibitions- und Ca²⁺/Calmodulin-Bindungsregion einschließt, sowie einer Carboxy(C)-terminalen Domäne, welche die Oligomerisation des Holoenzym ermöglicht (Assoziationsdomäne). Die Aktivierung der CaMKII erfolgt physiologischerweise während der Systole über einen Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration (Maier und Bers 2007). Dies geschieht über eine Komplexbildung von vier Ca²⁺-Ionen mit Calmodulin (CaM) zu einem Ca²⁺/CaM-Komplex, welcher dann an die regulatorische Domäne bindet. Neben der Aktivierung durch den Ca²⁺/CaM-Komplex kann die CaMKII auch durch Autophosphorylierung der autoinhibitorischen Domäne an Position Threonin 286 in einen dauerhaft aktiven Zustand versetzt werden (Maier und Bers 2002). Da die Autophosphorylierung der CaMKII eine Affinitätssteigerung der Bindung des Ca²⁺/CaM-Komplexes an die regulatorische Domäne um den Faktor 700 bewirkt, besitzt diese auch während der in der Diastole vorherrschenden erniedrigten zytosolischen Ca²⁺-Konzentration noch 20-80 % ihrer maximalen Aktivität (Lai et al. 1986; Lou et al. 1986; Schworer et al. 1986). Eine vollständige Inaktivierung der CaMKII erfolgt durch Dephosphorylierung an Position Threonin 286 durch die Serin/Threonin-Phosphatasen 1, 2A und 2C (Maier und Bers 2007; Zhang und Brown 2004). Eine schematische Darstellung der Struktur und Funktionsweise der CaMKII findet sich in Abbildung 3.

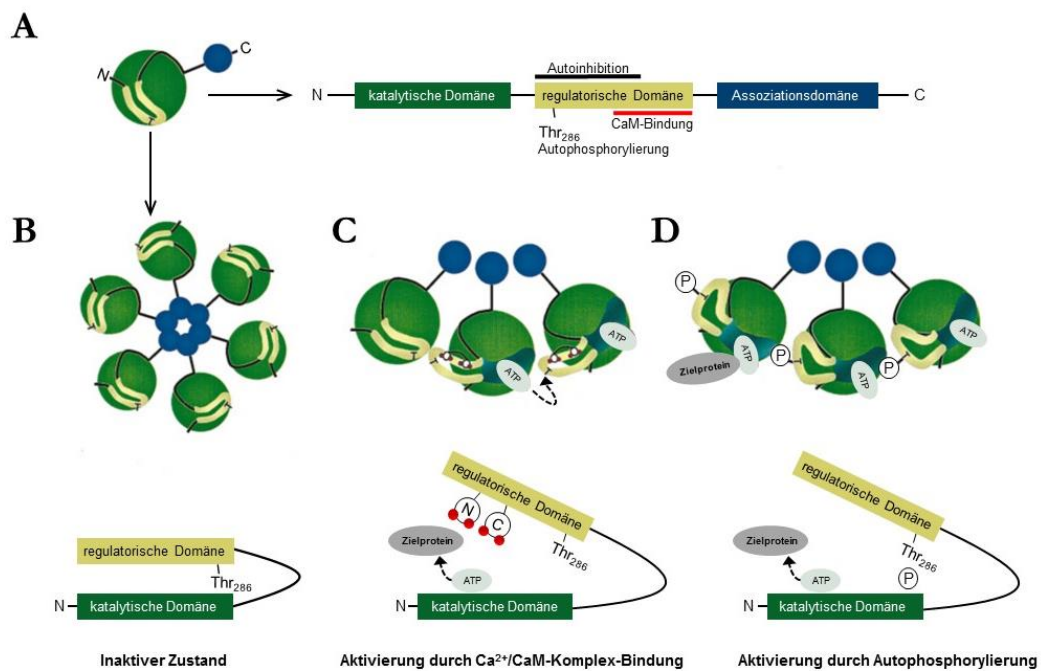


Abbildung 3: Schematische Abbildung der Funktionsweise der Ca²⁺-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII). A: Schematische Darstellung eines CaMKII-Monomers, bestehend aus einer katalytischen Domäne, einer regulatorischen Domäne sowie einer Assoziationsdomäne. B: Zusammenlagerung mehrerer CaMKII-Monomere zum CaMKII-Holoenzym. C: Aktivierung der CaMKII durch den Ca²⁺/Calmodulin-Komplex (rote Punkte). D: Aktivierung der CaMKII durch Autophosphorylierung an Position Threonin 286 führt zur Aufrechterhaltung von 20-80 % der maximalen CaMKII-Aktivität in der Diastole. (modifiziert nach Maier und Bers 2002 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Funktionell nimmt die CaMKII, wie auch die PKA, über die Phosphorylierung diverser intrazellulärer Zielproteine eine zentrale Stellung in der Regulation der elektromechanischen Kopplung in der Kardiomyozyte ein. Die Phosphorylierung der sarkolemmalen L-Typ-Ca²⁺-Kanäle durch die CaMKII bewirkt dabei eine Steigerung der Amplitude des am Anfang der elektromechanischen Kopplung stehenden I_{Ca} sowie eine verzögerte Inaktivierung dieses Ca²⁺-Einstroms (Dzhura et al. 2000; Maier und Bers 2007). Durch Phosphorylierung der RyR2 greift die CaMKII außerdem in die Modulation der Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 ein. Die funktionell wichtigsten Phosphorylierungsstellen der CaMKII am RyR2 liegen an Position Serin 2809 sowie Serin 2815, wobei die Position Serin 2809 ebenfalls eine Phosphorylierungsstelle der PKA darstellt (Hain et al. 1995; Maier und Bers 2007; Maier et al. 2003; Marx et al. 2000; Valdivia et al. 1995; Witcher et al. 1991). Weitere Studien ergaben mindestens vier weitere Phosphorylierungsstellen der CaMKII an RyR2, deren genaue Bedeutung allerdings noch unklar ist (Maier und Bers 2007; Rodriguez et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der RyR2 durch die CaMKII zu einer Steigerung des in der Systole freigesetzten Anteils des SR-Ca²⁺-Speichers führt und zusätzlich die diastolische Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 erhöht (Ai et al. 2005; Kohlhaas et al. 2006; Maier et al. 2003). Des Weiteren erfolgt durch die CaMKII eine Phosphorylierung von PLB an Position Threonin 17, welches dadurch seine hemmende Wirkung auf die SERCA2a verliert und

eine Steigerung der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR ermöglicht (Davis et al. 1983; Kohlhaas et al. 2006; Le Peuch et al. 1979).

1.5 Kardiale Serin/Threonin-Phosphatasen (PP)

Die Serin/Threonin-Phosphatasen (PP) stellen eine Gruppe von Enzymen dar, welche als Hydrolasen unter Verbrauch von einem Wasser-Molekül die Spaltung der Esterbindung zwischen einem Phosphatrest und einer Hydroxyl(OH)-Gruppe ermöglichen. Somit können durch die PP die von Proteinkinasen an die Seitenketten der Aminosäuren Serin und Threonin angehefteten Phosphatreste effektiv entfernt werden. Diese Reaktion stellt, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, einen den Proteinkinasen entgegengesetzten Mechanismus dar, weshalb die PP als deren funktionelle Gegenspieler betrachtet werden können.

Im Gegensatz zu der großen Anzahl an Proteinkinasen, welche durch das menschliche Genom codiert werden, existieren nur wenige Gene, die für die katalytischen Untereinheiten der Phosphatasen codieren (Virshup und Shenolikar 2009). Nach Cohen et al. umfasst die Gruppe der Serin/Threonin-Phosphatasen folgende Enzyme: PP1, PP2A, PP2B (Calcineurin) sowie PP2C (Cohen 1989). Erst kürzlich wurden die PP4-7 identifiziert, deren genaue Bedeutung aber noch teilweise unklar ist (Herzig und Neumann 2000; Shi 2009). Diese geringe Anzahl an PP kann nur durch Bildung von sog. Multi-Protein-Komplexen die große Vielzahl der Proteinkinasen effektiv antagonisieren. Die gebildeten Multi-Protein-Komplexe bestehen dabei aus einer katalytischen sowie diversen anderen Untereinheiten, welche als *regulatory subunits* (= regulatorische Untereinheiten), *targeting subunits* (= Lokalisationsuntereinheiten) und *scaffold subunits* (= Stützelemente) bezeichnet werden. Diese ermöglichen bei hoher Substratspezifität, neben der genauen Regulation der PP-Aktivität, eine spezielle subzelluläre Lokalisation der einzelnen Holoenzyme (Shi 2009; Virshup und Shenolikar 2009). Insgesamt wird die PP-Aktivität im menschlichen Herzen zu ~90 % durch die PP1, PP2A sowie PP2B (Calcineurin) bestimmt (Cohen 1989; El-Armouche und Eschenhagen 2009). Diese PP sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

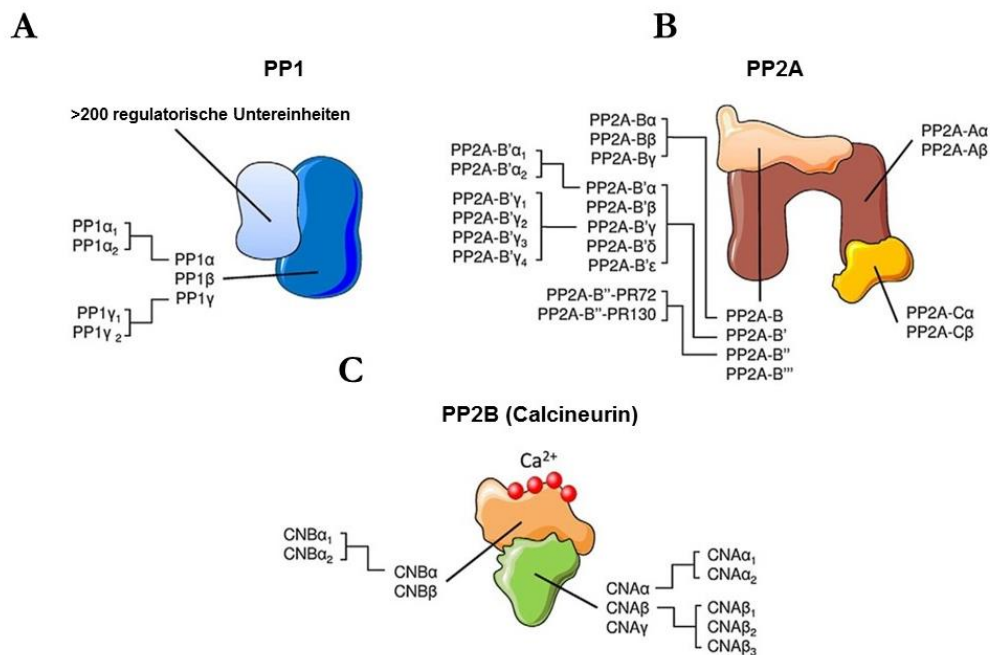


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zusammensetzung von A: PP1, B: PP2A und C: PP2B (Calcineurin) (modifiziert nach Heijman et al. 2013 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

In den folgenden Unterkapiteln werden die Struktur sowie die physiologischen Funktionen der wichtigsten kardialen PP besprochen. Der Beitrag der PP an der Entwicklung der Herzinsuffizienz wird in Kapitel 1.6 beschrieben.

1.5.1 Protein-Phosphatase 1 (PP1)

Die PP1 ist in nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers, folglich auch in den Kardiomyozyten, exprimiert (Heijman et al. 2013) und trägt dort zur Regulation der elektromechanischen Kopplung bei. Durch unterschiedliche Gene werden insgesamt drei Hauptformen der katalytischen Untereinheit exprimiert: PP1 α , PP1 γ sowie PP1 δ/β (Herzig und Neumann 2000). Eine weitere Unterteilung ist anhand von Splicevarianten der PP1 α sowie der PP1 γ möglich. Die verschiedenen Isoformen der PP1 besitzen unterschiedliche Lokalisationspezifitäten in der Kardiomyozyte, wobei die PP1 α hauptsächlich an den Myofilamenten, die PP1 δ/β am longitudinalen SR (PLB, SERCA2a) und die PP1 γ am junktionalen SR (RyR2) vorliegen (Aoyama et al. 2011; Herzig und Neumann 2000). Die katalytischen Untereinheiten der PP1 lagern sich mit einer von mehr als 200 regulatorischen Untereinheiten, den *Phosphatase-Interacting-Proteins* (= mit der PP1 interagierende Proteine, PIP) zu Dimeren zusammen, welche wiederum die Substratspezifität bedingen und die subzelluläre Lokalisation sowie die Aktivität der PP1 beeinflussen können (Chatterjee und Koehn 2013). Wichtige regulatorische Untereinheiten stellen dabei die endogenen PP1-Inhibitoren Inhibitor-1 (I1), Inhibitor-2 (I2) sowie das Hitzeschockprotein 20 (HSP20) dar (Cohen 2002). Funktionell trägt die PP1 gemeinsam mit der PP2A zur Dephosphorylierung der RyR2 und somit zur Steuerung der

Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR bei. Dabei wird die PP1 über die regulatorische Untereinheit Spinophilin an den RyR2-Komplex gebunden (Marks et al. 2002). Des Weiteren kontrolliert die PP1 die Dephosphorylierung des SERCA2a-Inhibitions-Proteins PLB an Position Serin 16 (PKA-Phosphorylierungsstelle) sowie Position Theronin 17 (CaMKII-Phosphorylierungsstelle) (Aye et al. 2012), wodurch die PP1 direkt in die Regulation der diastolischen Ca^{2+} -Elimination eingreift. Außerdem ist die PP1, gemeinsam mit der PP2A, für die Dephosphorylierung von Troponin I an Position Serin 23/24 zuständig und greift somit ebenfalls in die Regulation des Kontraktionsmechanismus ein (Solaro und Kobayashi 2011).

1.5.2 Protein-Phosphatase 2A (PP2A)

Die PP2A ist eine weitere, speziesspezifische PP mit wichtigen Funktionen in der Regulation des kardialen Ca^{2+} -Stoffwechsels (De Grande et al. 2013). Dabei liegt die PP2A entweder als Dimer aus einer katalytischen Untereinheit (PP2A-A) und einem Stützelement (PP2A-C) oder als Trimer aus einer katalytischen Untereinheit, einem Stützelement sowie einer regulatorischen Untereinheit vor. Die katalytischen Untereinheiten und Stützelemente der PP2A kommen unspezifisch in der gesamten Kardiomyozyte vor, wohingegen die regulatorischen Untereinheiten der PP2A eine spezifische subzelluläre Lokalisation besitzen (De Grande et al. 2013). Dabei werden vier Unterformen der regulatorischen Untereinheiten unterschieden: PP2A-B, PP2A-B', PP2A-B'', PP2A-B''' (Herzig und Neumann 2000). Die PP2A kann, wie auch die katalytische Untereinheit von PP2B (Calcineurin), an den Carboxy(C)-Terminus der α -Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals am Sarkolemm binden und die PKA-Phosphorylierungsstelle an Position Serin 1928 dephosphorylieren (Xu et al. 2010). Dadurch leistet die PP2A einen wichtigen Beitrag zur Steuerung der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Des Weiteren spielt die PP2A neben der PP1 in der humanen Kardiomyozyte eine wichtige Rolle in der Dephosphorylierung der RyR2, an welche sie durch die Untereinheit PR130, B56 α -Ankyrin-B oder B56 δ -mKAP gebunden wird (Marks et al. 2002).

1.5.3 Protein-Phosphatase 2B (PP2B, Calcineurin)

Die PP2B, welche auch als Calcineurin bezeichnet wird, ist eine Ca^{2+} -abhängige PP, welche aus einer katalytischen (CNA) sowie einer regulatorischen (CNB) Untereinheit besteht und in geringeren Anteilen in der Kardiomyozyte, vor allem aber im Gehirn und im Hoden vorkommt (Herzig und Neumann 2000). Calcineurin spielt in der Kardiomyozyte hauptsächlich eine Rolle in der transkriptionalen Regulation von diversen Proteinen und reguliert auch über Wechselwirkungen mit anderen Proteinkinasen und PP die kardiale elektromechanische Kopplung (Molkentin 2000; Weber et al. 2015).

1.6 Pathophysiologische Grundlagen des Ca^{2+} -Stoffwechsels in der Herzinsuffizienz

Störungen der Ca^{2+} -Homöostase und konsekutiv veränderte Prozesse der elektromechanischen Kopplung stellen in der humanen Kardiomyozyte eine wichtige Ursache für die Entwicklung der Herzinsuffizienz dar. Dabei ist die Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene durch eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung charakterisiert, welche sowohl auf eine frequenzabhängige Reduktion der Amplitude der systolischen Ca^{2+} -Transienten als auch auf eine Verminderung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes zurückzuführen ist (Gwathmey et al. 1987; Mulieri et al. 1992; Pieske et al. 1995; Pieske et al. 1999). Gleichzeitig sind eine erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration und eine verminderte Eliminationsgeschwindigkeit des zytosolischen Ca^{2+} in der Diastole in der Herzinsuffizienz beobachtet worden (Beuckelmann et al. 1992; Fischer et al. 2013; Pieske et al. 1999). Diese Parameter manifestieren sich klinisch in einer geringeren systolischen Kraftentwicklung, einer erhöhten diastolischen Spannung und einer verlängerten Relaxationszeit des Myokards (Harding et al. 1992). Gleichzeitig trägt auch die erhöhte Frequenz spontaner Ca^{2+} -Entladungen aus dem SR, der sog. *Ca^{2+} -Sparks*, zur Dysregulation der kardialen Ca^{2+} -Homöostase bei. Diese *Ca^{2+} -Sparks* generieren ein diastolisches SR- Ca^{2+} -Leck, welches auf mangelnde Stabilität der RyR2 zurückzuführen ist und ursächlich mit der Auslösung von Arrhythmien und der diastolischen Dysfunktion in Verbindung gebracht wird (Bers et al. 2003). Die erhöhte diastolische Ca^{2+} -Freisetzung sorgt zudem über den in der Herzinsuffizienz vermehrt exprimierten NCX durch den Austausch eines Ca^{2+} -Ions gegen drei Na^{+} -Ionen für einen Netto-Einwärtsstrom positiver Ladungen, welcher in der Folge späte Nachdepolarisationen verursachen kann (Reinecke et al. 1996; Schillinger et al. 2000; Studer et al. 1994). Außerdem ist in der Herzinsuffizienz der späte Na^{+} -Strom ($I_{\text{Na,late}}$) erhöht, welcher durch eine Na^{+} -Überladung der Zelle Nachdepolarisationen des Membranpotenzials auslösen kann und somit zur Entstehung kardialer Arrhythmien beiträgt (Glynn et al. 2015; Sossalla et al. 2008; Valdivia et al. 2005). Über eine Aktivierung der CaMKII führt der späte Na^{+} -Strom schließlich zur Aufrechterhaltung eines Teufelskreislaufs aus Arrhythmien und Pumpschwäche.

Ursächlich für die funktionellen Veränderungen der kardialen Ca^{2+} -Homöostase im Rahmen der Herzinsuffizienz ist neben der veränderten Expression spezifischer kardialer Proteine, wie der SERCA2a, auch der veränderte Phosphorylierungsstatus der Zielproteine L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, RyR2, PLB sowie der kardialen Myofilamente. Dabei steht der Phosphorylierungsstatus dieser Zielproteine auch in Zusammenhang mit der Expression und Aktivität der beteiligten Proteinkinasen und PP.

In den vergangenen Jahren wurde der Beitrag der PKA an der RyR2-Hyperphosphorylierung im Rahmen der Entwicklung der Herzinsuffizienz sowie der Entstehung von Arrhythmien kontrovers diskutiert (Houser 2014; Lehnart und Marks 2007; Li et al. 2002; Reiken et al. 2003). Lehnart et al. postulierten im Jahre 2007 anhand eines Tiermodells mit RyR2-S2808A

Knock-In-Mäusen (= entspricht der Inaktivierung der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle der RyR2), dass ein Fehlen der chronischen PKA-vermittelten Hyperphosphorylierung der RyR2 vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz schützt (Lehnart und Marks 2007). Zuvor wurde auch die Sensitivitätsänderung der RyR2 durch Abdissoziation von Calstabin 2 (FK506-Bindeprotein 12.6 = FKBP12.6) nach Hyperphosphorylierung der RyR2 durch die PKA als möglicher Pathomechanismus herausgearbeitet, welcher zur Progression der Herzinsuffizienz beitragen kann (Marx et al. 2000). Diesem Standpunkt widersprachen Mac Donnell et al. sowie Houser, indem sie aufzeigten, dass die RyR2-abhängige Dysregulation des kardialen Ca^{2+} -Stoffwechsels eher CaMKII-vermittelt und nicht auf Änderungen der PKA-abhängigen Phosphorylierung der RyR2 an Position Serin 2808 zurückzuführen ist (Houser 2014; Mac Donnell et al. 2008).

Durch weitere Studien konnte in den folgenden Jahren zunächst am Tiermodell (Zhang et al. 2012) und später auch in Experimenten mit humanem Myokard (Fischer et al. 2013) aufgezeigt werden, dass eine Hyperphosphorylierung der RyR2 durch die PKA zumindest im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz keine wesentliche Rolle mehr spielt. So fand sich in der terminalen Herzinsuffizienz keine Hyperphosphorylierung an der PKA-Phosphorylierungsstelle Serin 2808 (im Tiermodell) bzw. Serin 2809 (in humanem Myokard) (Fischer et al. 2013; Zhang et al. 2012). Stattdessen konnte gezeigt werden, dass eine Hyperphosphorylierung der RyR2 an Position Serin 2815 (CaMKII-Phosphorylierungsstelle) mit den beschriebenen Folgen der Dysregulation der Ca^{2+} -Homöostase in der terminalen Herzinsuffizienz einhergeht (Fischer et al. 2013). Die CaMKII wird dabei im Stadium der Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert und liegt zudem ebenfalls vermehrt in ihrer autophosphorylierten, aktivierten Form vor (Ai et al. 2005; Fischer et al. 2013; Hoch et al. 1999; Kirchhefer et al. 1999; Sossalla et al. 2010). Durch die folglich vermehrte Assoziation der CaMKII mit den RyR2 kommt es in der Herzinsuffizienz zu der beschriebenen Hyperphosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle an Position Serin 2815 (Fischer et al. 2013; Maier und Bers 2007; Sossalla et al. 2010). Hieraus resultiert eine Frequenzerhöhung spontaner diastolischer Ca^{2+} -Entladungen (*Ca²⁺-Sparks*) (Ai et al. 2005; Kohlhaas et al. 2006; Maier et al. 2003; Shannon et al. 2003; Sossalla et al. 2010; Witcher et al. 1991). Interessanterweise findet sich in der menschlichen Herzinsuffizienz sowie auch in CaMKII-transgenen Tiermodellen, trotz einer erhöhten Expression und Aktivität der CaMKII (Ai et al. 2005; Fischer et al. 2013; Maier und Bers 2007) und der daraus resultierenden Steigerung der SERCA2a-Aktivität über die Phosphorylierung von PLB an Position Threonin 17, insgesamt eine Abnahme des SR- Ca^{2+} -Gehaltes, welche sich durch eine verringerte SERCA2a-Expression, eine Steigerung der NCX-Aktivität sowie ein erhöhtes diastolisches SR- Ca^{2+} -Leck erklären lässt (Hasenfuss 1998; Maier et al. 2003; Mercadier et al. 1990). Es resultierten folglich, wie zuvor beschrieben, eine Depletion der Ca^{2+} -Speicher mit konsekutiver systolischer und diastolischer Dysfunktion sowie eine Steigerung der Arrhythmieneigung (Maier und Bers 2007).

Eine weitere Komponente, welche die Entstehung der Pumpschwäche begünstigt, ist die in der Herzinsuffizienz vorliegende Hypophosphorylierung von Troponin I sowie Myosin-bindendes-Protein-C (cMBP-C) (Heijman et al. 2013), welche unter anderem durch lokal vermehrte PP1- sowie PP2A-Aktivität an den jeweiligen PKA-Phosphorylierungsstellen erklärt werden kann und eine Einschränkung der Sarkomer-Funktion bedingt (Hamdani et al. 2013; Marston und de Tombe 2008; McConnell et al. 1998). Die fehlende Phosphorylierung der PKA-Phosphorylierungsstellen am cMBP-C bewirkt zudem eine Inhibition der Aktin-Myosin-Interaktion, sodass insgesamt eine Verschlechterung der kardialen Kontraktion sowie der Relaxation eintritt (Coulton und Stelzer 2012; Heijman et al. 2013).

Neben den pathophysiologischen Veränderungen auf der Ebene der Proteinkinasen scheinen somit auch die Aktivitäten der einzelnen kardialen PP in der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle zu spielen. Hierbei scheinen die Expression der PP1 sowie ihre Gesamtaktivität im Vergleich zu gesundem Myokard erhöht (Eiringhaus et al. 2015; Neumann 2002; Nicolaou und Kranias 2009), die PP2A-Expression jedoch erniedrigt zu sein (Eiringhaus et al. 2015; Wijnker et al. 2011), wobei unterschiedliche Expressionslevel in verschiedenen Studien detektiert wurden (Heijman et al. 2013). Insgesamt wird somit angenommen, dass in der Herzinsuffizienz eine erhöhte Proteinkinase-Aktivität sowie eine Dysregulation der verschiedenen PP-Aktivitäten vorliegen. Diese haben je nach subzellulärem Kompartiment unterschiedliche Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus der angesprochenen Zielproteine.

In den vergangenen Jahren konnte ein erster Einblick in die funktionellen Mechanismen der Dysregulation der kardialen PP im Rahmen menschlicher Herzerkrankungen gewonnen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Dysregulation der PP1-Spinophilin-Interaktion im Rahmen der pathophysiologischen Mechanismen des Vorhofflimmerns eine Rolle zu spielen scheint (Chiang et al. 2014). Bei Spinophilin handelt es sich um eine regulatorische Untereinheit des PP1-Makrokomplexes, welche die PP1-Assoziation mit den RyR2 fördert. So resultierte der *Knock-Out* (= Ausschaltung des Gens eines Proteins) von Spinophilin-1 in einer stark verminderten Interaktion der PP1 mit den RyR2. Dies führte zu einer deutlich erhöhten Phosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-Position Serin 2814, nicht aber an der PKA-Position Serin 2808 (Chiang et al. 2014). Funktionell resultierte daraus eine signifikante Erhöhung der Ca^{2+} -*Spark*-Frequenz, welche durch eine CaMKII-Inhibition reversibel war (Chiang et al. 2014). Zudem zeigten die untersuchten Versuchstiere eine starke Neigung hinsichtlich der Entwicklung eines Vorhofflimmerns (Chiang et al. 2014).

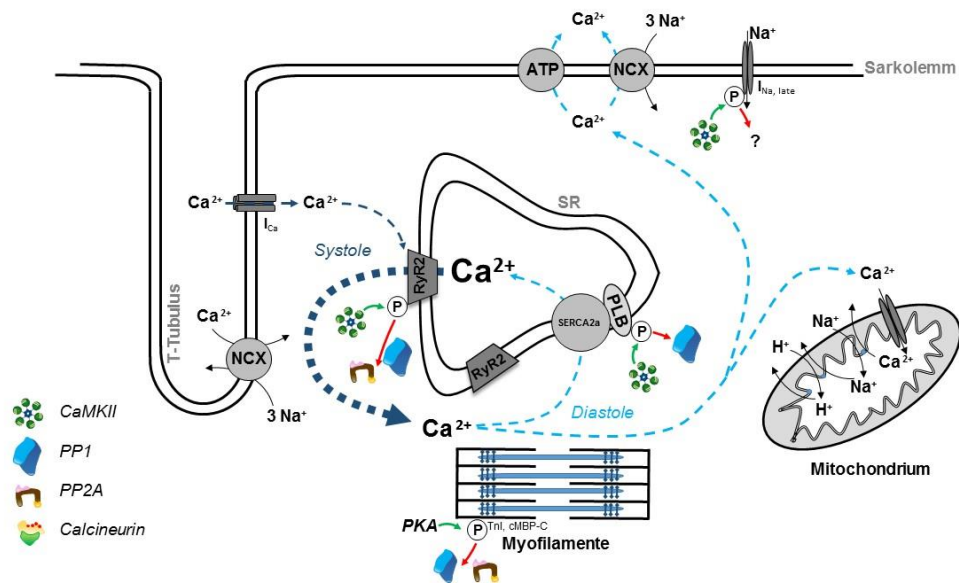
Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in der menschlichen Herzinsuffizienz eine Verminderung der Expression des endogenen PP1-Inhibitors Inhibitor-1 (I1) vorliegt (El-Armouche et al. 2004; El-Armouche et al. 2003), welche die zuvor beschriebene Aktivitätssteigerung der PP1 bedingt (Neumann et al. 1997; Schwoerer et al. 2008). Diese Feststellung konnte auch in einem experimentellen Hunde-Modell bestätigt werden (Gupta et al. 2003). Da I1 physiologischerweise als Verstärker der β -adrenergen Stimulation fungiert, indem er

in einem durch die PKA phosphorylierten Zustand die PP1 inhibiert, bewirkt die Hinabregulation von I1 in der Herzinsuffizienz folglich ein vermindertes Ansprechen auf β -adrenerge Stimulation (El-Armouche et al. 2008; El-Armouche et al. 2007). In einer Studie konnten El-Armouche et al. am Tiermodell aufzeigen, dass die Verminderung der Expression von I1 und die daraus resultierende Desensibilisierung der β -adrenergen Signalkaskade selbst Folgen der erhöhten β -adrenergen Stimulation darstellen (El-Armouche et al. 2007). Während eine starke Überexpression des I1 im Tiermodell zu einer kardialen Hypertrophie sowie einer kontraktiven Dysfunktion führte (El-Armouche et al. 2008), resultierte eine moderatere Überexpression des I1 in einer weiteren Studie in einer Kontraktilitätssteigerung (Wittköpper et al. 2010). Eine Erhöhung der I1-Expression oder Steigerung der I1-Aktivität könnte somit das Ansprechen auf Katecholamine verbessern und einen positiv inotropen Effekt in der Herzinsuffizienz erzielen. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass eine Überexpression von I1 von einer erhöhten Bereitschaft zur Entwicklung einer Katecholamin-induzierten kardialen Dysfunktion begleitet ist (Wittköpper et al. 2010). Molekular waren diese Änderungen unter anderem auf eine vermehrte Phosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-Position Serin 2815 sowie an PLB an Position Serin 16 zurückzuführen. Hierbei zeigte sich funktionell ein erhöhtes SR- Ca^{2+} -Leck bei unverändertem SR- Ca^{2+} -Gehalt (Wittköpper et al. 2010). Auf der anderen Seite konnten El-Armouche et al. jedoch zeigen, dass ein *Knock-Out* von I1 vor dem Auftreten letaler Katecholamin-induzierter Arrhythmien schützt, ohne sich dabei negativ auf die maximale Kontraktilität, die Herzstruktur oder die Lebenserwartung der in dem Tiermodell verwendeten Versuchstiere auszuwirken (El-Armouche et al. 2008). Auf molekularer Ebene resultierte das Fehlen von Inhibitor-1 dabei in einer verminderten Phosphorylierung der RyR2 an Position Serin 2815 sowie des Phospholambans an Position Serin 16 (El-Armouche et al. 2008). Somit erscheint ebenfalls die Verminderung der I1-Expression oder der I1-Aktivität positive Auswirkungen in der Herzinsuffizienz zu haben und als möglicher Mechanismus für zukünftige therapeutische Ansätze in Frage zu kommen. Eine weitere zeitlich vorausgehende Studie offenbarte hingegen keine negativen Auswirkungen auf die kardiale Funktion nach Überexpression von I1 und stellte die Überexpression von I1 als möglichen pharmakologischen Ansatzpunkt zur Therapie der Herzinsuffizienz dar (Pathak et al. 2005).

Entgegen der gut verstandenen Rolle der Proteinkinasen ist somit bislang nur wenig über den Beitrag der Phosphatasen an der Transition von der humanen kardialen Hypertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz bekannt (Weber et al. 2015). Diese Arbeit knüpft hier an und soll dabei helfen, die genauen Mechanismen der Regulation des kardialen Ca^{2+} -Stoffwechsels mittels Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung auf funktioneller Ebene weiter zu verstehen.

Eine zusammenfassende, schematisch vereinfachte Veranschaulichung der Regulation der elektromechanischen Kopplung durch Proteinkinasen und PP in gesundem Myokard sowie der bisher bekannten Regulationsmechanismen in der Herzinsuffizienz findet sich in Abbildung 5.

A Elektromechanische Kopplung in gesundem Myokard



B Elektromechanische Kopplung in der Herzinsuffizienz

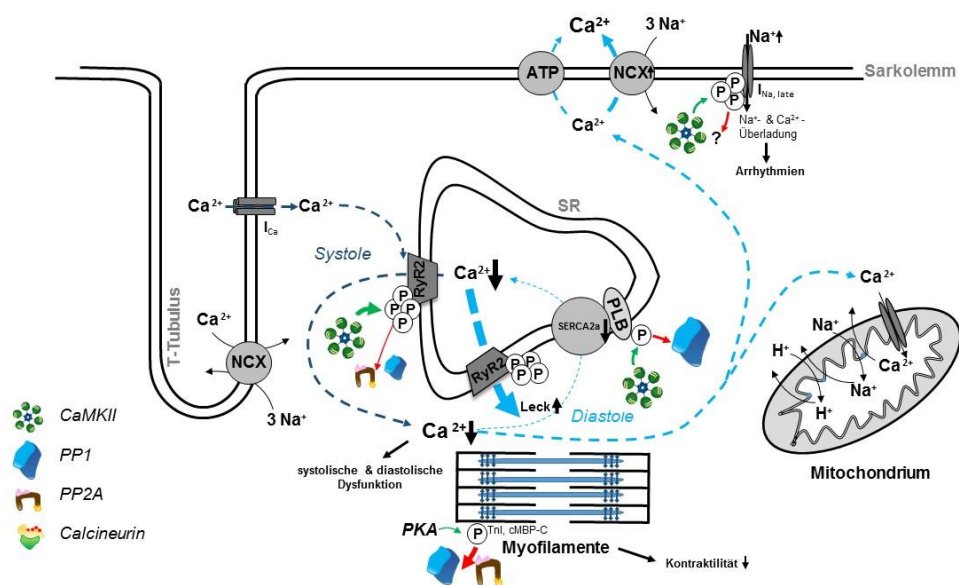


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Regulation der elektromechanischen Kopplung durch Proteinkinasen und PP in A: gesundem Myokard und B: der Herzinsuffizienz (in Anlehnung an Donald M. Bers 2002)

1.7 Pathophysiologische Grundlagen der Arrhythmieentstehung

Die physiologische Herzaktion ist durch eine rhythmisierte Abfolge von Kontraktion und Relaxation gekennzeichnet. Als Herzrhythmusstörungen werden Störungen der normalen rhythmischen Herzschlagabfolge sowie Abweichungen von der normalen Herzfrequenz (60-100 Schläge/min) bezeichnet. Eine Klassifizierung der Herzrhythmusstörungen kann anhand ihres Entstehungsortes, der Herzfrequenz, der Gefährlichkeit und der zugrundeliegenden Ätiologie erfolgen.

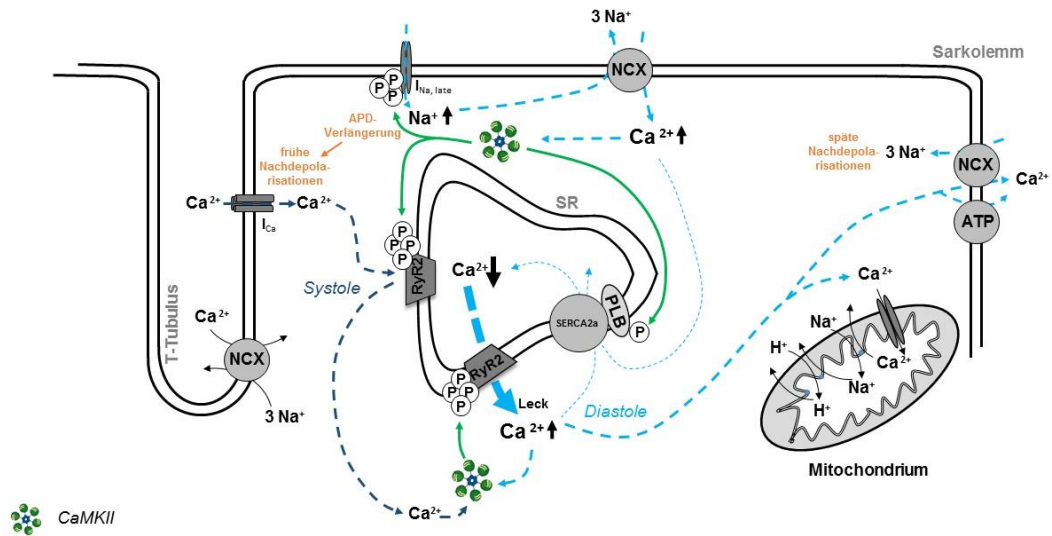
Ursachen der Entstehung von Herzrhythmusstörungen können Störungen der Erregungsbildung sowie Störungen der Erregungsleitung sein.

Ein wichtiger Mechanismus der Erregungsbildungsstörungen ist die sog. getriggerte Aktivität. Hierbei handelt es sich um Schrittmacheraktivität, welche während eines Aktionspotenzials bzw. im Anschluss an ein vorhergehendes Aktionspotenzial durch spontane depolarisierende Oszillationen des Membranpotenzials entsteht (Zipes 2003). Die somit entstehenden Nachdepolarisationen des Membranpotenzials werden in eine frühe (*early afterdepolarization* = frühe Nachdepolarisationen, EAD) sowie eine späte Form (*delayed afterdepolarization* = späte Nachdepolarisationen, DAD) unterteilt. Unter EADs werden depolarisierende Oszillationen des Membranpotenzials während der Repolarisationsphase des Aktionspotenzials verstanden, welche die Repolarisation unterbrechen und bei Überschreitung des Schwellenpotenzials Aktionspotenziale und somit eine ektope kardiale Aktivität auslösen können (Zipes 2003). Als DADs werden hingegen depolarisierende Oszillationen des Membranpotenzials verstanden, welche im Anschluss an eine vollständige Repolarisation auftreten und ebenfalls bei Überschreitung des Schwellenpotenzials Aktionspotenziale auslösen können (Zipes 2003).

Pathophysiologisch spielt bei der Entstehung von EADs und DADs der späte Natriumstrom eine wichtige Rolle (Maltsev und Undrovinas 2008; Sossalla und Maier 2012). Dieser trägt durch seinen während des gesamten Aktionspotenzials persistierenden depolarisierenden Na^+ -Einwärtsstrom zur Verlängerung der Aktionspotenzialdauer (APD) bei, welche als mit ursächlich für die Entstehung von EADs angesehen wird (Maltsev et al. 2007; Shryock et al. 2013; Song et al. 2008). Zudem gelangen aufgrund der Verlängerung der Aktionspotenzialdauer inaktivierte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle vorzeitig in einen aktivierbaren Zustand (January und Riddle 1989; Marban et al. 1986). Dies ermöglicht einen Ca^{2+} -Einstrom nach intrazellulär, welcher zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR führt. Es resultiert eine Ca^{2+} -Überladung der Kardiomyozyte, welche über die Stimulation des Vorwärtsmodus des NCX zu einem Netto-Einwärtsstrom positiver Ladungen und somit zur Depolarisation des Membranpotenzials und bei Überschreitung des Schwellenpotenzials zur Auslösung eines EADs führen kann. Zudem führt der späte Natriumstrom unter bestimmten Bedingungen zu einer intrazellulären Na^+ -Überladung der Kardiomyozyte. Sowohl die Verlängerung der Aktionspotenzialdauer als auch die intrazelluläre Na^+ -Überladung führen in der Folge durch Stimulation des Rückwärtsmodus des NCX zu einer Ca^{2+} -Überladung der Kardiomyozyte (Bers

2001). Diese bewirkt über eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der CaMKII eine Steigerung des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks. Die erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration kann schließlich durch Stimulation des Vorwärtsmodus des NCX zu einem Netto-Einwärtsstrom positiver Ladungen (transienter Einwärtsstrom; T_i) führen und somit zur Depolarisation des Membranpotenzials, welche bei Überschreitung des Schwellenpotenzials DADs auslösen kann (Rosen 1983; Song et al. 2008; Voigt et al. 2012). Diese pathophysiologischen Mechanismen der Arrhythmieentstehung sind in Abbildung 6 schematisch veranschaulicht.

A



B

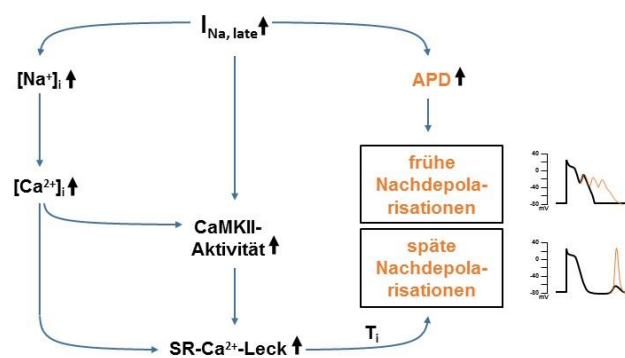


Abbildung 6: Schematische Darstellung A: der Dysregulation der elektromechanischen Kopplung im Rahmen der Arrhythmieentstehung. B: des Einflusses des späten Na^+ -Stroms ($I_{\text{Na,late}}$) auf die Aktionspotenzialdauer (APD), die CaMKII-Aktivität, das diastolische SR- Ca^{2+} -Leck sowie die durch diese Parameter induzierte Entstehung früher und später Nachdepolarisationen. (in Anlehnung an Mason und Sossalla 2017)

Da kardiale Arrhythmien oftmals auf dem Boden struktureller Herzerkrankungen wie der Herzinsuffizienz entstehen und eine wichtige Ursache des plötzlichen Herztodes darstellen, kommt der Erforschung der Entstehungsmechanismen arrhythmischer Ereignisse und der Optimierung der Arrhythmieerapie eine große Bedeutung in der Kardiologie zu (Mason

und Sossalla 2017). Da zudem ausschließlich das sehr nebenwirkungsreiche Klasse-III-Antiarrhythmikum Amiodaron für die Therapie kardialer Arrhythmien bei struktureller Herzerkrankung mit reduzierter Ejektionsfraktion zur Verfügung steht, ist die Identifikation geeigneter Zielstrukturen und Mechanismen für die Entwicklung von weiteren spezifischen und nebenwirkungsarmen Behandlungsansätzen essentiell.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich diesbezüglich mit den Auswirkungen der Regulation der Aktivität spezifischer kardialer Phosphatasen auf die Induktion fluoreszenzmikroskopisch detektierbarer zellulärer arrhythmischer Ereignisse durch das diastolische SR-Ca²⁺-Leck und untersucht, inwiefern eine Modulation der kardialen Phosphatase-Aktivität als therapeutische Option geeignet ist.

1.8 Pharmakologische Ansatzpunkte zur Modulation der Protein-Phosphatase 1 (PP1)-Aktivität

Wie zuvor aufgezeigt, konnten in den vergangenen Jahren die allgemeinen Funktionen und molekularen Mechanismen der verschiedenen kardialen PP zunehmend verstanden werden (Heijman et al. 2013; Weber et al. 2015). Diese Arbeit konzentriert sich vor allem auf die Modulation der PP1-Aktivität, da diese mutmaßlich eine bedeutende Rolle bei der Regulation des kardialen Ca²⁺-Stoffwechsels spielt. Diese PP interagiert, wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben, über die mehr als 200 verschiedenen *Phosphatase-Interacting-Proteins* mit den entsprechenden Substraten (Chatterjee et al. 2012; Cohen 2002; Weber et al. 2015). Durch die variable Enzym-Substrat-Spezifität der PP1 stellt die Findung möglicher Mechanismen zur gezielten Modulation ihrer Aktivität eine besondere Herausforderung dar (Chatterjee et al. 2012; Cohen 2002; De Munter et al. 2013; Weber et al. 2015). Während die Inhibition kardialer Proteinkinasen bereits einen etablierten pharmakologischen Mechanismus darstellt, welcher in der Forschung im Rahmen grundlagenwissenschaftlicher funktioneller Studien eine Anwendung findet, existierte bis zum Jahr 2012 noch keine Möglichkeit einen entsprechenden Gegenspieler, namentlich die PP1, direkt und spezifisch in lebenden Zellen zu aktivieren. Dies gelang erstmalig im Jahr 2012 der Forschungsgruppe um Frau Dr. Köhn vom EMBL Heidelberg (Chatterjee et al. 2012; Chatterjee und Koehn 2013).

Im Folgenden werden die verschiedenen Ansatzpunkte zur pharmakologischen Inhibition sowie der Aktivierung der im Zentrum dieser Arbeit stehenden PP vorgestellt und die angewendeten Methoden tiefergehend betrachtet.

1.8.1 Pharmakologische Ansatzpunkte zur Inhibition der Protein-Phosphatase 1 (PP1)

Der am weitesten verbreitete Mechanismus zur Inhibition der PP1 ist die direkte Inhibition der katalytischen Untereinheit über eine direkte Blockierung des aktiven Zentrums des En-

zyms (Chatterjee und Koehn 2013). Durch die hohe strukturelle Verwandtschaft der katalytischen Untereinheit der PP1 mit derjenigen der PP2A, ist jedoch die Synthese spezifischer Inhibitoren äußerst anspruchsvoll und weiterhin Forschungsgegenstand in der organischen Chemie (Chatterjee und Koehn 2013; Cho und Xu 2007). Daher werden zur direkten Inhibition der katalytischen Untereinheit aktuell hauptsächlich natürlich vorkommende, Phosphatase-unspezifische Toxine verwendet (Chatterjee und Koehn 2013; Swingle et al. 2007). Hierzu zählen neben dem in dieser Arbeit verwendeten *Okadaic Acid* (= Okadasäure) auch Calyculin A, Tautomycin, Microcystin-LR, Cantharidin und Nodularin (Chatterjee und Koehn 2013; Swingle et al. 2007). Da folglich neben der direkten Inhibition der PP1 auch weitere PP in ihrer Aktivität von den genannten Toxinen beeinflusst werden, führt beispielsweise eine Applikation von *Okadaic Acid* auch zu einer Inhibition der PP2A, PP4, PP5 sowie PP6 (Swingle et al. 2007). Zusätzlich lösen die Substanzen aufgrund der verschiedenen funktionellen Rollen der Phosphatasen in unterschiedlichen Stoffwechselprozessen auch pleiotrope Effekte aus (Chatterjee und Koehn 2013).

Darüber hinaus existieren mit den endogenen regulatorischen Proteinen I1 sowie I2 auch natürliche selektive Inhibitoren der katalytischen Untereinheit der PP1. Der tatsächliche Einsatz dieser Inhibitoren in funktionellen Messungen oder im Rahmen von Pharmakotherapien ist allerdings aufgrund ihrer Größe, der geringen Verfügbarkeit, der niedriger Stabilität sowie der geringen zellulären Permeabilität der Proteine stark begrenzt (Chatterjee und Koehn 2013).

Neben der direkten Inhibition der katalytischen Untereinheit ist eine Inhibition der PP1 auch auf indirektem Weg möglich. Diese kann durch die Blockierung der Bindungsstelle der aktivierenden regulatorischen Untereinheiten an der PP1 sowie durch die direkte Bindung eines Peptids oder *small molecule* (= Stoff mit niedriger Molekülmasse) an die regulatorischen Untereinheiten erfolgen (Chatterjee und Koehn 2013). Eine schematische Darstellung dieser Prozesse findet sich in Abbildung 7.

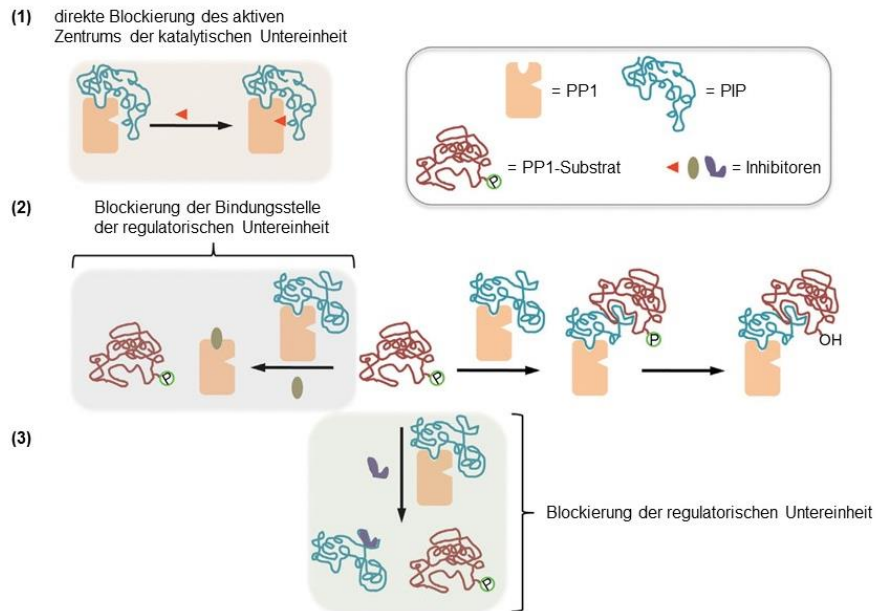


Abbildung 7: Pharmakologische Ansatzpunkte zur Inhibition der Protein-Phosphatase 1 (PP1). (1) Direkte Blockierung des aktiven Zentrums der katalytischen Untereinheit der PP1. (2) Indirekte Inhibition der PP1 über Blockierung der Bindungsstelle der aktivierenden regulatorischen Untereinheiten an der PP1. (3) Indirekte Inhibition der PP1 über die Blockierung der regulatorischen Untereinheit. (modifiziert nach Chatterjee und Koehn 2013 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

1.8.2 Pharmakologische Ansatzpunkte zur Aktivierung der Protein-Phosphatase 1 (PP1)

Die Möglichkeit zur pharmakologischen Aktivierung der PP1 ist erst seit wenigen Jahren gegeben und stellt einen wissenschaftlichen Durchbruch in der Peptidchemie dar (Chatterjee et al. 2012). Über 90 % der zuvor beschriebenen PIPs enthalten ein als sogenanntes RVxF-Motiv (einbuchstabiger Aminosäuren-Code, x= jede beliebige Aminosäure) bezeichnetes Bindungsmotiv für die PP1 (Chatterjee und Koehn 2013). Durch eine selektive Blockierung der RVxF-Motiv-Bindestelle an der PP1 über ein RVxF-Motiv tragendes Peptid oder *small molecule*, also einen RVxF-Mimetikum, kann die Bildung von Holoenzymen, bestehend aus der PP1 sowie den inhibierenden PIPs verhindert werden (Chatterjee et al. 2012; Chatterjee und Koehn 2013; Tappan und Chamberlin 2008). Dieser Vorgang resultiert in einer verstärkten enzymatischen Aktivität der PP1 *in vitro* (Tappan und Chamberlin 2008) und ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt. Im Jahr 2012 konnte die Forschungsgruppe um Frau Dr. M. Köhn erstmals ein proteolytisch stabiles und zellpermeables RVxF-Motiv-tragendes Peptid synthetisieren, welches auch die PP1-Aktivität in lebenden Zellen erhöhte (Chatterjee et al. 2012). Dieses Peptid, das sogenannte *PP1-Disrupting Peptide 3* (= PP1-aktivierendes Peptid 3, PDP3) wurde auch im Rahmen dieser Arbeit zur Aktivierung der PP1-Aktivität verwendet.

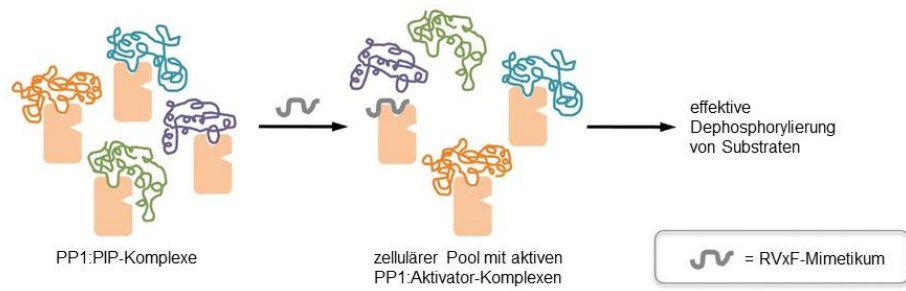


Abbildung 8: Pharmakologische Ansatzpunkte zur Aktivierung der Protein-Phosphatase 1 (PP1). Das RVxF-Mimetikum (= Aktivator) bricht einen Teil der PP1:PIP-Komplexe auf und generiert einen zellulären Pool mit PP1:Aktivator-Komplexen, welche effektiv Substrate der PP1 dephosphorylieren. Die Dephosphorylierung der PP1 an Position Thr320ph resultiert hierbei in einer weiteren Autoaktivierung der PP1 (Chatterjee et al. 2012). (modifiziert nach Chatterjee und Koehn 2013 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

1.9 Zielsetzungen und Fragestellungen der Dissertation

Diese Arbeit untersucht die Rolle der kardialen Protein-Phosphatasen PP1 und PP2A im Rahmen der Dysregulation des Ca^{2+} -Stoffwechsels in der menschlichen Herzerkrankung und soll aufzeigen, inwiefern eine pharmakologische Modulation der kardialen Phosphatase-Aktivität als Ansatzpunkt für die Entwicklung spezifischer antiarrhythmischer Therapien in Frage kommt.

Ziele der Arbeit sind:

- 1) die Evaluation der Auswirkungen einer Inhibition der PP1 und PP2A auf das diastolische SR- Ca^{2+} -Leck und die damit verbundene zelluläre Arrhythmieneigung sowohl in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion als auch der terminalen Herzinsuffizienz.
- 2) die Evaluation der Auswirkungen einer Inhibition der PP1 und PP2A auf die SR- Ca^{2+} -Freisetzungskinetik und den SR- Ca^{2+} -Gehalt sowohl in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion als auch der terminalen Herzinsuffizienz.
- 3) die Evaluation der Auswirkungen einer selektiven Aktivierung der PP1 auf das diastolische SR- Ca^{2+} -Leck und die damit verbundene zelluläre Arrhythmieneigung in der terminalen Herzinsuffizienz.
- 4) die Evaluation der Auswirkungen einer selektiven Aktivierung der PP1 auf die SR- Ca^{2+} -Freisetzungskinetik und den SR- Ca^{2+} -Gehalt in der terminalen Herzinsuffizienz.

2 Material und Methoden

2.1 Probengewinnung von humanem Ventrikelmyokard

Die Beschaffung von frischen humanen Ventrikelmyokardproben von herzinsuffizienten Patienten wurde durch eine Kooperation zwischen Herrn Prof. Dr. med. S. T. Sossalla und Herrn PD Dr. med. T. H. Fischer aus dem Labor für zelluläre Elektrophysiologie am Herz-zentrum der Universitätsmedizin Göttingen sowie Herrn Prof. Dr. med. J. Gummert aus der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie am Herz- und Diabeteszentrum Nordrheinwestfalen in Bad Oeynhausen ermöglicht. Das Patientenkollektiv beschränkte sich auf Patienten, die an einer dilatativen oder einer ischämischen Kardiomyopathie litten und im Rahmen einer notwendigen allogenen Herztransplantation ein Spenderherz transplantiert bekamen. Die entnommenen Myokardproben stammten folglich von terminal insuffizienten Herzen (NYHA IV) mit einer EF von $<30\%$. Die explantierten, konservierten Herzen bzw. Teilproben wurden unter Kühlung in Custodiol® (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, CH.-B. 0933411) unverzüglich nach Göttingen transportiert und dort zur Isolation linksventrikulärer Kardiomyozyten für anschließende mikroskopische Experimente verwendet. Eine kleine Gewebeprobe jedes Herzens wurde für noch ausstehende molekularbiologische Methoden wie Western Blots in Bad Oeynhausen direkt nach der Organentnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C eingelagert.

Eine Kooperation mit der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen ermöglichte die Beschaffung von linksventrikulären Myokardproben von Patienten mit kardialer Hypertrophie und erhaltener linksventrikulärer EF ($>50\%$). Dieses Gewebe wurde Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose während sog. Aortenklappenersatz-Operationen aus dem Ventrikelseptum entnommen, falls das dortige Gewebe den Ausflusstrakt einengte und den Einbau der neuen Klappe erschwerte. Das Gewebe wurde direkt nach Entnahme unter Kühlung in Custodiol® gelagert. Im Anschluss an die Entnahme von Gefrierproben, nach dem zuvor beschriebenen Verfahren, wurde auch dieses Gewebe zur Isolation linksventrikulärer Kardiomyozyten für mikroskopische Experimente verwendet.

Ein Einverständnis der Patienten sowie ein positives Votum der Ethikkommission lagen stets vor.

2.2 Isolation humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten

2.2.1 Lösungen und Substanzen

Tabelle 1: Isolationslösungen

Lösung	Substanzen	Hersteller	Lot	Masse bzw. Volumen
Verdaulösung 1	Joklik-MEM	Applichem®	1539-1/16	20 ml
	Kollagenase Typ 2	Worthington Biochem®	41C12591	15-25 mg
	Trypsin 2,5 %	Gibco®	1533234	0,7-1,2 ml
Verdaulösung 2	Joklik-MEM	Applichem®	1539-1/16	40 ml
	Kollagenase Typ 2	Worthington Biochem®	41C12591	35-45 mg
Stopplösung	Joklik-MEM	Applichem®	1539-1/16	9 ml
	Bovines Kalbsserum	HyClone®	AYG168765	1 ml

2.2.2 Isolationsprotokoll

Die Isolation humaner ventrikulärer Kardiomyozyten erfolgte nach dem etablierten Isolationsprotokoll unserer Arbeitsgruppe (vgl. Fluschnik 2011). Für die Isolation einzelner Kardiomyozyten aus dem insuffizienten Probenherz wurde ein etwa 4x4x2 cm großes Gewebestück aus dem linken Ventrikel mittels Skalpell herauspräpariert. Anschließend wurde dieses Stück in eine saubere Präparierschale in frisches, gekühltes Joklik-MEM (Joklik-MEM modifiziert für Spinner-Kulturen, Applichem®, Lot.-Nr. 1539-1/16) überführt. Die Präparierschale wurde dabei durch einen unterliegenden Kühlakku gekühlt. Danach wurde das Gewebestück mit Hilfe von zwei Kanülen fixiert und zunächst mittels einer Präparierschere das Myokard vom Epikard getrennt sowie überschüssige Fett- und Bindegewebsreste entfernt. Im Anschluss wurde das Myokardstück mit einer sehr feinen Präparierschere in 1x1 mm große Gewebestücke zerschnitten und diese mit einer weitlumigen Pipette in ein 50 ml Falcon überführt. Bei den Probenstücken, die bei Aortenklappenersatz-Operationen anfielen, wurde gleichermaßen verfahren. Im nächsten Schritt wurde der Überstand aus dem Falcon mit den Gewebestücken mittels einer Pipette abgenommen und es erfolgte eine dreimalige Waschung mit 20 ml Joklik-MEM-Lösung. Je nach Gewebebeschaffenheit wurden 0,7-1,2 ml Trypsin und 15-25 mg Kollagenase Typ 2 mit 250 U/mg in 20 ml Joklik-MEM gelöst. Diese Lösung wird im Folgenden als Verdaulösung 1 bezeichnet. Die Gewebestücke in dem 50 ml Falcon wurden nun mit 20 ml der Verdaulösung 1 resuspendiert und anschließend die gesamte Lösung mit einer Pipette vorsichtig in eine auf 37,8 °C vorgeheizte Isolationsflasche überführt, um unter konstantem Rühren für 45 Min. verdaut zu werden. Während dieser Verdauzeit erfolgte das Ansetzen der zweiten Verdaulösung, welche im Folgenden als Verdaulösung 2 bezeichnet wird. Diese wurde ebenfalls abhängig von der Gewebebeschaffenheit in ihrer Konzentration (35-45 mg Kollagenase Typ 2 auf 40 ml Joklik-MEM) variiert. Im Anschluss an diese erste 45-minütige Verdauphase wurde der Inhalt der Isolationsflasche vorsichtig in ein 50 ml Falcon überführt und, nach Absinken aller größeren Gewebekomponenten und Ausbildung eines Pellets, der Überstand mittels einer 25 ml Pipette abgenommen

und verworfen. Das Pellet wurde nun mit 10 ml der Verdauungslösung 2 resuspendiert und wieder in die Isolationsflasche überführt, wo ein weiterer Verdau unter konstantem Rühren stattfand. Nach 10 Min. wurde die Lösung abermals in den 50 ml Falcon überführt. Nach Ausbildung eines Pellets wurde der Überstand mit einer 25 ml Pipette abgenommen und in ein 15 ml Falcon überführt. Anschließend wurde dieses Falcon für 5 Min. bei 700 Umdrehungen/Min. (Rotofix 32, Hettich Zentrifugen) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet mit 1-5 ml Stopplösung, bestehend aus 9 ml Joklik-MEM sowie 1 ml Bovines Kalbserum (HyClone®, Lot. Nr. AYG168765), resuspendiert. Die beschriebenen Verdauschritte wurden mit der Verdauungslösung 2 vier- bis sechsmal fortgesetzt. Dazu wurden erneut 10 ml Verdauungslösung 2 zu dem in der vorherigen Verdauphase entstandenen Pellet hinzugefügt und diese Lösung wieder in die Isolierflasche überführt. Zur Beurteilung von Zellqualität und -quantität wurde ein binokulares Inversmikroskop (Motic AE 20, Motic®) verwendet. Die Selektion qualitativ hochwertiger Kardiomyozyten für die Konfokal- sowie Epifluoreszenzmikroskopie erfolgte anhand der Kriterien des Vorhandenseins einer deutlichen Querstreifung, einer rechteckigen Zellform sowie wenigen zellulären Granulationen. Eine Fotografie einer beispielhaften Zelle findet sich in Abbildung 9.

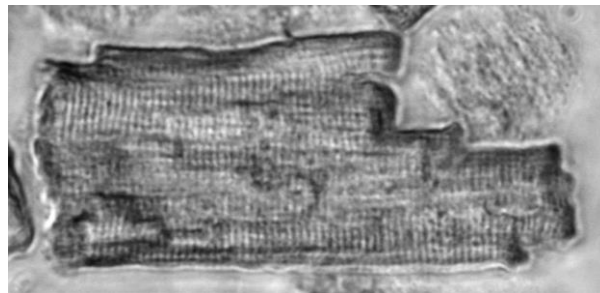


Abbildung 9: Fotografie einer frisch isolierten humanen linksventrikulären Kardiomyozyte (Axio Vert.A1 inverses Mikroskop, Carl Zeiss AG; 40x-Objektiv)

2.3 Lösungen für die intrazellulären Ca^{2+} -Messungen mittels Konfokal- und Epifluoreszenzmikroskopie

2.3.1 HEPES-Tyrode (N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)

Die HEPES-Tyrode kam als Versuchslösung in der Konfokal- sowie in der Epifluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Sie enthielt folgende Inhaltsstoffe in den in Tabelle 2 angegebenen Mengen und Konzentrationen.

Tabelle 2: HEPES-Tyrode

Substanz	Molekulargewicht in g/mol	Konzentration in mmol/l	Masse in g/l	
			1x-Tyrode	10x-Stock
NaCl	58,45	136,00	7,948	79,48
KCl	74,55	4,00	0,298	2,98
NaH_2PO_4	137,99	0,33	0,046	0,46
NaHCO_3	84,01	4,00	0,336	3,36
MgCl_2	95,22	1,60	0,152	1,52
HEPES	238,31	10,00	2,383	23,83
Glucose	180,16	10,00	1,802	-

Die Lösung wurde zunächst mit einem Liter zweifach destilliertem (bidestilliertem) Wasser (ddH_2O) als 10x-Stock angesetzt und bei Raumtemperatur (RT) mit Natriumhydroxid (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,4 titriert. Um die 1x-Tyrode für die Experimente zu erhalten, wurden 100 ml der 10x-Stock-Lösung mit 900 ml ddH_2O angesetzt und 1,8 g Glucose hinzugefügt. Anschließend wurde auch bei der 1x-Tyrode der pH-Wert mit NaOH auf einen Wert von 7,4 titriert. Die erhaltene Menge von einem Liter 1x-Tyrode wurde dann bei 5°C im Kühlschrank gelagert und für Versuche in einem Zeitraum von etwa zwei Wochen verwendet. Für die verschiedenen Experimente wurden vier Lösungen angesetzt, deren Basis die 1x-HEPES-Tyrode darstellte.

Tabelle 3: Versuchs-Tyrogen

Lösungen	HEPES-Tyrode in ml	CaCl_2 in mmol/l	Iso- proterenol in mol/l	Okadaic Acid in nmol/l	PDP3m in $\mu\text{mol/l}$	PDP3 in $\mu\text{mol/l}$	DMSO in μl
Kontrolle	50,0	1	10^{-8}	-	-	-	50
Okadaic Acid	50,0	1	10^{-8}	100	-	-	-
PDP3m	2,5	1	10^{-8}	-	25	-	-
PDP3	2,5	1	10^{-8}	-	-	25	-

Die in Tabelle 3 abgebildeten Versuchs-Tyrogen der Kontroll- sowie der *Okadaic Acid*-Gruppe wurde für die Superfusion von Kardiomyozyten sowohl in der Konfokal- als auch in der Epifluoreszenzmikroskopie verwendet. Da *Okadaic Acid* in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst war, wurde, um systemische Effekte des DMSO auszuschließen, das gleiche Volumen an DMSO (50 ml) auch der Kontrolle beigefügt. Die dargestellten Versuchs-Tyrogen der

PDP3m- sowie der PDP3-Gruppe wurden aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der jeweiligen Substanzen in einem System mit Mediaustausch zur Inkubation von Kardiomyozyten verwendet. Je nach Versuchsgruppe wurde die entsprechende Versuchs-Tyrode eingesetzt.

2.3.2 Fluo-3 AM

Im Rahmen der Konfokalmikroskopie wurde der nicht-ratiometrische Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3-Acetyloxymethylester (Fluo-3 AM, Molecular Probes™, Lot.-Nr. 1182524) verwendet. Dieser wurde zunächst mit DMSO zu einem Stock (1 mM) angesetzt, welcher bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurde und über einen längeren Zeitraum zur Herstellung der Messfarbstofflösung verwendet wurde.

Tabelle 4: Fluo-3 AM

Farbstoffstock	Fluo-3 AM (1 mg)	1 mM	in 885 μl DMSO gelöst, Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Messfarbstofflösung	Fluo-3 AM Stock (50 μl) Pluronic Acid (5 μl)	1 μM 200 mg/ml	in 5 ml 1 mM CaCl_2 HEPES-Tyrode lichtgeschützt bei RT gelöst, Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die fertig angesetzte Messfarbstofflösung wurde in Volumina à 200 μl in lichtdichte Eppendorf-Tubes® aufgeteilt und diese bei Bedarf aus der Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ entnommen.

2.3.3 Fura-2 AM

Bei Messungen in der Epifluoreszenzmikroskopie wurde der ratiometrische Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM (Molecular Probes™, Lot.-Nr. 1466635) verwendet. Dieser wurde vor jeder Messung frisch angesetzt. Dazu wurde zunächst ein Stock (1 mM) angesetzt, aus welchem dann die Messfarbstofflösung hergestellt wurde.

Tabelle 5: Fura-2 AM

Farbstoffstock	Fura-2 AM (50 μg)	1 mM	in 44,4 μl DMSO gelöst, Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Messfarbstofflösung	Fura-2 AM Stock (5 μl) Pluronic Acid (1 μl)	1 μM 200 mg/ml	in 500 μl 1 mM CaCl_2 HEPES-Tyrode lichtgeschützt bei RT gelöst, Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die fertig angesetzte Messfarbstofflösung wurde in Volumina à 500 μl in lichtdichte Eppendorf-Tubes® aufgeteilt, wovon später bei den Messungen jeweils 250 μl pro Messkammer verwendet wurden.

2.3.4 Koffein-Tyrode

Im Rahmen der Ca^{2+} -Transienten-Messungen am Epifluoreszenzmikroskop wurde eine Koffein-Tyrode verwendet, um durch eine Koffein-getriggerte Öffnung der RyR2 sog. Koffein-Transienten messen zu können, aus denen der SR- Ca^{2+} -Gehalt ermittelt werden konnte. Diese Lösung setzte sich, wie in Tabelle 6 beschrieben, zusammen.

Tabelle 6: Koffein-Tyrode

Substanz	Molekulargewicht in g/mol	Konzentration in mmol/l	Masse in g/l	
			1x-Tyrode	10x-Stock
NaCl	58,44	140	8,180	81,82
KCl	74,56	4	0,298	2,98
MgCl_2	95,21	1	0,095	0,95
HEPES	238,31	5	1,190	11,92
Glucose	180,16	10	1,800	-
Koffein	194,20	10	1,940	-

Die Lösung wurde wie die HEPES-Tyrode zunächst mit 1 Liter ddH₂O als 10x-Stock angesetzt und bei RT mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 titriert. Anschließend wurde die 1x-Koffein-Tyrode für die Experimente aus 100 ml der 10x-Stock-Lösung und 900 ml ddH₂O angesetzt sowie 1,8 g Glucose und 1,94 g Koffein hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf einen Wert von 7,4 titriert. Die erhaltene Menge von 1 Liter 1x-Koffein-Tyrode wurde dann bei 5 °C im Kühlschrank gelagert und für Versuche in einem Zeitraum von etwa vier Wochen verwendet.

2.4 Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffe

2.4.1 Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM

Zur Messung von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR über die RyR2, den sog. *Ca²⁺-Sparks*, wurde der nicht-ratiometrische Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM verwendet (Molecular Probes™, Lot.-Nr. 1182524) (Kao et al. 1989; Minta et al. 1989). Die Strukturformel sowie das Exzitations- und Emissionsspektrum von Fluo-3 AM im Ca^{2+} -gebundenen Zustand sind in Abbildung 10 dargestellt.

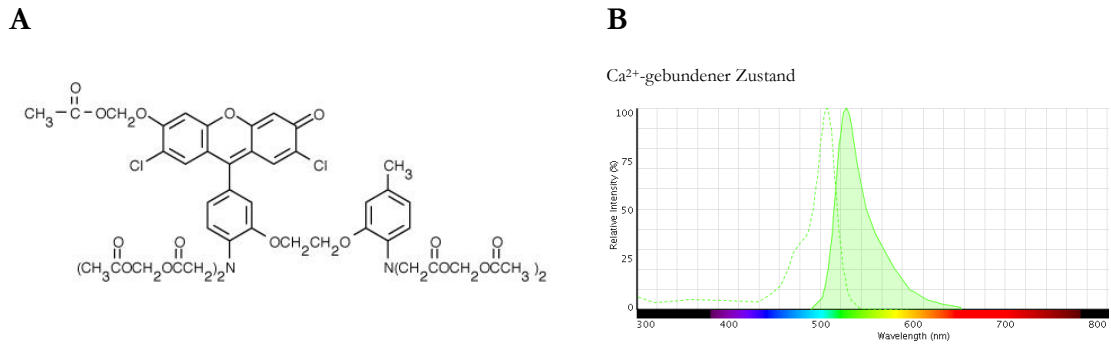


Abbildung 10: Darstellung der A: Fluo-3 AM-Strukturformel sowie des B: Fluoreszenz Exzitations- und Emissionsspektrums von Fluo-3 AM im Ca²⁺-gebundenen Zustand (modifiziert nach <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F14218>, Zugriff am 17.04.2016)

Der nicht-ratiometrische Ca²⁺-Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM kann Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration anzeigen, indem er nach selektiver Bindung an freies Ca²⁺ zu einer 40-fachen Erhöhung der Fluoreszenzintensität führt (Abbildung 11, 3). Dabei ändern sich jedoch nicht die Absorptions- und Emissionsmaxima des Farbstoffs (Minta et al. 1989). Der Farbstoff Fluo-3 AM funktioniert nach folgendem Prinzip (Fluschnik 2011; Minta et al. 1989): das Fluo-3 wird zunächst in Form des Pentaacetoxymethylesters in eine Zellsuspension appliziert (Abbildung 11, 1). Dieser kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften entlang seines Konzentrationsgradienten über die Zellmembran in die Kardiomyozyte diffundieren. Intrazelluläre Esterasen spalten das Molekül hydrolytisch in den polaren Farbstoff Fluo-3 und Acetoxymethyl (Abbildung 11, 2). Dadurch verliert der Farbstoff seine lipophilen Eigenschaften und folglich seine Membranpermeabilität. Durch den intrazellulären Abbau des Fluo-3 AM entsteht ein Konzentrationsgradient, nach dem stetig weiterer Farbstoff in die Zelle diffundiert und es zur intrazellulären Anreicherung kommt. Der Fluoreszenzeffekt des nun intrazellulären Farbstoffs gehorcht der sog. Stokes'schen Verschiebung (*Stokes Shift*), welche von Sir George Gabriel Stokes im Jahr 1852 erstmalig beschrieben wurde (Lakowicz 1999).

$$\text{Stokes'sche Verschiebung: } \lambda_s = |\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}}|$$

$$\text{Energiedifferenz: } \Delta E = h \times c \left(\frac{1}{\lambda_{\text{ex}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{em}}} \right)$$

Formel 1 & 2: Stokes'sche Verschiebung & Energiedifferenz, λ_s : Wellenverschiebung nach Stokes, λ_{ex} : Exzitationswellenlänge, λ_{em} : Emissionswellenlänge, ΔE : Energiedifferenz, h : Plancksches Wirkungsquantum $6,63 \times 10^{-34}$ Js, c : Lichtgeschwindigkeit

Fluo-3 wird zunächst mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt (Abbildung 11, 4). Durch die dabei stattfindende Absorption der Photonen resultiert ein kurzzeitiger Transfer der Elektronen in ein höheres Orbital. Dieser energiereiche aber instabile Zustand wird durch den spontanen Retransfer der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau aufgehoben. Die hierbei freiwerdende Energie ΔE wird unter anderem in Form von Lichtemission frei, welche im Vergleich zur Exzitation in den langwelligeren und somit energieärmeren Bereich verschoben ist (505 nm) (Abbildung 10, B; Abbildung 11, 5). Die restliche freiwerdende

Energie geht in Form von thermischer Energie sowie Vibrationsenergie verloren. Die sog. Stokes'sche Verschiebung bezeichnet hierbei die Entstehung einer Differenz zwischen der Exzitations- (λ_{ex}) und Emissionswellenlänge (λ_{em}) von ca. 20-50 nm (Lichtman und Conchello 2005).

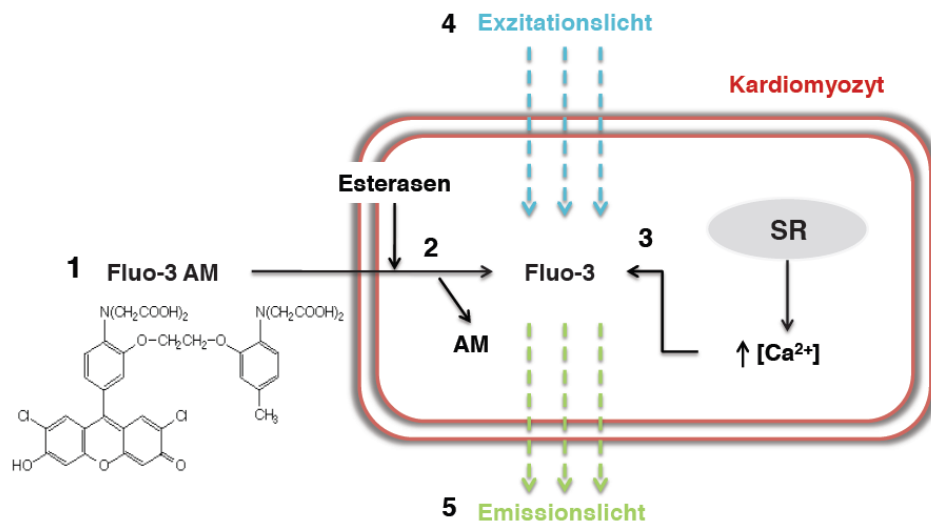


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips des nicht-ratiometrischen Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-3 AM (Fluschnik 2011)

2.4.2 Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM

Im Rahmen von Messungen in der Epifluoreszenzmikroskopie wurde in dieser Arbeit der ratiometrische Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM (Molecular Probes™, Lot.-Nr. 1466635) verwendet. Die Strukturformel sowie das Exzitations- und Emissionsspektrum von Fura-2 AM im Ca^{2+} -ungebundenen sowie Ca^{2+} -gebundenen Zustand sind in Abbildung 12 dargestellt.

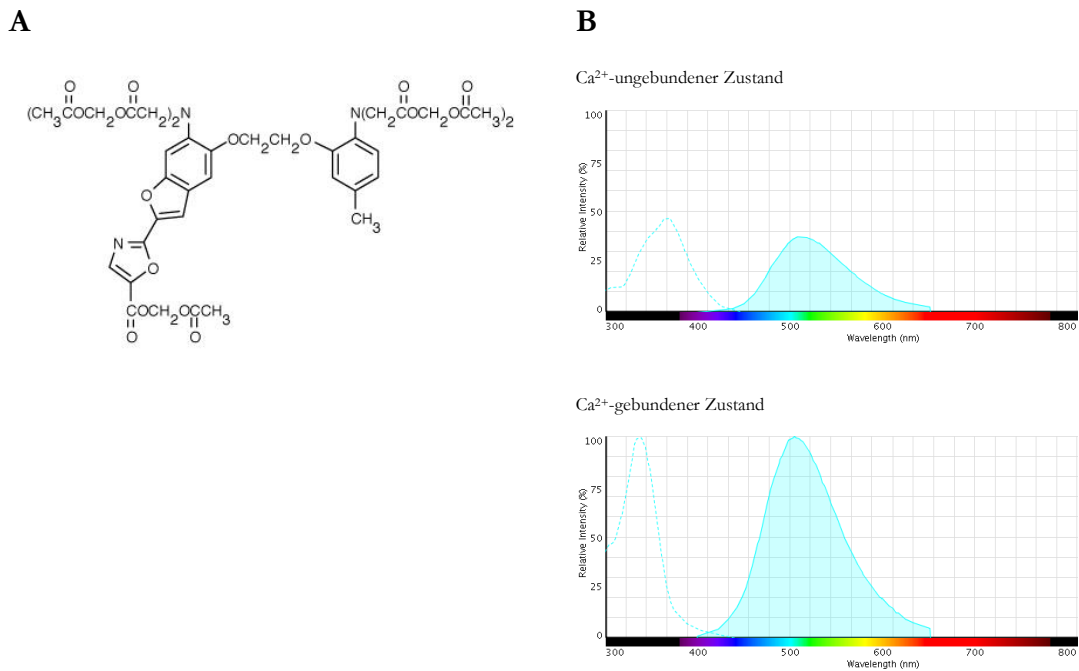


Abbildung 12: Darstellung der A: Fura-2 AM-Strukturformel sowie des B: Fluoreszenz Exzitations- und Emissionsspektrums von Fura-2 AM im Ca²⁺-ungebundenen und Ca²⁺-gebundenen Zustand (modifiziert nach <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F1221>, Zugriff am 17.04.2016)

Ratiometrische Ca²⁺-Fluoreszenzfarbstoffe zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, bei zwei verschiedenen Wellenlängen Licht absorbieren und emittieren zu können (Grynkiewicz et al. 1985), wobei das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von der Ca²⁺-Bindung beeinflusst wird. Dadurch ist es möglich, ein Verhältnis der beiden Intensitäten zu bilden, welches im Verlauf der Messung stets konstant bleibt, da beide Intensitäten gleichermaßen durch Artefakte, wie Bleichvorgänge, variierende Farbstoffkonzentrationen und Farbstoffverluste während der Messung beeinflusst werden (Barreto-Chang und Dolmetsch 2009). Besonders geeignet sind ratiometrische Ca²⁺-Fluoreszenzfarbstoffe daher für semiquantitative Messungen von intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum. Der Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale und der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurde durch folgende Formel erstmalig beschrieben (Grynkiewicz et al. 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Formel 3: Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale und der intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen $[Ca^{2+}]_i$

Tabelle 7: Beschreibung der mathematischen Parameter aus Formel 3 (modifiziert nach Grynkiewicz et al. 1985; Kohlhaas 2007)

R	berechneter Ratiowert der aufgenommenen Fluoreszenzintensität (für Fura-2 bei $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}/380 \text{ nm}$)
R_{min}	Ratiowert der Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}/380 \text{ nm}$) im Ca^{2+} -ungebundenen Zustand
R_{max}	Ratiowert der Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}/380 \text{ nm}$) im Ca^{2+} -gesättigten Zustand
K_d	Dissoziationskonstante des Farbstoffs
S_{f2}	Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im Ca^{2+} -ungebundenen Zustand
S_{b2}	Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im Ca^{2+} -gebundenen Zustand

Die fluoreszenzmikroskopische Anwendung von Fura-2 AM in Kardiomyozyten beruht auf einer intrazellulären Chelatkomplexbildung des Farbstoffs mit freiem Ca^{2+} und einer daraus resultierenden Ca^{2+} -abhängigen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 380 nm zu 340 nm, wohingegen das Emissionsmaximum unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration bei 510 nm konstant bleibt (Grynkiewicz et al. 1985). Während es unter 340 nm Exzitation bei Ca^{2+} -Bindung zu einem 3-fachen Anstieg des Fluoreszenzsignals kommt, tritt unter 380 nm Exzitation eine 10-fache Abnahme des Fluoreszenzsignals auf (Cobbold und Rink 1987). Zur Berechnung der finalen Ca^{2+} -Konzentration wird bei ratiometrischen Farbstoffen schließlich der Quotient des Fluoreszenzsignals beider Wellenlängen verwendet (Fura-2-Ratio: $F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$).

Fura-2 weist im Vergleich zu anderen Kationen eine besonders hohe Sensitivität für Ca^{2+} auf. Die Dissoziationskonstante (K_d) liegt bei 224 nM (Cobbold und Rink 1987). Somit ist der Farbstoff in der Lage, schon bei sehr geringen Ca^{2+} -Konzentration (ab 10 nM) Fluoreszenzsignale zu emittieren, die über der Eigenfluoreszenz der Zelle liegen. Die maximale zeitliche Auflösung der intrazellulären Ca^{2+} -Messungen mittels Fura-2 AM ist durch die Bindungs- und Dissoziationskinetik bedingt und beträgt ca. 5 ms (Cobbold und Rink 1987; Jackson et al. 1987; Kao und Tsien 1988). Auf die Bestimmung einer eigenen Dissoziationskonstante und Kalibrierung des Farbstoffs auf quantitative Ca^{2+} -Werte wurde in dieser Arbeit verzichtet. Bei allen epifluoreszenzmikroskopischen Messungen mittels Fura-2 AM wurden ausschließlich semiquantitative Daten erhoben, die nur im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu verstehen sind und dementsprechend ausgewertet wurden.

Wie bei Fluo-3 AM ist auch bei Fura-2 AM der eigentliche Farbstoff mit einer Acetoxymethyl-Gruppe verestert. Der dadurch entstehende lipophile Charakter verleiht dem Farbstoff eine gute Membranpermeabilität und ermöglicht eine Aufnahme in die Kardiomyozyte. Intrazellulär erfolgt durch endogene Esterasen eine hydrolytische Abspaltung der Acetoxymethyl-Gruppe, sodass der dann lipophobe Farbstoffrest nicht mehr aus der Zelle diffundieren kann.

Bei Messungen mit Fura-2 AM wurde der Farbstoff durch Licht mit den Wellenlängen 340-380 nm (UV-A-Licht) angeregt. Dieses kurzwellige Licht kann allerdings durch die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zellschädigend wirken und somit auch Auswirkungen auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel haben (Gaboriau et al. 1995; Ihrig et al. 1999). Dieser Effekt ist besonders dann bedeutsam, wenn die Lichtquellen des Mikroskopsystems im Laufe einer Messreihe ausgetauscht werden, da es dann durch unterschiedliche Belichtungsstärken zu nicht mehr vergleichbaren Ergebnissen kommen kann (Ihrig et al. 1999). Daher ist an dieser Stelle zu betonen, dass während der gesamten Messreihen die Lichtquelle des verwendeten Epifluoreszenzmikroskops nicht ausgetauscht wurde.

2.5 Konfokalmikroskopie

2.5.1 Grundlagen der Konfokalmikroskopie

Die konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie stellt ein lichtmikroskopisches Verfahren dar, das fluoreszierende Farbstoffe abbildet und sich dadurch auszeichnet, dass durch den gezielten Einsatz spezifischer Lochblenden Licht aus einer bestimmten Fokusebene betrachtet werden kann. Das Licht aus anderen Ebenen wird durch die Lochblenden weitestgehend ausgeblendet. Da bei der konventionellen Lichtmikroskopie die Auflösung des betrachteten Objektes durch die Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht limitiert wird, stellt die Konfokalmikroskopie folglich eine Weiterentwicklung dieser Methode dar. Begründet wurde sie im Jahre 1955 von dem US-amerikanischen Forscher Marvin Minsky (Minsky 1988).

Angewendet wurde die konfokale Lasermikroskopie (LSM 5 Pascal Laser Module, Carl Zeiss AG, Göttingen) im Rahmen dieser Arbeit, um den spontanen diastolischen Ca^{2+} -Verlust des SR, das sog. SR- Ca^{2+} -Leck, darzustellen. Detektiert wurden dazu kleine diastolische lokale Spitzen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, sog. Ca^{2+} -*Sparks*. Diese entstehen durch spontane, nicht stimulierte Öffnungen der in *Clustern* angeordneten RyR2 (Bers 2001; Cheng et al. 1993). Als quantitativ messbare Parameter wurden die Ca^{2+} -*Sparks*, die innerhalb einer definierten Scanzeit in einer bestimmten Zellregion auftraten, verwendet. Außerdem wurden zelluläre arrhythmische (arr.) Ereignisse, wie beispielsweise während der Messzeit spontan auftretende Kontraktionen der Zelle, Ca^{2+} -Wellen und Ca^{2+} -Wolken, quantifiziert und ausgewertet. Des Weiteren wurde die Konfokalmikroskopie im Rahmen dieser Arbeit zur Überprüfung der Zellpenetration des Peptides PDP3 verwendet. Eine genaue Beschreibung dieses Experimentes findet sich in Kapitel 2.5.4.

Die Grundsäulen der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie sind die punktuelle Belichtung des abzubildenden Objektes durch Laserlicht mittels sog. *Scanning* (= Bildzerlegung in Pixel) sowie die punktuelle Aufzeichnung des emittierten Lichtsignals der im Fokus liegenden Schicht, die durch den Einsatz spezifischer Lochblenden ermöglicht wird (Haupt und Draaijer 1989; Kino und Corle 1996). Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbte Probe

wird mittels einem über bewegliche Spiegel steuerbaren Laserlicht Punkt für Punkt gerastert (Haupt und Draaijer 1989). Dabei entsteht zunächst kein Bild, sondern es werden lediglich einzelne Bildpunkte abgebildet, die anschließend zu einem Bild zusammengefügt werden müssen. Für diese Darstellungen wurde in der vorliegenden Arbeit der sog. *Line-Scan-Modus* (= Aufzeichnung einzelner Bildzeilen über die Zeit) verwendet. Dabei wird eine bestimmte in der Fokusebene liegende Bildzeile, bestehend aus einer definierten Anzahl von Pixeln, in einem definierten Zeitraum wiederholt abgebildet und die detektierten Bildpunkte dann zu einem zweidimensionalen Bild zusammengefügt.

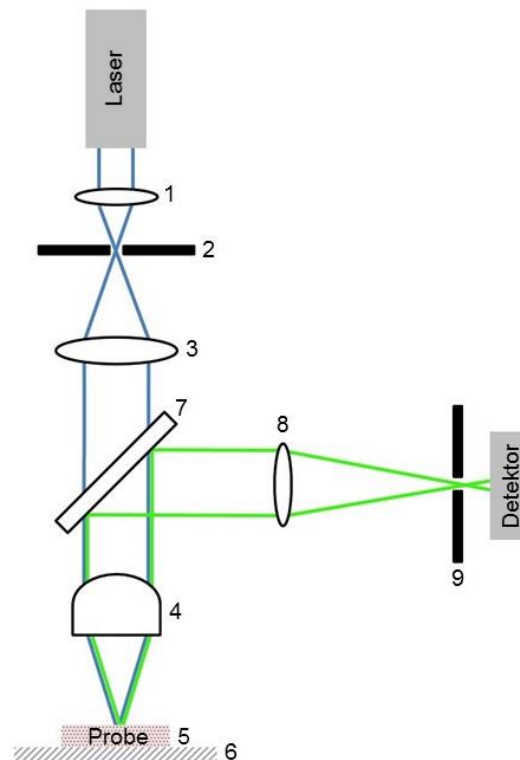
Das anregende Laserlicht (488 nm) wird über ein doppeltes Linsensystem und verschiedene Spiegel auf das Objekt fokussiert. Durch die besondere Anordnung der Linsen ist der Strahlengang sowohl zur Belichtung als auch zur Abbildung identisch, d. h. Anregungs- und Detektionsfokus liegen konfokal zueinander (Conchello und Lichtman 2005). Das emittierte Licht (505 nm) wird folglich von der Probe entsprechend des Strahlenganges reflektiert und durch einen dichroitischen Spiegel, welcher als Strahlteiler fungiert (Trennung von Exzitations- von Emissionslicht), in Abhängigkeit von seiner Wellenlänge zu einem Detektor geleitet (Abbildung 13). Emittiertes Licht, welches nicht aus der Fokusebene stammt, trifft hierbei auf die vor dem Detektor befindliche Blende und wird somit ausgeblendet. Dadurch wird ausschließlich die sich im Fokus befindliche Schicht dargestellt und es resultieren durch Streulichtunterdrückung kontrastreiche Bilder mit hoher lateraler und axialer Auflösung (Kino und Corle 1996). Um einen optimalen Kontrast zu erzielen, muss der Lochblendendurchmesser idealerweise unendlich klein sein (Wilhelm et al. 2010). Im Versuchsaufbau muss allerdings ein Kompromiss zwischen der Belichtungsstärke, die durch den Lochblendendurchmesser variierbar ist, und der resultierenden Kontrastschärfe gefunden werden, um eine optimale Darstellung der Fokusebene zu erreichen.

Das von der Probe ausgehende Emissionslicht wird von einem *Photomultiplier* (= Photoelektronenvervielfacher) (Carl Zeiss AG) detektiert. Dieser verstärkt die Intensität des Signals, wandelt es in elektrische Spannung um und leitet diese an den Analog-Digital-Wandler (Carl Zeiss AG) weiter, welcher die elektrische Spannung in digitale Signale umwandelt, die dann von einem Computer verarbeitet werden können. Dabei korreliert die Signalstärke mit der Fluoreszenzintensität. Das Signal wird synchronisiert mit der Laser-Anregung aufgezeichnet, sodass die Fluoreszenzintensität jeweils einem spezifischen Bildpunkt zugeordnet werden kann.

Für alle Versuche wurde ein Argon-Ion-Laser (RMC 7812Z, Lasos Lasertechnik GmbH) verwendet, der Fluo-3 mit einer Wellenlänge von 488 nm anregte. Die daraufhin emittierte Fluoreszenz gelangte durch einen Emissionsfilter (505 nm) zum *Photomultiplier*. Die in dem Versuchsaufbau durch die Apparatur definierten Dimensionen jedes Bildpunktes sind $0,075 \times 0,075 \times 0,075 \mu\text{m}^3$. Die Erfassung einzelner Bildpunkte wurde im unidirektionalen *Line-Scan-Modus* durchgeführt, wobei nach jeder Aufzeichnung einer Bildzeile ein Rücklauf des

Lasers in die Ausgangsposition erfolgte. Somit wurden alle Bildzeilen in derselben Scanrichtung aufgezeichnet. Zur Aufzeichnung von 10.000 Bildzeilen (jeweils 512 Pixel) wurden dabei 7.680 ms benötigt, welches einer Zeilenfrequenz von circa 1,3 Bildzeilen/ms bzw. 1.302 Bildzeilen/s entspricht.

Eine zusammenfassende schematische Darstellung des Strahlengangs der Konfokalmikroskopie findet sich in Abbildung 13.



Das Laserlicht mit einer Wellenlänge von 488 nm (blau) wird zunächst durch eine Linse (1) gebündelt und durch die Belichtungslochblende (2) fokussiert. Über eine zweite Linse (3) wird das Exzitationslicht auf das Objektiv (4) gelenkt und die darüber befindliche Probe (5) auf dem Objektisch (6) beleuchtet. Analog zu diesem Strahlengang wird das Licht durch den nicht-ratiometrischen Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff der Probe reflektiert (grün) und fällt als langwelligeres Emissionslicht mit einer Wellenlänge von 505 nm auf den Strahlteiler (7) (dichroitischer Spiegel), der die emittierte kritische Wellenlänge zunächst auf eine weitere Linse (8) und dann auf den Detektor leitet. Die sich vor dem Detektor befindende Detektions-Lochblende (9) verhindert den Einfall von Emissionslicht, das nicht aus der Fokusebene stammt.

Abbildung 13: Strahlengang der Konfokalmikroskopie (in Anlehnung an Kino und Corle 1996)

2.5.2 Versuchsprotokoll zur Messung von Ca^{2+} -Sparks

Alle Experimente wurden mit dem konfokalen Mikroskop LSM 5 Pascal Laser Module (Carl Zeiss AG) unter Verwendung eines 40x-Ölimmersionsobjektives sowie des Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3 AM durchgeführt. Zunächst wurden 400 μl Lösung frisch isolierter linksventrikulärer Kardiomyozyten auf 4 μl Laminin (Sigma[®], Lot. Nr. 024M4107V) in einer Ion Optix[®]-Messkammer ausplattiert und 30 Min. bei RT inkubiert. Die Kardiomyozyten bewegten sich dabei aufgrund ihrer hohen Masse in der Lösung nach unten und blieben auf dem Laminin haften. Die Messkammern mit den Kardiomyozyten wurden anschließend in den Dunkelraum transportiert und alle weiteren Schritte dort lichtgeschützt durchgeführt. Nach dem Entfernen der überschüssigen Lösung wurden 200 μl Fluo-3 AM appliziert und 30 Min. bei RT inkubiert. Dabei wurden jeweils 1 μl der pharmakologischen Substanzen, entsprechend der Konzentrationen, die auch den jeweiligen Versuchs-Tyroden beigefügt waren, hinzugefügt, sodass schon während der Farbstoffinkubation die Zellen mit der gewünschten Endkonzentration des Wirkstoffs inkubiert wurden. Nach diesen vorbereitenden Schritten wurde die Messkammer mit den nun angefärbten Kardiomyozyten in das Konfokalmikroskop eingespannt.

Zur Messung von Ca^{2+} -Sparks wurden im Rahmen der Konfokalmikroskopie zwei verschiedene Protokolle angewandt. Neben dem standardmäßig verwendeten Superfusions-Protokoll (für die Kontroll- und *Okadaic Acid*-Gruppe) wurde auch mit einem Mediaumaustausch-Protokoll (für die PDP3m- und PDP3-Gruppe) gearbeitet, da die genannten Substanzen nur limitiert zugänglich waren.

Im Superfusions-Protokoll (Abbildung 14) erfolgte vor Beginn des Experiments eine Auswaschung des überschüssigen extrazellulär verbliebenen Farbstoffs mittels Superfusion der jeweiligen Versuchs-Tyrode bei einer Superfusionsgeschwindigkeit von 30-50 ml/h für 5 Min. Dabei wurde in der gleichen Geschwindigkeit die überschüssige Flüssigkeit an der diagonal gegenüberliegenden Seite der Messkammer durch die Vakuumpumpe Masterflex[®] L/S (Cole Parmer[®]) abgesaugt, sodass ein kontinuierlicher Austausch des Mediums stattfand. Anschließend wurde die Superfusion der Versuchs-Tyrode bei gleichbleibender Geschwindigkeit fortgeführt und alle quergestreiften, rechteckigen Zellen mit wenigen Granulationen in einem Zeitraum von 25 Min. gemessen. Zeitgleich erfolgte die Farbstoffinkubation der nächsten Messkammer, sodass zwischen den einzelnen Versuchsabschnitten ein nahtloser Übergang bestand.

Im Mediaumaustausch-Protokoll erfolgte vor Beginn des Experiments eine Auswaschung des überschüssigen extrazellulär verbliebenen Farbstoffs mittels eines fünf-schrittigen Mediaumaustausch-Prozesses durch Normaltyrode. Nach dem letzten Auswaschungsschritt wurde die Normaltyrode durch 200 μl der jeweiligen Messtyrode ersetzt. Anschließend wurden auch hier, nach fünf-minütiger Präinkubation, alle quergestreiften, rechteckigen Zellen mit wenigen Granulationen in einem Zeitraum von 25 Min. gemessen. Ebenso erfolgte zeitgleich die

Farbstoffinkubation der nächsten Messkammer, sodass zwischen den einzelnen Versuchsabschnitten ein nahtloser Übergang bestand.

In beiden Protokollen wurden die Kardiomyozyten mit einem 40x-vergrößernden Ölimmersobjektiv betrachtet und nach den zuvor beschriebenen Kriterien selektiert. Vor jeder Einzelmessung einer Zelle wurde diese für 10 s mit 20 V bei einer Frequenz von 1 Hz mit dem Myopacer Field Stimulator (Ion Optix®) stimuliert. Schließlich wurde die eingestellte Zelle mit dem zum Setup gehörigen Programm Pascal LSM 5 Version 3.2 SP2 (Carl Zeiss AG) im *Line-Scan-Modus* für 7,68 s gemessen.

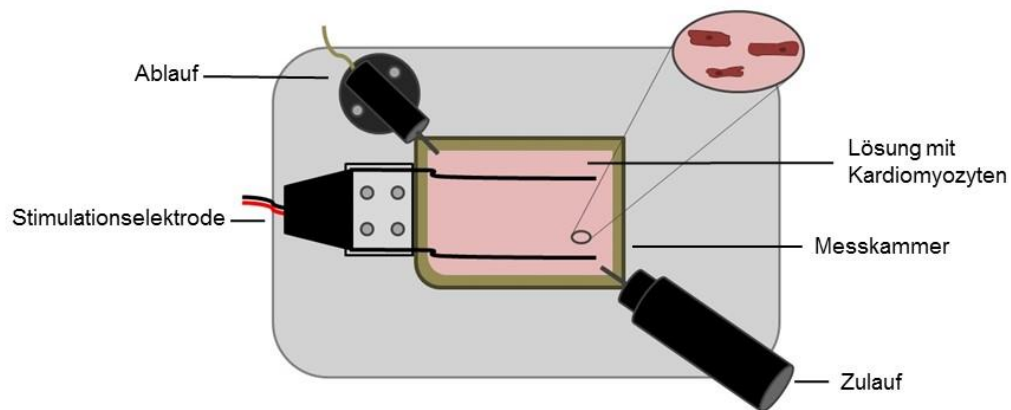


Abbildung 14: Versuchsaufbau der Konfokalmikroskopie (Superfusions-Protokoll)

2.5.3 Datengenerierung und Datenauswertung der Messungen von Ca^{2+} -Sparks

Die während der Messungen entstandenen zweidimensionalen Scans der jeweiligen Bildzeile einer Zelle wurden am Messcomputer im .lsm Format abgespeichert und alle Dateien eines Messtages zusammen ausgewertet. Für die Detektion und Analyse der Ca^{2+} -Sparks sowie der zellulären arrhythmischen Ereignisse wurde die *Plug-In-Software* (= Erweiterungsmodul) Sparkmaster® für ImageJ® 1.47v verwendet. Alle Rohdaten wurden in Microsoft Excel systematisch dokumentiert und durch Importieren in GraphPad Prism® Version 6 (GraphPad Software, Inc.) graphisch veranschaulicht und statistisch analysiert. Dabei wurden folgende, in Tabelle 8 dargestellten, Parameter berücksichtigt.

Tabelle 8: Konfokalmikroskopie-Parameter

Ca ²⁺ -Spark-Frequenz (CaSpF [100 μm ⁻¹ *s ⁻¹])	Auftreten von Ca ²⁺ -Sparks pro Zeiteinheit und Scanbreite
Ca ²⁺ -Spark-F/F ₀ (F/F ₀)	Ca ²⁺ -Spark-Intensität (Helligkeit) in Abhängigkeit zur <i>Baseline</i> (= Grundniveau); F/F ₀ = Amplitude+1
Ca ²⁺ -Spark-Breite (FW [μm])	Detektierte Ca ²⁺ -Spark-Breite
Ca ²⁺ -Spark-Dauer (FD [ms])	Detektierte Ca ²⁺ -Spark-Dauer
Ca ²⁺ -Spark-Größe (CaSPS)	Berechnete Ca ²⁺ -Spark-Größe CaSPS= F/F ₀ x FD x FW
SR-Ca ²⁺ -Leck	Berechneter Verlust von Ca ²⁺ aus dem SR SR-Ca ²⁺ -Leck= CaSPS x CaSPF
Max Flux	Maximal detektierter Ca ²⁺ -Ausstrom aus dem SR
Frequenz arr. Ereignisse	Auftreten von arr. Ereignissen pro Zeiteinheit und Scanbreite
Latenzzeit arr. Ereignisse	Latenzzeit zwischen dem letzten stimulierten Ca ²⁺ -Transienten und dem Auftreten des ersten arr. Ereignisses

2.5.4 Versuchsprotokoll zur Zellpenetrationstestung des 5-Carboxy-Fluorescein(FAM)-gebundenen Peptides PDP3

Auch dieses Experiment wurde mit dem konfokalen Mikroskop LSM 5 Pascal Laser Module (Carl Zeiss AG) unter Verwendung eines 40x-Ölimmersionsobjektives durchgeführt. Zunächst wurden 400 μl Lösung frisch isolierter linksventrikulärer Kardiomyozyten auf 4 μl Laminin (Sigma[®], Lot. Nr. 024M4107V) in einer Ion Optix[®]-Messkammer ausplattiert und 30 Min. bei RT inkubiert. Die Kardiomyozyten bewegten sich dabei aufgrund ihrer hohen Masse in der Lösung nach unten und blieben auf dem Laminin haften. Die Messkammern mit den Kardiomyotyten wurden anschließend in den Dunkelraum transportiert und alle weiteren Schritte dort lichtgeschützt bei RT durchgeführt. Im Folgenden wurde das Medium gegen Normaltyrode ausgetauscht und die Autofluoreszenz verschiedener linksventrikulärer Kardiomyozyten detektiert. Dabei wurden die Kardiomyozyten von einem Argon-Ion-Laser (RMC 7812Z, Lasos Lasertechnik GmbH) mit einer Wellenlänge von 488 nm bei einer Laserstärke von 10 % angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei 505 nm Wellenlänge im sog. *Frame-Scan-Modus* (= Aufzeichnung ganzer Bilder) bei 512x512 Pixeln aufgezeichnet und die entstandenen (Auto-)Fluoreszenzbilder verschiedener Bildebenen als optische *Z-stacks* (= schichtweise Darstellung einzelner Bildebenen) dargestellt. Dabei wurden ausschließlich quergestreifte, rechteckige Zellen mit wenigen Granulationen in das Experiment eingeschlossen.

Zusätzlich wurde von jeder Kardiomyozyte ein lichtmikroskopisches Hellfeldbild angefertigt, um diese später erneut auffinden und einer zweiten Messung aussetzen zu können.

Nun wurde die Normaltyrode entfernt und gegen eine Versuchstyrode mit 25 μM 5-Carboxy-Fluorescein-PDP3 (FAM-PDP3, EMBL Heidelberg, gelöst in 10 % DMSO/ddH₂O) ausgetauscht, welche für 60 Min. inkubiert wurde. Anschließend wurde die Versuchstyrode erneut entfernt und der extrazellulär verbliebene Anteil der FAM-PDP3 mit einem fünfschrittigen Auswaschvorgang beseitigt. Daraufhin wurden erneut Fluoreszenzbilder der zuvor verwendeten Kardiomyozyten aufgezeichnet.

2.5.5 Datengenerierung und Datenauswertung der Zellpenetrationstestung des 5-Carboxy-Fluorescein(FAM)-gebundenen Peptides PDP3

Die während der Messungen entstandenen Fluoreszenzbilder der jeweiligen Zelle wurden am Messcomputer im .lsm Format abgespeichert. Zur Quantifizierung der zellulären Autofluoreszenzintensität sowie der Fluoreszenzintensität der FAM-PDP3-inkubierten Zellen wurde das Programm ImageJ[®] 1.47v verwendet. Hierbei wurden die Fluoreszenzsignale desselben Ausschnittes der jeweiligen Zelle vor und nach FAM-PDP3-Inkubation quantifiziert. Alle Rohdaten wurden in Microsoft Excel systematisch dokumentiert und durch Importierung in GraphPad Prism[®] Version 6 (GraphPad Software, Inc.) graphisch veranschaulicht und statistisch analysiert. Da es sich hierbei um ein sog. *repeated-measures*-Experiment (= Wiederholungsmessungen an denselben Zellen) handelt, wurde folglich der gepaarte Student's t-Test verwendet.

2.6 Epifluoreszenzmikroskopie

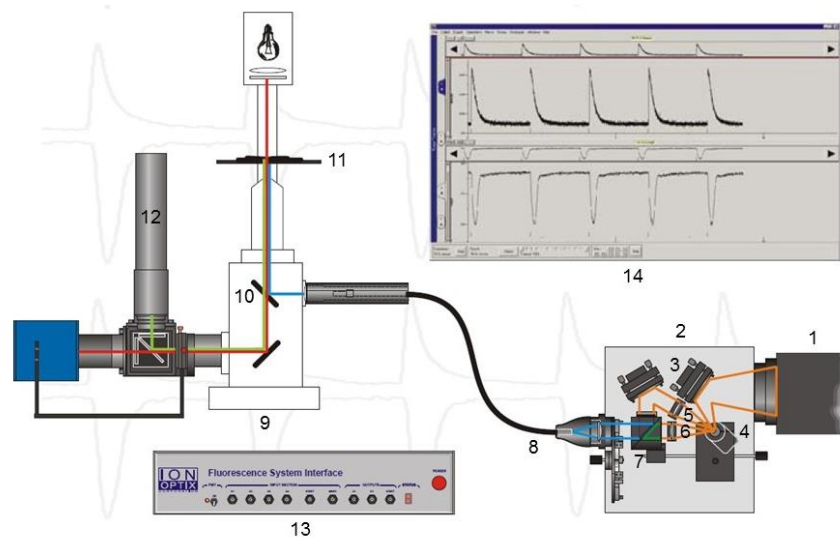
2.6.1 Grundlagen der Epifluoreszenzmikroskopie

Die Epifluoreszenzmikroskopie stellt ein lichtmikroskopisches Verfahren dar, welches, wie auch die Konfokalmikroskopie, Signale fluoreszierender Farbstoffe abbildet.

Ziel der Messungen mittels invertierter Epifluoreszenzmikroskopie (Motic AE 31, Ion Optix[®] Setup) war es, Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase frisch isolierter linksventrikulärer Kardiomyozyten anhand der fluktuierenden intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen zu untersuchen. Dafür wurden sog. Ca²⁺-Transienten (= Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen als Funktion der Zeit), die durch elektrische Stimulation der Zellen ausgelöst wurden, mit dem ratiometrischen Ca²⁺-Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM detektiert. Diese lassen Rückschlüsse auf die Ca²⁺-Ausschüttung bei einzelnen Kontraktionsvorgängen sowie im Falle einer Koffein-Applikation über den SR-Ca²⁺-Gehalt der Zelle zu.

Die Grundlage der Epifluoreszenzmikroskopie stellt in diesem Versuchsaufbau eine 75 W Xenonlampe (Ushio Inc.) dar. Das von dieser Lampe emittierte Anregungslicht wurde zunächst auf einen galvanometrischen Spiegel (= *Hyperswitch*; Spiegel, dessen Drehbewegung

proportional zum elektrischen Strom erfolgt) gelenkt, der es ermöglichte, repetitiv zwischen zwei Anregungswellenlängen (340 nm & 380 nm) zu wechseln, wodurch eine Anregung des ratiometrischen Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM ermöglicht wurde. Das Anregungslicht wurde zunächst auf einen dichroitischen Spiegel geleitet, dessen kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum des Farbstoffs liegt. Da der dichroitische Spiegel die Eigenschaft besitzt, das Licht unter der kritischen Wellenlänge zu reflektieren und nur das Licht über der kritischen Wellenlänge passieren zu lassen, wurde das kurzwellige Anregungslicht vom Spiegel reflektiert und somit durch das Objektiv auf das Präparat geleitet. Das langwelligere Emissionslicht konnte hingegen den Spiegel passieren. Dabei eliminierte ein nachgeschalteter Emissionsfilter (510/40 nm) das Streulicht und das bereinigte Fluoreszenzlicht konnte auf den *Photomultiplier* (Typ P25PC, Sens-Tech[®]) geleitet werden, welcher das einfallende Licht verstärkte und in elektrische Spannung umwandelte. Diese wurde durch den Analog-Digital-Wandler (Fluorescence System Interface, Ion Optix[®]) in ein digitales Signal umgewandelt, welches dann in der Computer-Software IonWizard Version 6.4.1.73 (Ion Optix[®]) dargestellt und analysiert werden konnte. Mittels des verwendeten Ion Optix[®]-Setups konnten somit bis zu 250 Ratiowerte/s generiert und aufgezeichnet werden (http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Ca-and-Cont_HSW_digital.pdf 2014). Eine schematische Darstellung des Strahlengangs in der Epifluoreszenzmikroskopie findet sich in Abbildung 15.



Das Exzitationslicht (orange) der Xenonlampe (1) wird zunächst im Hyperswitch (2) über einen einfachen Spiegel (3) auf den galvanometrischen Spiegel (4) gelenkt. Dieser ändert 250x/s seinen Einstellwinkel, sodass zwischen den verschiedenen Strahlengängen (5,6) für die beiden Anregungswellenlängen 340 nm (dunkelblau) & 380 nm (dunkelgrün) gewechselt werden kann. Das Exzitationslicht beider Wellenlängen (hellblau) wird nun über einen dichroitischen Spiegel (7) und einen Lichtleiter (8) zum Mikroskop (9) weitergeleitet. Dort wird es über einen weiteren dichroitischen Spiegel (10) auf das Präparat auf dem Objektstisch (11) geleitet. Das langwelligere Emissionslicht (hellgrün) von 510 nm Wellenlänge des angeregten ratiometrischen Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffs kann den dichroitischen Spiegel (10) passieren und wird über einen vorgeschalteten Emissionsfilter zum Photomultiplier (12) weitergeleitet. Über den nachgeschalteten Analog-Digital-Wandler (13) wird die generierte elektrische Information in eine digitale umgewandelt und kann anschließend am Computer dargestellt werden (14).

Abbildung 15: Strahlengang in der Epifluoreszenzmikroskopie (modifiziert nach http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Ca-and-Cont_HSW_digital.pdf, Zugriff am 20.04.2016)

2.6.2 Versuchsprotokoll zur Messung von systolischen sowie Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten

Alle Experimente der Epifluoreszenzmikroskopie wurden mit dem Lichtmikroskop Motic AE 31 im Ion Optix[®]-Setup unter Verwendung eines 40x-Objektives sowie des ratiometrischen Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 AM durchgeführt. Dafür wurden zunächst 400 μl Lösung frisch isolierter linksventrikulärer Kardiomyozyten auf 4 μl Laminin in einer Ion Optix[®]-Messkammer ausplattiert und 30 Min. bei RT inkubiert. Wie bei der Konfokalmikroskopie wurden die Messkammern mit den Kardiomyozyten anschließend in den Dunkelraum transportiert, in dem alle weiteren Schritte lichtgeschützt durchgeführt wurden. Nach dem Entfernen der überschüssigen Lösung wurden 250 μl Fura-2 AM appliziert und 30 Min. bei RT inkubiert. Dabei wurden jeweils 1,25 μl der pharmakologischen Substanzen, die auch den entsprechenden Versuchs-Tyrodin beigefügt waren, hinzugefügt, sodass schon während der Farbstoffinkubation die Zellen mit der gewünschten Endkonzentration des Wirkstoffs inkubiert wurden. Nach diesen vorbereitenden Schritten wurde die Messkammer mit den nun

angefärbten Kardiomyozyten in das Epifluoreszenzmikroskop eingespannt. Analog zur Konfokalmikroskopie (Kapitel 2.5.2) erfolgte auch hier vor Beginn der Messungen eine Auswaschung des überschüssigen extrazellulär verbliebenen Farbstoffs. Im Rahmen der Messungen in der Epifluoreszenzmikroskopie wurde schließlich mit den zwei Protokollen (Superfusions-Protokoll & Mediumaustausch-Protokoll), welche auch in der Konfokalmikroskopie verwendet wurden, gearbeitet (Abbildung 16).

Pro Messkammer wurden bis zu fünf quergestreifte, rechteckige Zellen mit wenigen Granulationen in einem Zeitraum von 25 Min. gemessen. Zeitgleich erfolgte die Farbstoffinkubation der nächsten Messkammer, sodass zwischen den einzelnen Versuchsteilen ein nahtloser Übergang bestand.

Bei der Betrachtung der Kardiomyozyten mit einem 40x-vergrößernden Objektiv wurden für die Messungen diejenigen Kardiomyozyten selektiert, die bei der Stimulation mit 20 V bei einer Frequenz von 0,5 Hz mit dem Myopacer Field Stimulator (Ion Optix[®]) optisch eine regelmäßige und gleichmäßige Kontraktion aufwiesen. Die ausgewählten Zellen wurden in dem zum Setup gehörigen Programm IonWizard Version 6.4.1.73 (Ion Optix[®]) horizontal eingestellt und der Hintergrund weitestgehend ausgeblendet, sodass ausschließlich Fluoreszenzsignale der Zellen detektiert wurden. Im Anschluss wurde das Experiment im Messprogramm gestartet und die Zelle bei einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Nach Erreichen des *Steady states* (= physiologischer Gleichgewichtszustand) wurde die Messung der Zelle für mindestens 30 s weiter aufrechterhalten und dieser Abschnitt für die Auswertung systolischer Ca²⁺-Transienten verwendet. Zur Messung des SR-Ca²⁺-Gehaltes wurden sog. Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten verwendet. Zur Induktion dieser Ca²⁺-Transienten wurde die Stimulation bei laufendem Experiment gestoppt und Koffein-Tyrode im Rhythmus der vorherigen Stimulation (bei 0,5 Hz nach 2 s) mittels des Applikationsgerätes cFlow Flow Controller (Cell Micro Controls[®]) selektiv auf die zu messende Zelle appliziert. Somit wurde gewährleistet, dass die Messung SR-Ca²⁺-Gehaltes von dem normalen Niveau des diastolischen SR-Ca²⁺-Levels ausging. Nach einer erfolgten Koffeinapplikation wurde die Kammer im Superfusions-Protokoll für mindestens 5 Min. superfundiert, bevor die nächste Koffeinmessung erfolgte. Im Mediumaustausch-Protokoll fand an dieser Stelle ein Auswaschungsprozess und anschließend eine Applikation frischer Tyrode der jeweiligen Versuchsgruppe statt.

Eine Messspur von mindestens 10 s wurde nach jeder gemessenen Zelle von einer danebenliegenden zellfreien Fläche aufgezeichnet, um später das Hintergrundfluoreszenzsignal vom Gesamtsignal subtrahieren zu können.

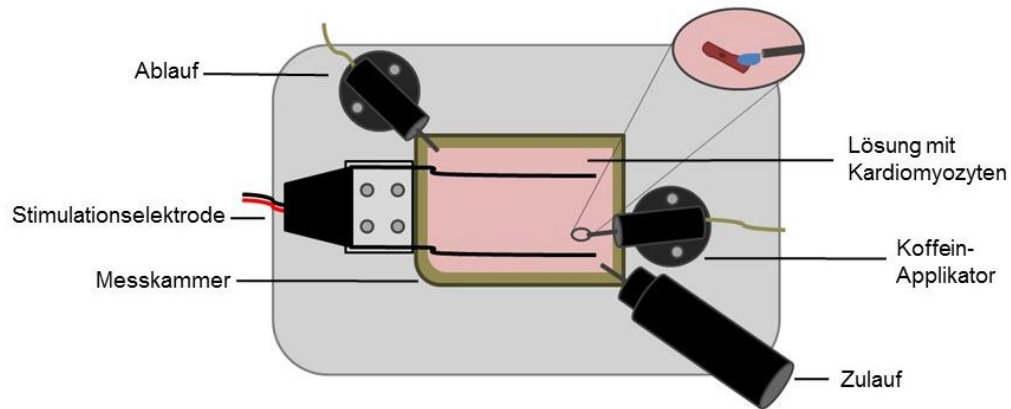


Abbildung 16: Versuchsaufbau der Epifluoreszenzmikroskopie (Superfusions-Protokoll)

2.6.3 Datengenerierung und Datenauswertung der Messungen von systolischen sowie Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten

Die während der Messungen aufgezeichneten Messspuren des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals (*Numerator* $F_{340\text{nm}}$ (= Zähler; Ca^{2+} -gebundener Zustand), *Denominator* $F_{380\text{nm}}$ (= Nenner; Ca^{2+} -freier Zustand), *Ratio* $F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$ (= Verhältnis)) der jeweiligen Zelle wurden am Messcomputer in einer Datei pro Zelle im .zpt Format abgespeichert und alle Dateien der einzelnen Messstage mit der Computer-Software IonWizard Version 6.4.1.73 (Ion Optix[®]) ausgewertet. Dabei wurde das Hintergrundfluoreszenzsignal zunächst herausgerechnet und anschließend die Einzelwerte der systolischen Ca^{2+} -Transienten sowie der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten kalkuliert.

Alle Rohdaten wurden in Microsoft Excel systematisch dokumentiert und durch Importierung in GraphPad Prism[®] Version 6 (GraphPad Software, Inc.) graphisch veranschaulicht und statistisch analysiert. Folgende, in Tabelle 9 dargestellten Parameter wurden berücksichtigt.

Tabelle 9: Epifluoreszenz-Parameter

Baseline (bl)	Detektiertes Grundniveau des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals während der Diastole
Amplitude der systolischen Ca^{2+} -Transienten (Ampl.)	Änderung des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit zur Baseline während der Systole; Amplitude= max. Ausschlagshöhe - Baseline
Halbmaximale Relaxationszeit (t to bl 50 %)	Detektierte Zeit von maximaler Amplitude bis zum Erreichen von 50 % der Amplitudenhöhe während der Diastole
Amplitude der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten (Ampl.)	Änderung des Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit zur Baseline nach Koffein-Applikation; Amplitude= max. Ausschlagshöhe - Baseline

2.7 Pharmakologische Substanzen

Sowohl bei den Messungen mittels Konfokal- als auch mittels Epifluoreszenzmikroskopie wurde der HEPES-Tyrode in den jeweiligen Versuchsgruppen *Okadaic Acid* (Endkonzentration: 100 nM) bzw. PDP3/3m (Endkonzentration: 25 μ M) hinzugefügt. In allen Experimenten wurde zur adrenergen Stimulation der Kardiomyozyten zusätzlich Isoproterenol (Endkonzentration: 10^{-8} mol/l) der jeweiligen Versuchstyrode beigefügt. Die verwendeten pharmakologischen Substanzen werden im Folgenden tiefergehend betrachtet.

2.7.1 Okadaic Acid (OA)

Okadaic Acid (OA, Enzo Life Sciences[®], Lot. Nr. 04251363, Molekulargewicht: 805.0 g/mol, gelöst in 100 % DMSO), auch Halochondrine A oder 9,10-Deepithio-9,10-didehydroacanthifolicin ($C_{44}H_{68}O_{13}$) genannt, ist ein natürlich vorkommendes Polyether-Toxin, welches von marinen Dinoflagellaten produziert wird und als Phosphatase-Inhibitor die PP2A sowie PP1 inhibiert (Bialojan und Takai 1988; Cohen et al. 1989; Haystead et al. 1989). Das verwendete Toxin der Firma Enzo Life Sciences[®] wurde aus dem *Dinoflagellatum Prorocentrum concavum* isoliert und aufgereinigt. Bei Konzentrationen ab 1 nM inhibiert es die PP2A aufgrund ihrer hohen Affinität zu *Okadaic Acid* vollständig, wohingegen die PP1 erst ab 15 nM inhibiert wird (Cohen et al. 1989). Im Vergleich hierzu reagiert die PP2B weniger sensitiv auf *Okadaic Acid*, die PP2C wird nicht von *Okadaic Acid* beeinflusst (Bialojan und Takai 1988). Des Weiteren führt eine Applikation von *Okadaic Acid* auch zu einer Inhibition der PP4 sowie der PP5 und möglicherweise auch der PP6 (Swingle et al. 2007). Die Strukturformel von *Okadaic Acid* ist in Abbildung 17 dargestellt.

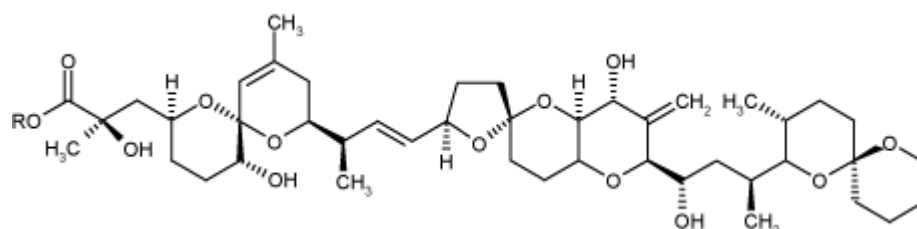


Abbildung 17: Okadaic Acid-Strukturformel (http://static.enzolifesciences.com/fileadmin/files/formula/350-003_1_01.gif, Zugriff am 24.04.2016)

2.7.2 PP1-Disrupting Peptides 3/3m (PDP3/3m)

PP1-Disrupting Peptide 3 (PDP3, SiChem GmbH, SC-0100-001, Molekulargewicht: 3016,61 g/mol, gelöst in 10 % DMSO/ddH₂O) ist ein künstlich hergestelltes, zellpermeables Peptid aus 23 Aminosäuren, welches mit bestimmten *Phosphatase-Interacting-Proteins* um eine Bindung an der PP1 mittels des sog. RVxF-Motivs konkurriert und diese bei erfolgreicher Bindung durch eine Blockierung der inhibitorischen PIP:PP1-Interaktionen selektiv aktivieren kann. Die dabei entstehende stabile Wechselwirkung des Peptids mit der Phosphatase

kommt durch eine kovalente Bindung zwischen dem L-4-Benzophenylalanin (Bpa) des PDP3 und dem Methionin 290 der PP1 zustande (Chatterjee et al. 2012).

Eine Aktivierung der PP2A erfolgt nicht (Reither et al. 2013). Das Peptid weist eine gute Zellpermeabilität sowie eine hohe intrazelluläre Stabilität auf. Eine generelle unspezifische Zytotoxizität besteht nicht. Lediglich bei sehr langen Inkubationszeiten kann es durch eine übermäßige PP1-Aktivierung zu einer Zytotoxizität kommen (Chatterjee et al. 2012).

Als inaktives Kontrollpeptid wurde das *PP1-Disrupting Peptide 3m* (PDP3m, SiChem GmbH, SC-0101-001, Molekulargewicht: 2912,46 g/mol, gelöst in 10 % DMSO/ddH₂O) verwendet, welches sich in der Aminosäurestruktur nur durch eine RATA-Mutation zum PDP3 unterscheidet, aufgrund welcher es nicht an die PP1 binden kann (Chatterjee et al. 2012).

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Zellpermeabilitätsexperimente wurde zum Nachweis einer Zellpenetration die 5-Carboxyfluorescein(FAM)-gebundene Form des Peptids PDP3 (FAM-PDP3) eingesetzt und die zelluläre Aufnahme des Peptids mittels Konfokalmikroskopie detektiert. Die Zellpenetrationsfähigkeiten von FAM-PDP3 und FAM-PDP3m unterscheiden sich dabei nicht (Chatterjee et al. 2012).

Tabelle 10: Aminosäuresequenzen von PDP3/3m (Chatterjee et al. 2012)

Peptid	Aminosäuresequenz	Molekulargewicht in g/mol
PDP3	NH ₂ - RRRKRPKRKRKNARVTF (Bpa) EAAEII - COOH	3016,61
PDP3m	NH ₂ - RRRKRPKRKRKNARATA (Bpa) EAAEII - COOH	2912,46

2.7.3 Isoproterenol (DL-Isoproterenol-Hydrochlorid)

Isoproterenol (Sigma-Aldrich[®], Lot. Nr. BCBL3043V, Molekulargewicht: 247,73 g/mol) ist ein Noradrenalin-derivat, welches eine Anwendung als Sympathikomimetikum findet. Die Summenformel lautet C₁₁H₁₇NO₃HCl. Alle fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden bei einer Isoproterenol-Konzentration von 10⁻⁸ mol/l durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Tyrode angesetzt (Tabelle 11), welcher 5 µl Salzsäure (HCl, 32 %) sowie 50 mg Ascorbinsäure (Sigma[®], Lot. Nr. 076K0042) beigefügt wurden. Von der erhaltenen sog. ASC-Tyrode (Tabelle 12) wurden nun 100 µl mit 1 mmol/l DL-Isoproterenol-Hydrochlorid (Tabelle 13) vermischt, um zunächst eine Isoproterenol-Lösung mit einer Konzentration von 10⁻⁵ mol/l zu erhalten. Durch eine weitere Verdünnung von 1:1.000 mit der Versuchstyrode, ergab sich eine Endkonzentration von 10⁻⁸ mol/l.

Tabelle 11: Tyrode (angesetzt mit 1.000 ml ddH₂O) bei pH-Wert 7,54 bei RT zur Herstellung der Isoproterenol-Lösung

Substanz	Molekulargewicht in g/mol	Konzentration in mmol/l
NaCl	58,44	140
KCl	74,56	4
MgCl ₂	95,21	1
HEPES	238,31	5
Glucose	180,16	10
Koffein	194,20	10

Tabelle 12: ASC-Tyrode (angesetzt mit 1.000 ml der Tyrode) zur Herstellung der Isoproterenol-Lösung

Substanz	
HCl (32 %)	5 µl
Ascorbinsäure	50 mg

Tabelle 13: 1 mmol/l DL-Isoproterenol-Hydrochlorid

Substanz	Molekulargewicht in g/mol	Konzentration in mol/l
Isoproterenol	247,73	1

2.7.4 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich[®], Lot. Nr. BCBC5888V) ist ein organisches Lösungsmittel der Klasse der Sulfoxide. Es hat die Summenformel C₂H₆OS. DMSO ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar und wirkt als sog. Penetrationsverstärker, d. h. es begünstigt die Membranpermeabilität und den Transport gelöster Substanzen über biologische Membranen (Brayton 1986). Dieser Effekt wurde sich in dieser Arbeit bei der Lösung von *Okadaic Acid* sowie den Farbstoffen Fluo-3 AM und Fura-2 AM zunutze gemacht. Da DMSO viele weitere Effekte auf zellulärer Ebene aufweist (De Menorval et al. 2012; Jacob und Herschler 1986; Santos et al. 2003), wurde es in den gleichen Konzentrationen auch der Kontroll-Versuchstyrode beigefügt, um nicht Wirkstoff-spezifische, verfälschende Effekte auszuschließen.

2.8 Statistische Datenauswertung

Alle erhobenen Daten wurden in Microsoft Excel systematisch dokumentiert und durch Importierung in GraphPad Prism[®] Version 6 (GraphPad Software, Inc.) graphisch veranschaulicht sowie statistisch analysiert. Im folgenden Ergebnisteil sind die erhobenen Messwerte als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (= *standard error of the mean* = S.E.M. = SEM) dargestellt. Dieser wurde wie folgt berechnet:

$$\text{S. E. M.} = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Formel 4: Standardfehler des Mittelwerts; S.E.M.: Standardfehler des Mittelwerts, n: Anzahl, σ^2 : Varianz, σ : Standardabweichung

Der ungepaarte Student's t-Test wurde für die Gegenüberstellung von Daten zweier Gruppen verwendet. Eine Ausnahme bildeten hierbei die Messdaten des Experimentes zur Zellpenetrationstestung des FAM-PDP3, bei welchem, wie bereits in Kapitel 2.5.5 beschrieben, der gepaarte Student's t-Test zur Anwendung kam.

Als statistisch signifikant wurde in beiden Fällen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

Alle statistischen Tests wurden auf Grundlage der Zahlenwerte der Originaldaten durchgeführt. Zur Gewährleistung der Übersichtlichkeit wurden im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit die Zahlenwerte der Originaldaten auf die erste bzw. zweite Nachkommastelle gerundet. Für durchgeführte Vergleiche der Zahlenwerte zweier Experimentgruppen wurden jedoch stets die nicht gerundeten Zahlenwerte der Originaldaten berücksichtigt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten der verwendeten humanen Herzen

Tabelle 14: Zusammenstellung klinischer Daten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Herzen

	Kardiale Hypertrophie mit erhaltener linksven- trikulärer EF	Terminale Herzinsuffizienz
Anzahl der Patienten (N)	9	25
Männliches Geschlecht (%)	55,6	88,0
Alter (Mittelwert \pm SEM, Jahre)	74,4 \pm 2,3	55,6 \pm 2,2
EF (Mittelwert \pm SEM, %)	53,6 \pm 2,8	20,3 \pm 1,9
LVEDD (Mittelwert \pm SEM, mm)	k.A.	65,1 \pm 2,2
AVA (Mittelwert \pm SEM, cm ²)	0,7 \pm 0,1	k.A.
P _{mean} (Mittelwert \pm SEM, mmHg)	51,1 \pm 6,2	k.A.
Ischämische Herzerkrankung (%)	55,6	56,0
LVAD (%)	0	41,7
Diabetes Typ 2 (%)	22,2	12,0
ACE-Hemmer (%)	44,4	37,5
β -Blocker (%)	66,7	95,8
Diuretika (%)	88,9	91,7
Digoxin (%)	0	45,8
Katecholamine (%)	0	4,2
Amiodaron (%)	11,1	33,3
AT1-Rezeptor-Antagonisten (%)	0	20,8
Aldosteron-Antagonisten (%)	11,1	66,7
PDE-Hemmer (%)	0	25,0
Ca ²⁺ -Kanal-Blocker (%)	11,1	0

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Myokard von insgesamt 34 Patienten zur Durchführung der in Kapitel 2 dargestellten Experimente verwendet (Tabelle 14). Hierbei handelte es sich um Gewebe von neun Patienten mit kardialer Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF sowie von 25 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz. In der Gruppe der kardialer Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF waren 55,6 % der Patienten männlichen Geschlechts, in der terminalen Herzinsuffizienz waren es 88,0 % der Patienten. Die Patienten mit kardialer Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF waren dabei mit einem Alter von durchschnittlich $74,4 \pm 2,3$ Jahren deutlich älter als die Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz, welche ein durchschnittliches Alter von $55,6 \pm 2,2$ Jahren aufwiesen. Die kardi-ale Ejektionsfraktion der Patienten mit kardialer Hypertrophie war zudem mit $53,6 \pm 2,8$ % nur minimal unter den Normalbereich (>55 %) erniedrigt, wohingegen die kardi-ale Ejektionsfraktion der Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz mit $20,3 \pm 1,9$ % hochgradig eingeschränkt war. Auch war bei den Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz der linksventri- kuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) mittelgradig auf $65,1 \pm 2,2$ mm erhöht. In der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF zeigten die Patienten dage-

gen eine hochgradige Aortenklappenstenose bei einer durchschnittlichen Aortenklappenöffnungsfläche (AVA) von $0,7 \pm 0,1 \text{ cm}^2$ und einem mittleren Druckgradienten (P_{mean}) von $51,1 \pm 6,2 \text{ mmHg}$. Der Anteil ischämischer Herzerkrankungen war mit 55,6 % bei den Patienten mit kardialer Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und 56,0 % bei den Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz in etwa gleich. Von den Patienten mit terminalen Herzinsuffizienz trugen 41,7 % ein implantiertes linksventrikuläres Unterstützungssystem (LVAD). Zudem lag bei 22,2 % der Patienten mit kardialer Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und 12,0 % der Patienten mit terminalen Herzinsuffizienz ein Diabetes mellitus Typ 2 vor. Die durchschnittliche Medikation der einzelnen Patientenkohorten bei der Erkrankung ist ebenfalls in Tabelle 14 dargestellt.

3.2 Ca^{2+} -Homöostase in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz

3.2.1 Diastolisches SR- Ca^{2+} -Leck

Die Untersuchung der diastolischen Undichtigkeit des sarkoplasmatischen Retikulums, sprich des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks, erfolgte in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz an frisch isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten mittels Konfokalmikroskopie (Abbildung 18).

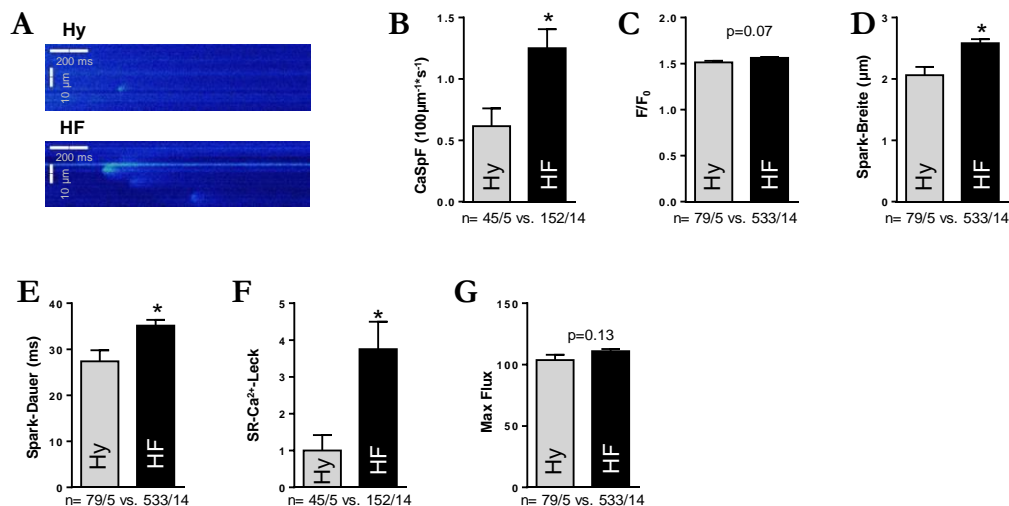


Abbildung 18: Vergleich des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF (Hy) und der terminalen Herzinsuffizienz (HF) mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM). A: Repräsentative konfokale Linescans humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten. B-G: Mittelwerte der spontanen Ca^{2+} -Spark-Frequenz (CaSpF), der Ca^{2+} -Spark-Amplitude (F/F_0), der Ca^{2+} -Spark-Breite, der Ca^{2+} -Spark-Dauer, des gesamt kalkulierten SR- Ca^{2+} -Lecks sowie des maximalen Ca^{2+} -Flusses aus dem SR (Max Flux) im Rahmen auftretender Ca^{2+} -Sparks (n Zellen/Herzen= 45/5 vs. 152/14). *= $p < 0,05$.

Hierbei zeigte sich in der terminalen Herzinsuffizienz eine im Vergleich zur kardialen Hypertrophie um $103 \pm 26 \%$ erhöhte spontane Ca^{2+} -Spark-Frequenz ($1,3 \pm 0,2$ vs. $0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen= 152/14 vs. 45/5, Abbildung 18 B). Des Weiteren

wurde eine starke Tendenz hinsichtlich einer höheren Amplitude der aufgezeichneten diastolischen Ca^{2+} -*Sparks* in der terminalen Herzinsuffizienz detektiert ($1,6 \pm 0,01$ vs. $1,5 \pm 0,02$, $p=0,07$, n *Sparks*/Herzen= 533/14 vs. 79/5, Abbildung 18 C). Auch die Ca^{2+} -*Spark*-Größe war in der terminalen Herzinsuffizienz erhöht. So war dort die Ca^{2+} -*Spark*-Breite um $25 \pm 3 \%$ ($2,6 \pm 0,1$ vs. $2,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $p<0,01$, n *Sparks*/Herzen= 533/14 vs. 79/5, Abbildung 18 D), die Ca^{2+} -*Spark*-Dauer um $28 \pm 5 \%$ ($35,2 \pm 1,3$ vs. $27,4 \pm 2,4$ ms, $p<0,05$, n *Sparks*/Herzen= 533/14 vs. 79/5, Abbildung 18 E) im Vergleich zur kardialen Hypertrophie erhöht. Diese Parameter resultierten in einer etwa dreifachen Erhöhung des kalkulierten diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks um insgesamt $275 \pm 75 \%$ ($p<0,05$, n Zellen/Herzen= 152/14 vs. 45/5, Abbildung 18 F) verglichen mit der kardialen Hypertrophie. Der maximale Ca^{2+} -Fluss aus dem SR (Max Flux) im Rahmen auftretender Ca^{2+} -*Sparks* war in der terminalen Herzinsuffizienz nicht signifikant verändert. Dennoch zeigte sich eine Tendenz hinsichtlich eines im Vergleich zur kardialen Hypertrophie erhöhten Max Flux ($p=0,13$, n *Sparks*/Herzen= 533/14 vs. 79/5, Abbildung 18 G).

Somit bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten insgesamt eine im Verlauf der Entstehung der Herzinsuffizienz zunehmende Störung der diastolischen RyR2-Dichtigkeit, wie sie in der Literatur vorbeschrieben ist (Fischer et al. 2013).

3.2.2 Systolische Ca^{2+} -Freisetzung und SR- Ca^{2+} -Gehalt

Mittels Epifluoreszenzmikroskopie wurde die systolische Ca^{2+} -Freisetzungskinetik sowie der SR- Ca^{2+} -Gehalt in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz ebenfalls an frisch isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten untersucht. Abbildung 19 A zeigt repräsentative Originalaufnahmen stimulierter systolischer Ca^{2+} -Transienten sowie Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten zur Messung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes.

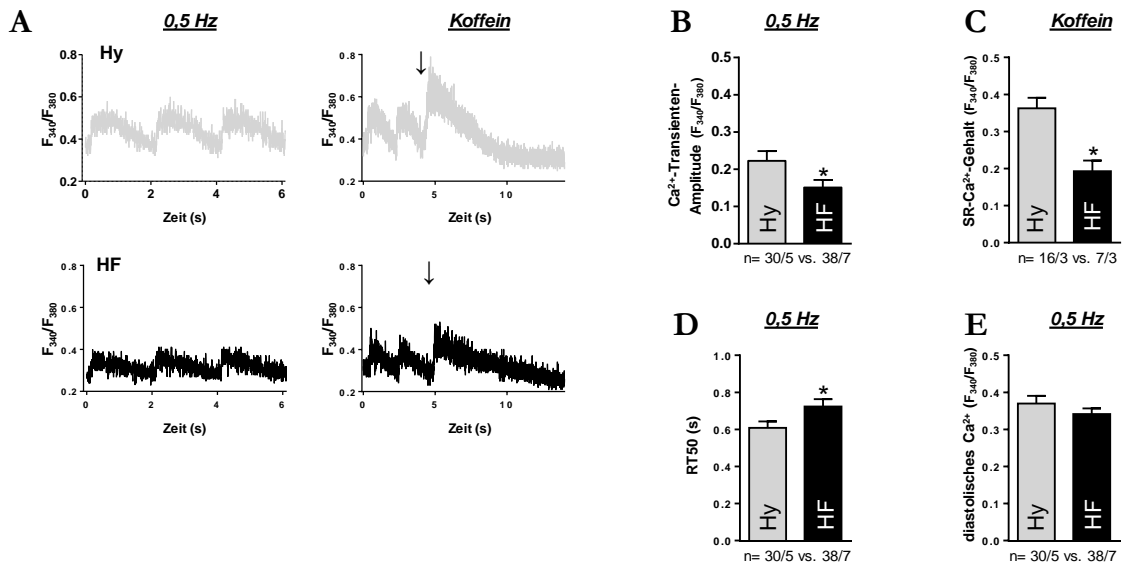


Abbildung 19: Vergleich der systolischen Ca^{2+} -Freisetzungskinetik sowie des SR- Ca^{2+} -Gehaltes in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF (Hy) und der terminalen Herzinsuffizienz (HF) mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Fura-2 AM). A: Repräsentative Originalaufnahmen stimulierter Ca^{2+} -Transienten (0,5 Hz) sowie Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten (Pfeil symbolisiert Koffein-Applikation). B: Mittelwerte der Amplitude stimulierter Ca^{2+} -Transienten (n Zellen/Herzen= 30/5 vs. 38/7). C: Mittelwerte der Amplitude Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten (n Zellen/Herzen= 16/3 vs. 7/3). D: Mittelwerte der halbmaximalen Relaxationszeit (RT50, n Zellen/Herzen= 30/5 vs. 38/7). E: Mittelwerte des diastolischen Ca^{2+} -Gehaltes (n Zellen/Herzen= 30/5 vs. 38/7). * = $p < 0,05$.

Die Amplitude stimulierter systolischer Ca^{2+} -Transienten war hierbei in der terminalen Herzinsuffizienz um $32 \pm 9 \%$ im Vergleich zur kardialen Hypertrophie erniedrigt (F_{340}/F_{380} : $0,15 \pm 0,02$ vs. $0,22 \pm 0,03$, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen= 38/7 vs. 30/5, Abbildung 19 B). Des Weiteren zeigte sich in der terminalen Herzinsuffizienz ein signifikanter Anstieg der halbmaximalen Eliminationszeit (RT50) um $19 \pm 7 \%$, folglich eine verlangsamte Wiederaufnahme des zytosolischen Ca^{2+} in das SR ($0,72 \pm 0,04$ vs. $0,61 \pm 0,03$ s, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen= 38/7 vs. 30/5, Abbildung 19 D). Ein signifikanter Unterschied des diastolischen Ca^{2+} -Gehaltes konnte nicht nachgewiesen werden ($0,34 \pm 0,02$ vs. $0,37 \pm 0,02$, $p = 0,26$, n Zellen/Herzen= 38/7 vs. 30/5, Abbildung 19 E). Dagegen war die Amplitude Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten in der terminalen Herzinsuffizienz im Vergleich zur kardialen Hypertrophie um $47 \pm 8 \%$ erniedrigt (F_{340}/F_{380} : $0,19 \pm 0,03$ vs. $0,36 \pm 0,03$, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen= 7/3 vs. 16/3, Abbildung 19 C). Somit ließ sich insgesamt ein verminderter SR- Ca^{2+} -Gehalt in der terminalen Herzinsuffizienz nachweisen.

3.3 Auswirkungen der PP1- und PP2A-Inhibition auf das diastolische SR- Ca^{2+} -Leck und die Frequenz arrhythmischer Ereignisse in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz

3.3.1 Diastolisches SR- Ca^{2+} -Leck in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF

Zur Messung des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks unter PP1- und PP2A-Inhibition wurden 100 nmol/l *Okadaic Acid* in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF auf frisch isolierte linksventrikuläre Kardiomyozyten appliziert.

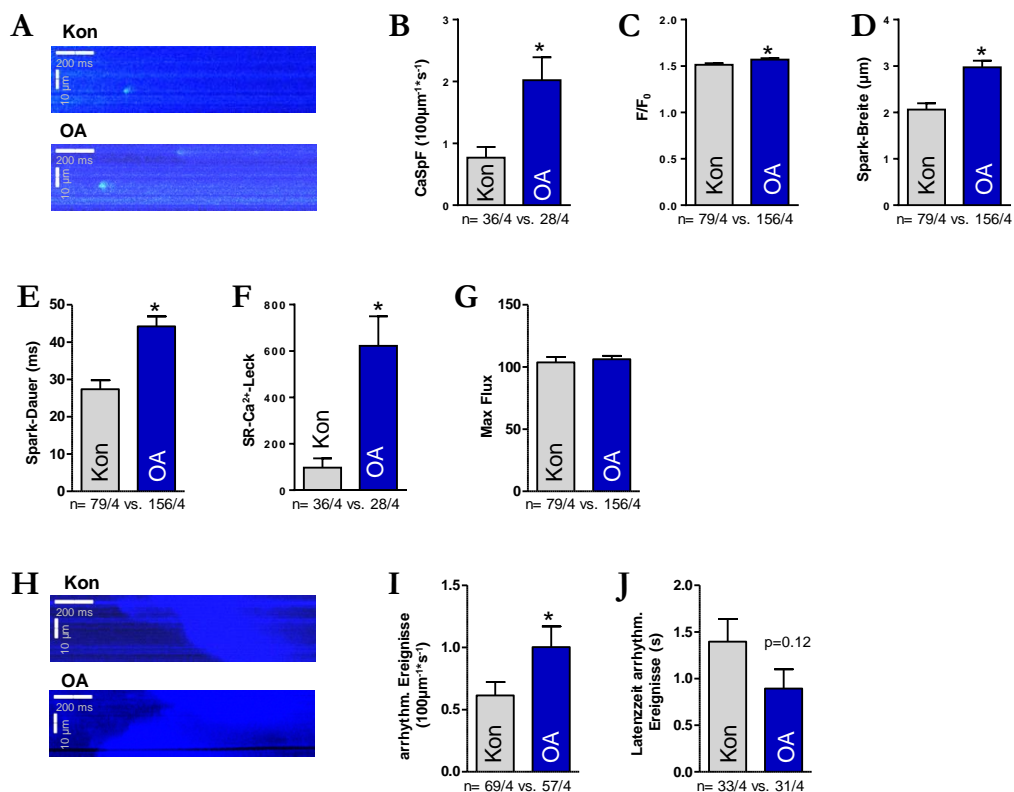


Abbildung 20: Analyse des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks unter PP1- und PP2A-Inhibition mittels 100 nmol/l Okadaic Acid (OA) in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM). A: Repräsentative konfokale Linescans humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten der Kontroll- (Kon) und Interventionsgruppe (OA). B-G: Mittelwerte der spontanen Ca^{2+} -Spark-Frequenz (CaSpF), der Ca^{2+} -Spark-Amplitude (F/F_0), der Ca^{2+} -Spark-Breite, der Ca^{2+} -Spark-Dauer, des gesamt kalkulierten SR- Ca^{2+} -Lecks sowie des maximalen Ca^{2+} -Flusses aus dem SR (Max Flux) im Rahmen auftretender Ca^{2+} -Sparks (n Zellen/Herzen= 36/4 vs. 28/4). H: Repräsentative konfokale Linescans arrhythmischer Ereignisse. I-K: Mittelwerte der Frequenz, der Latenzzeit sowie der Amplitude (F/F_0) arrhythmischer Ereignisse (n Zellen/Herzen= 69/4 vs. 57/4). *= $p < 0,05$.

Es zeigte sich in der Konfokalmikroskopie ein Anstieg der Ca^{2+} -Spark-Frequenz um $162 \pm 22\%$ verglichen zur unbehandelten Kontrolle ($2,0 \pm 0,4$ vs. $0,8 \pm 0,2 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen= 28/4 vs. 36/4, Abbildung 20 B). Die Ca^{2+} -Spark-Amplitude war unter Phosphatase-Inhibition um $4 \pm 1\%$ ebenfalls signifikant erhöht ($1,6 \pm 0,02$ vs. $1,5 \pm 0,02$,

$p < 0,05$, n *Sparks*/Herzen = 156/4 vs. 79/4, Abbildung 20 C). Ebenso verhielt es sich bei der Ca^{2+} -*Spark*-Breite (Anstieg um 44 ± 7 %, $3,0 \pm 0,1$ vs. $2,1 \pm 0,1$ μm , $p < 0,0001$, n *Sparks*/Herzen = 156/4 vs. 79/4, Abbildung 20 D) sowie der Ca^{2+} -*Spark*-Dauer (Anstieg um 61 ± 10 %, $44,2 \pm 2,7$ vs. $27,4 \pm 2,4$ ms, $p < 0,0001$, n *Sparks*/Herzen = 156/4 vs. 79/4, Abbildung 20 E). Insgesamt resultierte hieraus ein fünf-fach höheres SR- Ca^{2+} -Leck durch die Inhibition der Phosphatasen PP1 und PP2A (Anstieg um 540 ± 131 %, $p < 0,0001$, n Zellen/Herzen = 28/4 vs. 36/4, Abbildung 20 F) im Vergleich zur Kontrolle. Der Max Flux zeigte sich unverändert ($p = 0,60$, n *Sparks*/Herzen = 156/4 vs. 79/4, Abbildung 20 G).

Des Weiteren wurden während der Messungen spontan auftretende, nicht-stimulierte Ca^{2+} -Transienten, Ca^{2+} -Wellen und Ca^{2+} -*Spark*-Wellen als zelluläre arrhythmische Ereignisse klassifiziert und quantifiziert (Abbildung 20 H). Die Frequenz dieser arrhythmischen Ereignisse war dabei unter *Okadaic Acid*-Applikation um 63 ± 27 % signifikant erhöht ($1,0 \pm 0,2$ vs. $0,6 \pm 0,1$ $\mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen = 57/4 vs. 69/4, Abbildung 20 I). Auch wurde die Latenzzeit zwischen dem letzten stimulierten Ca^{2+} -Transienten und dem Auftreten der arrhythmischen Ereignisse gemessen. In der kardialen Hypertrophie zeigte sich hierbei eine Tendenz hinsichtlich eines früheren Auftretens arrhythmischer Ereignisse unter Phosphatase-Inhibition (Abfall um 36 ± 15 %, $0,9 \pm 0,2$ vs. $1,4 \pm 0,2$ s, $p = 0,13$, n Zellen/Herzen = 31/4 vs. 33/4, Abbildung 20 J).

3.3.2 Diastolisches SR- Ca^{2+} -Leck in der terminalen Herzinsuffizienz

In der terminalen Herzinsuffizienz wurden in der Konfokalmikroskopie zur Messung des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks unter PP1- und PP2A-Inhibition ebenfalls 100 nmol/l *Okadaic Acid* auf frisch isolierte linksventrikuläre Kardiomyozyten appliziert.

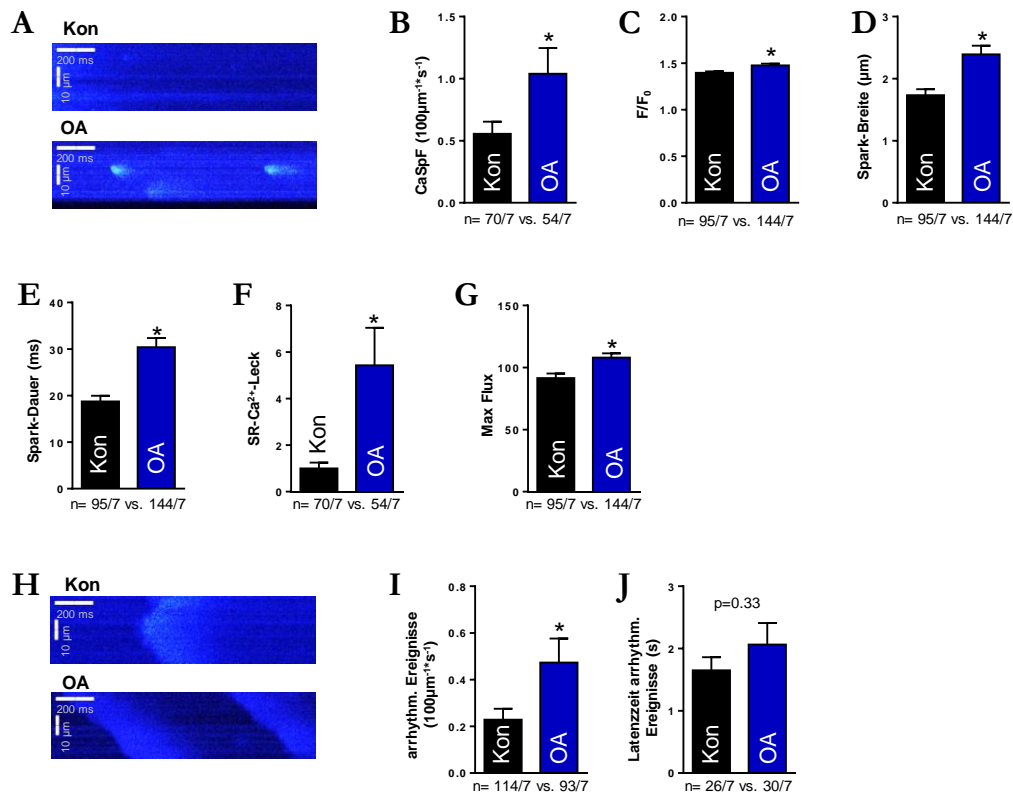


Abbildung 21: Analyse des diastolischen SR-Ca²⁺-Lecks unter PP1- und PP2A-Inhibition mittels 100 nmol/l Okadaic Acid (OA) in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM). A: Repräsentative konfokale Linescans humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten der Kontroll- (Kon) und Interventionsgruppe (OA). B-G: Mittelwerte der spontanen Ca²⁺-Spark-Frequenz (CaSpF), der Ca²⁺-Spark-Amplitude (F/F₀), der Ca²⁺-Spark-Breite, der Ca²⁺-Spark-Dauer, des gesamt kalkulierten SR-Ca²⁺-Lecks sowie des maximalen Ca²⁺-Flusses aus dem SR (Max Flux) im Rahmen auftretender Ca²⁺-Sparks (n Zellen/Herzen= 70/7 vs. 54/7). H: Repräsentative konfokale Linescans arrhythmischer Ereignisse. I-K: Mittelwerte der Frequenz, der Latenzzeit sowie der Amplitude (F/F₀) arrhythmischer Ereignisse (n Zellen/Herzen= 114/7 vs. 93/7). *= p<0,05.

Hierbei zeigte sich, wie in der kardialen Hypertrophie, ein signifikanter Anstieg der Ca²⁺-Spark-Frequenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Anstieg um 115 ± 43 %, 1,0 ± 0,2 vs. 0,5 ± 0,2 µm⁻¹s⁻¹, p<0,05, n Zellen/Herzen= 54/7 vs. 70/7, Abbildung 21 B). Ebenso war auch in der terminalen Herzinsuffizienz die Amplitude der Ca²⁺-Sparks nach Phosphatase-Inhibition erhöht (Anstieg um 6 ± 1 %, 1,5 ± 0,02 vs. 1,4 ± 0,01, p<0,01, n Sparks/Herzen= 144/7 vs. 95/7, Abbildung 21 C). Auch die Ca²⁺-Spark-Breite (Anstieg um 38 ± 8 %, 2,4 ± 0,1 vs. 1,7 ± 0,1 µm, p<0,001, n Sparks/Herzen= 144/7 vs. 95/7, Abbildung 21 D) sowie die Ca²⁺-Spark-Dauer (Anstieg um 62 ± 10 %, 30,4 ± 1,9 vs. 18,8 ± 1,2 ms, p<0,0001, n Sparks/Herzen= 144/7 vs. 95/7, Abbildung 21 E) waren unter *Okadaic Acid*-Applikation erhöht. Folglich resultierte auch in der terminalen Herzinsuffizienz die PP1- und PP2A-Inhibition in einer starken Erhöhung des diastolischen SR-Ca²⁺-Lecks (Anstieg um 443 ± 61 %, p<0,0001, n Zellen/Herzen= 54/7 vs. 70/7, Abbildung 21 F) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Max Flux zeigte sich unter Phosphatase-Inhibition signifikant erhöht (p<0,01, n Sparks/Herzen= 144/7 vs. 95/, Abbildung 21 G).

Zusätzlich wurde auch in der terminalen Herzinsuffizienz das spontane Auftreten zellulärer arrhythmischer Ereignisse quantifiziert (Abbildung 21 H). Unter *Okadaic Acid*-Applikation zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Frequenz arrhythmischer Ereignisse um $107 \pm 45 \%$ im Vergleich zur Kontrolle ($0,5 \pm 0,10$ vs. $0,2 \pm 0,05 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen = 93/7 vs. 114/7, Abbildung 21 I). Die Latenzzeit bis zum Auftreten zellulärer arrhythmischer Ereignisse blieb in der terminalen Herzinsuffizienz durch die Phosphatase-Inhibition unbeeinflusst ($2,1 \pm 0,3$ vs. $1,7 \pm 0,2$ s, $p = 0,33$, n Zellen/Herzen = 30/7 vs. 26/7, Abbildung 21 J).

3.4 Auswirkungen der PP1- und PP2A-Inhibition auf die systolische Ca^{2+} -Freisetzung und den SR- Ca^{2+} -Gehalt in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz

3.4.1 Systolische Ca^{2+} -Freisetzung und SR- Ca^{2+} -Gehalt in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF

Die Auswirkungen der Inhibition der PP1 und PP2A auf die systolische Ca^{2+} -Freisetzung sowie den SR- Ca^{2+} -Gehalt wurden an frisch isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit kardialer Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF mittels epifluoreszenzmikroskopischer Messungen unter Applikation von 100 nmol/l *Okadaic Acid* analysiert (Abbildung 22).

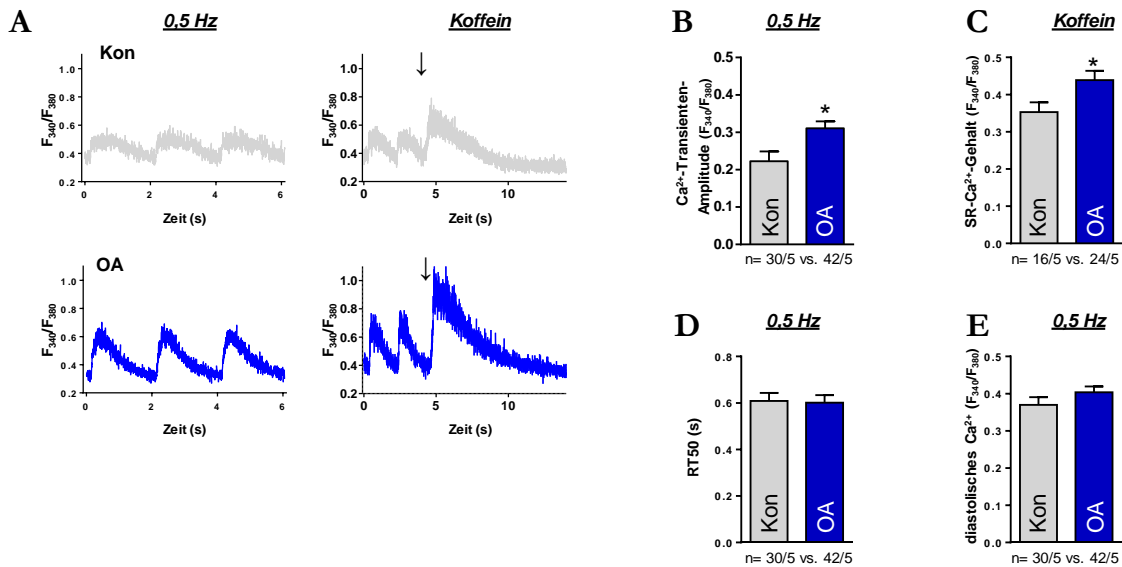


Abbildung 22: Analyse der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung sowie des SR- Ca^{2+} -Gehaltes unter PP1- und PP2A-Inhibition mittels 100 nmol/l Okadaic Acid (OA) in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Fura-2 AM). A: Repräsentative Originalaufnahmen stimulierter Ca^{2+} -Transienten (0,5 Hz) sowie Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten (Pfeil symbolisiert Koffein-Applikation) in der Kontroll- (Kon) sowie Interventionsgruppe (OA). B: Mittelwerte der Amplitude stimulierter Ca^{2+} -Transienten (n Zellen/Herzen= 30/5 vs. 42/5). C: Mittelwerte der Amplitude Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten (n Zellen/Herzen= 16/5 vs. 24/5). D: Mittelwerte der halbmaximalen Relaxationszeit (RT50, n Zellen/Herzen= 30/5 vs. 42/5). E: Mittelwerte des diastolischen Ca^{2+} -Gehaltes (n Zellen/Herzen= 30/5 vs. 42/5). * = $p < 0,05$.

Unter Phosphatase-Inhibition zeigte sich hierbei ein signifikanter Anstieg der Amplitude stimulierter systolischer Ca^{2+} -Transienten um $40 \pm 8 \%$ verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe (F_{340}/F_{380} : $0,31 \pm 0,02$ vs. $0,22 \pm 0,03$, $p < 0,001$, n Zellen/Herzen= 42/5 vs. 30/5, Abbildung 22 B). Die halbmaximale Eliminationszeit blieb in der kardialen Hypertrophie nach *Okadaic Acid*-Applikation unverändert (RT50, $0,60 \pm 0,03$ vs. $0,61 \pm 0,03$ s, $p = 0,88$, n Zellen/Herzen= 42/5 vs. 30/5, Abbildung 22 D). Zudem zeigte sich eine Tendenz hinsichtlich eines höheren diastolischen Ca^{2+} -Spiegels nach Applikation von *Okadaic Acid* ($0,40 \pm 0,015$ vs. $0,37 \pm 0,02$, $p = 0,18$, n Zellen/Herzen= 42/5 vs. 30/5, Abbildung 22 E). Die Amplitude koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten war in der kardialen Hypertrophie durch Phosphatase-Inhibition signifikant um $24 \pm 7 \%$ erhöht (F_{340}/F_{380} : $0,44 \pm 0,03$ vs. $0,35 \pm 0,04$, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen= 24/5 vs. 16/5, Abbildung 22 C). Insgesamt lässt sich somit unter PP1- und PP2A-Inhibition eine Erhöhung der Amplitude systolische Ca^{2+} -Transienten sowie des SR- Ca^{2+} -Gehaltes in der kardialen Hypertrophie nachweisen.

3.4.2 Systolische Ca^{2+} -Freisetzung und SR- Ca^{2+} -Gehalt in der terminalen Herzinsuffizienz

Auch in der terminalen Herzinsuffizienz wurden die Auswirkungen auf die systolische Ca^{2+} -Freisetzung sowie den SR- Ca^{2+} -Gehalt durch Inhibition der PP1 und PP2A mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 23).

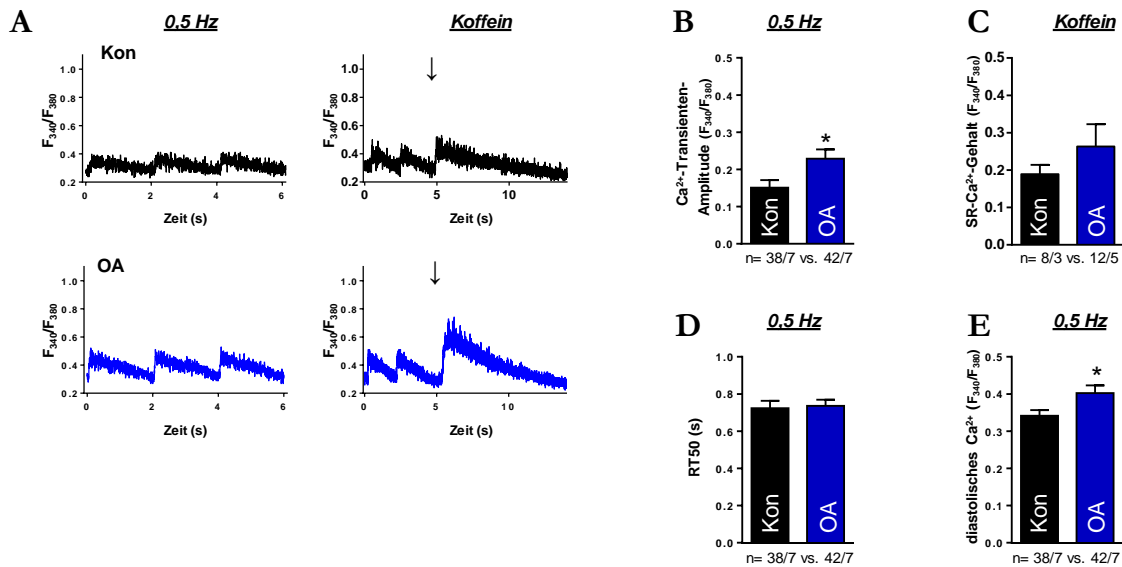


Abbildung 23: Analyse der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung sowie des SR- Ca^{2+} -Gehaltes unter PP1- und PP2A-Inhibition mittels 100 nmol/l Okadaic Acid (OA) in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Fura-2 AM). A: Repräsentative Originalaufnahmen stimulierter Ca^{2+} -Transienten (0,5 Hz) sowie Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten (Pfeil symbolisiert Koffein-Applikation) in der Kontroll- (Kon) sowie Interventionsgruppe (OA). B: Mittelwerte der Amplitude stimulierter Ca^{2+} -Transienten (n Zellen/Herzen= 38/7 vs. 42/7). C: Mittelwerte der Amplitude Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten (n Zellen/Herzen= 8/3 vs. 12/5). D: Mittelwerte der halbmaximalen Relaxationszeit (RT50, n Zellen/Herzen= 38/7 vs. 42/7). E: Mittelwerte des diastolischen Ca^{2+} -Gehaltes (n Zellen/Herzen= 38/7 vs. 42/7). * = $p < 0,05$.

Dabei kam es unter Applikation von *Okadaic Acid* zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude um $52 \pm 16 \%$ verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe (F_{340}/F_{380} : $0,23 \pm 0,02$ vs. $0,15 \pm 0,02$, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen= 42/7 vs. 38/7, Abbildung 23 B). Die halbmaximale Eliminationszeit blieb auch in der terminalen Herzinsuffizienz durch die Phosphatase-Inhibition unbeeinflusst (RT50, $0,74 \pm 0,03$ vs. $0,72 \pm 0,04$ s, $p = 0,82$, n Zellen/Herzen= 42/7 vs. 38/7, Abbildung 23 D). Zudem kam es in der terminalen Herzinsuffizienz zu einem signifikanten Anstieg des diastolischen Ca^{2+} -Spiegels durch PP1- und PP2A-Inhibition ($0,40 \pm 0,02$ vs. $0,34 \pm 0,02$, $p < 0,05$, n Zellen/Herzen= 42/7 vs. 38/7, Abbildung 23 E) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Amplitude koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten war unter Phosphatase-Inhibition in der terminalen Herzinsuffizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht (F_{340}/F_{380} : $0,26 \pm 0,06$ vs. $0,19 \pm 0,03$, $p = 0,34$, n Zellen/Herzen= 12/5 vs. 8/3, Abbildung 23 C). Somit lässt sich in der terminalen Herzinsuffizienz unter PP1- und PP2A-Inhibition eine Erhöhung der Amplitude systolische Ca^{2+} -Transienten bei gleichzeitig unverändertem SR- Ca^{2+} -Gehalt nachweisen.

3.5 Zellpenetrationstestung des PP1-aktivierenden 5-Carboxy-Fluorescein(FAM)-gebundenen Peptides PDP3

Die Testung der zellulären Permeabilität des selektiven PP1-Aktivators *PP1-Disrupting Peptide 3* (PDP3) wurde durch konfokalmikroskopische Messungen der Fluoreszenzintensität

der 5-Carboxy-Fluorescein(FAM)-gebundenen Form des Peptids PDP3 (FAM-PDP3) in humanen frisch isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die zelluläre Autofluoreszenz einer Zelle gemessen und anschließend mit der Fluoreszenzintensität derselben Zelle nach 60-minütiger Inkubation mit 25 $\mu\text{mol/l}$ FAM-PDP3 verglichen. Repräsentative licht- sowie konfokalmikroskopische Originaldarstellungen der verwendeten Zellen befinden sich in Abbildung 24 A.

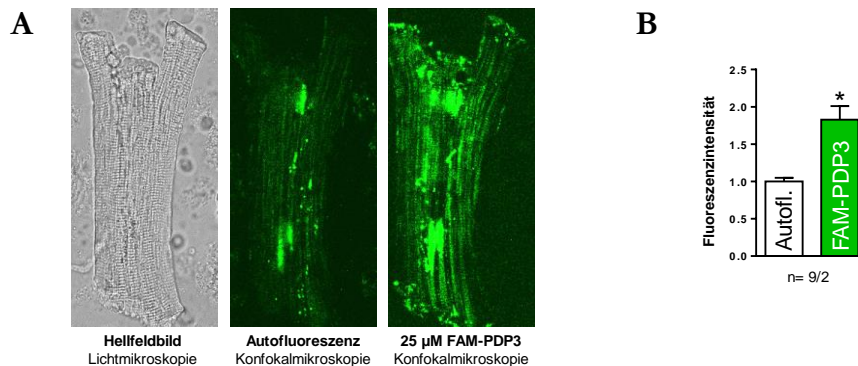


Abbildung 24: Nachweis der zellulären Permeabilität des selektiven PP1-Aktivators PP1-Disrupting Peptide 3 (PDP3) anhand konfokalmikroskopischer Messungen der Fluoreszenzintensität der 5-Carboxy-Fluorescein(FAM)-gebundenen Form des Peptids (FAM-PDP3) in humanen frisch isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten. A: Repräsentative Abbildungen der humanen linksventrikulären Kardiomyozyten mittels Licht- sowie Konfokalmikroskopie. B: Mittelwerte der Fluoreszenzintensität vor (Autofluoreszenz) sowie nach 60-minütiger Inkubation mit 25 $\mu\text{mol/l}$ FAM-PDP3 derselben Zellen (n Zellen/Herzen= 9/2). * = $p < 0,05$.

Insgesamt zeigte sich nach 60-minütiger Inkubation mit 25 $\mu\text{mol/l}$ FAM-PDP3 und einem anschließenden Auswaschungsprozess des extrazellulär verbliebenen FAM-PDP3 nahezu eine Verdopplung der zellulären Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Autofluoreszenz derselben Zellen (Anstieg um $83 \pm 18 \%$, $p < 0,001$, n Zellen/Herzen= 9/2, Abbildung 24 B). Dieser Anstieg der Fluoreszenzintensität spiegelt eine Akkumulation des FAM-PDP3 im Zellinneren wider und weist somit die Zellpermeabilität des PDP3 in humanen ventrikulären Kardiomyozyten nach.

3.6 Auswirkungen der PP1-Aktivierung auf das diastolische SR- Ca^{2+} -Leck und die Frequenz arrhythmischer Ereignisse in der terminalen Herzinsuffizienz

Zur Analyse des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks unter PP1-Aktivierung wurden in der terminalen Herzinsuffizienz 25 $\mu\text{mol/l}$ PDP3 auf frisch isolierte linksventrikuläre Kardiomyozyten appliziert. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten, welche eine Applikation des inaktiven PDP3m in der gleichen Konzentration erfuhren. Tatsächlich zeigte der Vergleich der PDP3m-Gruppe mit unbehandelten Kontrollzellen keinen Unterschied in der Ca^{2+} -Spark-Frequenz ($2,2 \pm 0,4$ vs. $1,8 \pm 0,3 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$, $p = 0,43$, n Zellen/Herzen= 44/5 vs. 67/5, Abbildung 25 B), dem SR- Ca^{2+} -Leck ($p < 0,71$, n Zellen/Herzen= 44/5 vs. 67/5, Abbildung 25 C)

und dem Max Flux ($p=0,75$, n *Sparks*/Herzen= 276/5 vs. 349/5, Abbildung 25 D). Somit erscheint die PDP3m-Gruppe als eine geeignete Kontrollgruppe.

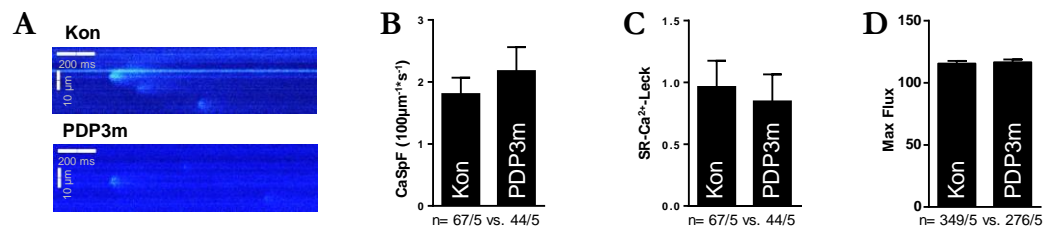


Abbildung 25: Analyse des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks unter Einfluss des inaktiven Peptides PDP3m in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM). A: Repräsentative konfokale Linescans humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten der Kontroll- (Kon) und Interventionsgruppe (PDP3m). B-D: Mittelwerte der spontanen Ca^{2+} -Spark-Frequenz (CaSpF), des gesamt kalkulierten SR- Ca^{2+} -Lecks sowie des maximalen Ca^{2+} -Flusses aus dem SR (Max Flux) im Rahmen auftretender Ca^{2+} -Sparks (n Zellen/Herzen= 67/5 vs. 44/5). *= $p<0,05$.

Nach Applikation des aktiven PDP3 zeigte sich in der Konfokalmikroskopie eine um $36 \pm 11\%$ signifikant erniedrigte Ca^{2+} -Spark-Frequenz ($1,4 \pm 0,3$ vs. $2,2 \pm 0,3 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$, $p<0,05$, n Zellen/Herzen= 56/8 vs. 61/8, Abbildung 26 B) im Vergleich zu PDP3m. Auch die Amplitude diastolischer Ca^{2+} -Sparks war signifikant vermindert (Abfall um $6 \pm 1\%$, $1,5 \pm 0,01$ vs. $1,6 \pm 0,01$, $p<0,0001$, n *Sparks*/Herzen= 236/8 vs. 397/8, Abbildung 26 C). Zudem zeigte sich durch die PP1-Aktivierung eine erniedrigte Ca^{2+} -Spark-Breite (Abfall um $23 \pm 2\%$, $1,9 \pm 0,1$ vs. $2,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $p<0,0001$, n *Sparks*/Herzen= 236/8 vs. 397/8, Abbildung 26 D) sowie Ca^{2+} -Spark-Dauer (Abfall um $32 \pm 2\%$, $22,0 \pm 0,8$ vs. $32,1 \pm 1,1$ ms, $p<0,0001$, n *Sparks*/Herzen= 236/8 vs. 397/8, Abbildung 26 E). Diese Änderungen resultierten in der terminalen Herzinsuffizienz in einem signifikant erniedrigten diastolischen SR- Ca^{2+} -Leck, welches insgesamt nach PDP3-Applikation um $74 \pm 6\%$ im Vergleich zur PDP3m-Gruppe verringert war ($p<0,01$, n Zellen/Herzen= 56/8 vs. 61/8, Abbildung 26 F). Darüber hinaus zeigte sich auch der Max Flux unter PP1-Aktivierung signifikant vermindert ($p<0,0001$, n *Sparks*/Herzen= 236/8 vs. 397/8, Abbildung 26 G).

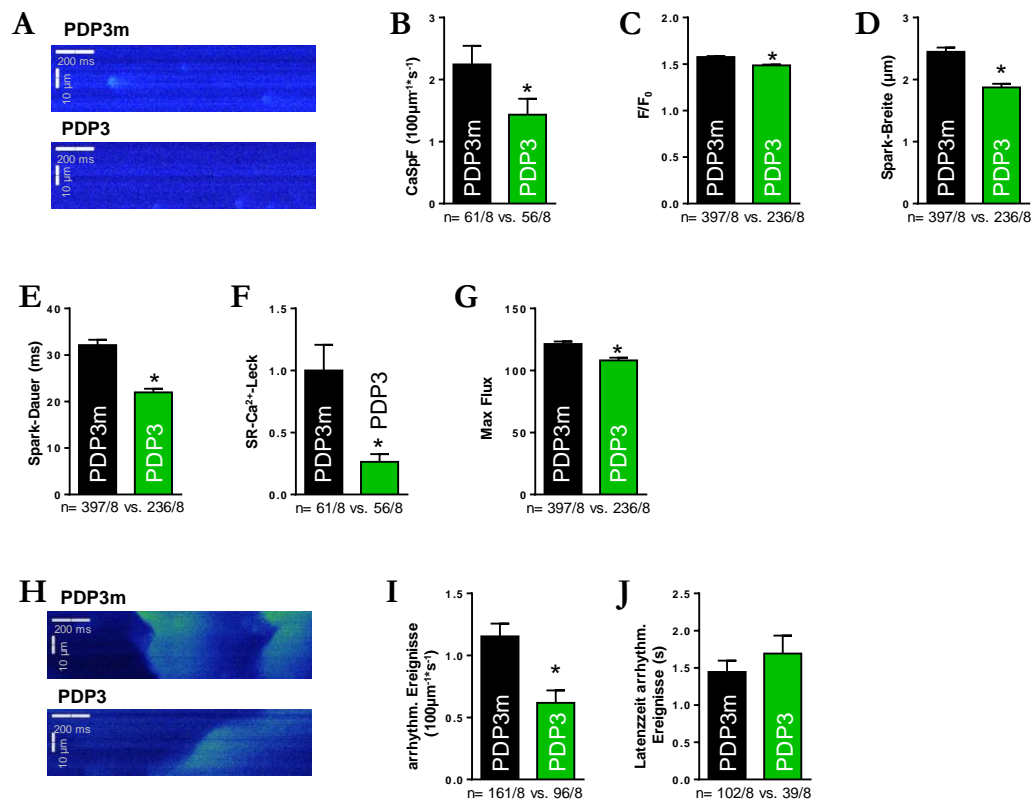


Abbildung 26: Analyse des diastolischen SR-Ca²⁺-Lecks unter PP1-Aktivierung mittels 25 µmol/l PDP3 in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Konfokalmikroskopie (Fluo-3 AM). A: Repräsentative konfokale Linescans humaner linksventrikulärer Kardiomyozyten der Kontroll- (PDP3m) und Interventionsgruppe (PDP3). B-G: Mittelwerte der spontanen Ca²⁺-Spark-Frequenz (CaSpF), der Ca²⁺-Spark-Amplitude (F/F₀), der Ca²⁺-Spark-Breite, der Ca²⁺-Spark-Dauer, des gesamt kalkulierten SR-Ca²⁺-Lecks sowie des maximalen Ca²⁺-Flusses aus dem SR (Max Flux) im Rahmen auftretender Ca²⁺-Sparks (n Zellen/Herzen= 61/8 vs. 56/8). H: Repräsentative konfokale Linescans arrhythmischer Ereignisse. I-K: Mittelwerte der Frequenz, der Latenzzeit sowie der Amplitude (F/F₀) arrhythmischer Ereignisse (n Zellen/Herzen= 161/8 vs. 96/8). * = p<0,05.

Zudem wurde auch unter PDP3-Applikation das spontane Auftreten zellulärer arrhythmischer Ereignisse quantifiziert. Hierbei war die Frequenz arrhythmischer Ereignisse unter PP1-Aktivierung signifikant vermindert (Abfall um 46 ± 9 %, 0,6 ± 0,1 vs. 1,2 ± 0,1 µm⁻¹·s⁻¹, p<0,001, n Zellen/Herzen= 96/8 vs. 161/8, Abbildung 26 I). Die Latenzzeit bis zum Auftreten zellulärer arrhythmischer Ereignisse wurde in der terminalen Herzinsuffizienz nicht durch die PP1-Aktivierung beeinflusst (1,7 ± 0,2 vs. 1,4 ± 0,2 s, p=0,40, n Zellen/Herzen= 39/8 vs. 102/8, Abbildung 26 J).

3.7 Auswirkungen der PP1-Aktivierung auf die systolische Ca^{2+} -Freisetzung und den SR- Ca^{2+} -Gehalt in der terminalen Herzinsuffizienz

Die Auswirkungen der Aktivierung der PP1 mittels Applikation von 25 $\mu\text{mol/l}$ PDP3 auf die systolische Ca^{2+} -Freisetzung sowie den SR- Ca^{2+} -Gehalt wurden an frisch isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 27).

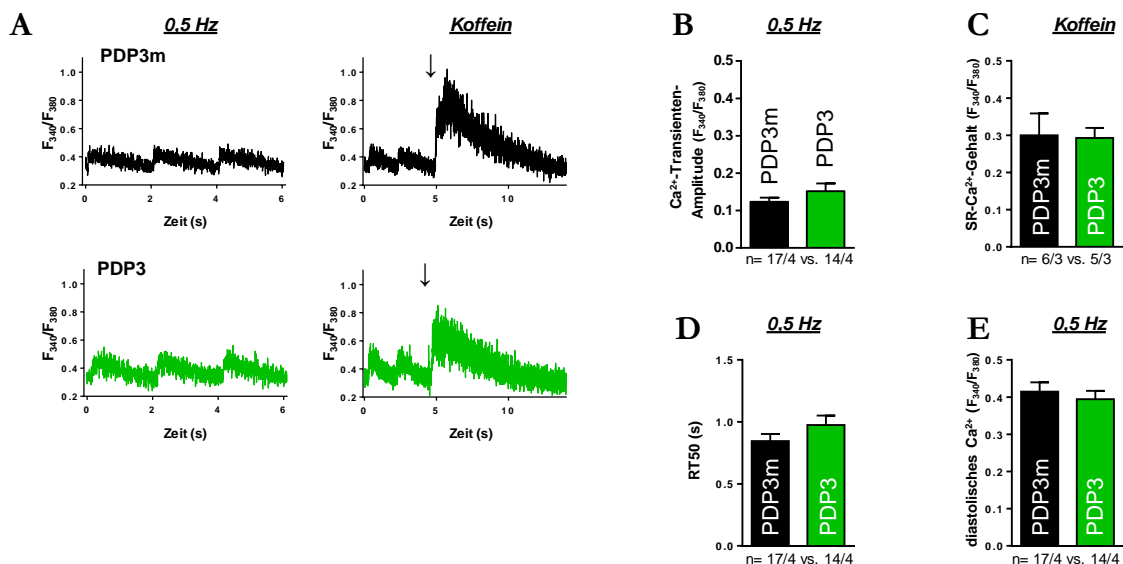


Abbildung 27: Analyse der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung sowie des SR- Ca^{2+} -Gehaltes unter PP1-Aktivierung mittels 25 $\mu\text{mol/l}$ PDP3 in der terminalen Herzinsuffizienz mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Fura-2 AM). A: Repräsentative Originalaufnahmen stimulierter Ca^{2+} -Transienten (0,5 Hz) sowie Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten (Pfeil symbolisiert Koffein-Applikation) in der Kontroll- (PDP3m) sowie Interventionsgruppe (PDP3). B: Mittelwerte der Amplitude stimulierter Ca^{2+} -Transienten (n Zellen/Herzen= 17/4 vs. 14/4). C: Mittelwerte der Amplitude Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten (n Zellen/Herzen= 6/3 vs. 5/3). D: Mittelwerte der halbmaximalen Relaxationszeit (RT50, n Zellen/Herzen= 17/4 vs. 14/4). E: Mittelwerte des diastolischen Ca^{2+} -Gehaltes (n Zellen/Herzen= 17/4 vs. 14/4). * = $p < 0,05$.

Hierbei zeigte sich unter PDP3-Applikation keine signifikante Änderung der systolischen Ca^{2+} -Transienten-Amplitude im Vergleich zur PDP3m-Gruppe (F_{340}/F_{380} : $0,15 \pm 0,02$ vs. $0,12 \pm 0,01$, $p=0,22$, n Zellen/Herzen= 14/4 vs. 17/4, Abbildung 27 B). Auch die halbmaximale Relaxationszeit blieb von der PDP3-Applikation unbeeinflusst (RT50, $0,97 \pm 0,08$ vs. $0,85 \pm 0,06$ s, $p=0,18$, n Zellen/Herzen= 14/4 vs. 17/4, Abbildung 27 D). Ebenso zeigten sich keine signifikanten Änderungen des diastolischen Ca^{2+} -Gehaltes nach PP1-Aktivierung ($0,39 \pm 0,02$ vs. $0,41 \pm 0,02$, $p=0,56$, n Zellen/Herzen= 14/4 vs. 17/4, Abbildung 27 E). Auch die Amplituden Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten offenbarten keine Alterationen nach PDP3-Applikation (F_{340}/F_{380} : $0,29 \pm 0,03$ vs. $0,30 \pm 0,06$, $p=0,92$, n Zellen/Herzen= 5/3 vs. 6/3, Abbildung 27 C).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Experimenten in der Konfokal- sowie Epifluoreszenzmikroskopie eine Vielzahl von Auswirkungen der Modulation der kardialen Serin/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A auf die Ca^{2+} -Homöostase in der menschlichen Herzerkrankung aufgezeigt werden. Hierbei resultierte die Inhibition der PP1 und PP2A in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF sowie der terminalen Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene in einer Erhöhung des proarrhythmogenen diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks sowie der Frequenz zellulärer arrhythmischer Ereignisse. Zudem zeigte sich in diesem Kontext eine erhöhte Amplitude stimulierter Ca^{2+} -Transienten sowie ein lediglich in der kardialen Hypertrophie erhöhter SR- Ca^{2+} -Gehalt. Interessanterweise führte die Aktivierung der PP1 in der Herzinsuffizienz zu einer starken Reduktion des SR- Ca^{2+} -Lecks sowie der Frequenz zellulärer arrhythmischer Ereignisse, ohne sich hierbei auf die Amplitude oder Kinetik der Ca^{2+} -Transienten auszuwirken. Somit stellt die kardiale Aktivierung der PP1 einen interessanten Mechanismus für eine potenzielle Entwicklung neuer pharmakologischer antiarrhythmischer Therapien dar.

4.1 Vergleich des Ca^{2+} -Stoffwechsels in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz

Zunächst konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass das SR- Ca^{2+} -Leck in der terminalen Herzinsuffizienz im Vergleich zur kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF trotz vermindertem SR- Ca^{2+} -Gehalt signifikant erhöht ist, welches eine sehr stark eingeschränkte Dichtigkeit der RyR2 in der Progression der menschlichen Herzerkrankung vermuten lässt. Diese resultierte folglich auch in einer Verminderung der stimulierten systolischen Ca^{2+} -Transienten-Amplitude in der terminalen Herzinsuffizienz. Die Ergebnisse zeigen somit einen in der Herzinsuffizienz stark beeinträchtigten Ca^{2+} -Stoffwechsel und stimmen mit einer Publikation unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2013 überein (Fischer et al. 2013). Die Verminderungen der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude sowie des SR- Ca^{2+} -Gehaltes bedingen hierbei, bezogen auf die Gesamtfunktion des Herzens, eine Verminderung der kardialen Pumpfunktion in der Herzinsuffizienz. Das erhöhte SR- Ca^{2+} -Leck bildet die Basis einer erhöhten Arrhythmieeigung in der Herzinsuffizienz.

Zurückzuführen sind die funktionellen Änderungen in der Herzinsuffizienz unter anderem auf Änderungen der Proteinexpression sowie der Proteinphosphorylierung. Bereits im Jahr 2010 konnte unsere Arbeitsgruppe die Ergebnisse einer Vorarbeit von Kirchhefer et al. aus dem Jahr 1999 bestätigen und aufzeigen, dass die Expression der CaMKII in humanem insuffizienten Myokard erhöht ist (Kirchhefer et al. 1999; Sossalla et al. 2010). Folglich nimmt auch die CaMKII-abhängige Phosphorylierung der RyR2 an Position Serin 2815 im Rahmen der Transition von der kardialen Hypertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz stark zu

(Fischer et al. 2013). Dementsprechend führte eine durch Fischer et al. im Jahr 2013 durchgeführte Inhibition der CaMKII zu einer Reduktion des proarrhythmogenen SR- Ca^{2+} -Lecks. Gestützt werden diese Ergebnisse durch weitere Studien, welche zeigen, dass die Hyperphosphorylierung der RyR2 durch die CaMKII zu einer Erhöhung des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks führt (Kohlhaas et al. 2006; Maier et al. 2003; Sag et al. 2009; Sossalla et al. 2010; Toischer et al. 2010; Zhang et al. 2003). Somit scheint die CaMKII eine Schlüsselrolle in der Progression von der kardialen Hypertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz einzunehmen und über die Hyperphosphorylierung der RyR2 und die daraus resultierende Disruption der Ca^{2+} -Homöostase für die erhöhte Arrhythmieneigung und die Verminderung der linksventrikulären Pumpfunktion in der Herzinsuffizienz mitverantwortlich zu sein.

Interessanterweise fanden Fischer et al. zudem heraus, dass die Transition von der kardialen Hypertrophie zur terminalen Herzinsuffizienz nicht mit Änderungen der Phosphorylierung an der PKA-assoziierten Position Serin 2809 an den RyR2 einhergeht (Fischer et al. 2013). Somit führte auch eine PKA-Inhibition in der terminalen Herzinsuffizienz nicht zu einer Reduktion des SR- Ca^{2+} -Lecks (Fischer et al. 2013). Dies legt offen, dass die PKA-abhängige Phosphorylierung der RyR2 zumindest in der terminalen Herzinsuffizienz nicht mehr mechanistisch relevant ist.

Weiterhin zeigte die Studie aus dem Jahr 2013 auf, dass sich der Phosphorylierungsstatus der RyR2 sowohl an der CaMKII- als auch der PKA-assoziierten Position in der kardialen Hypertrophie nicht signifikant von dem einer gesunden Kontrollgruppe unterscheidet. Zudem führte eine in diesem Kontext durchgeführte Inhibition beider Proteinkinasen in der kardialen Hypertrophie jeweils zu einer Reduktion des SR- Ca^{2+} -Lecks (Fischer et al. 2013). Somit scheinen beide Proteinkinasen in die Regulation der RyR2 in der kardialen Hypertrophie eingebunden zu sein. Hierbei scheint ein physiologisches Zusammenspiel beider Proteinkinasen zu existieren, welches im Rahmen der Transition zur terminalen Herzinsuffizienz verloren geht.

Darüber hinaus spielt auch die verminderte Expression der SERCA2a eine wichtige Rolle als weiterer relevanter Mechanismus, der zu den aufgezeigten funktionellen Änderungen in der Herzinsuffizienz führt. Hierdurch entsteht eine verlangsamte diastolische Ca^{2+} -Elimination, welche folglich zu einer Verminderung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes sowie einer Erhöhung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration beiträgt (Fischer et al. 2013; Hasenfuss 1998; Mercadier et al. 1990). Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings keine Erhöhung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration in der Herzinsuffizienz detektiert werden. Diese ist jedoch in der Literatur vorbeschrieben (Fischer et al. 2013).

Insgesamt unterstützen die erhobenen Daten dieser Arbeit die von Fischer et al. 2013 postulierten Zusammenhänge und lassen sich im Kontext der dort durchgeführten molekularen biologischen Experimente gut verstehen. Zudem stützen sie die Hypothese einer positiven Korrelation zwischen der linksventrikulären Ejektionsfraktion und dem SR- Ca^{2+} -Gehalt (Lindner et al. 1998). Hierbei ist anzunehmen, dass eine in der terminalen Herzinsuffizienz

vorliegende Erhöhung des SR- Ca^{2+} -Lecks über eine diastolische Depletion der SR- Ca^{2+} -Speicher, einen gesteigerten Ca^{2+} -Ionen-Transport nach extrazellulär durch den NCX sowie über eine verminderte Expression der SERCA2a zu einer Verminderung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes führt. Diese Ergebnisse stimmen auch mit verschiedenen Arbeiten an Tiermodellen überein (Ai et al. 2005; Belevych et al. 2011; Maier et al. 2003; Sag et al. 2011).

4.2 Auswirkungen der PP1- und PP2A-Inhibition auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF und der terminalen Herzinsuffizienz

Die Phosphatase-Inhibition resultierte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten in der kardialen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer EF sowie der terminalen Herzinsuffizienz in einer Erhöhung des diastolischen SR- Ca^{2+} -Lecks und konsekutiv in einer Erhöhung der Frequenz zellulärer arrhythmischer Ereignisse. Zudem konnte eine erhöhte Amplitude stimulierter systolischer Ca^{2+} -Transienten in beiden Erkrankungen sowie eine Erhöhung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes in der kardialen Hypertrophie detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Phosphatase-Inhibition in beiden Erkrankungen zu einer gesteigerten zellulären Arrhythmie neigung führt. Gleichzeitig spricht die erhöhte Amplitude stimulierter systolischer Ca^{2+} -Transienten sowie die Erhöhung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes in der kardialen Hypertrophie für eine, trotz eines vermehrten diastolischen Ca^{2+} -Verlustes, verstärkte diastolische Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR sowie einen potenziell positiv inotropen Wirkmechanismus.

Die in diesem Kontext durchgeführte Phosphatase-Inhibition mittels *Okadaic Acid* führte bekanntlich zu einer Inhibition der beiden Phosphatasen PP1 sowie PP2A (Bialojan und Takai 1988; Cohen et al. 1989; Haystead et al. 1989). Folglich stellt sich die Frage, welche molekularen Veränderungen durch die verminderte Aktivität der jeweiligen Phosphatasen als ursächlich für die dargestellten funktionellen Änderungen zu betrachten sind.

Auf Ebene der Expressions- und Aktivitätslevel der PP1 sowie PP2A ist zunächst davon auszugehen, dass in der kardialen Hypertrophie eine Abnahme der PP2A-Expression sowie in der terminalen Herzinsuffizienz – neben der Abnahme der PP2A-Expression – auch eine Zunahme der PP1-Expression vorliegt (Eiringhaus et al. 2015; Neumann 2002; Nicolaou und Kranias 2009; Wijnker et al. 2011). Diese globalen Expressions- und Aktivitätsdaten sagen jedoch nur wenig über die jeweilige Phosphatase-Aktivität in den spezifischen subzellulären Kompartimenten aus. Im Rahmen beider Erkrankungen tritt vermutlich, verglichen mit gesundem Myokard, ein Ungleichgewicht zwischen kardialen Kinasen und Phosphatasen auf (Eiringhaus et al. 2015; Heijman et al. 2013; Wijnker et al. 2011), welches zu einer Hyperphosphorylierung von Zielproteinen wie den RyR2 führt. Eine pharmakologische Inhibition beider Phosphatasen resultiert folglich in beiden Erkrankungen in einer zusätzlichen Verschiebung dieses Ungleichgewichtes. Es entsteht ein Zustand verminderter Phosphatase- und übermäßiger Kinaseaktivität. Dieser wirkt sich, je nach subzellulärem Kompartiment,

unterschiedlich auf den Phosphorylierungsstatus der jeweiligen Zielproteine aus, was wiederum die beschriebenen funktionellen Änderungen im Ca^{2+} -Stoffwechsel bedingt. Hierbei sind die funktionellen Änderungen im Rahmen der Phosphatase-Inhibition vermutlich hauptsächlich auf veränderte Phosphorylierungen an den RyR2 sowie an Phospholamban (PLB), den beiden wichtigsten Regulationsproteinen des SR, zurückzuführen.

Das mittels Konfokalmikroskopie gemessene diastolische SR- Ca^{2+} -Leck wird dabei maßgeblich durch den Phosphorylierungsstatus der RyR2 beeinflusst. Während in die Phosphorylierung dieses Zielproteins die CaMKII und die PKA eingebunden sind, wird die Dephosphorylierung der RyR2 durch die PP1 und die PP2A vollzogen (Heijman et al. 2013; Marks et al. 2002; Marx et al. 2000). Da mehr als 70 % der physiologischen Phosphatase-Aktivität am SR auf die PP1 zurückzuführen sind, scheint diese auch im Kontext der Regulation des SR- Ca^{2+} -Lecks eine entscheidende Rolle zu spielen (Neumann 2002). Für eine PP2B-abhängige Dephosphorylierung der RyR2 gibt es keine Hinweise (Zou et al. 2011).

Die PP1 wird über die regulatorische Untereinheit Spinophilin an die RyR2 gebunden und in ihrer Aktivität verstärkt (Feng et al. 2000; Marx et al. 2001; Oliver et al. 2002). Interessanterweise bindet Spinophilin dabei nicht über das RVxF-Motiv an die PP1, sondern interagiert mit dem C-Terminus der Phosphatase und ermöglicht somit weitere Interaktionen mit anderen PIPs (Hsieh-Wilson et al. 1999; Weber et al. 2015). Diese Eigenschaften machen Spinophilin zu einem interessanten Regulationsprotein der PP1. Im Rahmen einer Studie an Spinophilin-*Knock-Out*-Mäusen (= Ausschaltung des Gens eines Proteins) konnte dessen Relevanz für den normalen Ablauf der elektromechanischen Kopplung und das physiologische kardiale Wachstum gezeigt werden. So führte ein *Knock-Out* von Spinophilin zu einer Reduktion der Kardiomyozyten-Länge und einer Erhöhung der Amplitude systolischer Ca^{2+} -Transienten bei erhaltener β -adrenerger Stimulation (Petzhold et al. 2011). Eine weitere Studie der Forschungsgruppe um Wehrens et al. zeigte zudem, dass das *Knock-Out* von Spinophilin-1 in einer stark verminderten Interaktion der PP1 mit den RyR2 resultiert, welche sich in der deutlich erhöhten Phosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-Position Serin 2814, nicht aber an der PKA-Position Serin 2808, zeigte (Chiang et al. 2014). Funktionelle Experimente offenbarten folglich eine erhöhte diastolische Offenwahrscheinlichkeit der RyR2, welche anhand einer signifikant erhöhten Ca^{2+} -*Spark*-Frequenz quantifiziert werden konnte und durch eine CaMKII-Inhibition reversibel war (Chiang et al. 2014). Insgesamt konnte aufgezeigt werden, dass eine Dysregulation der PP1-Spinophilin-Interaktion im Rahmen der pathophysiologischen Mechanismen des Vorhofflimmerns eine Rolle zu spielen scheint. Die Ergebnisse dieser Studie sind gerade im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate als besonders wertvoll zu erachten. Sie bestätigen einerseits, dass eine Inhibition der PP1-Aktivität an den RyR2 zu einer Zunahme der zellulären Arrhythmieeigung, im Sinne einer erhöhten Ca^{2+} -*Spark*-Frequenz führt, sowie andererseits, dass zusätzlich eine Erhöhung der Amplitude systolischer Ca^{2+} -Transienten resultiert. Gleichzeitig zeigen sie auf, dass die fehlende PP1-Aktivität an den RyR2 auf molekularer Ebene zu einer Potenzierung der Wirkung der CaMKII führt und erklären somit die beobachteten Veränderungen der

funktionellen Parameter beider im Rahmen dieser Arbeit betrachteten kardialen Erkrankungen unter der Applikation von *Okadaic Acid*. Die Potenzierung der Wirkung der CaMKII könnte dabei theoretisch auch durch eine verminderte Inaktivierung der CaMKII erklärt werden, da die Desphosphorylierung von Threonin 286 an der CaMKII, welche PP1-, PP2A- sowie PP2C-abhängig geschieht, im Rahmen der durchgeführten Phosphatase-Inhibition mittels *Okadaic Acid* kompromittiert sein dürfte.

Des Weiteren können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch eine vorhergehende Studie gestützt werden, welche sich mit der Regulation des endogenen PP1-Inhibitors Inhibitor-1 (I1) beschäftigt hat. So zeigten Wittköpper et al., dass eine moderate Überexpression des I1, welche folglich ebenfalls zu einer Verminderung der PP1-Aktivität führte, in einer Kontraktilitätssteigerung, einer Erhöhung der Arrhythmieneigung sowie einer erhöhten Bereitschaft zur Entwicklung einer Katecholamin-induzierten kardialen Dysfunktion mündete (Wittköpper et al. 2010). Auf molekularer Ebene resultierte die I1-Überexpression dabei in einer vermehrten Phosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-Position Serin 2815, welche funktionell zu einem erhöhten SR-Ca²⁺-Leck führte (Wittköpper et al. 2010). Ebenfalls zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung von PLB an Position Serin 16, welche vermutlich indirekt die Kontraktilität über die Steigerung der SERCA-Aktivität erhöhte (Wittköpper et al. 2010). Folglich weist auch diese indirekte Inhibition der Phosphatase-Aktivität vergleichbare Auswirkungen wie die in dieser Arbeit durchgeführte direkte Phosphatase-Inhibition mittels *Okadaic Acid* auf die kardiale Funktion sowie den Ca²⁺-Stoffwechsel auf und stützt somit die Beobachtung, dass eine erniedrigte Phosphatase-Aktivität in einer erhöhten Arrhythmieneigung resultiert.

Mechanistisch lässt sich das vermehrte Auftreten arrhythmischer Ereignisse unter Phosphatase-Inhibition aus der pathologischen Erhöhung des SR-Ca²⁺-Lecks ableiten. So kommt es durch das erhöhte SR-Ca²⁺-Leck unter Phosphatase-Inhibition zunächst zu einem Anstieg der diastolischen Ca²⁺-Konzentration. Beides konnte in den durchgeführten Experimenten der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. In der Folge resultiert durch Stimulation des Vorwärtsmodus des NCX ein Netto-Einwärtsstrom positiver Ladungen (transienter Einwärtsstrom; T_i), welcher zur Depolarisation des Membranpotenzials und Entstehung später Nachdepolarisationen führen kann.

Neben der PP1 ist auch die PP2A in die Regulation des Phosphorylierungsstatus der RyR2 eingebunden. Sie scheint hierbei jedoch eine weniger ausschlaggebende Funktion einzunehmen, da sie physiologischerweise lediglich etwa 30 % der Phosphatase-Aktivität am SR ausmacht und zudem sowohl in der kardialen Hypertrophie als auch in der Herzinsuffizienz zusätzlich in ihrer Expression vermindert ist (Heijman et al. 2013; Neumann 2002; Weber et al. 2015). Dennoch ist davon auszugehen, dass sich eine Inhibition der Restaktivität der PP2A im Rahmen beider in dieser Arbeit betrachteten Herzerkrankungen ebenfalls auf die gemessenen funktionellen Parameter des Ca²⁺-Stoffwechsels auswirkt. Während der tatsäch-

liche funktionelle Beitrag der PP2A an der menschlichen Herzerkrankung nur wenig verstanden ist, werden die physiologischen Regulationsmechanismen der PP2A zunehmend entschlüsselt. Die PP2A wird dabei über ein komplexes System regulatorischer Untereinheiten reguliert, wobei einzelne Holoenzyme entsprechend der regulatorischen Untereinheiten subzellulären Kompartimenten zugeordnet werden können und über spezifische posttranslationale Methylierung und Phosphorylierung in ihrer Zusammensetzung modifiziert werden (De Grande et al. 2013). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die regulatorische Untereinheit B56 α einen autoinhibitorischen Effekt auf die PP2A besitzt und die kardiale PP2A-Aktivität somit direkt beeinflusst (Heijman et al. 2013; Little et al. 2015). Hierbei resultierte eine experimentelle Reduktion der B56 α -Expression im Mausmodell auf 50 % des physiologischen Levels in einer erhöhten PP2A-Aktivität und folglich in einer Reduktion der spontanen Ca^{2+} -*Spark*-Frequenz sowie der Ca^{2+} -*Wave*-Frequenz (= arrhythmische, fluoreszenzmikroskopisch detektierbare Ca^{2+} -Wellen) nach β -adrenerger Stimulation (Little et al. 2015). Diese funktionellen Änderungen konnten im Rahmen der Studie von Little et al. durch eine Verminderung der Phosphorylierung der RyR2 an den Positionen Serin 2808 sowie Serin 2814 erklärt werden. Zudem konnte eine Erhöhung der Amplitude stimulierter systolischer Ca^{2+} -Transienten sowie eine Zunahme des SR- Ca^{2+} -Gehaltes durch diese indirekte PP2A-Aktivierung beobachtet werden, welche allerdings nicht auf eine Veränderung der Phosphorylierung von Phospholamban an Position Serin 16 oder Threonin 17 zurückzuführen war, sondern eher als Folge eines verminderten diastolischen Ca^{2+} -Verlustes zu betrachten ist (Little et al. 2015). Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die PP2A tatsächlich auch in die funktionelle Regulation der kardialen Ca^{2+} -Homöostase eingebunden ist und eine indirekte Aktivierung der PP2A protektive Effekte auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel bewirkt. Daher ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit durchgeführte anteilige Inhibition der PP2A mittels *Okadaic Acid* einen gegenteiligen Effekt bedingt und somit tendenziell zur Disruption des Ca^{2+} -Stoffwechsels und konsekutiv der beobachteten erhöhten zellulären Arrhythmieeigung beiträgt.

Insgesamt scheinen folglich sowohl die Verminderung der PP1- als auch der PP2A-Aktivität für die in der Konfokalmikroskopie gemessenen funktionellen Veränderungen der Ca^{2+} -*Spark*-Parameter sowie der zellulären Arrhythmieeigung im Rahmen der Phosphatase-Inhibition mittels *Okadaic Acid* funktionell relevant zu sein. Hierbei ist der Verminderung der PP1-Aktivität, aufgrund ihres erheblich größeren Anteils an der Phosphatase-Aktivität, vermutlich eine größere Rolle in der Disruption des Ca^{2+} -Stoffwechsels zuzuschreiben. Eine besondere funktionelle Relevanz scheint dabei der daraus resultierenden vermehrten Phosphorylierung der RyR2 an der CaMKII-Position zuzukommen. Dies gilt es in weiterführenden Studien zu verifizieren.

In den Mechanismus der diastolischen Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR während der Relaxation der Kardiomyozyte sind die SERCA2a und indirekt auch Phospholamban als wichtige regulatorische Proteine eingebunden. Die Steuerung der Ca^{2+} -Elimination wird dabei auf

Seite der Phosphatasen hauptsächlich durch die PP1 ausgeführt, welche über die regulatorischen Untereinheiten R_{GL} oder HSP20 an die inhibitorische SERCA2a-Untereinheit Phospholamban gebunden wird und für die Dephosphorylierung an Position Serin 16 sowie Threonin 17 verantwortlich ist (Aye et al. 2012; Berrebi-Bertrand et al. 1998). Diese führt folglich zu einer Steigerung der inhibitorischen Wirkung von Phospholamban auf die SERCA2a. Im Kontext der in dieser Arbeit durchgeführten Phosphatase-Inhibition, ist daher eine gesteigerte Phospholamban-Phosphorylierung zu erwarten, welche wiederum über eine verminderte inhibitorische Wirkung von Phospholamban zu einer Steigerung der diastolischen Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR führt (Berrebi-Bertrand et al. 1998). Durch die effektive Ca^{2+} -Elimination ist zudem eine Erhöhung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes zu erwarten, welche in der Folge auch eine gesteigerte systolische Ca^{2+} -Freisetzung, im Sinne einer erhöhten Ca^{2+} -Transienten-Amplitude, ermöglicht. Diese molekularen Mechanismen erklären die in der vorliegenden Arbeit ermittelte erhöhte Amplitude systolischer Ca^{2+} -Transienten in der kardialen Hypertrophie sowie der terminalen Herzinsuffizienz unter Phosphatase-Inhibition. Der zudem beobachtete Anstieg des SR- Ca^{2+} -Gehaltes in der kardialen Hypertrophie lässt sich durch diese Mechanismen ebenso nachvollziehen. Die fehlende Erhöhung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes in der terminalen Herzinsuffizienz kann durch die in dieser Erkrankung verminderte SERCA2a-Expression und die folglich verminderte Ca^{2+} -Transportkapazität erklärt werden (Hasenfuss 1998; Mercadier et al. 1990).

Der Beitrag der PP2A an der Regulation der SERCA2a-Aktivität ist aufgrund der geringen Aktivität der PP2A, im Vergleich zur PP1, in den betrachteten kardialen Erkrankungen maßlich als vergleichbar geringfügig anzusehen (Weber et al. 2015). Inwiefern zudem der NCX im Rahmen der diastolischen Ca^{2+} -Elimination über den Phosphorylierungsstatus reguliert wird, ist derzeit noch nicht abschließend geklärt (Heijman et al. 2013).

Somit lassen sich die ermittelten Veränderungen der funktionellen Parameter in der Epifluoreszenzmikroskopie im Rahmen der Phosphatase-Inhibition mittels *Okadaic Acid* in beiden betrachteten Erkrankungen ebenfalls auf die Inhibition der PP1 sowie der PP2A zurückführen und durch gesicherte Erkenntnisse mechanistisch gut nachvollziehen. Eine Inhibition der PP1 scheint dabei einerseits zwar zu einer Verbesserung der zellulären Kontraktilität im Sinne eines positiv inotropen Mechanismus zu führen, andererseits jedoch insgesamt keine vorteilhaften Wirkungen auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel zu haben, da sie darüber hinaus in einer erhöhten zellulären Arrhythmieeigung, einer kardialen Dysfunktion sowie einem strukturellen *Remodelling* (= Umbauprozess des kardialen Gewebes) mündet (Biesiadecki und Ziolo 2015).

Zusammenfassend betrachtet, scheint daher auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Inhibition der PP1 und PP2A das Risiko der Entwicklung kardialer Arrhythmien sowie der Progression der Herzinsuffizienz zu erhöhen und stellt daher keinen relevanten Mechanismus zur Entwicklung zukünftiger Therapieansätze für die betrachteten menschlichen

Herzerkrankungen dar. Inwiefern hingegen eine Aktivierung der PP1 eine einen wünschenswerten Therapieansatz für die menschliche Herzerkrankung darstellen kann, wird im Folgenden tiefergehend erörtert.

4.3 Auswirkungen der PP1-Aktivierung auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel in der terminalen Herzinsuffizienz

Nachdem die pharmakologische Inhibition der PP1 und PP2A in einer Steigerung der zellulären Arrhythmieneigung resultierte, stellte sich in der Folge die Frage, ob die pharmakologische Aktivierung der PP1 zu einer Reduktion der zellulären Arrhythmieneigung führt. Zur Beantwortung dieser Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine spezifische Aktivierung der PP1 im kardiovaskulären System realisiert werden. Hierfür wurde das PP1-aktivierende Peptid PDP3 verwendet (Chatterjee et al. 2012). Der erbrachte Nachweis der intrazellulären Akkumulation des Peptides PDP3 in humanen Kardiomyozyten stellt dabei die Grundlage für die Annahme dar, dass die erhobenen Ergebnisse tatsächlich durch die Modulation der PP1-Aktivität bedingt sind.

Die selektive PP1-Aktivierung resultierte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten an Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz in einer Reduktion des proarrhythmogenen diastolischen SR-Ca^{2+} -Lecks sowie der Frequenz zellulärer arrhythmischer Ereignisse. Da hierbei keine Änderungen in der Kinetik systolischer Ca^{2+} -Transienten sowie des SR-Ca^{2+} -Gehaltes auftraten, offenbaren diese Ergebnisse folglich einen protektiven Effekt der PP1-Aktivierung auf die Ca^{2+} -Homöostase, im Sinne einer Abnahme der zellulären Arrhythmieneigung, bei potenziell gleichbleibender Kontraktilität. Hierbei erscheinen primär die zugrundeliegenden Mechanismen interessant, welche auf molekularer Ebene durch die Aktivierung der PP1 die funktionell ermittelbaren Änderungen bewirken.

Das konfokalmikroskopisch detektierte diastolische SR-Ca^{2+} -Leck wird, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, vor allem durch den Phosphorylierungsstatus der RyR2 beeinflusst, welcher wiederum auf Seite der dephosphorylierenden Phosphatasen hauptsächlich durch die PP1-Aktivität reguliert wird. Die Aktivierung der PP1 mittels des Peptids PDP3 scheint hierbei vermutlich zu einer vermehrten Dephosphorylierung der entsprechenden Zielproteine Serin 2808 und Serin 2815 an den RyR2 zu führen und somit funktionell der in der Herzinsuffizienz überwiegenden Kinaseaktivität entgegenzuwirken, was wiederum in einer Stabilisierung der RyR2 resultiert. Da bekannt ist, dass eine pharmakologische Inhibition der CaMKII zu einer Reduktion des SR-Ca^{2+} -Lecks führt (Fischer et al. 2013; Sossalla et al. 2010), lässt sich folglich nachvollziehen, dass eine der CaMKII entgegenwirkende Aktivierung der PP1 ähnliche Resultate bewirken kann. Die Stabilisierung der RyR2 stellt dabei die Grundlage für ein vermindertes Auftreten arrhythmischer Ereignisse unter PP1-Aktivierung dar. Durch das verminderte diastolische SR-Ca^{2+} -Leck wird ein Anstieg der diastolischen Ca^{2+} -Konzentra-

tion und die Auslösung zellulärer arrhythmischer Ereignisse, vornehmlich später Nachdepolarisationen, verhindert. Im Rahmen pathologisch erhöhter Kinaseaktivität führt der Anstieg der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration hingegen zur Stimulation des Vorwärtsmodus des NCX, woraus ein Netto-Einwärtsstrom positiver Ladungen (transienter Einwärtsstrom; T_i) entsteht, welcher zur Depolarisation des Membranpotenzials und folglich zur Entstehung später Nachdepolarisationen führen kann (Rosen 1983; Song et al. 2008; Voigt et al. 2012). Somit lässt sich die in dem Kontext der PP1-Aktivierung beobachtete Reduktion der zellulären Arrhythmieneigung auf theoretischer Ebene gut verstehen, bedarf aber zur endgültigen Klärung der involvierten molekularen Mechanismen weiterführender Studien auf molekularbiologischer Ebene.

In den Mechanismus der diastolischen Ca^{2+} -Elimination sind als wichtige regulatorische Proteine die SERCA2a und indirekt auch Phospholamban eingebunden (siehe Kapitel 4.2). Hierbei wird die lokale Kinaseaktivität am SR in der Herzinsuffizienz vorrangig durch die PP1 antagonisiert (Aoyama et al. 2011; Neumann 2002). Bei der Betrachtung der systolischen und diastolischen Ca^{2+} -Kinetik in dieser Arbeit, zeigten sich im Rahmen der erfolgten Messungen in der Epifluoreszenzmikroskopie keinerlei Änderungen der betrachteten Parameter unter PDP3-Applikation. So waren die Amplitude systolischer Ca^{2+} -Transienten, die halbmaximale Eliminationszeit (RT50), die diastolische Ca^{2+} -Konzentration sowie der SR- Ca^{2+} -Gehalt trotz Aktivierung der PP1 unverändert. Diese Ergebnisse sind insbesondere im Hinblick auf einen möglichen zukünftigen Einsatz von PDP3 oder ähnlichen Peptiden zur Behandlung kardialer Arrhythmien als sehr interessant zu erachten, da davon auszugehen ist, dass diese bei unveränderter Ca^{2+} -Kinetik keine negativ inotropen Auswirkungen haben. Über die genauen molekularen Mechanismen, die zu diesem Phänotyp führen, lassen sich zu diesem Zeitpunkt nur Vermutungen anstellen. Eine mögliche Erklärung für die fehlenden Auswirkungen der durch die Applikation von PDP3 erfolgten PP1-Aktivierung, wäre eine unterschiedlich starke Aktivierung der verschiedenen PP1-Isoformen. Diese weisen verschiedene subzelluläre Lokalisationsspezifitäten auf, wobei die PP1 γ hauptsächlich für die Regulation der RyR2 verantwortlich zu sein scheint, während die PP1 β vor allem die SERCA2a sowie Phospholamban reguliert (Aoyama et al. 2011). In der Zellkultur konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass unter allen PP1-Isoformen, die PP1 β am stärksten in die Regulation der diastolischen Ca^{2+} -Elimination involviert zu sein scheint. So resultierte lediglich der *Knock-Down* von PP1 β (= Hinabregulation des Gens eines Proteins) in einer Erhöhung der Amplitude systolischer Ca^{2+} -Transienten sowie des SR- Ca^{2+} -Gehaltes (Aoyama et al. 2011). Eine nur geringfügige oder komplett fehlende Aktivierung der PP1 β könnte folglich die unveränderte Ca^{2+} -Kinetik unter PDP3-Applikation erklären. Für die genaue Klärung der hier zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch weitere Studien erforderlich. Zudem ist die Wirkung des PDP3 auch von der in der Herzinsuffizienz vorliegenden Bindungsaffinität der katalytischen Untereinheit der PP1 zu den jeweiligen inhibitorischen *Phosphatase-Interacting-Proteins*, also den regulatorischen Untereinheiten, abhängig. Beim Vorliegen

lokal unterschiedlicher Bindungsaffinitäten ist somit eine subzellulär unterschiedliche Verdrängung der *Phosphatase-Interacting-Proteins* durch Blockierung der RVxF-Motiv-Bindestelle an der PP1 über das RVxF-Motiv tragende PDP3-Peptid vorstellbar. Dieser theoretische Ansatz könnte somit ebenfalls die unterschiedliche subzelluläre Wirkung der durchgeführten PP1-Aktivierung erklären.

Weitere Erkenntnisse, welche für die Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in den wissenschaftlichen Kontext relevant erscheinen, wurden auf dem Gebiet der Modulation der endogenen Phosphatase-Inhibitoren gewonnen. Hierbei wurde sich vor allem auf die Regulation von Inhibitor-1 (I1) konzentriert (Weber et al. 2015). In zwei verschiedenen Studien an Inhibitor-1-*Knock-Out*-Mäusen konnte durch das Fehlen von Inhibitor-1 entweder keine oder lediglich eine geringfügige Verminderung der kardialen Kontraktilität bei gleichzeitig verminderter Antwort auf β -adrenerge Stimulation beobachtet werden (Carr et al. 2002; El-Armouche et al. 2008). Die Studie von El-Armouche et al. aus dem Jahr 2008 konnte diesbezüglich aufzeigen, dass ein Inhibitor-1-*Knock-Out* einen Schutzmechanismus gegen β -adrenerge Überstimulation darstellt, ohne dabei maladaptive Auswirkungen mit sich zu bringen. Hierbei traten durch den Inhibitor-1-*Knock-Out* keine Änderungen in dem Proteinlevel der PP1 auf, jedoch wurden Veränderungen im Phosphorylierungsstatus ihrer spezifischen Zielproteine detektiert. Somit erscheint das Fehlen von Inhibitor-1 mechanistisch mit der in dieser Arbeit durchgeführten PP1-Aktivierung vergleichbar (El-Armouche et al. 2008). Im Rahmen der Studie von El-Armouche et al. resultierte das Fehlen von Inhibitor-1 in einer verminderten Phosphorylierung der RyR2 an Position Serin 2815 sowie des Phospholambans an Position Serin 16 (El-Armouche et al. 2008). Hierbei gehen die Autoren davon aus, dass die Kombination der daraus resultierenden ineffektiveren diastolischen Ca^{2+} -Elimination und des verminderten SR- Ca^{2+} -Lecks vermutlich zu der Entstehung eines neuen Gleichgewichts von Ca^{2+} -Freisetzung und Ca^{2+} -Wiederaufnahme auf einem niedrigeren Level führt (El-Armouche et al. 2008). Diese Ergebnisse beschreiben folglich ebenfalls eine Stabilisierung der Ca^{2+} -Homöostase durch eine PP1-Modulation und stützen somit die in dieser Arbeit im Rahmen der direkten PP1-Aktivierung ermittelten Resultate. Dennoch muss beachtet werden, dass sich die beiden Mechanismen der PP1-Modulation auf molekularer Ebene deutlich unterscheiden und die Regulation der PP1 über den endogenen Inhibitor-1 komplexen Regelkreisen unterliegt, deren Dysregulation im Rahmen eines Fehlens von Inhibitor-1 noch nicht endgültig verstanden ist (Weber et al. 2015). Beide Mechanismen zur PP1-Aktivierung scheinen jedoch relevante Strategien darzustellen, um zumindest unter experimentellen Bedingungen, eine Reduktion der zellulären Arrhythmieneigung zu erzielen. Somit erscheint es konsequent, dass neben der Entwicklung weiterer Peptide zur direkten pharmakologischen Aktivierung der PP1, in den vergangenen Jahren auch Peptide zur pharmakologischen Inhibition von Inhibitor-1 entwickelt wurden (Chatterjee und Koehn 2013; Sotoud et al. 2015). Insgesamt sind die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der erstmals im kardiovaskulären System angewendeten direkten PP1-Aktivierung gut in den Kontext des bisheri-

gen Wissenstandes integrierbar. Dabei stellt die PP1-Aktivierung aufgrund ihrer antiarrhythmischen Wirkung auf zellulärer Ebene einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung zukünftiger Therapieansätze in der Behandlung kardialer Arrhythmien dar und bedarf folglich weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen.

4.4 Limitationen der Arbeit

Einen großen Vorteil der vorliegenden Arbeit stellt die Verwendung von humanem explantiertem Myokard im Rahmen der durchgeführten funktionellen Experimente dar. Somit können im Vergleich zu Experimenten an Tiermodellen unerwünschte speziesspezifische Wirkungen ausgeschlossen und eine Übertragbarkeit auf die Therapie der menschlichen Herzkrankung gewährleistet werden. Gleichzeitig ergeben sich aus der Verwendung von humanem Myokard aber auch Limitationen, da längere ischämische Phasen während des Gewebetransports und der Zellisolation die posttranslationale Modifikation von Proteinen verändern und somit zu Abweichungen der Ca^{2+} -Homöostase vom ursprünglichen Zustand führen können (Fischer et al. 2013). Dieser Tatsache wurde durch eine bestmögliche Minimierung des ischämischen Schadens nach der operativen Myokardentnahme begegnet, indem die Myokardproben zur Protektion des Gewebes schnellstmöglich in Kardioplegie transferriert und schließlich unter Kühlung transportiert wurden.

Im Rahmen funktioneller Messungen wurden in dieser Arbeit verschiedene Enzyme in ihrer Aktivität moduliert. Da sich diese Experimente lediglich über kurze Zeitspannen erstreckten, konnten nur akute Effekte der Enzym-Modulation ermittelt werden. Langzeiteffekte der jeweiligen Enzym-Modulation bleiben somit unklar und sollten Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Auch bezüglich der in dieser Arbeit angewendeten pharmakologischen Substanzen existieren einige Limitationen. So wurde das Toxin *Okadaic Acid* im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich als konzentrationsabhängiger Inhibitor der PP1 sowie PP2A betrachtet. Dennoch scheint es auch Auswirkungen auf die PP4, die PP5 sowie möglicherweise auf die PP6 zu haben (Swingle et al. 2007). Zudem kann die Verminderung der Phosphatase-Aktivität auch in pleiotropen Effekten resultieren, da die involvierten Phosphatasen in diverse zelluläre Regulationsmechanismen eingebunden sind (Chatterjee und Koehn 2013). Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit des Peptids PDP3 wurden außerdem zwei verschiedene Protokolle in den Experimenten zur Phosphatase-Inhibition (Superfusions-Protokoll) und Phosphatase-Aktivierung (Mediumaustausch-Protokoll) verwendet. Daher können Protokoll-bedingte Unterschiede der Ca^{2+} -Homöostase nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch die Interventionsgruppen der einzelnen Protokolle ausschließlich mit den Kontrollgruppen desselben Protokoll-Typs verglichen wurden, sind keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der durchgeführten Enzym-Modulation zu erwarten.

4.5 Ausblick und klinische Relevanz

Die adäquate pharmakologische Therapie der Herzinsuffizienz stellt eine große Herausforderung in der gegenwärtigen Medizin dar. Obwohl eine Vielzahl etablierter Therapieverfahren existiert, sind die Prävalenz sowie die Mortalität dieser Erkrankung immer noch sehr hoch. Seit der Einführung der β -Blocker sowie der ACE-Hemmer gegen Ende der 1990er Jahre sind, mit Ausnahme der Entwicklung des Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitors (ARNI) LCZ696 und der Verifikation dessen mortalitätsreduzierender Wirkung im Rahmen der PARADIGM-Studie im Jahre 2013, in prognostischer Hinsicht nur geringfügige Fortschritte in der Weiterentwicklung der Pharmakotherapie erzielt worden. Somit erscheinen die genaue Erschließung der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz, die Entdeckung neuer pharmakologischer Angriffspunkte sowie die Entwicklung der entsprechenden Pharmazeutika als Grundlage für eine zukünftige Verbesserung der etablierten Therapiekonzepte und eine hieraus resultierende Morbiditäts- und Mortalitätsreduktion.

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass die Entstehung der Herzinsuffizienz sowie die damit einhergehende Entwicklung kardialer Arrhythmien auf zellulärer Ebene mit einer Dysregulation des Ca^{2+} -Stoffwechsels einhergeht, welche unter anderem durch die in diesem Kontext verstärkte Proteinkinase-Aktivität der CaMKII bedingt ist (Fischer et al. 2013; Zhang et al. 2003). Diese Arbeit beleuchtet erstmalig auch die funktionelle Rolle der Gegenspieler der kardialen Proteinkinasen, sprich der Phosphatasen, hinsichtlich ihres Beitrags an der Regulation des Ca^{2+} -Stoffwechsels in der menschlichen Herzerkrankung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine selektive Aktivierung der PP1 zu einer Verringerung der zellulären Arrhythmieeigung führt, ohne dabei die systolische Ca^{2+} -Freisetzung zu limitieren. Bezüglich einer zukünftig denkbaren Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Phosphatase-Aktivierung ist besonders das Fehlen negativer Auswirkungen auf die systolische Ca^{2+} -Freisetzung hervorzuheben, da diese Eigenschaft von einem Antiarrhythmikum gewünscht wird und bislang zu dem nebenwirkungsreichen Klasse-III-Antiarrhythmikum Amiodaron kein alternatives pharmakologisches Therapeutikum zur Behandlung von Arrhythmien bei reduzierter Ejektionsfraktion existiert (McMurray et al. 2012). Somit kann die selektive PP1-Aktivierung theoretisch als möglicher, zukünftig relevanter Mechanismus zur Therapie von Arrhythmien im Rahmen der Herzinsuffizienz angesehen werden. Dennoch erscheint eine zeitnahe Anwendung von Phosphatase-Modulatoren außerhalb der experimentellen Anwendung *in vitro* derzeit unwahrscheinlich, da die PP1 in diverse zelluläre Prozesse involviert ist, keine ausreichende Substratspezifität aufweist und ihr Vorkommen nicht nur auf das Myokard beschränkt ist (Peti et al. 2013). Die Zielprotein-spezifische kardiale Modulation der PP1-Aktivität *in vivo* stellt folglich aktuell eine große Herausforderung dar und bedarf zukünftig deutlicher wissenschaftlicher Fortschritte. Daher wird als Alternative zur Modulation der Phosphatase-Aktivität derzeit die gezielte posttranslationale Modulation von Zielproteinen der PP1 in der wissenschaftlichen Literatur diskutiert (Biesiadecki und Ziolo 2015).

Insgesamt hilft diese Arbeit dennoch dabei, die in die Disruption der Ca^{2+} -Homöostase involvierten Pathomechanismen weiter zu verstehen und bietet zukünftigen Studien eine gute Grundlage zur weiteren Erforschung der kardialen Ca^{2+} -Homöostase.

5 Zusammenfassung/Summary

Die Entwicklung der Herzinsuffizienz geht mit Störungen der Ca^{2+} -Homöostase einher, welche sich folglich negativ auf die elektromechanische Kopplung auswirken. Begründet sind diese unter anderem in einem Ungleichgewicht regulatorischer kardialer Proteinkinasen und Phosphatasen. Während die Rolle der Proteinkinasen in den vergangenen Jahrzehnten intensiv erforscht wurde, gibt diese Arbeit zum ersten Mal einen Einblick in die Rolle der Phosphatasen bei der Entstehung der menschlichen Herzinsuffizienz sowie kardialer Arrhythmien.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde humanes Myokard von Patienten mit kardialer Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion sowie von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz für fluoreszenzmikroskopische Experimente verwendet.

Eine umfangreiche Untersuchung des Ca^{2+} -Stoffwechsels in der kardialen Hypertrophie zeigte zunächst ein stark erhöhtes proarrhythmogenes SR- Ca^{2+} -Leck durch die Inhibition der PP1 und PP2A mittels *Okadaic Acid*. Gleichzeitig zeigten sich eine ebenfalls signifikant erhöhte Frequenz zellulärer arrhythmischer Ereignisse sowie eine erhöhte Amplitude stimulierter Ca^{2+} -Transienten und ein erhöhter SR- Ca^{2+} -Gehalt.

In der Herzinsuffizienz führte die Inhibition der PP1 und PP2A zu einer noch stärkeren Erhöhung des SR- Ca^{2+} -Lecks und der Frequenz zellulärer arrhythmischer Ereignisse. Die Amplitude stimulierter Ca^{2+} -Transienten wurde auch in der Herzinsuffizienz signifikant durch die Inhibition der PP1 und PP2A erhöht, der SR- Ca^{2+} -Gehalt blieb interessanterweise unverändert. Die erstmalig durchgeführte kardiale Aktivierung der PP1 mittels des Peptids PDP3 erzielte in der Herzinsuffizienz eine starke Reduktion des SR- Ca^{2+} -Lecks und der Frequenz zellulärer arrhythmischer Ereignisse. Dabei ergaben sich unter Aktivierung der PP1 keine negativen Auswirkungen auf die Amplitude stimulierter Ca^{2+} -Transienten und den SR- Ca^{2+} -Gehalt.

Zusammenfassend verdeutlicht diese Arbeit erstmalig die funktionelle Rolle der Phosphatasen für die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase in der menschlichen Herzerkrankung. Dabei konnte aufgezeigt werden, dass eine Modulation der Phosphatasen starke Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Homöostase hat. Während eine Inhibition der PP1 und PP2A zu einer Steigerung der zellulären Arrhythmieeigung führt, stellt die Aktivierung der PP1 einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt dar, eine in der Herzinsuffizienz pathologisch erhöhte Kinaseaktivität zu antagonisieren und somit das arrhythmogene SR- Ca^{2+} -Leck zu vermindern.

Disruption of Ca^{2+} -homeostasis is a key pathomechanism in the development of heart failure by compromising EC-coupling. While the role of respective kinases has been extensively studied during the last decades, the contribution of conversely acting serine/threonine phosphatases to arrhythmias in structural heart disease remains unknown. This study investigates for the first time the functional influence of cardiac phosphatases in the development of human heart failure and arrhythmias.

Human ventricular myocardium of patients with cardiac hypertrophy with preserved ejection fraction and patients with end stage heart failure was implemented in this thesis.

In cardiac hypertrophy an inhibition of PP1 and PP2A using Okadaic Acid resulted in an increased SR- Ca^{2+} -leak. Conclusively, the frequency of cellular arrhythmic events was also increased, as was the amplitude of systolic Ca^{2+} -transients and the SR- Ca^{2+} -load.

In heart failure, phosphatase inhibition further increased the SR- Ca^{2+} -leak and the frequency of cellular arrhythmic events. The amplitude of systolic Ca^{2+} -transients was increased by inhibition of PP1 and PP2A, whereas the SR- Ca^{2+} -load was not changed. Importantly, a selective activation of PP1 by the novel phosphatase disrupting peptide PDP3 yielded a prominent reduction of the SR- Ca^{2+} -leak and reduced the frequency of cellular arrhythmic events in human end stage failing cardiomyocytes. In this context no negative inotropic effects could be detected.

In summary, this study is the first to functionally investigate the role of phosphatases for Ca^{2+} -homeostasis in diseased human myocardium. The data indicate that modulations of phosphatase activity potently impact Ca^{2+} -homeostasis. Whereas an inhibition of PP1 and PP2A leads to an increase of cellular arrhythmias, an activation of PP1 potently counteracts an increased kinase activity in heart failure and seals the arrhythmogenic SR- Ca^{2+} -leak.

6 Literaturverzeichnis

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

Aoyama H, Ikeda Y, Miyazaki Y, Yoshimura K, Nishino S, Yamamoto T, Yano M, Inui M, Aoki H, Matsuzaki M (2011): Isoform-specific roles of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated Ca(2+) cycling. *Cardiovasc Res* 89, 79-88

Aye TT, Soni S, van Veen TA, van der Heyden MA, Cappadona S, Varro A, de Weger RA, de Jonge N, Vos MA, Heck AJ, et al. (2012): Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 52, 511-518

Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE (2009): Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *J Vis Exp* 23, 1067

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

Belevych AE, Terentyev D, Terentyeva R, Nishijima Y, Sridhar A, Hamlin RL, Carnes CA, Gyorke S (2011): The relationship between arrhythmogenesis and impaired contractility in heart failure: role of altered ryanodine receptor function. *Cardiovasc Res* 90, 493-502

Benkusky NA, Weber CS, Scherman JA, Farrell EF, Hacker TA, John MC, Powers PA, Valdivia HH (2007): Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 101, 819-829

Berrebí-Bertrand I, Souchet M, Camelin J-C, Laville M-P, Calmels T, Bril A (1998): Biophysical interaction between phospholamban and protein phosphatase 1 regulatory subunit GM. *FEBS Lett* 439, 224-230

Bers DM: Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2. Auflage; Springer Netherlands, Dordrecht 2001

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

Bers DM (2004): Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 37, 417-429

Bers DM, Guo T (2005): Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1047, 86-98

Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH (2003): Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport. *Circ Res* 93, 487-490

Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1992): Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85, 1046-1055

Bialojan C, Takai A (1988): Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256, 283-290

Biesiadecki BJ, Ziolo MT (2015): Should we treat heart failure with phosphatase inhibitors? Better to start at the end. *J Mol Cell Cardiol* 89, 116-118

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

Brayton CF (1986): Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet* 76, 61-90

Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, Del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing S-L, Allen PB, Greengard P (2002): Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22, 4124-4135

Chatterjee J, Koehn M (2013): Targeting the untargetable: recent advances in the selective chemical modulation of protein phosphatase-1 activity. *Curr Opin Chem Biol* 17, 361-368

Chatterjee J, Beullens M, Sukackaite R, Qian J, Lesage B, Hart DJ, Bollen M, Koehn M (2012): Development of a Peptide that Selectively Activates Protein Phosphatase-1 in Living Cells. *Angew Chem Int Ed Engl* 51, 10054-10059

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB (1993): Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262, 740-744

Chiang DY, Li N, Wang Q, Alsina KM, Quick AP, Reynolds JO, Wang G, Skapura D, Voigt N, Dobrev D (2014): Impaired local regulation of ryanodine receptor type 2 by protein phosphatase 1 promotes atrial fibrillation. *Cardiovas Res* 103, 178-187

Cho US, Xu W (2007): Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* 445, 53-57

Cobbold PH, Rink TJ (1987): Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J* 248, 313-328

Cohen P (1989): The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58, 453-508

Cohen P (2002): Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115, 241-256

Cohen P, Klumpp S, Schelling DL (1989): An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett* 250, 596-600

Cole HA, Perry SV (1975): The phosphorylation of troponin I from cardiac muscle. *Biochem J* 149, 525-533

Conchello J-A, Lichtman JW (2005): Optical sectioning microscopy. *Nat methods* 2, 920-931

Coulton AT, Stelzer JE (2012): Cardiac myosin binding protein C and its phosphorylation regulate multiple steps in the cross-bridge cycle of muscle contraction. *Biochemistry* 51, 3292-3301

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

De Menorval MA, Mir LM, Fernandez ML, Reigada R (2012): Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells. *PLoS One* 7, e41733

De Munter S, Koehn M, Bollen M (2013): Challenges and opportunities in the development of protein phosphatase-directed therapeutics. *ACS Chem Biol* 8, 36-45

De Grande ST, Little SC, Nixon DJ, Wright P, Snyder J, Dun W, Murphy N, Kilic A, Higgins R, Binkley PF, et al. (2013): Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart. *J Biol Chem* 288, 1032-1046

Delbridge LM, Satoh H, Yuan W, Bassani JW, Qi M, Ginsburg KS, Samarel AM, Bers DM (1997): Cardiac myocyte volume, Ca²⁺ fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol* 272, 2425-2435

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, et al. (2008): ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail* 10, 933-989

Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balser JR, Anderson ME (2000): Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol* 2, 173-177

- Edman CF, Schulman H (1994): Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1221, 89-101
- Eiringhaus J, Fischer TH, Saadatmand A, Singh S, Kohn M, Wang Y, Maier L, Hasenfuss G, El-Armouche A, Sossalla S (2015): Ca-homeostasis in human cardiac hypertrophy and end stage heart failure is directly impacted by modulations of protein phosphatase 1 and-2a activity. *Eur Heart J* 36, 362-362
- Eisner DA, Kashimura T, O'Neill SC, Venetucci LA, Trafford AW (2009): What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis? *J Mol Cell Cardiol* 46, 474-481
- El-Armouche A, Eschenhagen T (2009): Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14, 225-241
- El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann W-H, Jäckel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J (2003): Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in β -adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* 17, 437-439
- El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T (2004): Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 61, 87-93
- El-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, Wittköpper K, Peeck M, Eschenhagen T (2007): Long-term β -adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail* 9, 1077-1080
- El-Armouche A, Wittköpper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didié M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsöld B (2008): Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 80, 396-406
- Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245, C1-14
- Fabiato A (1985): Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium 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 calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249, 469-495

Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Ouimet CC, Greengard P (2000): Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci* 97, 9287-9292

Fischer TH, Rokita AG, Maier LS (2011): Schlüsselrolle des Ca²⁺ in der Herzinsuffizienz und mögliche neue therapeutische Ansatzpunkte. *Kardiologie* 5, 80-90

Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, Ellenberger D, Forster A, Schmitto JD, Gummert J, et al. (2013): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human cardiac pathology. *Circulation* 128, 970-981

Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V (1999): Shape, Size, and Distribution of Ca²⁺ Release Units and Couplons in Skeletal and Cardiac Muscles. *Biophys J* 77, 1528-1539

Gaboriau F, Demoulin-Giacco N, Tirache I, Morliere P (1995): Involvement of singlet oxygen in ultraviolet A-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Arch dermatol Res* 287, 338-340

Glynn P, Musa H, Wu X, Unudurthi SD, Little S, Qian L, Wright PJ, Radwanski PB, Gyorke S, Mohler PJ, et al. (2015): Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo. *Circulation* 132, 567-577

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450

Guatimosim S, Dilly K, Santana LF, Saleet Jafri M, Sobie EA, Lederer WJ (2002): Local Ca(2+) signaling and EC coupling in heart: Ca(2+) sparks and the regulation of the [Ca(2+)]_i transient. *J Mol Cell Cardiol* 34, 941-950

Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Imai M, Habib O, Sabbah HN (2003): Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H2373-H2381

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

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

Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA (2013): Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* 97, 464-471

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52

Harding SE, Jones SM, O'Gara P, del Monte F, Vescovo G, Poole-Wilson PA (1992): Isolated ventricular myocytes from failing and non-failing human heart; the relation of age and clinical status of patients to isoproterenol response. *J Mol Cell Cardiol* 24, 549-564

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

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

Haystead TA, Sim AT, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG (1989): Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337, 78-81

Heijman J, Dewenter M, El-Armouche A, Dobrev D (2013): Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol* 64, 90-98

Herzig S, Neumann J (2000): Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80, 173-210

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

Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E (2005): [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94, 488-509

Hornbeck PV, Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, Sullivan M (2012): PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res* 40, D261-270

Houser SR (2014): Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: protein kinase A-mediated hyperphosphorylation of the ryanodine receptor at serine 2808 does not alter cardiac contractility or cause heart failure and arrhythmias. *Circ Res* 114, 1320-1327

Hsieh-Wilson LC, Allen PB, Watanabe T, Nairn AC, Greengard P (1999): Characterization of the neuronal targeting protein spinophilin and its interactions with protein phosphatase-1. *Biochemistry* 38, 4365-4373

Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, et al. (2002): ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure) Developed in Collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation Endorsed by the Heart Failure Society of America. *J Heart Lung Transplant* 21, 189-203

Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1365

Ihrig I, Schubert F, Habel B, Haberland L, Glaser R (1999): The UVA light used during the fluorescence microscopy assay affects the level of intracellular calcium being measured in experiments with electric-field exposure. *Radiat Res* 152, 303-311

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

Jackson A, Timmerman M, Bagshaw C, Ashley C (1987): The kinetics of calcium binding to fura-2 and indo-1. *FEBS lett* 216, 35-39

Jacob SW, Herschler R (1986): Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* 23, 14-27

January CT, Riddle JM (1989): Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current. *Circ Res* 64, 977-990

Kao JP, Tsien RY (1988): Ca²⁺ binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements. *Biophys J* 53, 635-639

Kao JP, Harootunian AT, Tsien RY (1989): Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* 264, 8179-8184

Katz AM, Tada M, Kirchberger MA (1975): Control of calcium transport in the myocardium by the cyclic AMP-Protein kinase system. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 5, 453-472

Kentish JC, McCloskey DT, Layland J, Palmer S, Leiden JM, Martin AF, Solaro RJ (2001): Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ Res* 88, 1059-1065

Kino GS, Corle TR: Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems. Academic Press, San Diego u.a. 1996

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42, 254-261

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

Kranias EG (1985): Regulation of Ca²⁺ transport by cyclic 3',5'-AMP-dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 844, 193-199

Lai Y, Nairn AC, Greengard P (1986): Autophosphorylation reversibly regulates the Ca²⁺/calmodulin-dependence of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4253-4257

Lakowicz JR: *Energy Transfer: Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer US, Boston, MA 1999, 367-394

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

Lehnart S, Marks AR (2007): Regulation of ryanodine receptors in the heart. *Circ Res* 101, 746-749

Li Y, Kranias EG, Mignery GA, Bers DM (2002): Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 90, 309-316

Lichtman JW, Conchello JA (2005): Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2, 910-919

Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ (1998): Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30, 743-749

Little SC, Curran J, Makara MA, Kline CF, Ho H-T, Xu Z, Wu X, Polina I, Musa H, Meadows AM (2015): Protein phosphatase 2A regulatory subunit B56 α limits phosphatase activity in the heart. *Sci Signal* 8, ra72-ra72

Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H (1986): Activation of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9497-9501

Ma J, Hayek SM, Bhat MB (2004): Membrane topology and membrane retention of the ryanodine receptor calcium release channel. *Cell Biochem Biophys* 40, 207-224

Mac Donnell SM, García-Rivas G, Scherman JA, Kubo H, Chen X, Valdivia H, Houser SR (2008): Adrenergic Regulation of Cardiac Contractility Does Not Involve Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor at Serine 2808. *Circ Res* 102, e65-e72

Maier LS, Bers DM (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939

Maier LS, Bers DM (2007): Role of Ca²⁺/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 δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res* 92, 904-911

Maltsev VA, Undrovinas A (2008): Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Prog Biophys Mol Biol* 96, 421-451

Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI (2007): Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur J Heart Fail* 9, 219-227

Marban E, Robinson SW, Wier WG (1986): Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. *J Clin Invest* 78, 1185-1192

Marks AR, Marx SO, Reiken S (2002): Regulation of ryanodine receptors via macromolecular complexes: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *Trends Cardiovasc Med* 12, 166-170

Marston SB, de Tombe PP (2008): Troponin phosphorylation and myofilament Ca²⁺-sensitivity in heart failure: Increased or decreased? *J Mol Cell Cardiol* 45, 603-607

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-376

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang Y-M, Rosemblyt N, Marks AR (2001): Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors A novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol* 153, 699-708

Mason FE, Sossalla S (2017): The Significance of the Late Na⁺ Current for Arrhythmia Induction and the Therapeutic Antiarrhythmic Potential of Ranolazine. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 22, 40-50

Mattiazzi A, Kranias EG (2011): CaMKII regulation of phospholamban and SR Ca²⁺ load. *Heart Rhythm* 8, 784-787

McConnell BK, Moravec CS, Bond M (1998): Troponin I phosphorylation and myofilament calcium sensitivity during decompensated cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 274, H385-396

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, et al. (2012): ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 14, 803-869

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990): Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 85, 305-309

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

Minta A, Kao JP, Tsien RY (1989): Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 264, 8171-8178

Molkentin JD (2000): Calcineurin and Beyond. Cardiac Hypertrophic Signaling. *Circ Res* 87, 731-738

Mosterd A, Hoes AW (2007): Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93, 1137-1146

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

Neumann J (2002): Altered phosphatase activity in heart failure, influence on Ca²⁺ movement. *Basic Res Cardiol* 97, I91-I95

Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997): Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29, 265-272

Nicolaou P, Kranias EG (2009): Role of PP1 in the regulation of Ca cycling in cardiac physiology and pathophysiology. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 3571-3585

Oliver CJ, Terry-Lorenzo RT, Elliott E, Bloomer WAC, Li S, Brautigan DL, Colbran RJ, Shenolikar S (2002): Targeting protein phosphatase 1 (PP1) to the actin cytoskeleton: the neurabin I/PP1 complex regulates cell morphology. *Mol Cell Biol* 22, 4690-4701

Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz J-E, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F (2005): Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res* 96, 756-766

Peti W, Nairn AC, Page R (2013): Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *FEBS J* 280, 596-611

Petzhold D, da Costa-Goncalves AC, Gross V, Morano I (2011): Spinophilin is required for normal morphology, Ca²⁺ homeostasis and contraction but dispensable for β -adrenergic stimulation of adult cardiomyocytes. *J Muscle Res Cell Motil* 32, 243-248

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

Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G (1999): Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 85, 38-46

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 18, 891-975

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

Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ, Marks AR (2003): Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem* 278, 444-453

Reinecke H, Studer R, Vetter R, Holtz J, Drexler H (1996): Cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 31, 48-54

Reither G, Chatterjee J, Beullens M, Bollen M, Schultz C, Koehn M (2013): Chemical activators of protein phosphatase-1 induce calcium release inside intact cells. *Chem Biol* 20, 1179-1186

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

Roger VL (2010): The heart failure epidemic. *Int J Environ Res Public Health* 7, 1807-1830

Rosen MR (1983): The relationship of delayed afterdepolarizations to arrhythmias in the intact heart. *Pacing Clin Electrophysiol* 6, 1151-1156

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

Sag CM, Köhler AC, Anderson ME, Backs J, Maier LS (2011): CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 51, 749-759

Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C (2003): Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 65, 1035-1041

Schillinger W, Janssen PML, Emami S, Henderson SA, Ross RS, Teucher N, Zeitz O, Philipson KD, Prestle J, Hasenfuss G (2000): Impaired Contractile Performance of Cultured Rabbit Ventricular Myocytes After Adenoviral Gene Transfer of Na(+)-Ca(2+) Exchanger. *Circ Res* 87, 581-587

Schwoerer AP, Neuber C, Schmechel A, Melnychenko I, Mearini G, Boknik P, Kirchhefer U, Schmitz W, Ehmke H, Eschenhagen T (2008): Mechanical unloading of the rat heart involves marked changes in the protein kinase–phosphatase balance. *J Mol Cell Cardiol* 45, 846-852

Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR (1986): Reversible generation of a Ca²⁺-independent form of Ca²⁺(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 Ca²⁺ leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circ Res* 93, 592-594

Shi Y (2009): Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139, 468-484

Shryock JC, Song Y, Rajamani S, Antzelevitch C, Belardinelli L (2013): The arrhythmogenic consequences of increasing late I_{Na} in the cardiomyocyte. *Cardiovasc Res* 99, 600-611

Solaro RJ, Kobayashi T (2011): Protein phosphorylation and signal transduction in cardiac thin filaments. *J Biol Chem* 286, 9935-9940

Song Y, Shryock JC, Belardinelli L (2008): An increase of late sodium current induces delayed afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2031-2039

Sossalla S, Maier LS (2012): Role of ranolazine in angina, heart failure, arrhythmias, and diabetes. *Pharmacol Ther* 133, 311-323

- Sossalla S, Hasenfuss G, Maier LS (2008): Inhibition des späten Natriumeinstroms (INa,late) als neuartige kardioprotektive Therapieoption. *Kardiologie* 2, 142-148
- Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, et al. (2010): Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107, 1150-1161
- Sotoud H, Borgmeyer U, Schulze C, El-Armouche A, Eschenhagen T (2015): Development of phosphatase inhibitor-1 peptides acting as indirect activators of phosphatase 1. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 388, 283-293
- 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
- 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(+)-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75, 443-453
- Swingle M, Ni L, Honkanen RE (2007): Small Molecule Inhibitors of Ser/thr Protein Phosphatases: Specificity, Use and Common Forms of Abuse. *Methods Mol Biol* 365, 23-38
- Tappan E, Chamberlin AR (2008): Activation of protein phosphatase 1 by a small molecule designed to bind to the enzyme's regulatory site. *Chem Biol* 15, 167-174
- Taylor SS, Zhang P, Steichen JM, Keshwani MM, Kornev AP (2013): PKA: lessons learned after twenty years. *Biochim Biophys Acta* 1834, 1271-1278
- 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 (2010): Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122, 993-1003
- Valdivia CR, Chu WW, Pu J, Foell JD, Haworth RA, Wolff MR, Kamp TJ, Makielski JC (2005): Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 38, 475-483
- Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ (1995): Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg²⁺ and phosphorylation. *Science* 267, 1997-2000
- Virshup DM, Shenolikar S (2009): From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33, 537-545

Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Mattiazzi A (2008): Phospholamban phosphorylation by CaMKII under pathophysiological conditions. *Front Biosci* 13, 5988-6005

Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S, et al. (2012): Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 125, 2059-2070

Weber S, Meyer-Roxlau S, Wagner M, Dobrev D, El-Armouche A (2015): Counteracting Protein Kinase Activity in the Heart: The Multiple Roles of Protein Phosphatases. *Front Pharmacol* 6, 270

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70

Wijnker PJ, Boknik P, Gergs U, Muller FU, Neumann J, dos Remedios C, Schmitz W, Sindermann JR, Stienen GJ, van der Velden J, et al. (2011): Protein phosphatase 2A affects myofilament contractility in non-failing but not in failing human myocardium. *J Muscle Res Cell Motil* 32, 221-233

Wilhelm S, Gröbler B, Gluch M, Heinz H: Confocal laser scanning microscopy principles. ZEISS Reference Library, Jena 2010

Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR (1991): Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 266, 11144-11152

Wittköpper K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsöld B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D (2010): Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest* 120, 617-626

Xu H, Ginsburg KS, Hall DD, Zimmermann M, Stein IS, Zhang M, Tandan S, Hill JA, Horne MC, Bers D, et al. (2010): Targeting of protein phosphatases PP2A and PP2B to the C-terminus of the L-type calcium channel Ca_v1.2. *Biochemistry* 49, 10298-10307

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007): Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem* 76, 367-385

Zalk R, Clarke OB, des Georges A, Grassucci RA, Reiken S, Mancina F, Hendrickson WA, Frank J, Marks AR (2015): Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature* 517, 44-49

Zhang H, Makarewich CA, Kubo H, Wang W, Duran JM, Li Y, Berretta RM, Koch WJ, Chen X, Gao E, et al. (2012): Hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808 is not involved in cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res* 110, 831-840

Zhang T, Brown JH (2004): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63, 476-486

Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, Brown JH (2003): The δ C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912-919

Zhao S, Brandt NR, Caswell AH, Lee EY (1998): Binding of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 to the ryanodine-sensitive calcium release channel protein. *Biochemistry* 37, 18102-18109

Zipes DP (2003): Mechanisms of clinical arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14, 902-912

Zou Y, Liang Y, Gong H, Zhou N, Ma H, Guan A, Sun A, Wang P, Niu Y, Jiang H (2011): Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 58, 1099-1110

Internetquellen

Fluschnik N: Inhibition der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKII) verbessert die Kontraktilität von terminal insuffizientem Myokard des Menschen. <http://hdl.handle.net/11858/00-1735-0000-0006-B2AD-3> Med. Diss. Göttingen 2011

Houpt PM, Draaijer A: Confocal laser scanning microscope. Google Patents 1989. <https://patents.google.com/patent/US4863226A/en>

http://static.enzolifesciences.com/fileadmin/files/formula/350-003_1_01.gif; Zugriff am 24.04.2016, 10.12 Uhr

http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Ca-and-Cont_HSW_digital.pdf; Zugriff am 20.04.2016, 14.48 Uhr

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F1221>; Zugriff am 17.04.2016, 14:14 Uhr

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F14218>; Zugriff am 17.04.2016, 14:17 Uhr

Kohlhaas M: Die Bedeutung der subzellulären CaMKII δ -Überexpression auf den intrazellulären Ca^{2+} -Stoffwechsel in Herzmuskelzellen. <http://hdl.handle.net/11858/00-1735-0000-0006-AC4F-6> Nat.-Wiss. Diss. Göttingen 2007

7 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Fischer TH, **Eiringhaus J**, Dybkova N, Forster A, Herting J, Kleinwachter A, Ljubojevic S, Schmitto JD, Streckfuss-Bomeke K, Renner A, Gummert J, Hasenfuss G, Maier LS, Sossalla S (2014): Ca(2+) /calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* **16**, 1292-1300

Fischer TH, Herting J, **Eiringhaus J**, Pabel S, Hartmann NH, Ellenberger D, Friedrich M, Renner A, Gummert J, Maier LS, Zabel M, Hasenfuss G, Sossalla S (2016): Sex-dependent alterations of Ca²⁺ cycling in human cardiac hypertrophy and heart failure. *Europace* **18**, 1440-1448

Fischer TH, Kleinwächter A, Herting J, **Eiringhaus J**, Hartmann N, Renner A, Gummert J, Haverich A, Schmitto JD, Sossalla S (2016): Inhibition of CaMKII Attenuates Progressing Disruption of Ca²⁺ Homeostasis Upon Left Ventricular Assist Device Implantation in Human Heart Failure. *Artificial Organs* **40**, 719-726

Abstracts

Eiringhaus J, Fischer TH, Herting J, Schmitto J, Foerster A, Renner A, Gummert J, Hasenfuss G, Maier L, Sossalla S (2014): CaMKII equally triggers SR Ca²⁺ leak in human ischemic and non-ischemic heart failure. *European Heart Journal* **35**, 328-328, Postervortrag am 31.08.2014 in Barcelona, Spanien, European Society of Cardiology Kongress 2014

Fischer TH, **Eiringhaus J**, Saadatmand AR, Singh S, Wang Y, Koehn M, Renner A, Gummert J, Hasenfuß G, El-Armouche A, Sossalla S (2015): Activation of protein phosphatase 1 by novel phosphatase disrupting peptide seals arrhythmogenic SR Ca leak in human cardiac hypertrophy and end stage heart failure. *Clinical Research in Cardiology* **104**, Vortrag am 09.04.2015 in Mannheim, Deutschland, 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

Eiringhaus J, Fischer TH, Saadatmand A, Singh S, Koehn M, Maier L, Hasenfuss G, El-Armouche A, Sossalla S (2015): Modulations of protein phosphatase 1 and -2a activity directly impact Ca²⁺-homeostasis in human cardiac hypertrophy and end stage heart failure. Postervortrag am 22.01.2015 in Les Diablerets, Schweiz, Heart Failure Winter Research Meeting 2015 der European Society of Cardiology

Eiringhaus J, Fischer TH, Hasenfuss G, Sossalla S (2015): Protein phosphatase 1 attenuates late I_{Na} dependent induction of the SR Ca leak in ventricular myocardium. *Clinical Research in Cardiology* **104**, Postervortrag am 11.04.2015 in Mannheim, Deutschland, 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

Eiringhaus J, Fischer TH, Saadatmand A, Singh S, Koehn M, Wang Y, Maier L, Hasenfuss G, El-Armouche A, Sossalla S (2015): Ca-homeostasis in human cardiac hypertrophy and end stage heart failure is directly impacted by modulations of protein phosphatase 1 and-2a activity. *European Heart Journal* **36**, 362-362, Postervortrag am 30.08.2015 in London, England, European Society of Cardiology Kongress 2015

Eiringhaus J, Herting J, Schatter F, Koehn M, Hasenfuss G, El-Armouche A, Sossalla S, Fischer TH (2016): Kinase/phosphatase balance regulates late I_{Na} dependent SR Ca^{2+} leak induction in ventricular myocardium. *Clinical Research in Cardiology* **105**, Postervortrag am 31.03.2016 in Mannheim, Deutschland, 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

Eiringhaus J, Herting J, Schatter F, Koehn M, Hasenfuss G, El-Armouche A, Sossalla S, Fischer TH (2016): Mechanismen der Induktion des SR-Calcium-Lecks durch den späten Natriumstrom in ventrikulärem Myokard. Vortrag am 10.04.2016 in Mannheim, Deutschland, 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin

Eiringhaus J, Fischer TH, Koehn M, Wang Y, Maier L, Hasenfuss G, Sossalla S (2017): PP1 activation as novel antiarrhythmic approach in human heart failure. *European Heart Journal* **38**, 1236-1236, Postervortrag am 29.08.2017 in Barcelona, Spanien, European Society of Cardiology Kongress 2017

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. S. T. Sossalla sowie dem wissenschaftlichen Betreuer dieser Arbeit, Herrn PD Dr. med. T. H. Fischer. Ihre fortwährende Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen ermöglichten mir optimale Bedingungen für die Durchführung der Experimente und die Verfassung dieser wissenschaftlichen Arbeit. Durch die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und ihre hohe soziale Kompetenz übertrugen sich ihre Begeisterung für die kardiovaskuläre Grundlagenforschung und ihr Engagement auch auf meine Laborarbeit. Für die Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas sowie die tatkräftige Unterstützung in den letzten Jahren möchte ich mich herzlich bedanken.

Zudem möchte ich meinen Dank Herrn Dr. med. N. H. Hartmann sowie Herrn J. Herting für den Rat in vielen theoretischen sowie praktischen Fragen im Laboralltag aussprechen.

Des Weiteren danke ich auch meinen Mitdoktoranden/-innen sowie den weiteren Mitarbeiter/-innen des Labors für die vielen konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen, die gegenseitige Unterstützung und die positive Arbeitsatmosphäre.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner Vordoktorandin Frau A. Kleinwächter für die kompetente Einführung in die Techniken der Fluoreszenzmikroskopie.

Mein weiterer Dank gilt den technischen Assistenten Herrn T. Schulte sowie Frau K.-C. Hansing, welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Vielen Dank für die Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. El-Armouche und Frau Prof. Dr. M. Köhn für die freundliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Peptids PDP3.

Abschließend gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. med. G. Hasenfuß, welcher mir als Direktor der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen die Möglichkeit gab, in seiner Abteilung zu promovieren.