

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN  
PROF. DR. STEFAN WAGNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***Die Bedeutung der NADPH-Oxidase II für die  
Regulation der Angiotensin II-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$  -  
Lecks des sarkoplasmatischen Retikulums***

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Johanna-Philine Möllencamp

2017



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN  
PROF. DR. STEFAN WAGNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***Die Bedeutung der NADPH-Oxidase II für die  
Regulation der Angiotensin II-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$  -  
Lecks des sarkoplasmatischen Retikulums***

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Johanna-Philine Möllencamp

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1.Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Wagner
2.Berichterstatter:	Prof. Dr. York Zausig
Tag der mündlichen Prüfung:	02.03.2018



# ***Inhaltsverzeichnis***

## ***Abbildungs-, Tabellen-, Formel- und Abkürzungsverzeichnis***

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>- 10 -</b>
1.1 Das sarkoplasmatische Retikulum .....	- 12 -
1.2 Elektromechanische Kopplung.....	- 13 -
1.3 Der L-Typ-Kalziumkanal.....	- 15 -
1.4 Ryanodin-Rezeptor und IP <sub>3</sub> - Rezeptor: Wichtige Ca <sup>2+</sup> - Freisetzungskanäle des sarkoplasmatischen Retikulums .....	- 16 -
1.5 Angiotensin II .....	- 23 -
1.6 NADPH-Oxidase .....	- 26 -
1.7 Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Kinase .....	- 27 -
1.7.1 Aktivierung.....	- 28 -
1.7.2 Funktion.....	- 30 -
1.7.3 Akute vs. chronische CaMKII-Aktivierung.....	- 30 -
1.8 Proteinkinase A.....	- 31 -
1.8.1 Substrate der PKA.....	- 33 -
1.9 Proteinkinase C.....	- 34 -
1.10 reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	- 37 -
1.11 Nachdepolarisationen .....	- 40 -
1.12 Pathologische Veränderungen in insuffizienten Herzen in Bezug auf den SR-Ca <sup>2+</sup> - Gehalt .....	- 42 -
1.13 Zielsetzung und Fragestellung .....	- 44 -
 <b>2. Material und Methoden:.....</b>	 <b>- 47 -</b>
2.1. Genetisch veränderte Mäuse .....	- 47 -
2.1.1 gp91phox KO-Mäuse.....	- 47 -
2.1.2 CaMKII KO-Mäuse .....	- 48 -
2.1.3 PKA KI-Mäuse .....	- 48 -
2.2 Zellisolation .....	- 49 -
2.3 Konfokalmikroskop.....	- 53 -
2.4 Versuchsdurchführung .....	- 54 -
2.5 Auswertung .....	- 58 -
2.6 Statistik .....	- 62 -

2.7 Lösungen .....	- 62 -
2.7.1 Angiotensin II.....	- 62 -
2.7.2 H89 (5-Isoquinolinesulfonamide).....	- 62 -
2.7.3 AIP (Autocamide-2-Related Inhibitory Peptide).....	- 63 -
2.7.4 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl Borate).....	- 63 -
2.7.5 BIS (Bisindolylmaleimide I (BIS I, GF 109203X)).....	- 64 -
2.7.6 Koffein .....	- 64 -
2.7.7 Farbstoff Fluo-4-AM.....	- 64 -
 <b>3. Ergebnisse .....</b>	 <b>- 66 -</b>
3.1 Basale Charakteristika der verwendeten Mäuse.....	- 66 -
3.2 Angiotensin II steigert die Frequenz von Kalziumsparks.....	- 67 -
3.3 Die Angiotensin II-induzierte Steigerung der Kalziumsparkfrequenz wird durch NOX2 vermittelt .....	- 71 -
3.4 Angiotensin II induziert das SR-Kalziumleck über eine NOX2-abhängige Aktivierung der CaMKII .....	- 75 -
3.5 Die Proteinkinase A hat keinen Einfluss auf die Angiotensin II-abhängige Steigerung der Kalziumsparks .....	- 82 -
3.6 Auch die Proteinkinase C hat keine Einfluss auf die durch Angiotensin II induzierte Steigerung der SR-Kalziumsparkfrequenz .....	- 87 -
3.7 Neben dem Ryanodinrezeptor scheint auch eine Kalziumfreisetzung via IP <sub>3</sub> -Rezeptor an den durch Ang II induzierten Kalziumsparks beteiligt zu sein .....	- 89 -
 <b>4. Diskussion .....</b>	 <b>- 93 -</b>
4.1 Ang II erhöht das Kalziumleck.....	- 93 -
4.2 Die NADPH-Oxidase ist für die Ang II-induzierte Generierung von Kalziumsparks unerlässlich.....	- 97 -
4.3 Eine Aktivierung der CaMKII ist eine notwendige Voraussetzung für die Generierung von Ang II-induzierten Kalziumsparks .....	- 99 -
4.3.1 Ang II vermittelt seine Wirkung auf das Kalziumleck über eine Aktivierung der CaMKII.....	- 100 -
4.4 Die PKA ist nicht wesentlich bei der Regulation des Ang II-induzierten Kalziumlecks beteiligt.....	- 104 -

4.5 Angiotensin II und die Proteinkinase C .....	- 109 -
4.5.1 Angiotensin II und IP <sub>3</sub> - Rezeptoren in Kardiomyozyten .....	- 110 -
4.6 Limitationen der Arbeit .....	- 112 -
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>- 114 -</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>- 116 -</b>
<b>7. Danksagung</b>	
<b>8. Lebenslauf</b>	

### *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1-1: Aufteilung des junktionalen SR (jSR) und longitudinalen SR....	- 13 -
Abbildung 1-2: Die elektromechanische Kopplung des Herzens .....	- 15 -
Abbildung 1-3: Der RyR2 mit den verschiedenen regulativen Untereinheiten ..	- 17 -
Abbildung 1-4: Öffnungsverhalten des RyR.....	- 18 -
Abbildung 1-5: Aufbau der NADPH-Oxidase II .....	- 26 -
Abbildung 1-6: Aufbau der CaMKII .....	- 28 -
Abbildung 1-7: Aktivierung der CaMKII.....	- 29 -
Abbildung 1-8: Aufbau der PKA.....	- 32 -
Abbildung 1-9: Aktivierung der klassischen PKC-Isoformen.....	- 35 -
Abbildung 1-10: Entstehungs- und Abbauewege von ROS .....	- 38 -
Abbildung 1-11: Zeitliches Auftreten der Nachdepolarisationen .....	- 40 -
Abbildung 1-12: DAD-Entstehung.....	- 42 -
Abbildung 2-1: Langendorff-Perfusionsanlage.....	- 52 -
Abbildung 2-2: Laser-Konfokalmikroskop .....	- 54 -
Abbildung 2-3: Ablauf eines Kalziumtransientens.....	- 59 -
Abbildung 2-4: Typische Sparkcharakteristika.....	- 60 -
Abbildung 3-1: Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht .....	- 66 -
Abbildung 3-2: Alter der Mäuse .....	- 67 -
Abbildung 3-3a: Originalreg. Sparkmessung: WT vs. WT+Ang II .....	- 68 -
Abbildung 3-3b: Sparkfrequenzen: WT vs. WT+Ang II .....	- 68 -

Abbildung 3-4: diastol. Kalziumleck: WT vs. WT+Ang II .....	- 69 -
Abbildung 3-5a: Originalreg. Koffeinmessungen: WT vs. WT+Ang II .....	- 70 -
Abbildung 3-5b: SR Kalziumgehalt: WT vs. WT+Ang II .....	- 71 -
Abbildung 3-6a: Originalreg. Sparkmessungen: gpKO vs. gpKO+Ang II .....	- 72 -
Abbildung 3-6b: Sparkfrequenzen gpKO vs. gpKO+Ang II .....	- 72 -
Abbildung 3-7: diastol. Kalziumleck: gpKO vs. gpKO+Ang II .....	- 73 -
Abbildung 3-8a: Originalreg. Koffeinmessungen: gpKO vs. gpKO+Ang II .....	- 74 -
Abbildung 3-8b: SR Kalziumgehalt: gpKO vs. gpKO+Ang II .....	- 75 -
Abbildung 3-9a: Originalreg. Sparkmessungen: gpWT+Ang II+AIP .....	- 76 -
Abbildung 3-9b: Sparkfrequenzen: gpWT+Ang II+AIP .....	- 76 -
Abbildung 3-10a: Originalreg. Sparkmess.: CaMKII-KO vs. CaMKII-KO+Ang II ..	- 77 -
Abbildung 3-10b: Sparkfrequenzen: CaMKII-KO vs. CaMKII-KO+Ang II .....	- 78 -
Abbildung 3-11: diastol. Kalziumleck: gpWT+Ang II vs. gpWT+Ang II+AIP... ..	- 79 -
Abbildung 3-12: diastol. Kalziumleck: gpKO+Ang II vs. gpWT+Ang II .....	- 80 -
Abbildung 3-13a: Originalreg. Koffeinmessung: CaMKII KO versus. gpWT+Ang II+AIP. ....	- 81 -
Abbildung 3-13b: SR Kalziumgehalt: CaMKII KO vs. CaMKII KO+Ang II.... ..	- 82 -
Abbildung 3-14a: Originalreg. Sparkfrequenz: PKA WT+Ang II+H89.....	- 83 -
Abbildung 3-14b: Sparkfrequenzen: PKA KI vs. PKA KI+Ang II.....	- 83 -
Abbildung 3-15a: Originalreg. Sparkfrequenz: PKA KI+Ang II vs. PKA KI+Ang II+H89 .....	- 84 -
Abbildung 3-15b: diastol. Kalziumleck: PKA KI vs. PKA KI+Ang II+H89. ....	- 85 -
Abbildung 3-16a: Koffeinmess.: PKA WT+Ang II+H89 versus PKA KI+Ang II+H89.....	- 86 -
Abbildung 3-16b SR Kalziumgehalt: PKA KI+Ang II vs. PKA KI+Ang II+H89...-	- 87 -
Abbildung 3-17a: Originalreg. Sparkfrequenz: gpWT+Ang II+BIS.....	- 88 -
Abbildung 3-17b: Sparkfrequenzen: gpWT+Ang II+BIS .....	- 88 -
Abbildung 3-18: diastol. Kalziumleck: gp WT+Ang II+BIS. ....	- 89 -
Abbildung 3-19a: Originalreg. Sparkfrequenz: gpWT+Ang II+2-APB . ....	- 90 -
Abbildung 3-19b: Sparkfrequenzen: gpWT+Ang II+2-APB vs. gpWT+Ang II . .	- 90 -
Abbildung 3-20: diastol. Kalziumleck: gpWT+Ang II vs. gpWT+Ang II+2APB	-92-

### ***Tabellenverzeichnis***

Tabelle 2-1: Die zur Isolierung verwendeten Lösungen.....	- 52 -
Tabelle 2-2: Zusammensetzung der Koffeinelösung. ....	- 64 -
Tabelle 3-1: Zusammenfassung der Sparkcharakteristika.....	- 91 -
Tabelle 3-2: Zusammenfassung der Ergebnisse .....	- 92 -

### ***Formelverzeichnis***

Formel 2-1: Berechnung des Kalziumlecks .....	- 61 -
Formel 2-2: Berechnung der Sparkvolumina .....	- 61 -
Formel 2-3: Berechnung Delta F/F0 .....	- 61 -

### ***Abkürzungsverzeichnis***

2-APB	2-aminoethoxydiphenyl Borate
A-Banden	anisotrope Banden
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AD/DA	analog digital/digital analog
ADP	Dauer des Aktionspotentials
AIP	autocamide-2 related inhibitory peptide
AM	Acetoxymethyl-Ester
ANF	atrialer atriuretischer Faktor
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	one-way-analysis of variance
AP	Aktionspotential
apoCaM	Ca <sup>2+</sup> -freier Zustand der RyR
A.	Arteria
AT	Angiotensin-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	Bisindolylmaleimide
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
Ca <sup>2+</sup> -CaM	Ca <sup>2+</sup> -gebundener Zustand der RyR
CaMK	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin-Kinase

cAMP	zyklisches Adenosinmonohosphat
CaSpF	Kalziumsparkfrequenz
Cav1.2	L-typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanal
CICR	Ca <sup>2+</sup> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung
DADs	späte Nachdepolarisationen
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EADs	frühe Nachdepolarisationen
ECC	excitation-contraction-coupling
ER	endoplasmatisches Retikulum
FDHM	full duration at half maximum
FKBP506	FK-Binde-Protein-506
FWHM	full width at half maximum
gp	gp91phox
Gq	aktiviertes G-Protein
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H89	5-Isoquinolinesulfonamid
HDAC5	Histon Deazetylase 5
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure
HG	Herzgewicht
Hz	Hertz
I-Banden	isotrope Banden
ICa	einwärtsgerichtete Kalziumströme in die Kardiomyozyten
IP3	Inositoltriphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KI	knock-in
Kir	einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle
KN-93	2-[N-(2-hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)] amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine
KO	knock-out

LSM	Laser Scanning Microscopy
LTCC	L-tyr-Ca <sup>2+</sup> -Kanal, Dihydropyridinrezeptor
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ms	Millisekunde
N	Stichprobengröße
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCX	Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NOX	NADPH-Oxidase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
OH <sup>·</sup>	Hydroxylradikal
OP	Operation
P <sub>0</sub>	Öffnungswahrscheinlichkeit
PDE4D3	Phosphodiesterase 4D3
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PP	Proteinphosphatase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	reaktive Sauerstoffpezies
RT	return time
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SCD	sudden cardiac death
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
Ser	Serin
SERCA	SR-Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TierSchG	Tierschutzgesetz

T-Tubuli

WT

Z-Linie

Transversaltubuli

Wildtyp

Zwischenlinie



# ***1. Einleitung***

Epidemiologisch stellt sich die Herzinsuffizienz als eine weit verbreitete und in den westlichen Populationen zunehmende Erkrankung dar. Dabei zeigt die Prävalenz mit zunehmenden Alter einen deutlichen Anstieg, so dass in der Bevölkerungsgruppe der über 80-Jährigen eine Rate von >11,6 % vorliegt (ROSAMOND et al. 2008). In Anbetracht des demographischen Wandels und des damit einhergehenden Zuwachses der älteren Bevölkerung bekommt diese Erkrankung damit zunehmend den Charakter einer Volkskrankheit mit bedeutender epidemiologischer Tragweite (CLELAND et al. 2001 ).

Die Herzinsuffizienz wird als der Zustand definiert, bei welchem aufgrund struktureller oder funktioneller Veränderungen des Herzens die Sauerstoffversorgung des Gewebes nicht ausreichend ist, trotz normaler Füllungsdrücke (DICKSTEIN et al. 2008).

Neben der belastenden Symptomatik steht die schlechte Prognose der Patienten mit einer stark limitierten Überlebenszeit im Vordergrund. So zeigten HO et al. (1993), basierend auf der FRAMINGHAM-Studie, eine mittlere Lebenserwartung nach Diagnosestellung von nur wenigen Jahren. Die Erkrankung der Herzinsuffizienz präsentiert sich in Bezug auf die Auslösung von lebensbedrohlichen Arrhythmien als die zweithäufigste kardiale Grunderkrankung mit solch folgenschwerem Verlauf. Demnach steigt mit dem Vorliegen einer Herzinsuffizienz die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von plötzlichem Herztod (*sudden cardiac death*, SCD) im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung auf ein Fünffaches an (KANDEL et al. 1994).

Über neurohumorale Mechanismen besteht eine Verbindung zwischen einer bei chronischen Herzinsuffizienz veränderten Aktivität verschiedener Transmitter und der kardialen Leistung (HÜLSMANN 2003 ). Dabei scheint dem Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Ion, das dem Kontraktionsvorgang zugrunde liegt, über diese neurohumoralen Zusammenhänge in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und ihrer Folgeerkrankungen eine tragende Rolle zuzukommen. Eine Fehlfunktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes der Kardiomyozyten ist der wichtigste Grund für kontraktile Dysfunktion und Arrhythmien (POGWIZD et al. 2001).

Um zum Verständnis der Pathophysiologie dieser Krankheit beizutragen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel von Kardiomyozyten untersucht. Die Experimente erfolgten an frisch isolierten Mäusekardiomyozyten,

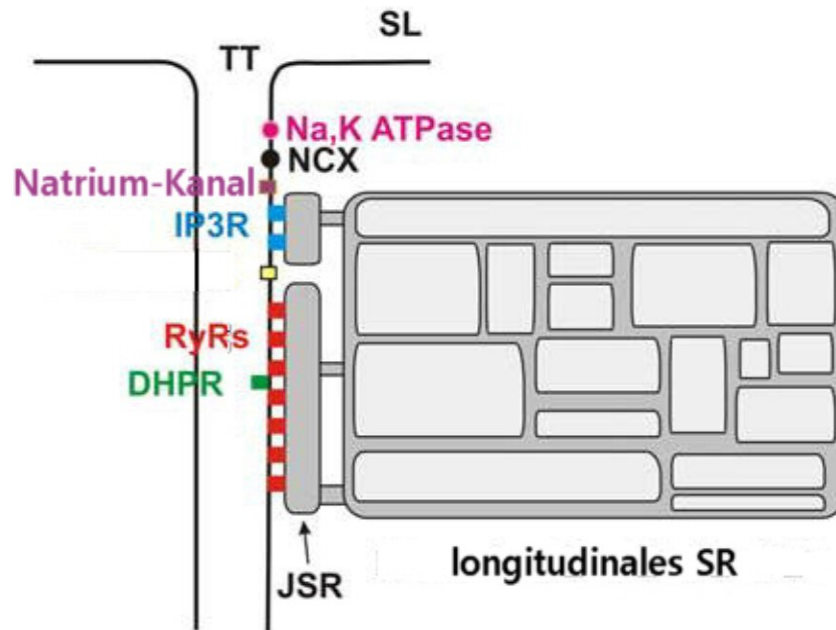
welche mithilfe eines Laser-Fluoreszenz-Konfokalmikroskops untersucht wurden. Es konnte eine deutliche Beeinflussung des Kalziumstoffwechsels im Sinne einer signifikanten Steigerung der Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Angiotensin II (Ang II) nachgewiesen werden.

Um die erlangten Ergebnisse der Versuche einordnen zu können, beginnt die vorliegende Dissertation mit einer Beschreibung verschiedener Strukturen der Kardiomyozyten sowie der elektromechanischen Kopplung des Herzens. Zudem werden die in den Versuchen primär untersuchten Sparks, welche als die messbaren Indikatoren für die Kalziumfreisetzung in den Kardiomyozyten definiert werden können, mit den für sie relevanten Ionenkanälen, Rezeptoren und Enzymen vorgestellt. Um die Bedeutung der Zusammenhänge zwischen der Kalziumhomöostase und der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz nachvollziehen zu können, erfolgt zum Ende der Einleitung noch eine Schilderung pathologischer Aspekte mit einer Beschreibung von Nachdepolarisationen und den kardialen Veränderungen bei Herzinsuffizienz.

### ***1.1 Das sarkoplasmatische Retikulum***

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist ein Organell der Herzmuskelzellen. Die Funktion des SR der Kardiomyozyten ist primär eine Speicherung von  $\text{Ca}^{2+}$ , so dass durch Freisetzung dieser Ionen die Kontraktion ermöglicht wird (LÜLLMANN-RAUCH 2006). Dabei besteht das SR aus multiplen Untereinheiten, welche alle eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufweisen und miteinander in Verbindung stehen (BROCHET et al. 2005). Diese Untereinheiten werden in zwei Bereiche eingeteilt: Das junktionale SR und das longitudinale SR (SONG LS et al. 2005) (siehe Abb. 1-1). Im junktionalen SR sind die Ryanodin-Rezeptoren lokalisiert, welche als die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle des SR fungieren. Diese sind in kleinen Gruppierungen (sogenannten Clustern) im SR angeordnet und überspannen einen 15 nm umfassenden Zytoplasmaspalt (GYORKE S et al. 2007) (siehe Abb. 1-1).

Das SR verfügt auch über Verbindungen zu den anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern der Zelle. Also hat das SR Verbindungen sowohl zum endoplasmatischen Retikulum als auch zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des Nukleus (WU X und BERS 2006).



**Abbildung 1-1.** Aufteilung des junktionalen SR (jSR) und des longitudinalen SR. Zu erkennen ist ebenfalls die clusterförmige Aufteilung der Ryanodin-Rezeptoren (RyR). TT: T-Tubulus, SL: Sarkolemm, Na,K ATPase: Natrium-Kalium-ATPase, NCX: Natrium-Kalzium-Austauscher, IP3R: Inositoltriphosphat-Rezeptor, DHPR: Dihydropyridinrezeptor. Modifiziert nach SONG, 2005, S. 103.

## 1.2 Elektromechanische Kopplung

Die sogenannte elektromechanische Kopplung stellt den Prozess von der elektrischen Erregung der Kardiomyozyten bis zur Kontraktion dar (BERS 2002).

Der Kontraktion eines Kardiomyozyten geht die Depolarisation der Zelle voraus. Diese ist gleichbedeutend mit einer Vorzeichenumkehr des Membranpotenzials. Das Ruhemembranpotenzial von ca. -90 mV wird durch einwärts-gleichrichtende Kalium-Kanäle ( $K_{ir}$ ) und damit vom Kalium-( $K^+$ )-Gleichgewichtspotential bestimmt. Das Aktionspotential wird durch die Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle mit in der Folge starkem Einstrom positiv geladener Natriumionen initiiert (KUSHNIR und MARKS 2010). Dies stellt die sogenannte Aufstrichphase dar. In der Aufstrichphase schließen die  $K_{ir}$ , so dass ein höherer  $K^+$ - Ausstrom unter der Depolarisation verhindert wird. Die die Aufstrichphase dominierenden  $Na^+$ - Kanäle inaktivieren nach ca. 1-2 ms und sind zunächst nicht wieder aktivierbar. Diese Inaktivierung der  $Na^+$ - Kanäle bedingt auch die sogenannte absolute Refraktärphase, in welcher keine weitere Depolarisation erfolgen kann (KLINKE et al. 2010).

Die Depolarisation der Kardiomyozyten breitet sich in die T-Tubuli aus. Sobald das Membranpotenzial -40 mV erreicht, öffnen auch die dort lokalisierten L-Typ-Kalzium-

Kanäle ( $\text{Ca}_v1.2$ ) und generieren einen zusätzlichen Einstrom positiv geladener Kalziumionen (BEAN 1985). Diese bestimmen die für den Herzmuskel charakteristische sogenannte Plateauphase des Aktionspotenzials (siehe Abb. 1-2)

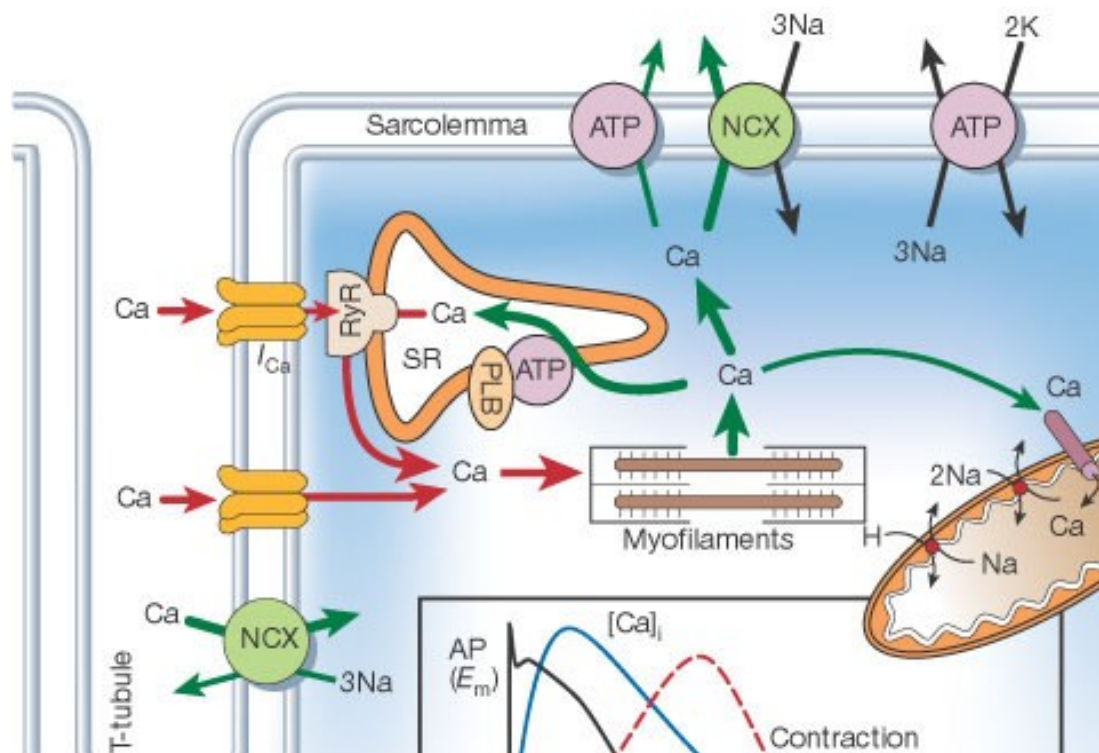
Der beschriebene Vorgang, bei welchem das aus dem Extrazellulärraum einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  einen zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem SR in das Zytosol durch die Öffnung kardialer Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) triggert, wird auch als „ $\text{Ca}^{2+}$ -induced- $\text{Ca}^{2+}$ -Release“ (CICR) bezeichnet (BERS 2002). Dieser induzierte Kalziumausstrom aus dem SR trägt ca. 70% - 90% zu dem für die Kontraktion erforderlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei (SOBIE et al. 2006). Durch den der Kalziumfreisetzung folgenden Anstieg der freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von weniger als 100 nM auf  $\sim 1 \mu\text{M}$  steigt die Wahrscheinlichkeit einer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die Begleitproteine der Aktinfilamente, den Troponinkomplex. Dies bedingt eine Interaktion von Aktin und Myosin, was schlussendlich in einer mechanischen Kontraktion resultiert (KLINKE et al. 2010).

Der durch den Kalziumeinstrom dominierten Plateauphase folgt die Repolarisation, das heißt die Rückkehr der Kardiomyozyten zum Ruhemembranpotenzial (KLINKE et al. 2010). Diese Repolarisation wird schon während der Plateauphase durch die Öffnung sogenannter verzögert ansprechender  $\text{K}^+$ -Kanäle (Auswärtsstrom  $\text{I}_{\text{Kr}}$  und Auswärtsstrom  $\text{I}_{\text{Ks}}$ ) eingeleitet. Nach abgeschlossener Repolarisation schließen diese  $\text{K}^+$ -Kanäle wieder und die das Ruhemembranpotenzial regulierenden  $\text{K}^+$ -Kanäle  $\text{K}_{\text{ir}}$  öffnen wieder. Während der Repolarisationsphase, also ab circa -50 mV werden die  $\text{Na}^+$ -Kanäle wieder aktivierbar. Dies stellt die sogenannte relative Refraktärphase dar. Am Ende dieser Phase ist die Ionenverteilung wieder wie zu Beginn des Aktionspotenzials, so dass ein erneuter Kontraktionszyklus initiiert werden kann (KLINKE et al. 2010).

Die Relaxation der Muskelfasern wird erreicht durch die Abnahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und damit eine Annäherung an den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ruhewert. Diese Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird zu Beginn durch die Beendigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms bedingt. Zusätzlich zu der Beendigung des Kalziumeinstroms tragen verschiedene aktive und passive  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportwege aus dem Zytosol zur Reduktion der erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei: Zum einen pumpt die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA)  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR zurück. Des Weiteren transportiert ein  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) Kalzium über die Zellmembran nach extrazellulär. Zusätzlich fungieren mitochondriale und sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen als  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter.

Auch ein mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ - Uniporter reduziert das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  (BERS 2002). Die jeweiligen Anteile der einzelnen Kanäle an der  $\text{Ca}^{2+}$ - Reduktion sind speziesspezifisch (BASSANI et al. 1994).

Aufgrund der wesentlichen Bedeutung des SR-Kalziums für die zur Kontraktion erforderliche  $\text{Ca}^{2+}$ - Freisetzung bestimmt der SR  $\text{Ca}^{2+}$ - Gehalt direkt die Eigenschaften der Kardiomyozyten. So wird die Größe des CICR aufgrund des Massenverteilungsgesetzes auch durch die Höhe des  $\text{Ca}^{2+}$  im SR bestimmt (DOBREV et al. 2011). Die Menge des  $\text{Ca}^{2+}$ , die sich im SR befindet wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. So steigert ein erniedrigter  $\text{Ca}^{2+}$ - Ausstrom und eine gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ - Aufnahme die SR  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration (BERS 2002). Damit trägt also das Verhältnis der an der Regulation der Kalziumkonzentration beteiligten Mechanismen entscheidend zum SR  $\text{Ca}^{2+}$ - Gehalt bei.



**Abbildung 1-2.** Die elektromechanische Kopplung am Herzen: Durch den  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom via LTCC wird die  $\text{Ca}^{2+}$ - Freisetzung aus dem SR durch die RyR getriggert. Die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration führt zur erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die Myofilamente. Die grünen Pfeile stellen die verschiedenen Wege der Entfernung von  $\text{Ca}^{2+}$  im Kardiomyozyten dar. Modifiziert nach BERS, 2002, S.198.

### 1.3 Der L-Typ-Kalziumkanal

Der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, auch Dihydropyridin-Rezeptor genannt, ist ein spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanal des Sarkolemm (KAMP und HELL 2000). Die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ - Kanäle sind in dem Teil des Sarkolemm lokalisiert, welcher den T-Tubulus

bildet (CHENG H et al. 1996b). So sind die Kanäle ganz in der Nähe von den Ryanodin-Rezeptoren (RyR) (SCRIVEN et al. 2000). Die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ - Kanäle umspannen also eine kleine Region des Sarkolemm der T-Tubuli und sind gegenüber den RyR des junctionalen SR zu finden (PROSSER et al. 2010).

Durch den beschriebenen Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum im T-Tubulus in den Kardiomyozyten durch die LTCC kommt es zu einer Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in einem Umfeld von 60 nm um die Pore des Kanals (SOBIE et al. 2006). Diese lokale Erhöhung des Kalziums führt zu einer lokalen Überschreitung der Pufferkapazität für Kalzium, so dass nachfolgend eine massive Erhöhung der Kalziumkonzentration resultiert, was dann im Endeffekt erst die Aktivierung der Ryanodin-Rezeptoren bedingt (TERENTYEV et al. 2002). Zum zytosolischen Kalziumpuffer gehören unter anderem Troponin, Myosin, Calsequestrin und Calmodulin (BERLIN et al. 1994).

Eine Inaktivierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanäle erfolgt primär als Funktion der Zeit und des Membranpotenzials. Jedoch beschreiben ECKERT und CHAD (1984) auch eine Inaktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen. Dabei ist die Kalzium-abhängige Inaktivierung direkt vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom  $I_{\text{Ca}}$  abhängig, denn mit steigendem  $I_{\text{Ca}}$  akkumuliert auch das zytosolische Kalzium, so dass die erwähnte Pufferkapazität überschritten wird und erst damit das freie Kalzium zur Inaktivierung der Kanäle zur Verfügung steht (ECKERT und CHAD 1984).

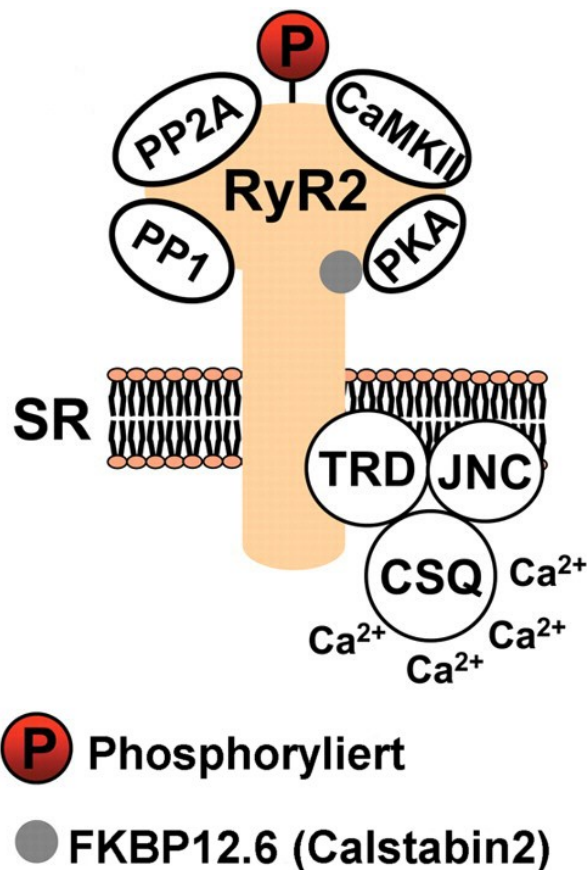
Neben dieser kalziumabhängigen Regulation werden die LTCC durch posttranslationale Modifikation in ihrer Aktivität auch von multiplen Kinasen beeinflusst. Dazu gehören u. a. die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) (siehe 1.7), die Protein Kinase A (siehe 1.8) und die Proteinkinase C (siehe 1.9). Zudem konnte eine Beeinflussung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanals durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (siehe 1.10) gezeigt (COETZEE und OPIE 1992).

#### ***1.4 Ryanodin-Rezeptor und $\text{IP}_3$ -Rezeptor: Wichtige $\text{Ca}^{2+}$ -***

##### ***Freisetzungskanäle des sarkoplasmatischen Retikulums***

Wie schon beschrieben, stellt der RyR2 aufgrund des sogenannten „Calcium-Induced-Calcium-Release“ (CICR), die grundlegende Funktionseinheit für die für eine Kontraktion erforderliche Kalziumkonzentrationserhöhung dar (KUSHNIR et al. 2010).

Dieser Rezeptor ist ein Kalziumkanal des sarkoplasmatischen Retikulums (BERS 2002) und ist als Homotetramer aufgebaut. Jedes Monomer hat charakteristischerweise einen transmembranen Teil (ca. 10 % des Proteins), welcher die Kanalpore bildet (WEHRENS et al. 2005), und einen zytoplasmatischen Teil (ca. 90 %) (KUSHNIR und MARKS 2010), welcher auch als Gerüst für viele regulative Untereinheiten und Enzyme fungiert (ZALK et al. 2007).



**Abbildung 1-3.** Der RyR2 mit den verschiedenen regulativen Untereinheiten. Dazugehörig sind die Proteinphosphatase1 (PP1), Proteinphosphatase2A (PP2A), Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige-Kinase II (CaMKII), die Proteinkinase A (PKA), sowie FKBP12.6 (Calstabin). Über Triadin (TRD) und Junctin (JNC) ist Calsequestrin (CSQ) mit dem RyR2 verbunden. Modifiziert nach DOBREV et al., 2011, S.736.

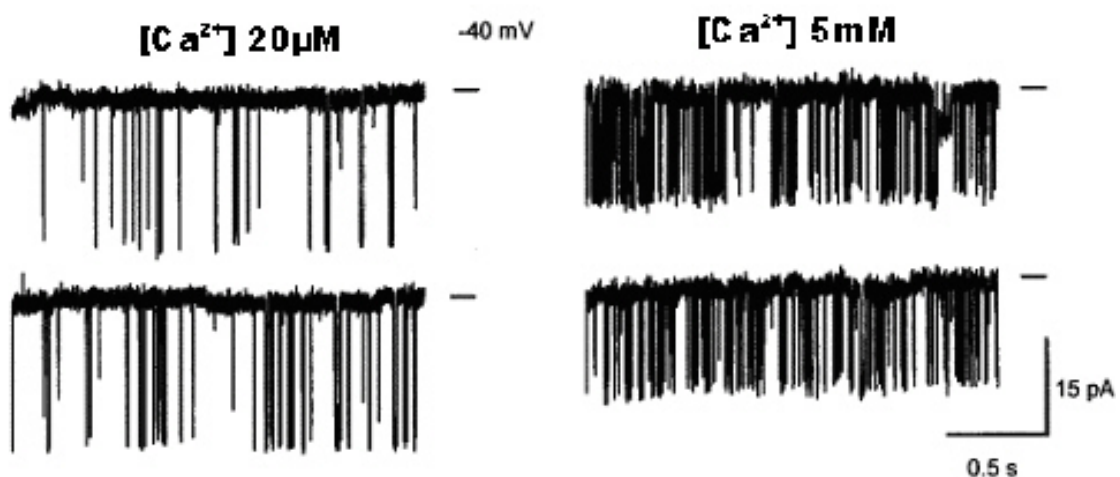
Laut SUN et al. (1995) befinden sich die RyR in kleinen Gruppierungen (Clustern) in der Membran des junktionalen SR. Wie schon beschrieben, ist die Membran des junktionalen SR nur ca. 15 nm von dem Sarkolemm entfernt, so dass die RyR sich räumlich in enger Nähe zu den LTCC befinden.

Es gibt drei Isoformen des Ryanodin-Rezeptors: RyR1, RyR2 und RyR3. Alle drei Isoformen weisen ähnliche Durchflusseigenschaften auf (FILL und COPELLO 2002).

Im Myokard weist der Ryanodin-Rezeptor 2 eine dominante Expression auf (OTSU et al. 1990).

Die Aktivität der RyR wird von verschiedenen Mechanismen und Enzymen reguliert. So beschreiben FILL und COPELLO (2002) eine Regulation des RyR durch  $\text{Ca}^{2+}$ . Dabei konnten sowohl luminale (GYORKE I und GYORKE 1998) als auch zytosolische (XU und MEISSNER 1998) Regulationsstellen für  $\text{Ca}^{2+}$  gezeigt werden, so dass von einer  $\text{Ca}^{2+}$ - Sensitivität des RyR gesprochen werden kann.

Diese  $\text{Ca}^{2+}$ - Sensitivität des RyR hat dabei entscheidenden Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten. Demnach steigt die Instabilität der RyR mit einer Steigerung ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität an. Instabilität bedeutet in diesem Kontext eine Steigerung der Wahrscheinlichkeit, dass eine spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung weitere RyR aktivieren kann. Ein erhöhtes luminales  $\text{Ca}^{2+}$  führt auch zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der RyR gegenüber dem  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol (SITSAPESAN und WILLIAMS 1994) (siehe Abb. 1-4).



**Abbildung 1-4.** Diese Abbildung zeigt die Auswirkung einer luminalen Kalziumkonzentrationserhöhung auf das Öffnungsverhalten des RyR. Die Öffnung des RyR wird durch eine abwärtszeigende Linie repräsentiert. Modifiziert nach GYORKE und GYORKE, 1998, S. 2805.

Die Aktivität des RyR2 wird auch vom Protein Calmodulin reguliert. Eine Bindung des kalziumfreien-(apocam)-Calmodulin an den RyR vermindert dessen Öffnungswahrscheinlichkeit. Desweiteren wird der RyR auch von Calstabin 2 reguliert. Dieses FK-506-Binding Protein 506 (Calstabin2) ist ein 12.6 kDa Immunoglobulin (KUSHNIR und MARKS 2010), welches als Stabilisator des kardialen RyR2 fungiert. Es bindet den RyR2 mit hoher Affinität und stabilisiert so den geschlossenen Zustand (BRILLANTES et al. 1994). Eine Dissoziation des Calstabin2 von dem RyR2



aufgrund von Phosphorylierung desselbigen durch die Proteinkinase A oder die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Kinase II, erhöht daher dessen Öffnungswahrscheinlichkeit ( $P_0$ ) (XIAO RP et al. 1997).

Auch die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A beeinflussen die Aktivität des RyR2. In den Kardiomyozyten sind diese Phosphatasen an den RyR2 gebunden und können somit regulierenden Einfluss auf ihn ausüben (DOBREV et al. 2011). Ob eine Dephosphorylierung und damit Inaktivierung erfolgt, ist abhängig vom Verhältnis zwischen den im Folgenden beschriebenen aktivierenden Kinasen und den dephosphorylierenden Phosphatasen (VEST et al. 2005).

Die CaMKII (siehe 1.7) bewirkt ebenfalls eine Phosphorylierung des RyR2. Auch diese Phosphorylierung führt zu einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR. Als Ursache ist hier eine der Phosphorylierung folgende Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des RyR2 für zytosolisches Kalzium anzunehmen (WEHRENS et al. 2004). Für die Bestimmung der genauen Phosphorylierungsstellen an dem RyR2 finden sich in der Literatur mehrere Beschreibungen. KUSHNIR et al. (2010) konnten eine Phosphorylierungsstelle an Serin 2815 (Human) oder Serin 2814 (Maus) zeigen. Diese Phosphorylierungsstelle variiert dabei in Abhängigkeit von der Spezies. Eine weitere Phosphorylierungsstelle wird für Serin 2808(Maus)/2809(Human) genannt (WITCHER et al. 1991).

Die Proteinkinase A (siehe 1.8.) reguliert den RyR durch Phosphorylierung an Serin 2808 (WEHRENS et al. 2006) bzw. Serin 2030 (XIAO et al. 2007). Im inaktiven Zustand des RyR ist im Durchschnitt weniger als eine von den vier Untereinheiten des Rezeptors phosphoryliert. Bei akuter  $\beta$ -adrenergen Aktivierung hingegen sind 3 - 4 der PKA- Phosphorylierungsstellen mit einer Phosphatgruppe versehen (SHAN et al. 2010). Durch eine Phosphorylierung des RyR2 wird die Bindeaffinität von FK-506-BP an den RyR2 vermindert, so dass eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit resultiert (WEHRENS et al. 2006). Insgesamt, so schreiben SOBIE et al. (2006), liegt diese damit aktivierende Funktion der PKA aber nur bei niedrigen oder moderaten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen vor. Bei einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR durch die PKA eher erniedrigt (SOBIE et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (siehe 1.10) den RyR und seine Aktivität beeinflussen. Dabei ist es bedeutsam, dass niedrige Level an ROS primär zu einer Aktivierung des Kanals führen. Gesteigerte Mengen

von ROS zeigen hingegen eine Suppression der RyR-Aktivität (YAN et al. 2008). Diese quantitätsabhängige Modulation der RyR-Aktivität kann auf verschiedene Signalwege der Beeinflussung zurückgeführt werden. Die RyR können durch eine S-Nitrosylierung beeinflusst werden, oder auch einer direkten sowie indirekten Redox-Modifikation unterliegen. Dabei weist jedes Monomer der RyR bis zu 89 Cysteinreste auf (XU et al. 1998), wovon aber nur wenige einer Redox-Modifikation zugänglich zu sein scheinen (ABRAMSON und SALAMA 1989). Laut XU et al. (1998) zeigt sich jedoch bei einer Oxidation von bis zu 24 Thiol-Gruppen pro RyR kein Effekt. Eine Steigerung der Oxidation hingegen resultiert in einer irreversiblen Aktivierung der RyR. Diese direkte Redox-Modulation des RyR wird durch das Vorhandensein von Sulfhydryl-(SH)-Gruppen der Cysteinreste ermöglicht (ZIMA und BLATTER 2006). Die aktivierende Wirkung erfolgt, da durch eine Oxidation der SH-Gruppen die Konformation des RyR so geändert wird, dass eine Disulfidbrückenbildung ermöglicht wird (ZIMA und BLATTER 2006), so dass in dem Bereich in welchem der Kanal lokalisiert ist, dies in einer Öffnung bzw. Schließung des Kanals resultiert (IKEMOTO und YAMAMOTO 2000).

Neben der direkten Oxidation und damit Aktivierung der Ryanodin-Rezeptoren kann auch eine Phosphorylierung und somit ebenfalls Aktivierung derselbigen über einen indirekten Weg erfolgen. Dieser indirekte Weg kann u. a. über die durch ROS aktivierbare CaMKII (siehe 1.7.) erfolgen.

Zur Beurteilung der Kalziumfreisetzung aus dem SR durch RyR können sogenannte Sparks gemessen werden. Einem Sparkereignis liegt die gleichzeitige Aktivierung von 6 - 20 Ryanodin-Rezeptoren (1 Cluster) in einem Bereich des junktionalen SR zugrunde (BERS 2002). Initiiert wird ein Spark, indem eine lokale Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Öffnung der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bewirkt wird (LOPEZ-LOPEZ et al. 1995). Eine Verringerung des lokalen  $\text{Ca}^{2+}$  im SR wird als die Ursache für eine Beendigung der Sparks angesehen (BROCHET et al. 2005; TERYTYEV et al. 2002). Ob ein Spark entsteht, hängt dabei sowohl von dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR, als auch von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der RyR ab (RAMAY et al. 2011). Dabei aber bleibt der Radius eines Sparkereignisses, gleichbedeutend mit der Sparkbreite, auf ca. 1,5  $\mu\text{m}$  begrenzt (CHENG et al. 1993).

Aus physiologischer Sicht tragen Sparks während der Kontraktion entscheidend zur Kalziumfreisetzung aus dem SR der Kardiomyozyten bei. Dabei kommt es während eines Aktionspotentials zur synchronen Aktivierung von mehreren Tausend  $\text{Ca}^{2+}$ -

Sparks (BERS 2002). Zur Bildung des Transienten findet also eine räumliche und zeitliche Summation dieser Sparks statt (LOPEZ-LOPEZ et al. 1995).

Neben der genannten multiplen Generierung von Sparks als Grundlage der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, konnte eine diastolische Öffnung der RyR und damit auch eine diastolische Sparkentstehung gezeigt werden (CHENG et al. 1993). Diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks können durch die zufällige Öffnung eines RyR getriggert werden. Diese Generierung basiert auf der einer RyR-Öffnung folgenden, lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung, welche die anderen in demselben junktionalem SR-Bereich angeordneten RyR aktiviert (PROSSER et al. 2010).

Unter physiologischen Bedingungen neigen diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks nicht dazu, weitere Sparks zu generieren (CHENG et al. 1993). Erst ein gesteigerter SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt führt zu einer Erhöhung der RyR-Sensitivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  (SONG LS et al. 2005). So führt die Entstehung von diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks unter pathologischen Zuständen - z. B. bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung - zu einer Steigerung der Wahrscheinlichkeit zur Bildung von sogenannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen (CHENG et al. 1993).  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen können als das Ergebnis von räumlicher und zeitlicher Summation von Sparkereignissen beschrieben werden (CHENG H et al. 1996a; CHEN et al. 2009). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen und damit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks haben pathophysiologisch eine sehr hohe Relevanz, da diese die Basis für sogenannte Nachdepolarisationen sein können. Diese Nachdepolarisationen werden als Auslöser für Arrhythmien angesehen (siehe 1.11).

Der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ist ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, welcher die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern ermöglicht (BERRIDGE et al. 2000).

Der Aufbau des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors ähnelt dem des RyR. Das heißt, wie auch der RyR stellt der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ein homotetrameres Protein dar (MIGNERY et al. 1989) und besteht demnach aus vier Armen, welche in einer ringähnlichen Struktur miteinander verbunden sind, welche gleichzeitig auch den transmembranen Anteil und den eigentlichen Kalziumkanal darstellt (CHADWICK et al. 1990). Dieser transmembrane Anteil wird von dem C-Terminus des Moleküls gebildet (MIGNERY und SUDHOF 1990). Die Stelle, an welcher die Liganden gebunden werden, ist Teil des N-Terminus und weit von dem Kanal entfernt, so dass MIGNERY und SUDHOF (1990) annehmen, dass bei Ligandenbindung der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor eine weitreichende Konformationsveränderung durchläuft.

Es sind drei Isoformen dieses Rezeptors bekannt. Dabei ist der IP<sub>3</sub>-Rezeptor Typ 2 im Herzen zu finden (MACKENZIE et al. 2004; PEREZ et al. 1997). Die Verteilung der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren im Herzen ist jedoch verschieden. So konnte gezeigt werden, dass die Expression des IP<sub>3</sub>-Rezeptoren in den atrialen Kardiomyozyten deutlich höher ist als in den ventrikulären (DOMEIER et al. 2008). Insgesamt aber ist die Dichte dieses Rezeptors im Vergleich zum RyR deutlich niedriger (MOSCHELLA und MARKS 1993; PEREZ et al. 1997).

Eine Aktivierung des Rezeptors wird durch die Bindung des sekundären Botenstoffes IP<sub>3</sub> bewirkt. Dabei konnten HAJNOCZKY und THOMAS (1994) zeigen, dass der IP<sub>3</sub>-Rezeptor auch durch die Bindung von IP<sub>3</sub> inaktiviert wird.

Eine Regulation in seiner Aktivität erfährt der IP<sub>3</sub>-Rezeptor unter anderem durch die nukleare CaMKIIδb (MAXWELL et al. 2012). Eine Rolle der Proteinkinase A in der Regulation des IP<sub>3</sub>-Rezeptors wurde ebenfalls beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Typen des IP<sub>3</sub>-Rezeptors durch die PKA reguliert werden. Die im Herzen exprimierte Form IP<sub>3</sub>-Rezeptortyp 2 weist dabei aber eine eher schwache Stöchiometrie auf. Dennoch wird der Kalziumfluss durch die PKA gesteigert (WOJCIKIEWICZ und LUO 1998). KRIZANOVA et al. (2008) zeigten jedoch, dass die Typ 2- Rezeptoren hingegen nicht durch Katecholamine und damit auch nicht durch die PKA reguliert bzw. aktiviert werden.

Im Bezug auf die Wirkung einer IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Aktivierung konnten DOMEIER et al. (2008) zeigen, dass die IP<sub>3</sub>-Rezeptor abhängige Kalziumfreisetzung einen positiv inotropen Effekt aufweist, indem die Kalziumfreisetzung durch die RyR vereinfacht wird. Die durch die IP<sub>3</sub>-Rezeptoren bedingte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung kann auch die Öffnung der RyR beeinflussen und so die Wahrscheinlichkeit einer Sparkentstehung erhöhen (HORN et al. 2013). Eine Rolle des IP<sub>3</sub>-Rezeptors in der RyR unabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung ist jedoch noch Gegenstand der aktuellen Diskussion (ZIMA et al. 2010). Insgesamt jedoch wird die Bedeutung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors für die kardiale Kalziumregulation zunehmend als wichtig eingeschätzt: Zum einen erlaubt die Lokalisation eine Regulation der verschiedenen kardialen Funktionen. Zum anderen mehrten sich die Hinweise auf eine Bedeutung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors in der kardialen Pathogenese. Das heißt, da der IP<sub>3</sub>-Rezeptor wie beschrieben die elektromechanische Kopplung des Kontraktionsvorganges beeinflusst, kann dieser wohl auch zur Entstehung von Arrhythmien beitragen (DOMEIER et al. 2008). Die Annahme einer Bedeutung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors für pathologische Herzveränderungen

wird auch durch die gesteigerte Expression desselbigen in hypertrophen Herzen (NAKAYAMA et al. 2010), sowie bei Patienten mit ischämischer dilatativer Kardiomyopathie untermauert (HARZHEIM et al. 2010). Auch eine Hochregulation der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren unter herzinsuffizienten Bedingungen konnte gezeigt werden (GO et al. 1995).

Zudem wird eine Rolle des IP<sub>3</sub>-Rezeptors in der Generierung von kardialen pathologischen Bedingungen auch durch die in den Experimenten von MACKENZIE et al. (2004) durchgeführte erfolgreiche Anwendung des IP<sub>3</sub>-Rezeptor-spezifischen Antagonisten 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl Borate) belegt. In diesen Experimenten wurden sowohl die durch IP<sub>3</sub>-Rezeptorstimulation bedingten Arrhythmien als auch der proarrhythmische diastolische Kalziumtransient gehemmt. Zudem konnten LUO et al. (2008) eine durch IP<sub>3</sub>-Rezeptorstimulation medierte Generierung von Kalziumsparks und Kalziumwellen, durch eine der alpha1-adrenergen Stimulation folgenden Aktivierung der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren zeigen.

Insgesamt also deuten viele Untersuchungen auf eine Rolle des IP<sub>3</sub>-Rezeptors in der Pathogenese von kardialen Dysfunktionen hin. Abgesehen davon, stellt sich die Beschreibung der Regulation als auch der Wirkung einer IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Aktivierung vor allem im Bezug auf die verschiedenen Isoformen aufgrund vieler widersprüchlicher Angaben und Uneinheiten in der Literatur als schwierig dar.

## ***1.5 Angiotensin***

Physiologisch stellt Angiotensin II (Ang II) das Effektorpeptid des Renin-Angiotensin-Systems dar (SILBERNAGL 2014). Unter verschiedenen Umständen, insbesondere bei Herzinsuffizienz kommt es zu einer kompensatorischen dauerhaften Erhöhung von Ang II (PIANO et al. 1998). Dem liegt zugrunde, dass durch das bei Herzinsuffizienz auftretende Kontraktionsdefizit eine renale Minderperfusion resultiert, was eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems induziert (KLINKE et al. 2010). Die Auswirkung dieser Ang II Aktivierung sind vielfältig. Um einer Betrachtung der Funktionen des Angiotensin II gerecht zu werden, muss zwischen direkten bzw. lokalen und indirekten bzw. systemischen Effekten unterschieden werden.

Die lokalen bzw. direkten Effekte werden durch die Bindung des Angiotensin II an die entsprechenden Angiotensin-Rezeptoren in den Zielorganen vermittelt. Diese

Rezeptoren sind in vielen Organen oder Gewebe ausgeprägt; dazu gehören Gefäße, Nebenniere, Niere, Gehirn, Leber und das Herz (PEACH 1977). Von den genannten Angiotensin-Rezeptoren gibt es vier Subtypen  $AT_1$ ,  $AT_2$ ,  $AT_3$  und  $AT_4$ . Der Hauptvertreter im menschlichen Herzen ist der Rezeptorsubtyp  $AT_2$  (NOZAWA et al. 1994; VILA PETROFF und MATTIAZZI 2001). Bei einer Stimulation der kardialen Angiotensin-Rezeptoren zeigt sich ein positiv chronotroper, sowie positiv inotroper Effekt (DOSTAL et al. 1997). Zudem konnten Veränderungen des kardialen Metabolismus und eine Vasokonstriktion der Herzkranzgefäße gezeigt werden (DOSTAL et al. 1997). Die positiv inotrope Wirkung des Ang II resultiert trotz der vorliegenden  $AT_2$ -Rezeptor Dominanz, vor allem über einen  $AT_1$ -Rezeptor medierten Mechanismus (ISHIHATA und ENDOH 1993). Diesem positiv inotropen Effekt liegt zugrunde, dass entweder eine Steigerung der zytosolischen Kalziumkonzentration oder eine Steigerung der Kalziumsensitivität der Myofilamente aus einer Ang II-Wirkung resultiert. Welcher dieser Mechanismen der Ang II-Wirkung zugrunde liegt, ist bis heute nicht geklärt (VILA PETROFF und MATTIAZZI 2001). Eine der Ang II-Freisetzung folgende Steigerung des intrazellulären Kalziumtransienten konnte aber gezeigt werden (WATANABE und ENDOH 1998). Allgemein akzeptiert ist, dass die einer Ang II-Freisetzung folgende Generierung von  $IP_3$ - und DAG einen Teil der kardialen Wirkungen einer Ang II-Freisetzung bedingen. Welchen Beitrag die  $IP_3$ -Generierung zu der einer Ang II-Wirkung folgenden Kalziumfreisetzung leistet, ist hingegen noch nicht geklärt. Die einer DAG-Freisetzung folgenden Aktivierung der PKC scheint sehr wahrscheinlich den positiv inotropen Effekt mit zu induzieren (BRAZ et al. 2004).

Die systemischen oder auch indirekten Effekte wirken durch die an die Angiotensinausschüttung gekoppelte Katecholaminausschüttung (DOSTAL et al. 1997; VILA PETROFF und MATTIAZZI 2001) sowie durch die renalen und endokrinen Funktionen. Demnach reguliert Ang II die Volumen- und Elektrolythomöostase durch beispielsweise die Regulation der Aldosteronbiosynthese und Sekretion. Demnach trägt Ang II über eine der Ang II-Freisetzung folgende Stimulation der Aldosteronproduktion zu einer Vasokonstriktion und  $Na^+$ -Rückresorption bei (DIBONA 2000). Somit kann eine vermehrte und langfristige Ang II-Freisetzung auch zur Entstehung von Hypertension führen (LI Q et al. 1996). Einer Ang II-Freisetzung folgenden Freisetzung von Katecholaminen liegt zugrunde, dass das Nebennierenmark über  $AT_1$ -Rezeptoren einer Ang II-Stimulation

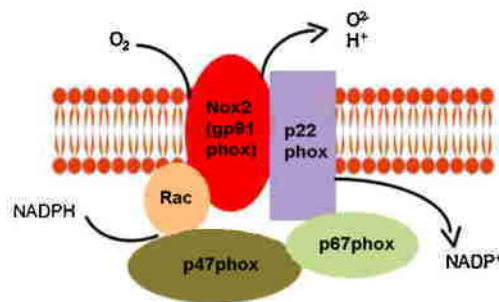
zugänglich ist. Eine Hemmung dieses Rezeptors in reperfundiertem Gewebe zeigte einen deutlichen antiarrhythmischen Effekt (YAHIRO et al. 2003). Dabei konnte auch eine  $AT_2$ -Rezeptor medierte Katecholaminfreisetzung des Nebennierenmarks gezeigt werden (BELLONI et al. 1998).

Neben den beschriebenen akuten Effekten, bei welchen, die Regulation der Volumen- und Elektrolythomöostase sowie die Modulation der kardialen Kontraktilität (VON LEWINSKI et al. 2008) im Vordergrund stehen, zeigt Ang II auch verschiedene langfristige Effekte. Diese umfassen die Entwicklung von Hypertrophie (ACETO und BAKER 1990) und sind zudem mit Hypertension (FLEMING 2000), KHK, Herzinsuffizienz (GAVRAS und GAVRAS 2002) und perivaskulärer Fibrose (TAKAYANAGI et al. 2015) assoziiert. Demnach sind die langfristigen kardialen Auswirkungen von Ang II vor allem pathologischen Effekten zuzuordnen. Das Bestehen einer pathologischen Wirkung des Ang II wird neben den beschriebenen Beobachtungen durch die erfolgreiche Anwendung von ACE-Hemmern und Ang II-Rezeptorblockern als therapeutisches Agens mittels einer Blutdrucksenkung bei Hypertension und kongestiver Herzinsuffizienz unterlegt. Zudem wird ACE-Hemmern und Ang II-Rezeptorblockern eine Rolle bei der Prävention und Therapie von Vorhof- und Kammerarrhythmien zugesprochen (GARG et al. 2006). Eine präventive Auswirkung von Ang II-Rezeptorblockern wurde zum ersten Mal nach der ELITE Trail-Studie postuliert (PITT 1997).

In Bezug auf die Kardiomyozyten konnte bisher nachgewiesen werden, dass Angiotensin II zur Erhöhung der Auftretenswahrscheinlichkeit von EADS und DADs führt (ZHAO et al. 2011). Die ursächlichen Einflüsse der EADs und DADs sind dabei unter anderem vermutlich die Generierung von ROS (siehe 1.10) über eine Aktivierung der NADPH- Oxidase 2 (ZHAO et al. 2011). Über diesen Mechanismus kann Ang II auch den durch Arrhythmie bedingten plötzlichen Herztod auslösen (FISCHER R et al. 2007). Zudem wird eine durch Ang II bedingte Aktivierung der PKC postuliert, welche ebenfalls im Umfeld pathologischer kardialer Bedingungen erwähnt wird (DORN und FORCE 2005; CHURCHILL und MOCHLY-ROSEN 2007). Insgesamt also scheint Ang II in vielfältiger Weise in die Generierung kardialer Dysfunktion involviert zu sein. Die Pathophysiologie dieser Wirkung umfasst dabei wahrscheinlich vor allem die Aktivierung der NADPH-Oxidase mit folgender ROS-Produktion. Die zugrunde liegenden Mechanismen sollen im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

## 1.6 NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase ist ein an die Membran gebundener Enzymkomplex. Bisher sind fünf verschiedene NADPH-Oxidase-Homologe (NOX 1 – NOX 5) beschrieben worden (GARRIDO und GRIENDLING 2009). In den Kardiomyozyten befinden sich vorwiegend die Isoformen 2 und 4 (ERICKSON et al. 2011). Der Unterschied dieser beiden Isoformen beruht vor allem darauf, dass NOX 2 zur Produktion von  $O_2^-$  die Assoziation von katalytischen und zytosolischen regulatorischen Untereinheiten erfordert.



**Abbildung 1-5.** Aufbau der NADPH-OXIDASE II. Die NADPH-Oxidase umfasst einen Cytochrom b558-Komplex, welcher aus der gp91phox-Untereinheit sowie der p22-phox-Untereinheit und drei weiteren Untereinheiten (p47phox, p67phox und RAC) besteht. Modifiziert nach GARRIDO und GRIENDLING, 2009, S. 148.

Im Herzen ist das endogene Aktivitätslevel der NADPH-Oxidase eher niedrig. Verschiedene kardiovaskuläre Agonisten können aber die Oxidaseaktivität schnell und effektiv erhöhen. Zu diesen gehört unter anderen Angiotensin II (LI Y-L et al. 2007).

Die Aktivierung der NADPH-Oxidase 2 durch Ang II umfasst mehrere Zwischenschritte. Um eine Steigerung der enzymatischen Aktivität der NOX2, der eigentlichen Kinase zu erreichen, muss eine Translokation der zytosolischen Faktoren zu dem konstitutiv transmembranen NOX2/p22phox-Komplex erfolgen. Dafür bindet zunächst Angiotensin II an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor (PALOMEQUE et al. 2009b). Dies führt zu einer Translokation der zytosolischen Anteile des NADPH-Oxidase-Komplexes. Das heißt, initial bedingt eine Phosphorylierung von p47phox eine Konformationsänderung wodurch diese Einheit zur Membran gelangt. Dadurch wird die „Aktivator“-Untereinheit p67phox in Kontakt mit dem NOX2/p22phox-Komplex gebracht, so dass die GTPase Rac in mehreren Schritten mit dem NOX2/p22phox-Komplex interagieren kann (NISHIDA et al. 2005). Hieraus resultiert schlussendlich eine vollständige Zusammenkunft des Kinase-Komplexes wodurch



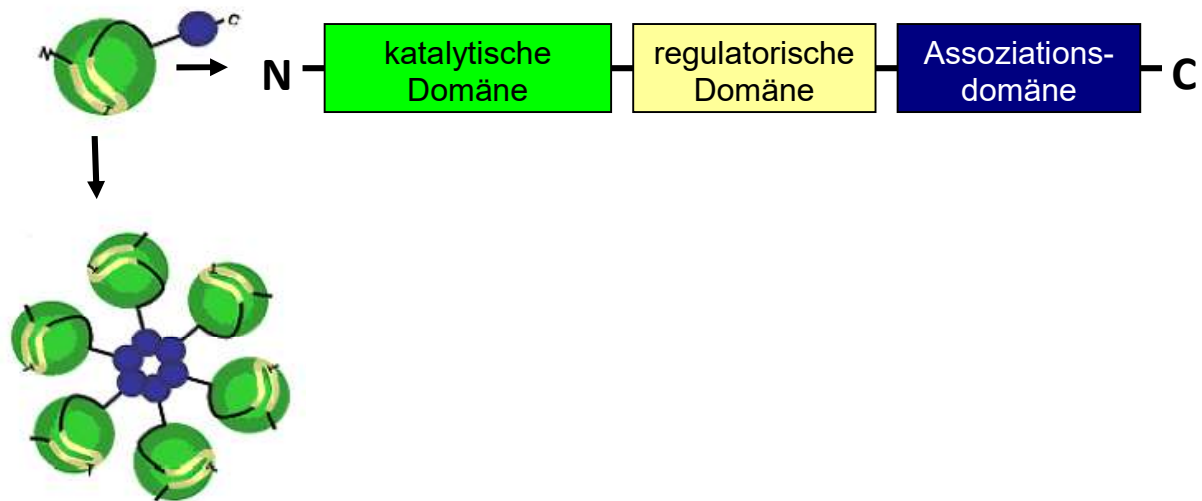
die Aktivierung erfolgt. Es können nun Superoxide produziert werden, indem ein Elektron von NADPH in dem Zytosol zum Sauerstoff in dem extrazellulären Bereich gebracht wird (BEDARD und KRAUSE 2007).

Eine vermehrte Aktivität der NADPH-Oxidase 2 führt zu einer gesteigerten Generierung von ROS. Die somit folgende Erhöhung der ROS-Konzentration kann all die damit im Zusammenhang stehenden myokardialen Schäden und Missfunktionen bedingen (PALOMEQUE et al. 2009b) (siehe 1.10). Eine Hemmung der NADPH-Oxidase als Möglichkeit in der Therapie der Herzinsuffizienz vorzugehen, wurde bereits angeregt (ZHANG M et al. 2013). Als Voraussetzung sehen die Autoren die Entwicklung eines NOX-Isoform spezifischen Inhibitors.

### ***1.7 $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase***

Die CaMKII ist sowohl für die Physiologie als auch für die Pathophysiologie des Kalziumstoffwechsels von Kardiomyozyten entscheidend.

Diese  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase II ist ein Holoenzym, welches eine Serin/Threonin Kinase darstellt (ERICKSON et al. 2011). Sie besteht aus 6 unabhängigen katalytischen Untereinheiten (HUDMON und SCHULMAN 2002). Jede dieser Untereinheiten enthält drei verschiedene Domänen (ANDERSON 2011). Zu diesen gehört eine Assoziationsdomäne, welche den Aufbau des Enzyms bestimmt. Eine weitere Domäne stellt den regulatorischen Part dar, der die Aktivität des Enzyms bestimmt. Die dritte ist eine katalytische Domäne. Sie gewährleistet die eigentliche Kinasefunktion des Enzyms (ERICKSON et al. 2011).



**Abbildung 1-6.** Aufbau der CaMKII mit ihren Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten besteht aus einer katalytischen, einer regulatorischen und einer Assoziationsdomäne. Diese Monomere schließen sich in einer Ring-ähnlichen Struktur zur CaMKII zusammen. Modifiziert nach MAIER und BERS (2002). Zwei dieser Hexamere lagern sich übereinander und bilden so eine Gruppe mit insgesamt 12 Monomeren (ANDERSON 2015).

Es sind vier verschiedene Isoformen der CaMKII bekannt: CaMKII $\alpha$ , CaMKII $\beta$ , CaMKII $\gamma$  und CaMKII $\delta$ . Dabei ist die CaMKII $\delta$  die im Herzen am meisten exprimierte Isoform und weist zudem verschiedene Splicevarianten auf (SCHWORER et al. 1993; EDMAN und SCHULMAN 1994). Die Splicevariante CaMKII $\delta_B$  befindet sich primär im Nukleus (MAYER et al. 1994) und die Splicevariante CaMKII $\delta_C$  ist vor allem im Zytosol der Kardiomyozyten vorhanden (SRINIVASAN et al. 1994; KOHLHAAS et al. 2006). Dabei ist die Lokalisation nicht als exklusiv einzuordnen. Es konnte gezeigt werden, dass sich beide Subtypen auch im Nukleus bzw. im Zytosol befinden (MISHRA et al. 2011).

Die nukleare CaMKII $\delta_B$  wird durch eine IP<sub>3</sub>-Rezeptorstimulation vermittelte Kalziumfreisetzung aktiviert (WU X et al. 2006). Dieser IP<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelte Mechanismus scheint für die Hypertrophieentwicklung von Bedeutung zu sein (ZHANG T et al. 2002). Die zytosolische CaMKII Isoform CaMKII $\delta_C$  soll im Weiteren näher erläutert werden.

### 1.7.1 Aktivierung

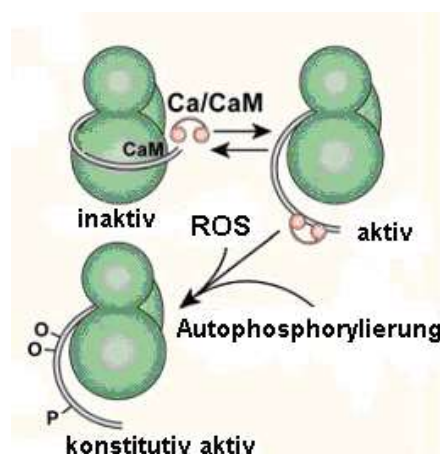
Eine Aktivierung der CaMKII $\delta_C$  erfolgt durch die Bindung des regulatorischen Proteins Calmodulin in Ca<sup>2+</sup>-gebundener Form. Diese Anlagerung an die regulatorische Untereinheit bewirkt eine Konformationsveränderung der CaMKII,

welche im Folgenden die katalytische Einheit einer Substratbindung zugänglich macht (RELLOS et al. 2010). Auf diese Weise aktiviert, kann die CaMKII dann die verschiedenen Zielsubstrate phosphorylieren.

Wenn diese  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Bindung über einen längeren Zeitraum besteht, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Autophosphorylierung an T287 erfolgt (BERS 2011). Diese Autophosphorylierung erfolgt an Threonin 287 und bewirkt eine Affinitätssteigerung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM für die CaMKII um ein Tausendfaches. So wird die Zeitspanne in welcher  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM an CaMKII gebunden bleibt von weniger als einer Sekunde auf mehrere hundert Sekunden verlängert (MEYER et al. 1992) und damit eine konstitutive Aktivierung induziert. Demnach bleibt auch bei niedrigem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  die Aktivierung erhalten.

Ein weiterer neben dem Kalzium wichtiger Regulationsmechanismus der CaMKII sind die sogenannten reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) (PALOMEQUE et al. 2009b). Diese oxidieren die CaMKII an Methionin 281/282 (ERICKSON et al. 2011), was in der Folge dazu führt, dass ähnlich der Autophosphorylierung eine Kalzium-unabhängige prolongierte Aktivierung resultiert. Durch oxidativen Stress infolge von ROS kann die CaMKII also ebenfalls in den autonom aktiven Zustand gebracht werden. Die Generierung der ROS erfolgt über eine durch Ang II induzierte NADPH-Oxidase-Aktivität, was dann schlussendlich in der CaMKII-Aktivierung resultiert (ZHAO et al. 2011).

Um die autonome Aktivierung zu beenden, muss die Phosphorylierung an Thr-287 durch Phosphatasen rückgängig gemacht werden. Dies wird primär durch die Phosphatasen PP1 und PP2A gewährleistet (STRACK et al. 1997).



**Abbildung 1-7.** Eine Aktivierung der CaMKII erfolgt durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin (Ca/CaM). Eine konstitutive Aktivierung resultiert aus einer Oxidation durch ROS an Methionin 281/282 oder durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung an Threonin 287. Modifiziert nach ANDERSON, 2011, S. 1501.

Auch konnte eine vermehrte Aktivität der CaMKII $\delta$  während der Reperfusionsphase nach einer Ischämie nachgewiesen werden. Dabei ist dieser Umstand mit den nach Reperfusion auftretenden Arrhythmien assoziiert (ADAMEOVA et al. 2012).

### **1.7.2 Funktion**

Durch ihre vielfältigen Funktionen nimmt die CaMKII eine wichtige Rolle im zellulären Funktionsapparat ein. So werden Proteine reguliert, welche die elektromechanische Kopplung sowie die Erregbarkeit der Zelle beeinflussen. Wie unter 1.3 schon beschrieben phosphoryliert und aktiviert damit die CaMKII den kardialen RyR2. Abgesehen vom RyR2, dessen Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität durch die CaMKII gesteigert wird (GUO et al. 2012), phosphoryliert die CaMKII weitere Ca<sup>2+</sup>-Transport- Kanäle. Dazu gehören u. a. der spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanal sowie der Na<sub>v</sub>1.5 - Natriumkanal und K<sup>+</sup>- Kanäle (BERS und GRANDI 2009).

Die Phosphorylierung und damit Aktivierung der LTCC führt zu einer Steigerung des I<sub>Ca</sub> (L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Strom) (YUAN und BERS 1994). Dabei phosphoryliert die CaMKII den LTCC an der  $\alpha_{1c}$ - Untereinheit des LTCC (HUDMON et al. 2005) oder an der  $\beta_{2a}$ - Untereinheit (GRUETER et al. 2006).

Als weiteres Phosphorylierungstarget der CaMKII ist das Protein Phospholamban zu nennen. Eine Phosphorylierung von Phospholamban durch die CaMKII erfolgt an Threonin 17 (BERS und DESPA 2009; MAIER et al. 2003). Durch diese Phosphorylierung wird wie bei einer Phosphorylierung durch die PKA die Inhibition der SERCA aufgehoben, so dass eine erhöhte SERCA-Aktivität resultiert (KOSS und KRANIAS 1996).

### **1.7.3 Akute vs. chronische CaMKII-Aktivierung**

Um einer Betrachtung der CaMKII-Funktion gerecht zu werden, muss zwischen einer akuten CaMKII $\delta_c$ -Aktivierung und einer chronischen CaMKII $\delta_c$ -Überaktivierung unterschieden werden.

Bei einer akuten Aktivierung kommt es zu einer Steigerung der aberranten Kalziumfreisetzung, dem sogenannten SR Ca<sup>2+</sup>- Leck, bei gleichzeitig reduziertem SR Ca<sup>2+</sup>- Gehalt. KOHLHAAS et al. (2006) führen dies auf eine erhöhte Freisetzung des SR Ca<sup>2+</sup> zurück, was durch die gesteigerte Ca<sup>2+</sup>- Sensitivität der RyR begründet werden kann. Dennoch bleibt die Menge an systolisch freigesetzten Ca<sup>2+</sup> konstant, da gleichzeitig der LTCC Ca<sup>2+</sup>- Einstrom gesteigert ist.

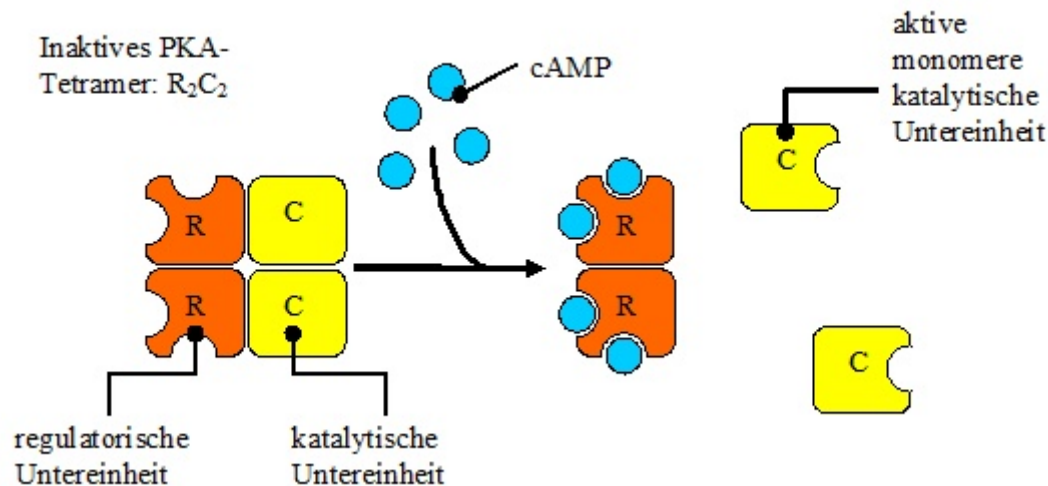
Eine chronische CaMKII $\delta_c$ - Aktivierung wird mit verschiedenen pathologischen Zuständen der Kardiomyozyten in Verbindung gebracht. Vielfach wurde eine Bedeutung der CamKII in der Entwicklung von Hypertrophie (BOKNIK et al. 2001; HAGEMANN et al. 2001; WESTENBRINK et al. 2015; ZHANG T. et al. 2002) und Herzinsuffizienz (HOCH et al. 1999; KIRCHHEFER et al. 1999; NETTICADAN et al. 2000; MAIER et al. 2003) nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die CaMKII sowohl bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, als auch bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie erhöht ist (FISCHER et al. 2014; HOCH et al. 1999; KIRCHHEFER et al. 1999).

Zudem beschreiben WAGNER et al. (2006), dass eine übermäßig aktivierte CaMKII proarrhythmische Veränderungen bedingt. Diese arrhythmogene Wirkung der CaMKII konnte sowohl in vivo als auch bei In-vitro-Experimenten nachgewiesen (SAG et al. 2009; SOSSALLA et al. 2010; VAN OORT et al. 2010; SOSSALLA et al. 2011; WAGNER et al. 2011) werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei Inhibition der CaMKII- Phosphorylierungsstelle des RyR2 (Ser2814) eine Reduktion von arrhythmischen Zellen erreicht werden konnte (FISCHER TH et al. 2014). Daher sollte über einen Einsatz von CaMKII-Inhibitoren als therapeutische Option nachgedacht werden (SAG et al. 2009; FISCHER TH et al. 2014; SAG et al. 2014). Nach neueren Untersuchungen sind die durch eine CaMKII $\delta_c$ -Überexpression bedingten Arrhythmien und die diastolische Dysfunktion unter anderem durch einen vermehrten späten Na<sup>+</sup>- Strom bedingt (WAGNER et al. 2006; SAG et al. 2014). Dem liegt zugrunde, dass ein gesteigerter Na<sup>+</sup> /Ca<sup>2+</sup> - Austausch sowie eine veränderte PLB- und SERCA-Expression in den Kardiomyozyten zu finden sind (MAIER et al. 2003). Somit könnte eine Inhibition des Na<sup>+</sup>- Stroms auch eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit darstellen (SOSSALLA et al. 2011; SAG et al. 2014).

## ***1.8 Proteinkinase A***

Die Proteinkinase A hat einen hohen Stellenwert in der Regulation des Kalziumstoffwechsels der Kardiomyozyten. Auch wenn die genaue Auswirkung einer PKA-Aktivierung noch diskutiert wird, so steht fest, dass die PKA für die Regulation des Kalziums sehr wichtig ist.

Die Proteinkinase A (PKA) ist eine cAMP-abhängige Proteinkinase und wird zu den Serin/Threoninkinasen gezählt. Der Aufbau zeigt zwei katalytische und zwei regulatorische Untereinheiten. Die regulatorischen Untereinheiten sind mit dem RyR2 verbunden (MARX et al. 2000).



**Abbildung 1-8.** Als Heterotetramer besteht die PKA in ihrem Aufbau aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten. Aus einer Bindung von vier cAMP-Molekülen an die beiden regulatorischen Untereinheiten resultiert eine Konformationsänderung, wodurch die katalytischen Untereinheiten (C) als aktive Monomere freigesetzt werden. Modifiziert nach RASSOW et al., 2007, Seite 548.

Kardiomyozyten exprimieren vier verschiedene Isoformen der regulatorischen Untereinheiten: PKA-R1 $\alpha$ , PKA-R1 $\beta$  sowie PKA-R1I $\alpha$  und PKA-R1I $\beta$  (DI BENEDETTO et al. 2008). Dabei zeigen die PKA-R1 und die PKA-R1I verschiedene Lokalisationen und biochemische Merkmale. So ist die PKA-R1 vor allem im Zytosol der Kardiomyozyten, die PKA-R1I hingegen ist hauptsächlich an der Zellmembran assoziiert (CORBIN et al. 1977).

Eine Aktivierung dieser Proteinkinase erfolgt über folgenden Signalweg: Durch die Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird ein G<sub>s</sub>-Protein aktiviert, welches wiederum die Aktivität der Adenylatzyklase steigert. Eine vermehrte Aktivität der Adenylatzyklase bewirkt einen Anstieg der cAMP-Konzentration (KLINKE et al. 2010). Damit kann cAMP an die regulatorische Einheit binden und die PKA aktivieren, indem es die Dissoziation von den katalytischen Einheiten bewirkt (KLINKE et al. 2010). So werden die katalytischen Untereinheiten frei und die entsprechenden Substrate der PKA phosphoryliert (KAMP und HELL 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass die PKA-R1 auch eine Regulation durch ROS erfährt. Dabei wiesen BRENNAN et al. (2006) nach, dass es bei einer Redoxaktivierung zu der Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den zwei regulatorischen Untereinheiten

kommt. Dies führt zu der Aktivierung der PKA und damit auch zu der folgenden Phosphorylierung der Zielsubstrate. Demnach liegt dabei eine cAMP-unabhängige Aktivierung der PKA vor.

### **1.8.1 Substrate der PKA**

Die von der PKA phosphorylierten Substrate sind u. a. Phospholamban, der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der RyR, Troponin I sowie das Myosin-bindende Protein C (BERS 2002). All diese Phosphorylierungen tragen zu einem inotropen und lusitropen Effekt bei.

Die Phosphorylierung von Phospholamban erfolgt an Serin 16 und löst die durch Phospholamban bedingte Hemmung der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) auf (LEHNART und MARKS 2007), was die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität derselbigen um das 2 - 3fache anhebt (BERS und DESPA 2009). Diese ATPase stellt eine Kalziumpumpe dar, welche Kalziumionen aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum befördert. Somit trägt die SERCA einen großen Beitrag zur Senkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Zellen bei, so dass die Relaxation des Herzmuskels gewährleistet wird (BERS 2002). Phospholamban (PLB) ist ein Protein der Kardiomyozyten, welches funktionell einen endogenen Inhibitor der SERCA darstellt (BERS 2002). Diese Inhibition der SERCA wirkt vor allem bei niedrigem zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ , da Phospholamban die Affinität der SERCA zu  $\text{Ca}^{2+}$  senkt ohne dabei die maximale Transportrate zu verändern (BERS und DESPA 2009). Die Phosphorylierung des Phospholambans durch die PKA bewirkt eine Dissoziation von PLB und SERCA. In der Folge kommt es zur Des-Inhibition (TADA und TOYOFUKU 1996). Die gesteigerte SERCA Aktivität führt zu einer schnelleren Relaxation des Kardiomyozyten (BERS 2002). Zugleich bewirkt die vermehrte Aktivität der SERCA einen erhöhten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt. Unter anderem durch diesen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg resultiert der positiv inotrope Effekt der PKA (BERS 2002).

Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal wird nachweislich durch eine Phosphorylierung mittels PKA aktiviert (HULME et al. 2006). Ser 1700 bzw. Ser 1928 in dem C-Terminus der  $\alpha_1$ -Untereinheit wird dabei als die relevante Phosphorylierungsstelle der PKA beschrieben (HULME et al. 2006; HELL 2010).

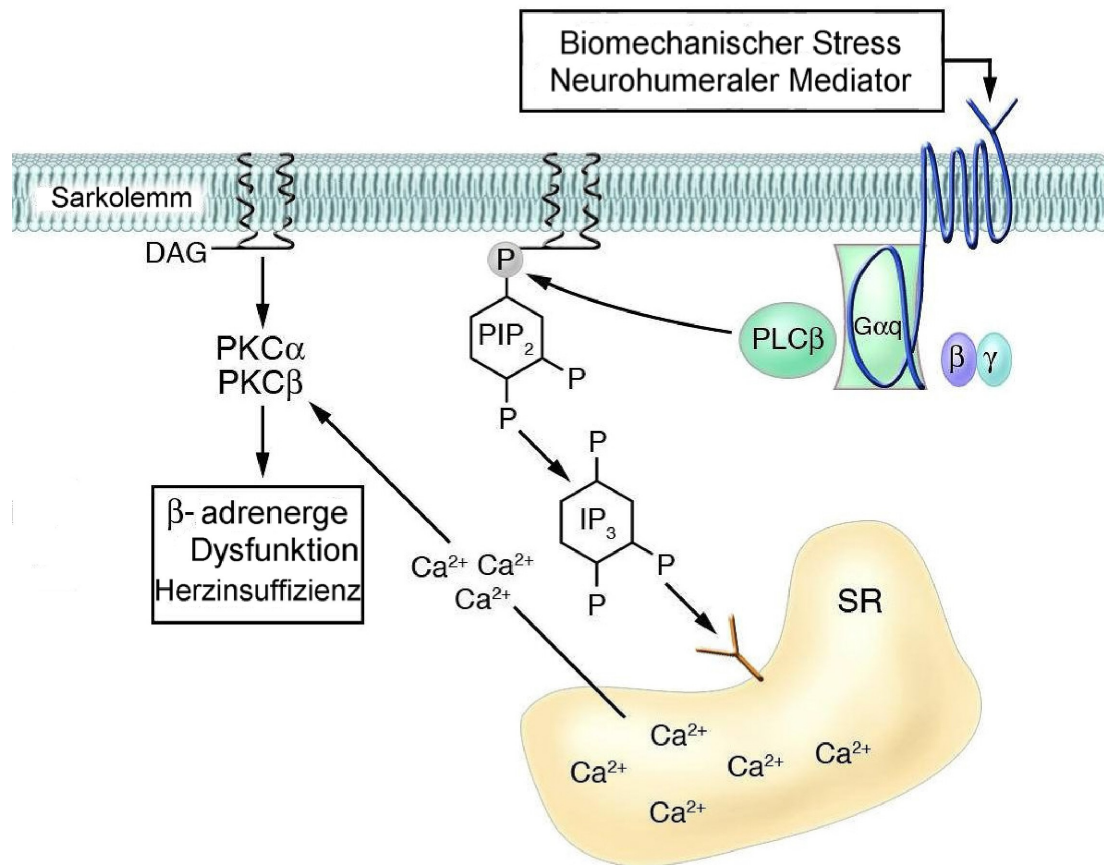
Wie unter 1.4 beschrieben, wird auch der RyR durch die PKA reguliert. Die Bedeutung dieser PKA-abhängigen Phosphorylierung der RyR wird kontrovers diskutiert. Nach MARKS (2013) trägt eine PKA-abhängige Hyperphosphorylierung zu einer Entleerung des SR bei. Über diese Kalziumentleerung des SR können

Depolarisationen und damit Arrhythmien ausgelöst werden. Nach anderer Ansicht scheint die PKA-abhängige Hyperphosphorylierung der RyR für die Entwicklung des Kontraktilitätsdefizits bei einer Herzinsuffizienz eher nicht von Bedeutung zu sein (HOUSER 2014). Die kardiale Dysfunktion nach Myokardinfarkt scheint ebenfalls nicht durch die PKA-abhängige Phosphorylierung der RyR bedingt zu sein (ZHANG T et al. 2010). Zudem wurden auch die nach Isoproterenol-Gabe vermehrt zu beobachtenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen (siehe 1.4) durch Hemmung der PKA nicht verhindert. Aus diesem Grund gehen die Autoren der Studie davon aus, dass die PKA auch in diesem Zusammenhang keine große Bedeutung hat, sondern andere Kinasen dafür relevant sind (CURRAN et al. 2010).

### **1.9 Proteinkinase C**

Da auch die PKC und der mit dieser interagierende  $\text{IP}_3$ -Rezeptor aufgrund ihrer Rolle in der Kalziumregulation anhand der durchgeführten Experimente untersucht wurde, sollen diese ebenfalls beschrieben werden. Die Proteinkinase C ist ein Enzym der Gruppe der Serin/Threoninkinasen. Mittlerweile wurden multiple Isoenzyme beschrieben, welche in drei Gruppen eingeordnet werden. Diese Gruppen umfassen die klassischen PKC-Isoenzyme mit den Formen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$  sowie die neuen PKC-Isoenzyme mit  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\eta$  und  $\theta$  und die atypischen Isoenzymen mit  $\zeta$  und  $\lambda$  (NARUSE und KING 2000). Eine Aktivierung der PKC erfolgt über eine Aufhebung der, durch eine inhibitorische Domäne, vorliegenden Hemmung der katalytischen Domäne (HOUSE und KEMP 1987). Für die Funktion der klassischen PKC wird  $\text{Ca}^{2+}$  benötigt, so dass die Aktivierung der PKC mit einer Stimulierung der Phospholipase C durch ein aktiviertes G-Protein ( $\text{G}_q$ ) beginnt (KORBMACHER 2014). Diese aktivierte Phospholipase C hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerin (DAG). Während DAG direkt als Kofaktor für die PKC fungiert, führt  $\text{IP}_3$  durch eine Interaktion mit den  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren zu einer zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg bewirkt dann zusammen mit DAG die Aktivierung der klassischen PKC. Die neuen und atypischen Isoenzyme der PKC werden  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig aktiviert, wobei die neuen PKC-Isoenzyme zur Aktivierung DAG und Phosphatidylserin benötigen. Die atypischen PKC-Isoenzyme sind sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ - als auch DAG unabhängig und werden durch Phosphatidylserin aktiviert (NARUSE und KING 2000).





**Abbildung 1-9.** Über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit folgender Generierung von PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) und IP<sub>3</sub> (Inositoltriphosphat) erfolgt die Aktivierung der klassischen PKC-Isoformen. Modifiziert nach DORN und FORCE, 2005, S. 530.

Neben diesem Aktivierungsweg der klassischen PKC konnten Gopalakrishna et al. einen weiteren Beeinflussungsmechanismus der PKC-Aktivität zeigen. Dieser basiert auf einer ROS-abhängigen Modulation der PKC-Aktivität. Dabei hatten niedrige ROS-Konzentrationen eine eher aktivierende Wirkung, hohe ROS-Konzentrationen führten hingegen zu einer irreversiblen Inaktivierung der PKC (GOPALAKRISHNA und ANDERSON 1989). Dem liegt zugrunde, dass bei niedrigen ROS-Konzentrationen nur die regulative Domäne der PKC oxidiert und damit aktiviert wird. Bei hohen Konzentrationen hingegen werden sowohl die regulatorische, als auch die katalytische Domäne verändert, was in einer irreversiblen Inaktivierung resultiert (GOPALAKRISHNA und ANDERSON 1989).

Die PKC katalysiert die Phosphorylierung multipler zellulärer Proteine und stellt damit einen wichtigen Part der Signaltransduktion in den Kardiomyozyten dar. Die genauen Auswirkungen einer PKC Aktivierung zu analysieren, stellt sich aufgrund der so zahlreichen Isoenzyme und den damit einhergehenden multiplen Effekten und Wirkmechanismen als komplex dar.

Mehrere Zielsubstrate der PKC, welche im Zusammenhang mit der Kalziumregulation stehen, sollen hier aber dennoch genannt werden. So phosphoryliert die aktivierte Proteinkinase C unter anderem den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (KAMP und HELL 2000), den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher (WIEDERKEHR et al. 1999), den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (IWAMOTO et al. 1996) sowie kontraktile Proteine (CLEMENT et al. 1992). Dabei wurde bereits beschrieben, dass eine Aktivierung der PKC auch zu einer starken Reduktion des  $\text{Na}^+$ - Stroms, aufgrund einer der Phosphorylierung folgenden Veränderung des  $\text{Na}^+$ -Kanals führt (QU et al. 1994; MURRAY et al. 1997). Eine Phosphorylierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals durch die PKC erfolgt an Ser1928 der  $\alpha 1\text{c}$ -Untereinheit, was mit einer Steigerung des  $I_{\text{Ca}}$  einhergeht (YANG et al. 2005). Diese Phosphorylierungsstelle ist auch Ziel einer PKA mediierten LTCC-Aktivierung, so dass von einer Interaktion der beiden Kinasen in der LTCC-Regulation ausgegangen werden kann (YANG et al. 2005). KAMP und HELL (2000) beschreiben jedoch auch eine Inhibition des LTCC und damit gegensätzliche Wirkung bezüglich des  $I_{\text{Ca}}$ . Dieses konträre Resultat durch eine PKC-Aktivierung führen sie auf die verschiedenen Wirkungen der multiplen Subtypen der PKC zurück. Auch der kardiale NCX wird durch eine PKC-abhängige Phosphorylierung aktiviert (IWAMOTO et al. 1996).

Die Aktivität der SERCA wird ebenfalls durch einen mehrere Schritte umfassenden Signalweg von der PKC reguliert (BRAZ et al. 2004). Dieser umfasst die zu Beginn erfolgende Phosphorylierung des PP1-Inhibitors 1, was zu einer gesteigerten PP1 Aktivität führt und somit über eine Phospholamban-Dephosphorylierung in einer verminderten SERCA-Aktivität resultiert (BRAZ et al. 2004). Dies ist auch im Rahmen der Herzinsuffizienz von Bedeutung (siehe 1.12).

Viele der Isoenzyme der PKC scheinen einen nicht unerheblichen Anteil an der Entstehung von kardialer Hypertrophie (DORN und FORCE 2005) und Herzinsuffizienz zu haben (VLAHOS et al. 2003; MONTGOMERY et al. 2005; CHURCHILL und MOCHLY-ROSEN 2007; HINKEN et al. 2012). Die  $\text{PKC}\alpha$  kann zudem auch die Kontraktilität der Kardiomyozyten beeinflussen, indem diese den Kalziumhaushalt sowie die Myofilamente der Kardiomyozyten reguliert (BRAZ et al. 2004).

Da die ursprüngliche Stimulation der klassischen PKC über den  $\text{G}_q$ -gekoppelten Rezeptoren erfolgt, besteht als möglicher ursprünglicher Faktor ein Zusammenhang

vor allem mit Angiotensin II (AT1-Rezeptor) (SADOSHIMA et al. 1993) sowie Noradrenalin ( $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptor) (KNOWLTON et al. 1993).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die PKC im Zusammenhang mit der Entwicklung von Hypertrophie (DORN und FORCE 2005; JOHNSEN et al. 2005; SABRI und STEINBERG 2003; SIMONIS et al. 2003) und Herzinsuffizienz (HINKEN et al. 2012; MONTGOMERY et al. 2005; SABRI und STEINBERG 2003; SIMONIS et al. 2003) eine hohe Bedeutung hat.

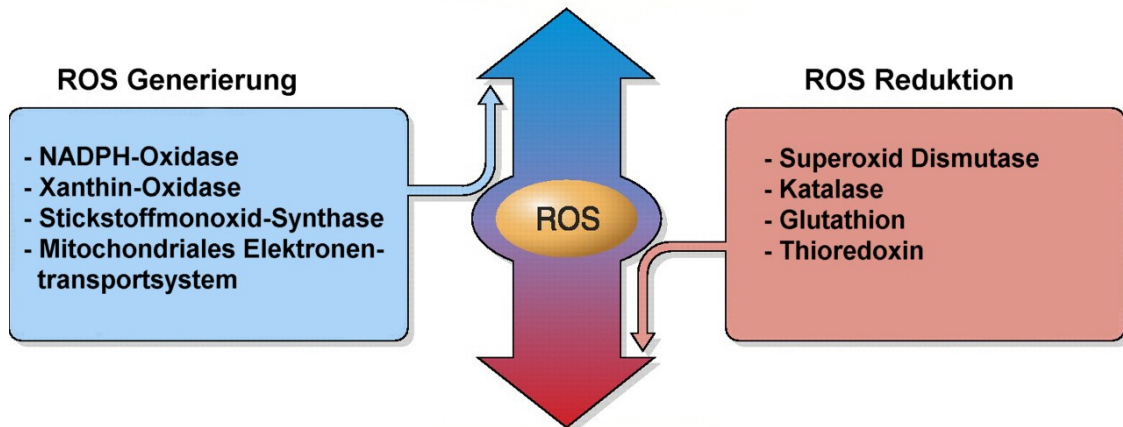
### ***1.10 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)***

Wie schon angedeutet, nehmen ROS einen sehr wichtigen Part in der Regulation und auch Dysregulation des Kalziumhaushaltes von Kardiomyozyten ein (YAN et al. 2008).

ROS sind Zwischenprodukte bei der Reduktion von  $O_2$  zu  $H_2O$ . Dabei können drei verschiedene ROS-Formen entstehen:  $O_2^-$  (Superoxid Anion),  $OH^\cdot$  (Hydroxylradikal) und  $H_2O_2$  (Wasserstoffperoxid) (GARRIDO und GRIENDLING 2009; ZIMA und BLATTER 2006). Zudem werden auch mitochondrial generierte ROS beschrieben (ZHOU et al. 2009). Physiologisch entstehen geringe Mengen an ROS primär im Rahmen des oxidativen Stoffwechsels.

Bei nicht krankhaft veränderten kardialen Bedingungen werden die entstehenden ROS durch verschiedene Mechanismen zu  $H_2O$  reduziert (YAMAWAKI et al. 2003). Diese verschiedenen Abbauewege sind alle an der Prävention gegen ROS-Schäden elementar beteiligt und ermöglichen damit eine Regulation der ROS-Konzentration im nicht toxischen Bereich (GARRIDO und GRIENDLING 2009; ZIMA und BLATTER 2006).

Unter pathologischen Bedingungen hingegen, kann die Reduktionskapazität der Kardiomyozyten durch ein erhöhtes ROS-Aufkommen erschöpft sein, so dass eine vermehrte Produktion von Radikalen resultiert.



**Abbildung 1-10.** Die verschiedenen Entstehungs- und Abbauewege von ROS. Modifiziert nach ERICKSON, 2011, S. 906.

Insgesamt ist eine gesteigerte Konzentration an ROS mit multiplen kardialen Pathologien verbunden. So konnte bei Myokardhypertrophie (KINUGAWA et al. 2000) sowie Apoptose (ERICKSON et al. 2008) eine pathologisch gesteigerte Menge an ROS beobachtet werden. Unter Reperfusion nach einer Ischämie des Herzmuskels konnte ebenfalls ein enormer Anstieg von ROS gezeigt werden (ZIMA und BLATTER 2006; PERRELLI et al. 2011). Zudem zeigten FERDINANDY und SCHULZ (2003), dass hohe Mengen an ROS in ischämischem Herzgewebe zu irreversiblen Veränderungen führen. ROS führen auch über eine Aktivierung der RyR zu einer Verkürzung der Refraktärzeit, so dass dies als ein wahrscheinlich wichtiger Mechanismus in der Entwicklung von Arrhythmien und SCD in der alternden Bevölkerung eingestuft wird (COOPER et al. 2013).

All die genannten krankhaften Veränderungen auf organischer Ebene können durch die im Folgenden beschriebenen, durch ROS bedingten, multiplen pathophysiologischen Veränderungen auf molekularer Ebene verursacht werden. Diese molekularen Effekte der ROS basieren dabei primär auf der Oxidation von SH-Gruppen, was wiederum zur Bildung von Disulfidbrücken führen kann (ZIMA und BLATTER 2006). Außerdem konnte in den letzten Jahren ein weiterer molekularer Wirkmechanismus von ROS gezeigt werden: Nach KASSMANN et al. (2008) bewirken ROS neben der bekannten Redox-Modifikation der SH-Gruppen auch eine Oxidation von Methionin. Durch diese Oxidationen wird die ursprüngliche Form der Proteine verändert, so dass damit auch deren Funktion eine Modifikation erfährt (HUANG et al. 1992).

Dabei scheinen sich diese Oxidationseffekte der ROS aufgrund ihrer hohen Reaktivität eher lokal zu ereignen (ZHOU et al. 2009). Die folgende Beschreibung der Veränderungen des kardialen Stoffwechsels lässt jedoch vermuten, dass Serin/Threoninkinasen ebenfalls von ROS beeinflusst werden und somit zusätzlich mittelbare Effekte durch ROS bedingen (WAGNER et al. 2012).

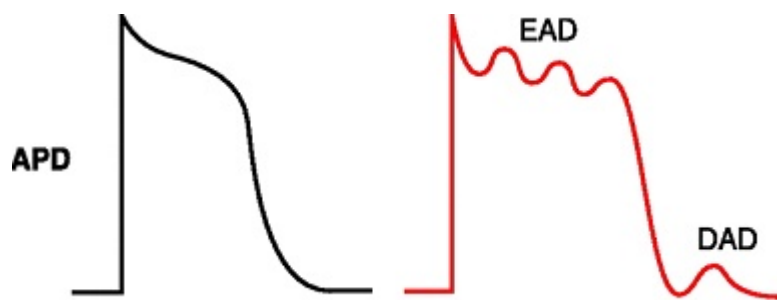
Zu den oxidierten und damit funktionell beeinflussten Kinasen der ROS gehört die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase II, deren Aktivitätssteigerung durch eine Oxidation der Methionine 281/282 durch ROS in der regulatorischen Domäne induziert wird (ERICKSON et al. 2011; ZHAO et al. 2011) (siehe 1.7.). Wie schon beschrieben sind auch die Proteinkinase A sowie die Proteinkinase C einer Modulation ihrer Aktivität durch ROS zugänglich. Die PKA wird dabei durch eine aus der ROS-Interaktion resultierenden Disulfidbrückenbildung aktiviert (BRENNAN et al. 2006) (siehe 1.8). Die PKC erfährt eine quantitative Beeinflussung ihrer Aktivität (GOPALAKRISHNA und ANDERSON 1989) (siehe 1.9).

Neben der Regulation der verschiedenen Kinasen haben ROS auch einen Einfluss auf andere Enzyme, multiple Kanäle und Rezeptoren. Bezüglich des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals konnte gezeigt werden, dass ROS sowohl den Strom  $I_{\text{Ca}}$  steigern als auch vermindern können. Dieser gegensätzlichen Wirkung liegt nach WAGNER et al. (2012) zugrunde, dass sowohl eine direkte als auch eine indirekte Regulation der LTCC erfolgt. Die spannungsabhängigen  $\text{Na}^{+}$ -Kanäle weisen Methioninreste auf und zeigen bei ROS-vermittelter Oxidation derer eine beeinträchtigte Inaktivierung des offenen Zustandes (KASSMANN et al. 2008). Dies kann die Kanäle letztendlich zu einer verspäteten Reposition in den aktivierbaren Zustand führen und damit eine verminderte Öffnungsmöglichkeit bewirken (FUKUDA et al. 2005). KUKREJA et al. (1988) zeigten eine Hemmung der kardialen  $\text{SR-Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) durch ROS, woraus eine verminderte  $\text{SR-Ca}^{2+}$ -Konzentration der Kardiomyozyten resultiert. Auch eine aktivierende Wirkung der SERCA durch ROS wurde beschrieben (siehe 1.8.1). Wie unter 1.4 schon beschrieben, erfahren auch die RyR durch ROS eine Modulation ihrer Aktivität. Dabei ist es bedeutsam, dass niedrige Level an ROS primär zu einer Aktivierung des Kanals führen. Gesteigerte Mengen von ROS hingegen bewirken eine Minderung der Spark-Frequenz und damit eine Suppression der RyR-Aktivität (YAN et al. 2008).

## 1.11 Nachdepolarisationen

Wie schon beschrieben, führt eine Erhöhung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes u. a. zu sogenannten Nachdepolarisationen. Diese Nachdepolarisationen sind Oszillationen des Transmembranpotenzials (HOFFMAN und ROSEN 1981). Genau genommen heißt dies, dass zweite, unterschwellige, der eigentlichen Depolarisation folgende Schwankungen des Transmembranpotenzials auftreten (VOLDERS et al. 2000). Falls dabei das Schwellenpotential für eine Depolarisation erreicht wird, können diese Nach-depolarisationen ektope Aktionspotentiale auslösen. Damit können Nachdepolarisationen eine wichtige Grundlage für die Entstehung von ventrikulären Arrhythmien darstellen (WIT und ROSEN 1983).

Es existieren zwei Arten von Nachdepolarisationen. Diese unterscheiden sich primär hinsichtlich ihres zeitlichen Auftretens (DOBREV et al. 2011; WEHRENS et al. 2005).



**Abbildung 1-11.** Das zeitliche Auftreten der Nachdepolarisationen im Vergleich zum physiologischen Aktionspotential (APD).  
Modifiziert nach ERICKSON, 2011, S. 896.

Frühe Nachdepolarisationen (EADs) sind in ihrem zeitlichen Auftreten dadurch gekennzeichnet, dass sie schon vor Rückkehr zum Ruhemembranpotenzial entstehen (CRANEFIELD 1977).

Solche frühen Nachdepolarisationen treten typischerweise dann auf, wenn eine verlängerte Repolarisation stattfindet. Aufgrund der Verlängerung der Repolarisation können die LTCC reaktiviert werden, wodurch ein zweiter Depolarisationsaufstrich, ausgehend von der Plateauphase entstehen kann (CHANG et al. 2012; CLUSIN 2003; MARBAN et al. 1986). Neben der Generierung von Ektopien durch Depolarisation, können EADs auch neue APs initiieren (ANTZELEVITCH und SICOURI 1994), was unter bestimmten kardialen Umständen wie beispielsweise bei Herzinsuffizienz zu letalen Arrhythmien führen kann (VERMEULEN 1998).

Bei den sogenannten späten Nachdepolarisationen (DADs) ist das zeitliche Auftreten dadurch definiert, dass diese erst nach vollständiger Rückkehr zum Ruhemembranpotenzial entstehen (CRANEFIELD 1977).

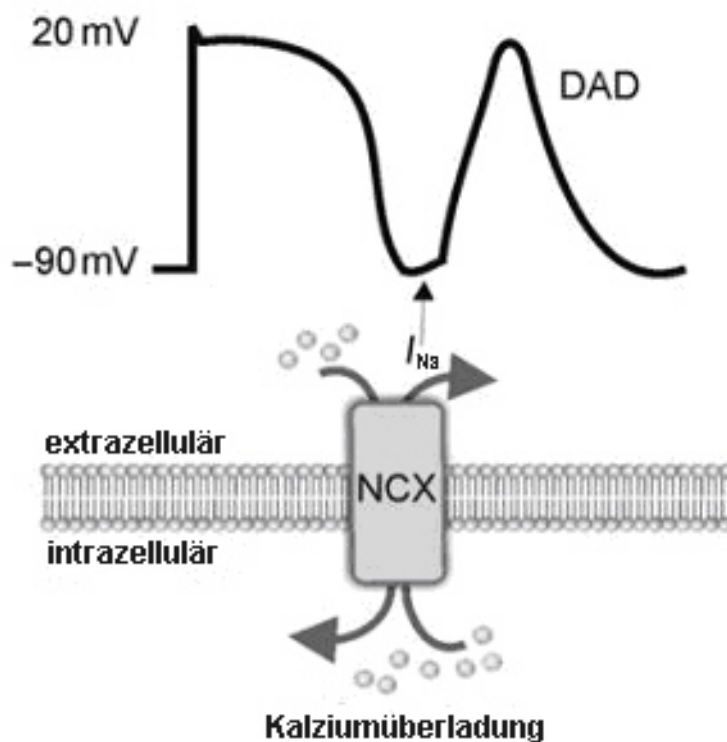
Grundlage der DADs ist dabei eine aberrante Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, d.h. eine spontane, nicht-synchronisierte, diastolische SR-Kalziumfreisetzung (Spark). Als Ursache für die Entstehung von DADs gilt ein stark erhöhtes intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  (HOFFMAN und ROSEN 1981). Vor allem die Beobachtung von einer stark gesteigerten DAD-Frequenz unter Intoxikation mit Herzglykosiden, welche bekanntlich eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bedingen, lässt auf die Auslösung von DADs durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung rückschließen (WIT und ROSEN 1983). WIT und ROSEN (1983) beschreiben auch eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit für DADs bei einer erhöhten Katecholaminkonzentration.

Auf zellulärer Ebene kann eine Mutation oder Überstimulation des RyR2, eine Kalziumüberladung des SR oder eine Verknüpfung von beidem, als ursächlicher Mechanismus einem gesteigerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck, bzw. einer aberranten Kalziumfreisetzung zugrunde liegen (DOBREV et al. 2011; WEHRENS 2007).

Die Entstehung der DADs durch diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung ist darin begründet, dass das Kalzium aus dem Zytosol u. a. durch einen elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch aus der Zelle befördert wird (POGWIZD et al. 2001). Somit führt die spontane Kalziumfreisetzung durch den RyR2 zur Aktivierung eines  $\text{Na}^+$ -Einstroms, maßgeblich gewährleistet durch den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher Strom. Dies stellt nach POGWIZD et al. (2001) den Hauptmechanismus der Entstehungsursachen von DADs dar.

Bei den meisten DADs befindet sich das Oszillationslevel unter dem Schwellenpotenzial, so dass vorwiegend keine irregulären APs ausgelöst werden. Bei Erreichen des Schwellenpotenzials hingegen kann ein getriggelter Impuls entstehen (WIT und ROSEN 1983). Die Amplitude der DADs und damit die Wahrscheinlichkeit, ein AP auszulösen, steigt linear mit der Anzahl der Kalziumwellen pro Zeiteinheit an (CHEN et al. 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entstehung der den DADs zugrunde liegenden Sparks untersucht, bei welchen die spontane Kalziumfreisetzung über den RyR2 im Vordergrund steht.



**Abbildung 1-12.** Eine zytosolische Kalziumüberladung verursacht einen Natriumeinstrom durch den Natrium-Kalziumaustauscher (NCX), wodurch DADs getriggert werden können. Modifiziert nach KUSHNIR und MARKS, 2010, S. 9.

### ***1.12 Pathologische Veränderungen in insuffizienten Herzen in Bezug auf den SR $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt***

In Hinblick auf die zu Beginn dargestellten epidemiologischen und prognostischen Daten der Herzinsuffizienz zeigt sich, welche Bedeutung das Verständnis der Ätiologie und der Pathogenese der molekularen Abläufe dieser Erkrankung hat.

Um die bei einer Herzinsuffizienz vorliegende Minderung der kardialen Funktion zu kompensieren, wird eine Aktivierung verschiedener Kompensationsmechanismen initiiert. Die durch die chronische Aktivität des  $\beta$ -adrenergen Signalweges angeregten Prozesse führen zu einer Störung der Kalziumhomöostase (GWATHMEY et al. 1987) und aufgrund dessen auch zu einer progressiven kardialen Verschlechterung (WEHRENS und MARKS 2004). Zudem bewirkt eine im Verlauf der Herzinsuffizienz auftretende renale Minderperfusion eine kompensatorische Aktivierung des RAAS (PIANO et al. 1998). Wie bereits dargestellt, wird eine langanhaltende Erhöhung von Angiotensin II unter anderem im Zusammenhang mit proarrhythmischen Veränderungen gesehen (GARG et al. 2006; FISCHER R et al. 2007; ZHAO et al.



2011). Die molekularen Veränderungen welche diese Ang II-induzierte Arrhythmogenese verursachen, sind bisher nicht vollständig verstanden. Daher soll die vorliegende Arbeit einen Teil zu einem besseren Verständnis beitragen. Der bisherige Kenntnisstand in Bezug auf den Kalziumhaushalt in den Kardiomyozyten insuffizienter Herzen stellt sich folgendermaßen dar: Insgesamt ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR erniedrigt. Dies könnte nach BERS der zentrale Grund für das bei Herzinsuffizienz vorliegende Kontraktionsdefizit sein (BERS 2002). Für die Minderung des  $\text{Ca}^{2+}$  im SR kann eine in insuffizienten Herzen bestehende reduzierte Expression der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sowie die gleichzeitige Erhöhung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers verantwortlich sein (HASENFUSS 1998).

Neben dem erniedrigten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt wurde in insuffizienten Herzen auch ein erhöhter diastolischer SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust, also ein gesteigertes SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck beschrieben (BERS et al. 2006; FISCHER TH et al. 2013b). Dies kann auf eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR durch Hyperphosphorylierung, das heißt eine vollständige Phosphorylierung aller Phosphorylierungsstellen zurückgeführt werden (Marx et al., 2000). Das gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck kann dabei sowohl über Spark-Ereignisse (lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsereignisse) als auch über Nicht-Spark-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung erfolgen (ZIMA et al. 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass in den Kardiomyozyten von insuffizienten Herzen eine  $\text{Na}^+$ -Überladung der Zellen vorliegt (DESPA et al. 2002; PIESKE et al. 1999). Dabei führen DESPA et al. (2002) diese  $\text{Na}^+$ -Überladung auf einen erhöhten  $\text{Na}^+$ -Einstrom zurück, unabhängig von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Diese zeigte im Vergleich zwischen insuffizienten und gesunden Kardiomyozyten keinen Unterschied in ihrer Aktivität und Funktion. Dabei hat der  $\text{Na}^+$ -Haushalt einen direkten Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Kardiomyozyten, was vor allem durch den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher gewährleistet wird. Dieser ist in den Kardiomyozyten insuffizienter Herzen ebenfalls erhöht, so dass bei einer  $\text{Na}^+$ -Überladung in Verbindung mit einer verstärkten Expression des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und reduzierter SERCA-Expression durch den größeren Beitrag des Austauschers zur Reduktion des zytosolischen Kalziums ein reduzierter SR-Kalziumgehalt resultiert (BERS und DESPA 2009). Zudem kann die  $\text{Na}^+$ -Überladung bei Erreichen des Schwellenpotenzials eine Depolarisation auslösen (VOLDERS et al. 2000), was das deutlich gesteigerte Auftreten von Arrhythmien bei Patienten mit Herzinsuffizienz erklären kann.

Als weitere Veränderungen treten bei Herzinsuffizienz auch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auf (PERRELLI et al. 2011). Die vorliegende erhöhte ROS-Konzentration ist dabei vor allem auf eine gesteigerte NADPH-Oxidase-(NOX2)-Aktivität zurückzuführen (CAVE et al. 2006). Auch die PKC ist vermehrt aktiviert und trägt damit zu den genannten Veränderungen des Natrium- und Kalziumhaushaltes bei Herzinsuffizienz bei. Wie unter 1.11 schon beschrieben ist die Expression des Inositoltriphosphat-Rezeptors (IP<sub>3</sub>-Rezeptor) in insuffizienten Herzen ebenfalls hochreguliert (GO et al. 1995).

Die PKA hingegen scheint in den Kardiomyozyten insuffizienter Herzen nicht vermehrt aktiviert zu sein (KIRCHHEFER et al. 1999).

### ***1.13 Zielsetzung und Fragestellung***

Die Herzinsuffizienz stellt eine Krankheit dar, welche von einer hohen Prävalenz und Inzidenz gekennzeichnet ist. Zudem zeigen Patienten mit dieser Erkrankung eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, Arrhythmien zu entwickeln. Die vorliegende Arbeit soll zum Verständnis der Genese dieser Arrhythmien beitragen.

Die bisherigen Ausführungen zeigen, dass Angiotensin II Arrhythmien verursachen kann. Diesen Arrhythmien liegt ein gesteigertes Ca<sup>2+</sup>-Leck zugrunde, (POGWIZD et al. 1999; POGWIZD et al. 2001) was sich in den Beobachtungen von DADs zeigt.

Aus diesen Beobachtungen folgt die Überlegung, dass dieses Ca<sup>2+</sup>-Leck direkt von Ang II beeinflusst wird. Als molekulare Voraussetzung gilt, dass eine Redox-abhängige Modifikation des RyR einen Teil seiner Regulation darstellt. Aufgrund der Bedeutung des RyR für das Ca<sup>2+</sup>-Leck wird mit der Regulation des RyR auch direkt das Ca<sup>2+</sup>-Leck beeinflusst.

Dabei tragen ROS wesentlich zu dieser Redox-Modifikation des RyR bei. Eine mögliche ROS-Quelle ist die Aktivierung der NADPH-Oxidase. Damit ergibt sich die Hypothese, dass die NADPH-Oxidase an der Angiotensin II -abhängigen Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Lecks beteiligt ist. Demnach ist das Ziel, die Bedeutung der NADPH-Oxidase für die Regulation des Angiotensin II-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Lecks des sarkoplasmatischen Retikulums näher zu untersuchen.

Die aus der Zielsetzung resultierenden Fragestellungen lauten:

- Welchen Einfluss hat Angiotensin II auf die durch RyR2-Aktivierung generierten Sparks und deren Charakteristika (Sparkfrequenz, Sparkamplitude, FDHM, FWHM und das daraus resultierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck)?
- Was ist der den durch Ang II induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks zugrunde liegende Mechanismus?
  - Welche Bedeutung hat die NADPH-Oxidase für die durch Ang II induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks?
    - ⇒ Können Ang II-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks in NOX II-Knockout-Mäusen verhindert werden?
    - ⇒ Inwieweit kann ein durch Sparks induziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck durch Verwendung von NOX II-Knockout-Mäusen beeinflusst werden?
  - Welche Bedeutung hat die CaMKII für die durch Ang II induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ - Sparks?
    - ⇒ Inwieweit kann eine veränderte Sparkfrequenz durch eine Inhibition der CaMKII beeinflusst werden? (Messung bei Verwendung von CaMKII- Inhibitor AIP und Messung von CaMKII- Knockout- Mäusen)
    - ⇒ Inwieweit kann ein durch Sparks induziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck durch Inhibition der CaMKII beeinflusst werden?
  - Welche Bedeutung hat die PKA für die durch Ang II induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ - Sparks?
    - ⇒ Inwieweit kann eine durch Ang II veränderte Sparkfrequenz durch eine Inhibition der PKA beeinflusst werden? (Messung bei Verwendung des PKA-Hemmstoffes H89)
    - ⇒ Inwieweit kann ein durch Sparks induziertes  $\text{Ca}^{2+}$ - Leck durch Inhibition der PKA beeinflusst werden?

- Welche Bedeutung hat die PKC für die durch Ang II induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks?
  - ⇒ Inwieweit kann eine durch Ang II veränderte Sparkfrequenz durch eine Inhibition der PKC beeinflusst werden? (Messung bei Verwendung des PKC- Hemmstoffes BIS)
  - ⇒ Sind  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren (möglicherweise aktiviert durch Ang II induzierte  $\text{IP}_3$ -Stimulation) unabhängig von der durch Ang II induzierten Aktivierung der NOX2, für die Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks verantwortlich? (Messung bei Verwendung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptorantagonisten 2-APB)
- Welche Rolle spielt ein neuer Aktivierungsmechanismus (Redox-abhängige Aktivierung) der PKA für die durch Ang II induzierte Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz?
  - ⇒ Ist das basale RyR Öffnungsverhalten verändert? (Messung von PKA-Knockin-Mäusen, in welchen die PKA nicht redoxaktivierbar ist)
  - ⇒ Inwieweit kann eine durch Ang II veränderte Sparkfrequenz durch Inhibition der Möglichkeit der PKA-Redoxmodifikation beeinflusst werden?
  - ⇒ Welchen Einfluss hat diese Redoxmodifikation der PKA auf das durch Ang II induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck?
- Welche Rolle spielt der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt bei der Regulation des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks?
  - Inwiefern ist der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt durch Ang II induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks beeinflusst?

## ***2. Material und Methoden***

### ***2.1. Genetisch veränderte Mäuse***

Um den dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothesen nachzugehen, wurden neben den zum Vergleich verwendeten Wildtypmäusen auch verschiedene genetisch veränderte Mausmodelle eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Mausmodelle zum Einsatz: CaMKII-knockout-Mäuse, gp91phox-knockout-Mäuse und PKA R1-knockin-Mäuse. Um die genetische Modifikation zu erreichen wird das veränderte Gen in embryonale Stammzellen, welche aus Mäuseblastozysten isoliert werden, injiziert. Diese genetisch veränderten Blastozysten werden dann in die Plazenta von Mäuseleihmüttern eingebracht. Diese injizierten Blastozysten entwickeln sich zu Chimären (GRAW 2007). Wenn diese chimären Mäuse sich mit Wildtyp-Mäusen paaren, entstehen heterozygote Knockout-Mäuse. Eine Vermehrung dieser - in Bezug auf die vorgenommene genetische Modifikation heterozygoten Mäuse untereinander - bringt sowohl Heterozygote als auch Homozygote und Wildtypmäuse als Nachkommen hervor (GRAW 2007). Die homozygoten Knockout-Mäuse zeichnen sich dadurch aus, dass diese das Zielgen nicht mehr exprimieren. Alle Experimente wurden nach dem „GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS“ (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996) durchgeführt.

#### ***2.1.1 gp91phox-knockout-Mäuse***

Zur Überprüfung der Bedeutung der NADPH-Oxidase in dem Kalziumstoffwechsel der Kardiomyozyten, wurde die katalytische Untereinheit der NOX 2 (gp91phox) aus dem Genom von Black Six-(C57BL6/N)-Mäusen entfernt (gp91phox-knockout: gp91phox<sup>-/-</sup>)

Die zum Knockout führende Veränderung der verwendeten Mäuse wurden nach dem Protokoll von POLLOCK et al. (1995) durchgeführt. Demnach erfolgte die Generierung dieser Mäuse durch die Unterbrechung des sogenannten Cybb-Bereichs auf dem X-Chromosom, in welchem das gp91phox-Gen lokalisiert ist. Somit wurde in das dritte Exon dieses Gens ein Zielvektor eingebracht, welcher unter anderem mit der Herpes- Thymidinkinase versehen war. Mittels Elektroporation konnte dieses Konstrukt in die embryonalen Stammzellen der Mäuse eingebracht

werden, so dass diese mit dem oben beschriebenen Zielvektor transfiziert wurden. Danach wurden die Stammzellen unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend mittels Ganciclovir selektiert, so dass nur die Zellen überlebten, welche mit der Thymidinkinase versehen waren, d.h. also nur die Zellen, welche mit dem Zielvektor versehen waren. Die nach Ganciclovirbehandlung überlebenden Zellen wurden vermehrt. Via Southern Blot konnte der Erfolg der homologen Rekombination, also des Einbaus der fremden DANN, überprüft werden. Die auf diese Weise veränderten Stammzellen wurden in junge Blastozysten injiziert und in weibliche Black Six-Mäuse eingebracht (POLLOCK et al. 1995).

### ***2.1.2 CaMKII $\delta$ -knockout-Mäuse***

Um den Einfluss der CaMKII $\delta$  auf die Entwicklung des diastolischen Kalziumlecks unter Angiotensinstimulation näher zu untersuchen, wurden in den Experimenten auch CaMKII $\delta$ -knockout-Mäuse verwendet. Das heißt, bei diesen Mäusen war das Gen für die CaMKII $\delta$  vollständig abgeschaltet. Die Generierung dieser CaMKII $\delta^{-/-}$  Mäuse wurde nach dem Protokoll von BACKS et al. (2009) durchgeführt. Demnach wurde ein CaMKII $\delta$ -null Allel geschaffen, indem durch das Rekombinationssystem Cre/loxP Exon 1 und Exon 2 entfernt wurden, da diese für Teile des katalytischen Bereichs des Enzyms kodieren. In der Folge wird nur ein funktionsloses CaMKII $\delta$  Bruchstück exprimiert, welches rasch wieder abgebaut wird. Dies führt zu einer massiven Reduktion der CaMKII Aktivität (BACKS et al. 2009). Zur Überprüfung der erfolgreichen Wirkung dieser transgenen Veränderung wurde ein Southern Blot durchgeführt.

### ***2.1.3 PKA-knockin-Mäuse***

Um die Bedeutung der Proteinkinase A und insbesondere den Einfluss einer möglichen redox-abhängigen Aktivierung der PKA auf das diastolische Kalziumleck näher zu untersuchen, wurde ein Knockin-Mausmodell geschaffen, dass eine nicht mehr oxidierbare PKA exprimiert. Das bedeutet, dass diese Mäuse in der Art transgen verändert sind, dass die Proteinkinase A Typ I nicht mehr redoxsensibel ist (BURGOYNE et al. 2015; JOHNSTON et al. 2015). Dies wird durch den Austausch von Cystein zu Serin erreicht, wodurch eine Disulfidbrückenbildung verhindert wird, so dass die ROS Interaktionsstelle nicht mehr zugänglich ist. Dies bedingt die im

Folgenden fehlende Redoxsensibilität (BURGOYNE et al. 2015; JOHNSTON et al. 2015).

## **2.2 Zellisolation**

Die in den Experimenten verwendeten Mäuse wurden in einem luftdichten Glasexsikkator mit der Gabe von 800 µl Isofluran in Narkose versetzt. Bei Erreichen eines tiefen Narkosestadiums, zu erkennen an der Abnahme der Atemfrequenz bei gleichzeitiger Zunahme der Atemtiefe, wurde mechanisch das Genick gebrochen. Dies geschah durch heftiges Rucken am Schwanz bei gleichzeitiger Fixierung des Nackens mittels Metallschere.

Nach Eintreten des Todes wurde zunächst das Körpergewicht der Maus ermittelt. Anschließend wurde mit der Präparation begonnen. Mithilfe einer chirurgischen Pinzette wurde die Bauchdecke angehoben und diese mit Schnittführung in Richtung der beiden Vorderpfoten mit einer OP-Schere geöffnet.

Nach Öffnung des Brustkorbes erfolgte, bei gleichzeitiger Fixierung des Sternums, die Durchtrennung des Diaphragmas. Die Lunge wurde angehoben, so dass das Herz freigelegt wurde. Die Aorta ascendenz wurde dann proximal der ersten drei Abgänge (Truncus brachiocephalicus, linke A. carotis und link A. subclavia) durchteilt; die übrigen zu- und abführenden Gefäße des Herzens grob abgetrennt. Daraufhin konnte das Herz dem Thorax entnommen werden. Ein mechanisches Ausdrücken des Herzens erfolgte um das Blut aus den Herzzinnenräumen zu entfernen.

Anschließend wurde das Wiegen des Herzens vorgenommen, um später das Herz-/Körpergewichtverhältnis definieren zu können.

Unmittelbar danach erfolgte die Kanülierung der Aorta, welche dann mithilfe eines doppelten Knotens und einer Klemme an der Kanüle fixiert wurde. Durch die Kanüle wurden die Koronarien unter Sicht freigespült, so dass das Herz anschließend in die Perfusionsanlage gebracht werden konnte (siehe Abb. 2-1).

Diese sogenannte Langendorff-Perfusionsanlage durchspült das Herz mit kalziumreduzierter kollagenasehaltiger Enzymlösung (siehe Tabelle 2-1) bei 37°C retrograd, um kalziumabhängige, interzelluläre Verbindungen (gewährleistet durch Integrine, Cadherine) aufzulösen. Entwicklung und erster Einsatz dieser retrograden Perfusionsanlage geschah 1895 durch LANGENDORFF (1985) (siehe Abbildung 2-1).

Die ersten drei Minuten der retrograden Perfusion wurde das Herz mit Isolationspuffer (Tyrode) (siehe Tabelle 2-1) perfundiert. Dann folgte eine ca. 7-minütige Perfusion mit einer liberase- und trypsinhaltigen Enzymlösung (siehe Tabelle 2-1).

Im Anschluss an die Perfusion wurden die Ventrikel von den Atrien getrennt und die ersteren in zerschnittener Form in die erste Stopplösung (Stopplösung 1) (siehe Tabelle 2-1) gegeben. Mit einer stumpfen Pipette erfolgte eine weitere mechanische Zerkleinerung des Gewebes, so dass die Zellen in Suspension gebracht werden konnten. Durch eine Nylongaze (Porengröße 200 µm) wurden die Gewebereste anschließend abgefiltert und die Zellen in die Stopplösung 2 (siehe Tabelle 2-1) eingebracht.

Zur Bildung eines Zellsedimentes wurde diese Zellsuspension für 7 min stehen gelassen, um die Zellen anschließend einem Kalziumaufbau zuführen zu können. Das heißt, der Überstand wurde entfernt und Lösungen mit aufsteigender Kalziumkonzentration (0,1 %; 0,2 %; 0,4 %; 0,8 %) (siehe Tabelle 2-1) hinzugegeben. Der Überstand des sich innerhalb einer siebenminütigen Periode bildenden Zellsedimentes wurde dabei jeweils entfernt und die nächsthöher konzentrierte Kalziumlösung hinzugegeben. Zur Sedimentation der Zellen wurde keine Zentrifuge eingesetzt, da dies zu Zellschädigungen geführt hätte.

Nachdem der Kalziumaufbau abgeschlossen war, wurden jeweils 500 µl der mit 0,8 % Kalzium versetzten Zellsuspension auf eine mit Laminin (1,3-1,5 µl) versehene Kammer aufgetragen. In den folgenden 15 min sollte eine Adhäsion der Zellen am Grund der Kammer erreicht werden, wobei das Laminin eine bessere Anhaftung der lebenden Zellen ermöglicht, da es als ein wichtiger Bestandteil der Basallamina unter anderem auch die Zelladhäsion vermittelt.



Lösung	Substanz	Konzentration	Durchführung
Tyrode	NaCl	113 mmol/l	gelöst in bidestilliertem H <sub>2</sub> O bei pH 7,42 bei 37 °C
	KCl	4,7 mmol/l	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 mmol/l	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,6 mmol/l	
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mmol/l	
	Phenol-rot	0,032 mmol/l	
	NaHCO <sub>3</sub>	12 mmol/l	
	KHCO <sub>3</sub>	10 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
	Taurine	30 mmol/l	
	Glukose	5,5 mmol/l	
	BDM (Stock)	10 mmol/l	

Lösung	Substanz	Masse/Volumen	Durchführung
Verdauungslösung	1x Tyrode	20 ml	auf 37 °C erwärmen
	Liberase TM	1,5 mg	
	Trypsin 10-fach, 2,5%	111,2 µg	
	10 mM CaCl <sub>2</sub>	25 µg	

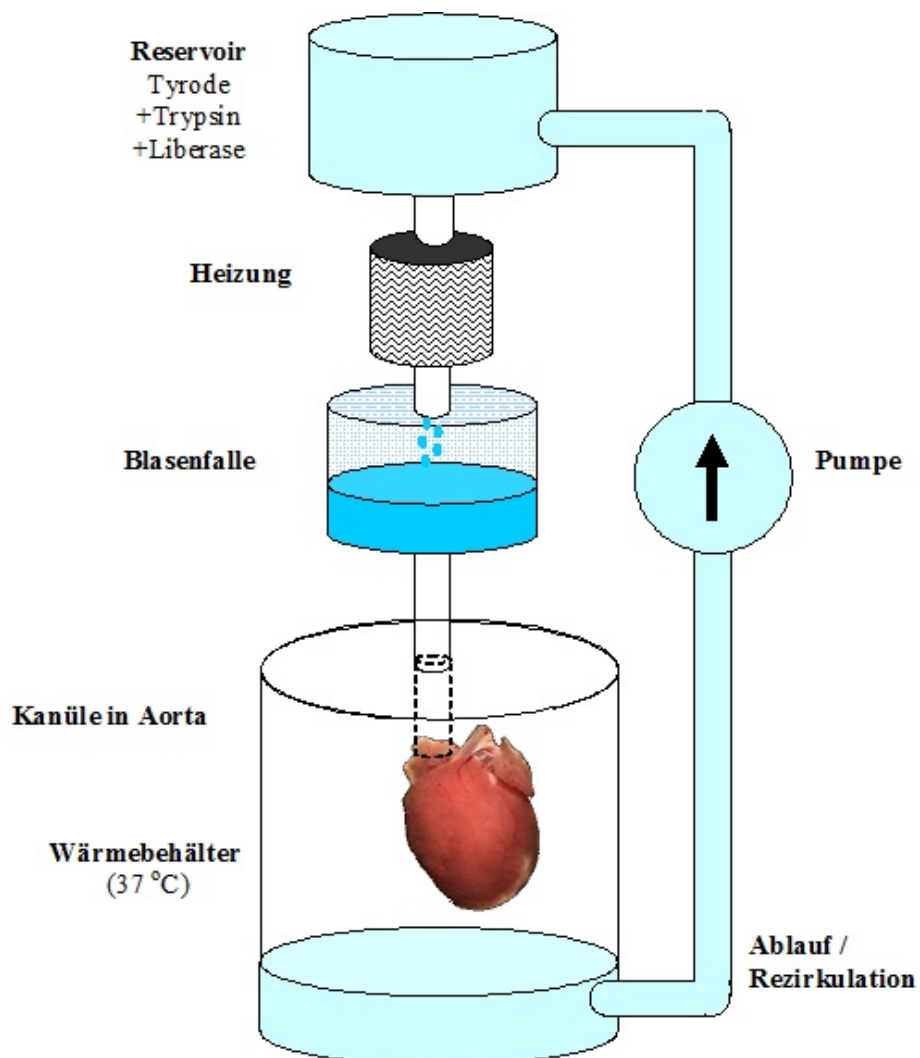
Lösung	Substanz	Volumen	Durchführung
Stopplösung 1	1x Tyrode	2,25 ml	auf 37 °C erwärmen
	Bovines Kälberserum (BCS, 5%)	0,25 ml	
	10 mM CaCl <sub>2</sub>	3,125 ml	

Lösung	Substanz	Volumen	Durchführung
Stopplösung 2	1x Tyrode	23,75 ml	auf 37 °C erwärmen
	Bovines Kälberserum (BCS, 5%)	1,25 ml	

## Lösung

<i>Kalziumaufbau</i> 0,1 mM $\text{Ca}^{2+}$	5 $\mu\text{l}$ $\text{CaCl}_2$ (100 mM) in 5 ml Stopplösung 2
<i>Kalziumaufbau</i> 0,2 mM $\text{Ca}^{2+}$	10 $\mu\text{l}$ $\text{CaCl}_2$ (100 mM) in 5 ml Stopplösung 2
<i>Kalziumaufbau</i> 0,4 mM $\text{Ca}^{2+}$	40 $\mu\text{l}$ $\text{CaCl}_2$ (100 mM) in 10 ml Stopplösung 2
<i>Kalziumaufbau</i> 0,8 mM $\text{Ca}^{2+}$	80 $\mu\text{l}$ $\text{CaCl}_2$ (100 mM) in 10 ml Stopplösung 2

**Tabelle 2-1.** Die zur Isolierung der Mäusekardiomyozyten verwendeten Lösungen.



**Abbildung 2-1.** Vereinfachte Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage, welche zur Isolation der Mäusekardiomyozyten eingesetzt wurde. Die Kanüle wurde im oberen Teil des Aortenstumpfs platziert, um eine Perfusion der Koronararterien mit den verwendeten Lösungen zu gewährleisten. Modifiziert nach BELLMANN, 2012, S.28.

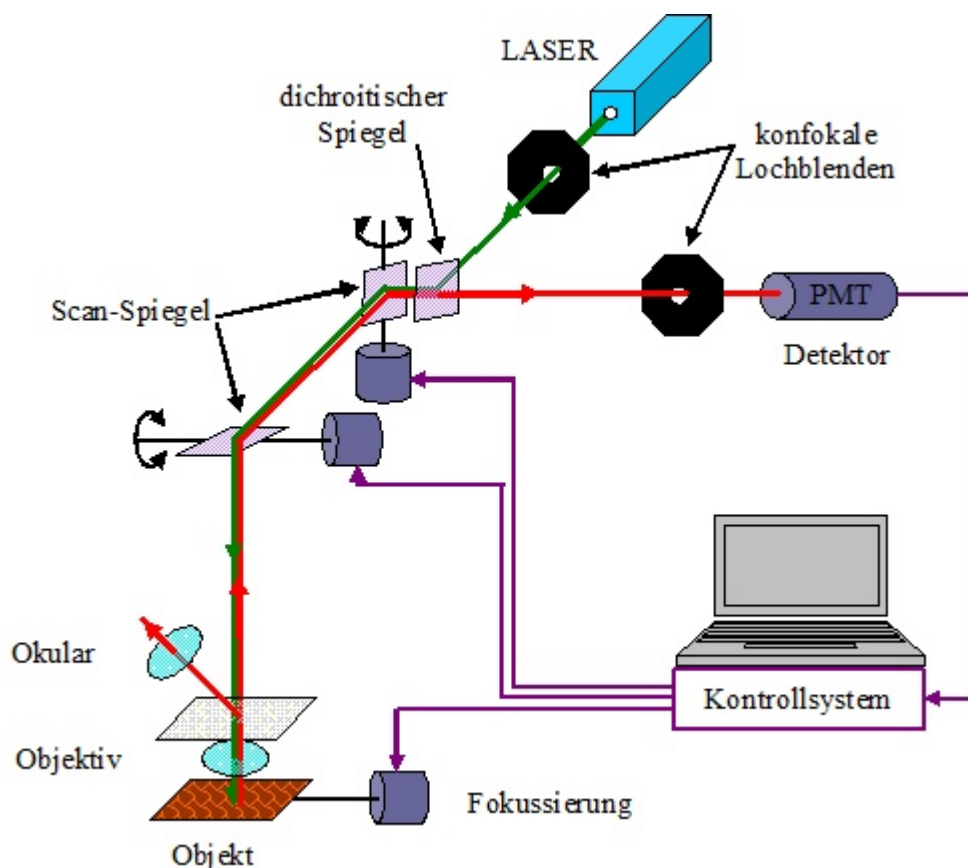
## ***2.3 Konfokalmikroskop***

Für die Erfassung der Sparks und der Kalziumtransienten unter Koffeingabe wurde ein Konfokalmikroskop (Laser Scanning Microscopy (LSM) 5 PASCAL) eingesetzt.

Ein Konfokalmikroskop ist ein Lichtmikroskop, welches im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop nicht das gesamte Emissionslicht erfasst, sondern ausschließlich Licht aus der Brennebene des Objekts sammelt. So ist es möglich, Informationen über das Innere des Präparats zu bekommen. Dabei wird das Licht eines Argon-Lasers (488 nm) durch ein Objektiv mit sehr großer numerischer Appertur (1.3) auf eine bestimmte Ebene des Objektes gebracht. Um zu gewährleisten, dass ausschließlich Licht aus dem Fokus eingesammelt wird, wird das reflektierte oder emittierte Licht des Objekts auf eine Lochblende geleitet. Zudem beschränkt eine zweite Lochblende das Sichtfeld auf einen Punkt (siehe Abb. 2-2). Der Aufbau dieses Systems erfolgt symmetrisch, so dass beide Blenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal sind. Das heißt der Fokus innerhalb der Probe und derjenige innerhalb der Lochblende sind in optisch konjugierten Punkten (konfokal) angeordnet. Dabei wird der Durchmesser der Blenden sehr klein eingestellt. Dies bewirkt, dass Licht aus Bereichen des Objekts, welches nicht in der Brennebene liegt, nicht in die Apertur der Blende fällt. Dieses Licht, welches die Apertur nicht erreicht, wird ausgeblendet und den Photomultiplier erreicht schlussendlich ausschließlich Licht aus der Brennebene des Objekts. Dies gewährleistet, dass das erzeugte Bild von Unschärfe durch ungewollten Lichteinfall weitestgehend frei ist. So wird der Kontrast gesteigert und die Auflösung verbessert. Für diesen Vorgang eignet sich Laserlicht besonders gut, da dieses monochromatisches Licht ist und auf einen kleinen Punkt fokussiert werden kann und zudem die Intensität des Lichtes sehr hoch ist.

Um ein Bild der gesamten Objektebene zu bekommen, ist es notwendig das Präparat Punkt für Punkt zu rastern, was durch ein XY-Beugungssystem ermöglicht wird und anschließend von der Software des Computers zu einem Bild zusammengefügt wird. Demnach wird die Probe Punkt um Punkt, sowie Linie um Linie gescannt, indem der Laser entlang der X- und Y-Koordinaten wandert und so ein Profil der Probe generiert (ZEISS 2005) (siehe Abbildung 2.2). Das durch die Probe emittierte Licht wird durch den XY-Scanner auf dichroitische Spiegel gelenkt, welcher das Erregungslicht des Lasers von dem Emissionslicht des Objektes trennt. Die Spiegel

werden über Stellmotoren, welche vom Computer gesteuert werden, in die entsprechende Position gebracht, so dass das Laserlicht in X- und Y-Achse abgelenkt wird. Um das mitunter schwache optische Signal zu detektieren, wird es mithilfe eines Photomultipliers verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das so generierte elektrische Signal ist ein analoges Signal und wird anschließend von einem AD/DA-Wandler in ein digitales Signal übersetzt. Dieses wird von der Software des diese Informationen verarbeitenden Computers, in diesem Fall die LSM 5 Pascal Software, visualisierbar gemacht, gespeichert sowie eine Analyse der Daten ermöglicht.



**Abbildung 2-2.** Vereinfachte Darstellung des Prinzips des verwendeten Laser-Konfokalmikroskops. Das Laserlicht wird durch das Objektiv in beugungsbegrenzter Form auf das Objekt gebracht. Die zwei Scan-Spiegel ermöglichen, dass das Objekt in Y- und X-Achse gescannt wird. Dabei wird das von dem Objekt emittierte Licht durch den dichroitischen Spiegel in Emissions- und Anregungslicht aufgetrennt. Von dort wird es zu dem PMT (photomultiplier tube) gelenkt, so dass das Lichtsignal in einen elektrischen Impuls gewandelt werden kann. Modifiziert nach INOUE (2006), S.7.

## 2.4 Versuchsdurchführung

Nach 15 min der Zelladhäsion wurde der Überstand der kalziumhaltigen Tyrode in den Superfusionskammern abgegossen und jeweils 200 µl, mit einer Konzentration

von 10  $\mu\text{mol/l}$ , des fluoreszierenden Farbstoffs Fluo-4-AM (MOLECULAR PROBES, invitrogen<sup>TM</sup>) hinzugefügt. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaft des Farbstoffes wurden die Farbstoffzugabe sowie die gesamten Experimente in einem vollständig abgedunkelten Raum durchgeführt. Nach 10 min Inkubation, welche die Aufnahme des Farbstoffs in die Zellen gewährleistet, konnte mit der Superfusion der Kammern begonnen werden.

Diese Superfusion sichert zum einen, dass der Farbstoff welcher nicht in die Kardiomyozyten aufgenommen wurde, entfernt wird. Dies ist erwünscht, um eine Überladung der Zellen und damit eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für Artefakte in den Messungen zu verhindern. Zum anderen ermöglicht diese Superfusion, dass eine gleichmäßige Verteilung der superfundierten Lösungen und damit auch des darin enthaltenen Kalziums stattfindet.

Bei dem Einsatz von Normaltyrode (siehe Tabelle 2-1) wurde eine Superfusionszeit von

5 min angesetzt. Während dieser Zeit fand keine Stimulation statt. Bei allen anderen Experimenten wurde aufgrund des Einsatzes von mit Angiotensin II angereicherter Tyrode, eine Superfusionszeit von 15 min angesetzt, um die volle Wirkung des Angiotensin II zu ermöglichen.

Um die Superfusion technisch möglich zu machen, wurde die jeweilige Kammer in eine in dem Konfokalmikroskop eingearbeitete Haltevorrichtung eingesetzt und die Zulaufkanüle sowie eine Absaugung fixiert. Zudem erfolgte das Einsetzen eines Stimulationsdrahtes. Um Artefakte durch mechanische Störungen und Erschütterungen der Umgebung zu vermeiden, befand sich das Konfokalmikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch.

Sobald die Superfusionszeit beendet war, konnte mit den eigentlichen Messungen begonnen werden. Demnach wurden mithilfe der elektrischen Feldstimulation die Kardiomyozyten mit einer Frequenz von 0,5 Hz zur Kontraktion angeregt und es wurde durch das Okular des Mikroskops bei einer Vergrößerung von (40 x 100) eine Herzmuskelzelle ausgewählt.

Dieser Kardiomyozyt musste dabei den sichtbaren Kriterien von Vitalität entsprechen. Das heißt, die Kontraktion des Kardiomyozyt musste synchron zur gewählten Stimulationsfrequenz erfolgen und die Zellbegrenzungen sollten der regulären Form eines Kardiomyozyten entsprechen (länglich gewachsene Konfiguration mit regelmäßiger und relativ glatter Begrenzung). Zudem sollten

Messungen in vakuoligen Zellen vermieden werden, da diese ebenfalls auf Schädigungen der Kardiomyozyten hinweisen.

Der ausgewählte Kardiomyozyt wurde fokussiert und mithilfe der Framescaneinstellung wurde eine erste Übersichtsdarstellung des Kardiomyozyts vollzogen, zweidimensional in einer Scanebene (xy-Scan). In der so dargestellten Abbildung des Kardiomyozyts wurde mithilfe der Software eine Linie für den folgenden Messvorgang definiert (Linescan). Die Kriterien zur Wahl der Position des Linescans beinhalteten die Vermeidung der Messung subzellulärer Strukturen insbesondere des Zellkerns sowie die Lokalisation des Startpunktes des Linescans außerhalb des Kardiomyozyten, um eine spätere Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz zu ermöglichen (siehe Abbildung 2.3).

Nach der Positionierung wurde mit dem Scan entlang der Linie (xt-Scan) mit insgesamt 4000 Wiederholungen und einer Wiederholrate von 1 kHz begonnen; so dass eine Messung von einer Dauer von ca. 4 sec ( $4 \cdot 960 \mu\text{sec}$ ) erfolgte. Damit waren bei einer elektrischen Feldstimulation der Kardiomyozyten mit einer Rate von 0.5 Hz während einer Linescan-Messung zwei Erregungszyklen zu beobachten. Dieser Messzeitraum war an die Eigenschaften des Farbstoffs angepasst, indem so gewährleistet wurde, dass kein Ausbleichen die Messungen beeinflusste. Das "Ausbleichen" eines fluoreszierenden Farbstoffes meint einen Prozess bei welchem durch Exposition des Farbstoffes zum Anregungslicht eine chemische Zerstörung des fluoreszierenden Farbstoffes resultiert und damit auch die Fähigkeit zur Fluoreszenz verloren geht (SONG L et al. 1995). Das heißt also diese Moleküle können dann nicht länger am Erregungs-Emissions-Zyklus teilnehmen. Da das Maß des Ausbleichens von der Erregungsintensität und Dauer abhängig ist (SONG L et al. 1995), wurde durch die Einhaltung einer bestimmten Zeitspanne das Risiko dieses Ausbleichens reduziert und somit eine starke Beeinflussung der Messergebnisse durch abgeschwächte Emissionssignale verhindert. Der hinter dem Ausbleichen stehende Mechanismus ist bis heute nicht gut verstanden. Eine mögliche Erklärung für diesen Vorgang ist, dass durch die Absorption eines Photons ein Elektron in einen energiereicheren Zustand übergeht, wodurch eine höhere Wahrscheinlichkeit resultiert, dass das angeregte Molekül mit anderen Molekülen in der Umgebung interagiert. Durch die Anregung wird also das Fließgleichgewicht von Grundzustand, Singulett und Triplett verschoben (SONG L et al. 1995). Es befinden sich somit mehr Moleküle im Triplettzustand, da die Zeitspanne in welcher sich die

Moleküle im Triplettzustand befinden durch die Anregung verlängert wird (LINDQVIST 1960). Hieraus resultiert die erhöhte Wahrscheinlichkeit auf chemische Reaktionen und damit die chemische Zerstörung der Fluoreszenz zu bewirken.

Die weiteren Einstellungen des Linescan waren wie folgt: Die Pixelzahl wurde auf 512 pro Linie festgelegt, was bei einer Scanbreite von 51.2  $\mu\text{m}$  eine Pixelgröße von 0,1  $\mu\text{m}$  ergab. Die Einstellung der Lochblende wurde auf 1 Airy Unit festgelegt, um eine minimale Streuung in z-Richtung zu gewährleisten. Nach diesen Einstellungen entsprach die Voxellänge und Voxelbreite bzw. Tiefe ca. 0,1 x 0,1 x 0,1  $\mu\text{m}$ .

Diese Einstellungen waren für alle Messungen identisch, um einen Vergleich der Messungen untereinander zu ermöglichen.

Nach erfolgter erster Linescan-Messung unter elektrischer Feldstimulation wurde eine weitere Messung derselbigen Zelle nach einer Stimulationspause von 30s durchgeführt. Hierbei wurde eine neue Lokalisation des Linescans gewählt, welche zu der ursprünglich gewählten Linie des ersten Linescans leicht verschoben war.

Aufgrund der Stimulationspause kommt es in den Kardiomyozyten durch die Kalziumtransportmechanismen (SR  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase, der sarkolemmale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  - Austauscher, die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase sowie der mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  - Uniport (BERS 2002)) zu einer Reduktion des diastolischen Kalziums und einem Anstieg des Kalziumgehaltes des sarkoplasmatischen Retikulums.

Bei jeder untersuchten Isolation wurden bis maximal sechs Kammern gemessen. Einige der Kammern wurden mit Normaltyrode superfundiert, so dass die Messbedingungen möglichst den physiologischen Gegebenheiten ähnelten. Die anderen Kammern wurden mit Angiotensin II versetzter Tyrode superfundiert, um Ergebnisse bezüglich der Ang II Wirkung zu generieren. Dabei kamen verschiedene Mausmodelle zum Einsatz (siehe 2.1). Einige Experimente erfolgten in Anwesenheit pharmakologischer Inhibitoren: Proteinkinase A Hemmstoff H89, CaMKII Inhibitor AIP, 2-APB ein Hemmstoff der  $\text{IP}_3$ - induzierten Kalziumfreisetzung aus dem SR und Proteinkinase C-Inhibitor BIS (siehe 2.7).

Um eine Aussage über den Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums machen zu können, wurde pro Kammer eine Messung eines Kardiomyozyten unter Koffeinexposition (10 mmol/l) durchgeführt. Dem liegt zugrunde, dass Koffein bei rascher Applikation über eine simultane Öffnung aller RyR2 zu einer vollständigen Kalziumfreisetzung aus dem SR führt. Somit kann die Amplitude des koffein-induzierten Kalziumgradienten als Indikator für die SR-Kalzium-Beladung

herangezogen werden. Dabei beeinflussen aber auch andere Faktoren den durch Koffein induzierten Kalziumtransienten. So ist der Kalziumtransient auch von der Dosis der Koffeinapplikation abhängig (SU und HASSELBACH 1984), wobei aber in den vorliegenden Versuchen aufgrund der hohen Konzentration von einer maximalen Aktivierung der RyR ausgegangen werden kann.

Auch bei diesen Messungen wurde auf die Qualitätsmerkmale gesunder Kardiomyozyten geachtet. Wie schon beschrieben, bedeutet dies eine der Stimulationsfrequenz entsprechende Kontraktion sowie klare Begrenzungen der Kardiomyozyten und keine Messung in vakuoligen Zellen.

Für die Umsetzung der Koffein-Messungen, wurde nach Sichtung eines potentiell messbaren Kardiomyozyten, eine Kanüle bis auf ein Sichtfeld Nähe an diese Zelle herangebracht. Die elektrische Feldstimulation wurde dabei synchronisiert zur Koffeinfreisetzung beendet: d.h. zwei Sekunden nach der letzten Stimulation wurde die Koffeinpulslösung auf die Zelle gebracht. Dies erfolgte, indem zum richtigen Zeitpunkt ein magnetisch verschlossener Zulauf, welcher mit Koffeinpulslösung gefüllt war, manuell eröffnet, so dass die Koffeinzufuhr auf diesem Wege initiiert wurde.

Für die Koffeinmessungen wurde ebenfalls ein Linescan mit einer Wiederholrate von 1 kHz und insgesamt 15000 Wiederholungen durchgeführt. Hierdurch war gewährleistet, dass ein vollständiger Abfall des Kalziumtransienten, welcher unter Koffein zu beobachten war (siehe Abbildung 2.4). Die Pixel- und Voxelgröße war mit den oben beschriebenen Messungen identisch.

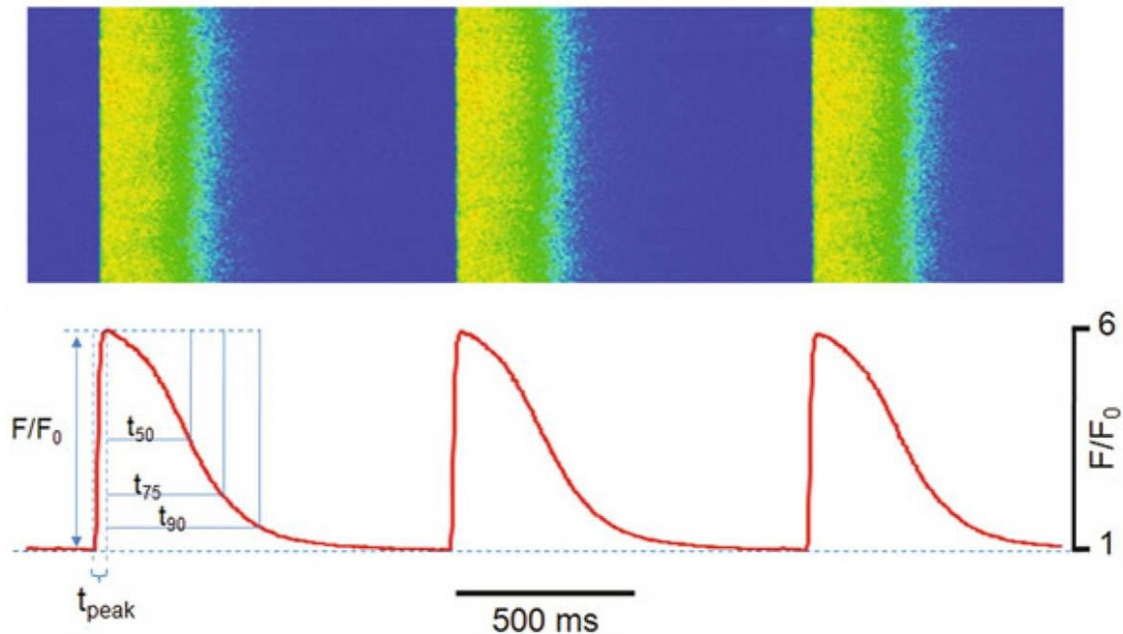
Es wurden alle Versuchsgruppen, welche im Hinblick auf die Entstehung von Sparks untersucht wurden, auch unter Koffeingabe gemessen.

## ***2.5 Auswertung***

Während der Messungen diente der Computer sowohl der Aufnahme sowie der Sichtbarmachung als auch der Speicherung der Daten. Dies wurde durch die Verwendung der Zeiss-Software ermöglicht. So entstanden während der Messungen zwei-dimensionale Bilder, welche räumliche Informationen in einer Dimension und die zeitlichen Information in der zweiten Dimension zeigten (xt-Diagramm). Dabei wird das freie Kalzium im Zytosol durch verschiedene Pixelintensitäten repräsentiert. Die Ergebnisse der Koffeinmessungen wurden in einer Zeit/Intensitäts-Tabelle erfasst. Diese konnte dann mithilfe von Excel ausgewertet werden. Die Return time (RT) 50%, RT 80%, RT 90 % und der SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt wurde als  $F/F_0$  bestimmt, was



die Normalisierung der Fluoreszenzintensität auf die Ausgangsfluoreszenz ( $F/F_0$ ) ermöglicht. Die RT beschreibt dabei den Zeitpunkt nach welchem ein Abfall der Fluoreszenzintensität um 50% (bzw. 80% oder 90%) erreicht wurde.



**Abbildung 2-3.** Darstellung des Ablaufes eines Kalziumtransienten mit der entsprechenden Kinetik. Modifiziert nach GUATIMOSIM, 2011, S. 206.

Bei Sparks werden in der Regel, also auch in der vorliegenden Arbeit, vier Charakteristika untersucht. Zu diesen zählen die Sparkfrequenz  $f$ , die Amplitude  $I_{\max}$ , die FDHM (*full duration at half maximum*) und die FWHM (*full width at half maximum*). Nach Erhebung der Daten erfolgte dann die Analyse mit der Software ImageJ und dem Plugin Sparkmaster: Automated calcium spark analysis (FERREIRA und RASBAND). Diese Software analysiert unter anderem die Anzahl der erkannten Sparks und die Sparkfrequenz sowie die individuellen Sparkparameter (Amplitude, Sparkbreite (*full width at half-maximum amplitude*), Sparkdauer (*full duration at half-maximum amplitude*)) (PICHT et al. 2007) (siehe Abbildung 2.5).

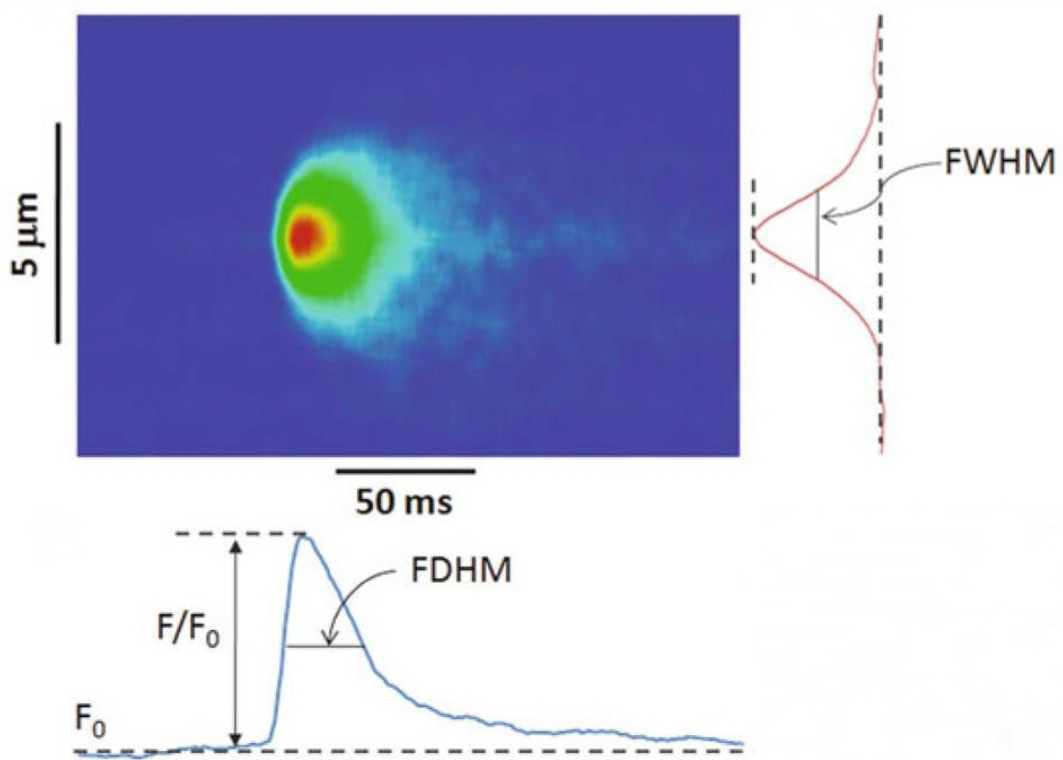
Die Frequenz wird als die Anzahl der Sparks pro Zellbreite und Beobachtungszeit definiert. Damit dient die Frequenz als Maß für die Häufigkeit der Sparks, bezogen auf den gemessenen Bereich der Zelle und den Beobachtungszeitraum.

Nach PICHT et al. (2007) stellt die Amplitude die Differenz zwischen der maximalen Sparkfluoreszenz und der Hintergrundfluoreszenz  $\Delta F/F_0$  dar (siehe Abbildung 2.5). Damit beschreibt die Amplitude die maximale Fluoreszenzdifferenz, welche durch

einen Spark ausgelöst wird und soll damit Hinweis geben auf die in diesem Spark maximal freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen-Menge.

FWHM, gemessen in  $\mu\text{m}$ , beschreibt die Breite des gemessenen Sparks bei der halben Höhe der Amplitude. Zur Bestimmung wird das Integral des gemessenen Sparks in Bezug auf seine Helligkeit in x-Richtung (siehe Abbildung 2.5) gebildet - dies als Maß für die Anzahl der insgesamt freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen. Da die Breite der Sparks maßgeblich von der Anzahl der aktivierten RyR abhängt, kann ein Wert bestimmt werden, welcher mit der Anzahl der aktivierten RyR korreliert.

Der Wert FDHM, gemessen in ms, steht für die zeitliche Ausdehnung (in t Richtung) des Sparks auf Höhe der halben Amplitude (siehe Abbildung 2.5). Diese Messgröße beschreibt also die Dauer des Sparks und dient damit zur Bestimmung eines Wertes, der sich auf die Öffnungsdauer der RyR beziehen lässt und im Bezug auf diese Öffnungsdauer eine vergleichbare Größe darstellt.



**Abbildung 2-5.** Bildliche Darstellung der typischen Sparkcharakteristika (Amplitude, FDHM, FWHM). Modifiziert nach GUATIMOSIM, 2011, S.11.

Die Erkennung eines Sparks durch das Programm Sparkmaster erfolgt derart, dass das Bild durch eine Tiefpass-Filterfunktion gefiltert wird, um dann den Mittelwert und

die Standardabweichung (SD) für jeden Punkt des Bildes errechnen zu können. Nach endgültiger Normierung des Bildes kann die Ermittlung von Sparks beginnen. Sparks werden als solche gedeutet, wenn in der mutmaßlichen Sparkregion die Intensität der Pixel mit 3-facher Standardabweichung den Mittelwert des Hintergrundes überschreitet. Aufgrund der hohen Sensitivität der Ausnutzung einer 3-fachen Standardabweichung wurden falsch positive Berechnungen manuell aussortiert, d.h. die Scans wurden zusätzlich manuell überprüft.

Die Ergebnisse der ImageJ-Analyse wurden in Excel übertragen, um neben den durch ImageJ erfassten Parametern wie Amplitude, FDHM und FWHM über verschiedene Berechnungen weitere Parameter zu erfassen.

Das Kalziumleck eines Kardiomyozyten während eines Messzyklus wurde durch folgende Formel berechnet:

$$\frac{\sum(\text{Sparkvolumen})}{\left(\frac{\text{Zellbreite}}{\text{Scan} - \text{Zeit}}\right)}$$

Formel 2-1.

Als Grundlage für das Kalziumleck wurde zunächst das Sparkvolumen nach folgender Formel berechnet:

$$\sum \text{Sparkvol.} = \frac{\text{DeltaF}}{F0} * \frac{\text{FDHM}}{1000} * \text{FWHM}$$

Formel 2-2.

$$\text{wobei } \frac{\text{DeltaF}}{F0} = \frac{\text{Amplitude} * F0 - \text{Background}}{F0 - \text{Background}}$$

Formel 2-3.

Die nach diesen Rechnungen ermittelten Werte wurden dann zur statistischen Analyse in das Softwareprogramm GraphPadPrism5 importiert.

## **2.6 Statistik**

Mithilfe von GraphPadPrism5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA ) wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwertes bestimmt und mit den so ermittelten Werten eine *one-way-analysis of variance* (ANOVA) durchgeführt. Dafür wurde der Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test eingesetzt, welcher einen Post-hoc-Test darstellt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

In den Abbildungen der Ergebnisse werden die Daten als Säulendiagramme gezeigt, bei welchem die Mittelwerte dieser dargestellt werden. Die Fehlerbalken entsprechen dabei dem Standardfehler des Mittelwertes.

## **2.7 Lösungen**

### **2.7.1 Angiotensin II**

Angiotensin II wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und in einer Endkonzentration von 1,0  $\mu\text{mol/l}$  verwendet.

### **2.7.2 H89 (5-Isoquinolinesulfonamide)**

Der Protein Kinase A Hemmstoff H89 wurde ebenfalls mit bidestilliertem Wasser angesetzt und in Aliquots verteilt, welche zur Zwischenlagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden. Zur weiteren Verwendung wurde H89 mit Normaltyrode in einem Verhältnis von 1:1000 gemischt, so dass mit einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{mol/l}$  gemessen werden konnte.

Es konnte bisher gezeigt werden, dass H89 einen potenten Inhibitor der PKA darstellt (CHIJWA et al. 1990; DAVIES et al. 2000). Die Kinetik der Versuche zeigte, dass die Inhibition auf einem kompetitiven Vorgang des H89 mit ATP basiert (CHIJWA et al. 1990). Zudem beschrieben CHIJWA et al. (1990) diesen PKA-Inhibitor als selektiven, spezifischen Inhibitor. Doch DAVIES et al. (2000) konnten zeigen, dass bei einer Konzentration des H89 von  $>10\mu\text{M}$  eine gleichzeitige Inhibition von bis zu 8 weiteren Kinasen stattfindet. Demnach wird empfohlen diesen Inhibitor bei Messungen nicht als alleinigen Inhibitor einzusetzen, sondern nur in Verbindung mit anderen PKA Inhibitoren zu verwenden (LOCHNER und MOOLMAN 2006).

### ***2.7.3 AIP (autocamide-2 related inhibitory peptide)***

Das Pulver des CaMKII-Inhibitors AIP wurde mit bidestilliertem Wasser in Lösung gebracht und dann mit einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  in den Experimenten verwendet. Dabei wurde die myristoylierte Form des AIP eingesetzt, so dass die Membrangängigkeit des Inhibitors gewährleistet wurde.

1995 wurde dieser Hemmstoff von ISHIDA et al. (1995) entwickelt und es konnte eine hochspezifische und potente Hemmung der CaMKII durch AIP gezeigt werden. Im Vergleich zu KN-93, dem bisher wissenschaftlich vielfach eingesetzten Inhibitor der CaMKII, resultierte die Verwendung von AIP in einer 500fach stärkeren Inhibition. Zudem wurde gezeigt, dass die Spezifität von AIP gewährleistet ist, denn in den durchgeführten Experimenten wies AIP keine signifikante Beeinflussung der anderen multifunktionalen Proteinkinasen wie PKA, PKC oder CaMKIV auf. Den möglichen Inhibitionsmechanismus des AIP sehen die Autoren in einer Bindung des AIP an die Substratbindestelle der Autophosphorylierung (ISHIDA et al. 1995).

### ***2.7.4 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl Borate)***

Der membrangängige Inhibitor 2-APB wurde mit bidestilliertem Wasser vermischt und aliquotiert. Nach Vermischung mit der Normaltyrode betrug die Endkonzentration 2  $\mu\text{mol/l}$ . MARUYAMA et al. (1997) beschreiben 2-APB als den ersten membrangängigen Inhibitor, der die durch  $\text{IP}_3$ -induzierte Kalziumfreisetzung aus dem SR hemmt. 2-APB hemmt also die Inositoltriphosphatrezeptoren. Dabei wird aber die Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphate an die  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren nicht beeinflusst. Da 2-APB nicht die RyR abhängige Kalziumfreisetzung beeinflusst, wurde dieser Inhibitor als ein spezifischer  $\text{IP}_3$ -Rezeptor Inhibitor eingestuft (MARUYAMA et al. 1997).

MISSIAEN et al. (2001) zeigten wenige Jahre später in ihren Experimenten, dass 2-APB auch weitere den Kalziumstoffwechsel regulierende Elemente beeinflusst. Demnach inhibiert 2-APB auch die Kalziumaufnahme in die nicht-mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und steigert das unspezifische Kalziumleck, so dass sie diesen Hemmstoff als nicht spezifisch klassifizieren. Als möglichen, der Wirkung von 2-APB zugrunde liegenden Mechanismus beschreiben sie, dass 2-APB als hydrophober Stoff die Lipidphase oder die hydrophobe Kopfgruppe der Membran beeinflusst. Somit stellt die Inhibition laut MISSIAEN et al. (2001) eine eher unspezifische Interaktion mit den in der Membran eingebauten Teilen der Kalziumpumpen und des

IP<sub>3</sub>-Rezeptors dar. Wie beschrieben ordnen MARUYAMA et al. (1997) 2-APB hingegen als spezifischen IP<sub>3</sub>-Rezeptor Inhibitor ein, so dass also verschiedene Untersuchungen über den Inhibitor 2-APB vorliegen.

#### **2.7.5 BIS (Bisindolylmaleimide I (Bis I, GF 109203X))**

Der Proteinkinase C Inhibitor BIS wurde mit einer Konzentration von 2,0 µmol/l für die Messungen eingesetzt.

TOULLEC et al. (1991) untersuchten diese Inhibition des Bisindolylmalmeide I bezüglich PKC umfassend. Aufgrund ihrer Experimente schlussfolgerten sie, dass dieser Hemmung eine kompetitive Inhibition zugrunde liegt, bei welcher BIS mit dem Agonist ATP um die Besetzung der Substratbindestelle der PKC konkurriert. Zudem zeigten sie, dass eine für die PKC spezifische Inhibition vorliegt, auch wenn die ATP-Bindestelle eine hohe Ähnlichkeit mit den ATP-Bindestellen anderer Proteinkinasen aufweist. Jedoch weist Bisindolylmalmeide I keine Spezifität bezüglich der verschiedenen Subtypen der PKC (α,β1,β2,γ) auf (TOULLEC et al. 1991).

#### **2.7.6 Koffein**

Koffein, welches zur Induktion einer vollständigen Ca<sup>2+</sup>- Freisetzung aus dem SR eingesetzt wurde, wurde mit einer Konzentration von 10 mmol/l verwendet. Wie unter 2.3 beschrieben, korreliert die Menge des freigesetzten Kalziums mit dem SR Ca<sup>2+</sup> - Gehalt.

<b>Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
<i>Koffeinlösung</i>	Normaltyrode	
	Koffein	10 mmol/l

**Tabelle 2-2.** Zusammensetzung der bei den Koffeinemessungen verwendeten Koffeinlösung.

#### **2.7.7 Farbstoff Fluo-4-AM**

Zur Darstellung der intrazellulären Kalziumsparkereignisse wurde der Farbstoff Fluo-4-AM verwendet. Fluo-4 ist ein Analogon von Fluo-3, wobei die zwei Chloratome des Fluo-3 durch Fluor ersetzt sind. Damit stellt Fluo-4 wie Fluo-3 einen Fluoreszenzindikator für intrazelluläres Kalzium dar. Die genannte Strukturveränderung führt dazu, dass das Absorptionsmaximum von Fluo-4 im Vergleich zu Fluo-3 um 12nm gesenkt (MOLECULAR PROBES 2011) ist. Infolgedessen kommt es in der Laserkonfokalmikroskopie zu einer erhöhten Signalstärke bei 488 nm (MOLECULAR PROBES 2011). Fluo-4 wurde in seiner

Acetoxymethyl-Ester-Form verwendet. Dieses Fluo-4-AM ist vorteilhaft, da es ein lipophiles ungeladenes Molekül darstellt, welches somit im Gegensatz zu Fluo-4 die Zellmembranen passieren kann (MOLECULAR PROBES 2011). In den Zellen erfolgt durch unspezifische Esterasen die Hydrolyse der lipophilen Gruppen, so dass nun die Wahrscheinlichkeit der geladenen Moleküle die Membran zu durchdringen deutlich geringer ist, als in ihrer vorangegangenen membrangängigen veresterten Form (MOLECULAR PROBES 2010).

Beim Messen sollte die Konzentration so gering wie möglich gehalten werden, um eine Überladung und die damit im Zusammenhang stehenden Messartefakte zu vermeiden.

Als eine die Oberflächenspannung herabsetzende Substanz, wurde Pluronic F 127 zu Fluo-4-AM hinzugefügt, so dass die Dispersion des unpolaren Farbstoffs ermöglicht wurde, damit dieser bei den Messungen in allen Zellen in gleicher Konzentration vorliegt.

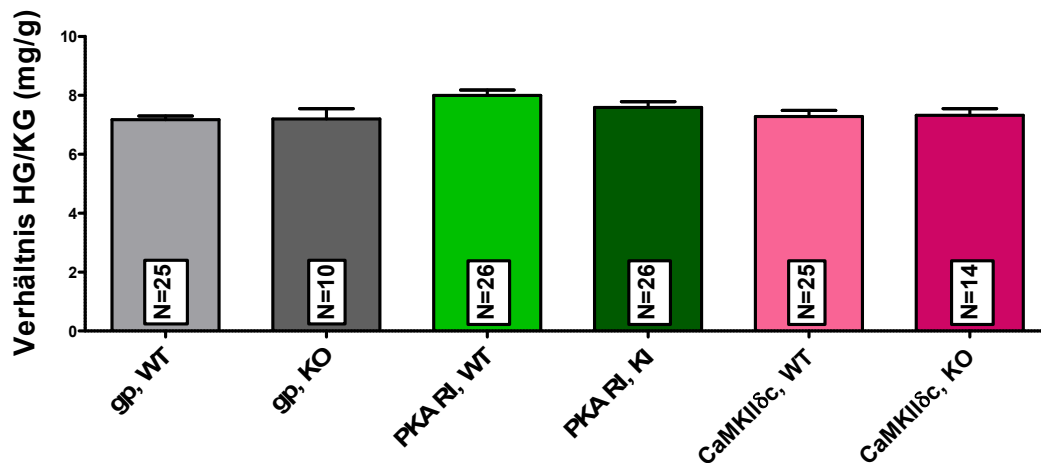
Zur Präparation des Farbstoffs wurde 50 µg Pulver des Special Packaging Fluo-4-AM mit 44 µl Dimethylsulfoxide (DMSO) als Lösungsmittel unter Einsatz einer Vortexmaschine vermischt. Jeweils 5 µl des Stocks wurden mit 1 µl 20% Pluronic zur Dispersion, unter Ausschluss von Lichteinfall in einem dunklen Eppendorf Cup tituiert und mit jeweils 500 µl kalziumfreier Normaltyrode versetzt. Damit war der Farbstoff mit einer Endkonzentration von 10,339 µmol/l für die Messungen vorbereitet.

### 3. Ergebnisse

Um die Mechanismen der Ang II-abhängigen Regulation des Kalziumstoffwechsels genauer zu verstehen, wurden die bereits erwähnten Mausmodelle eingesetzt.

#### 3.1 Basale Charakteristika der verwendeten Mäuse

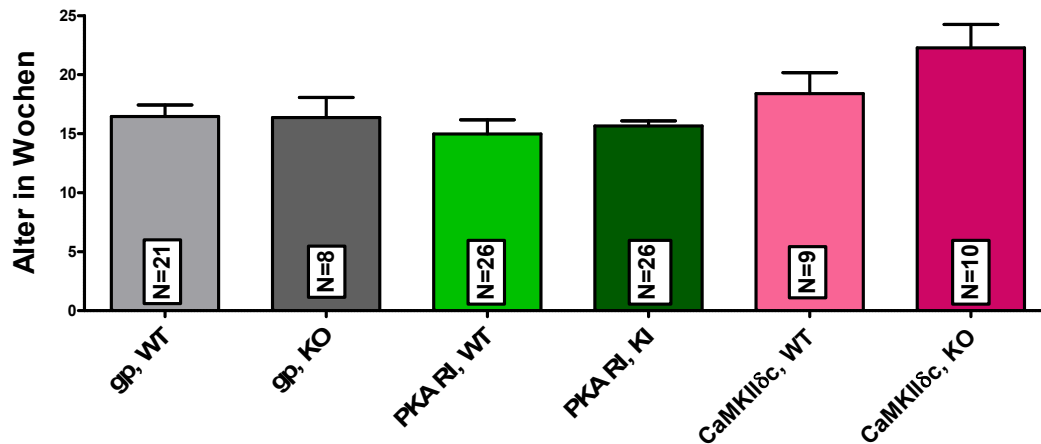
Die in den Experimenten verwendeten Mauslinien wurden auch im Hinblick auf Differenzen bezüglich des Verhältnisses von Körpergewicht zu Herzgewicht untersucht. Bei diesem Vergleich zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 3-1.** Dieses Säulendiagramm zeigt, dass die genetische Veränderungen der Mauslinien keinen Einfluss auf die Relation Herz/Körpergewicht hatten. Damit bewirkten weder ein Knockout der gp91phox, noch ein Knockout der CaMKIIδc und auch nicht die Modifikation der PKA R1 einen Unterschied in dem Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht im Vergleich zum Wildtyp.

Bei allen Untersuchungen wurden nur Tiere im Alter von 10 bis 29 Wochen eingesetzt. In Abbildung 3-2 ist die Altersverteilung dargestellt.





**Abbildung 3-2.** Dieses Säulendiagramm zeigt, dass die in den Experimenten untersuchten Mäuse alle in einem ähnlichen Alter waren. Die verwendeten Mäuse waren minimal 11 bis maximal 29 Wochen alt.

In den durchgeführten Versuchen wurden mehr männliche als weibliche Versuchstiere eingesetzt. Das Verhältnis lag bei 75 : 28. Demnach wurden 72,8% Männchen und 27,2% Weibchen verwendet.

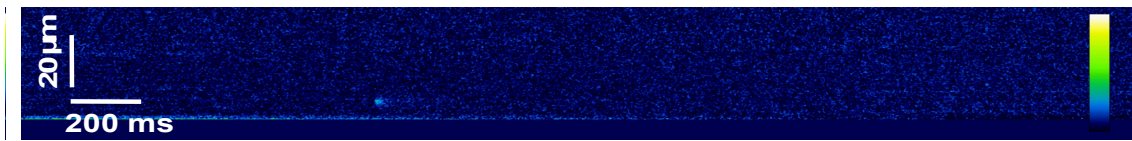
### ***3.2 Angiotensin II steigert die Frequenz von Kalziumsparks***

Wie in der Einleitung bereits dargestellt, scheint Ang II in die Pathogenese kardialer Dysfunktion involviert zu sein. Dabei führt Ang II zu einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von EADs und DADs. Den DADs liegt eine diastolische Wiedereröffnung kardialer Ryanodin-Rezeptoren zugrunde. Als messtechnisches Korrelat zur Ryanodin-Rezeptoröffnung gelten Sparks, so dass der Einfluss von Ang II auf die diastolische Kalziumfreisetzung aus dem SR unter anderem anhand der Messung von Sparks untersucht werden kann.

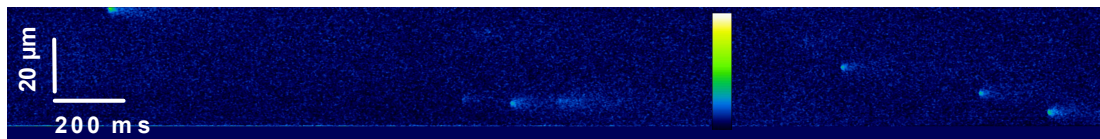
Die Sparkfrequenz stellt, wie unter 2.5 schon erläutert, die Anzahl der Sparkereignisse pro definierter Messzeit und Messbereich dar.

Durch die ausgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass im Mittelwert die Frequenz der Sparkereignisse durch die Inkubation mit Angiotensin II in den Kardiomyozyten der Wildtypmäusen signifikant von dem Basalwert mit  $0,6960 \pm 0,03769 \text{ } 100 \text{ } \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  auf  $1,798 \pm 0,1368 \text{ } 100 \text{ } \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  gesteigert wurde (siehe Abbildung 3-3a.)

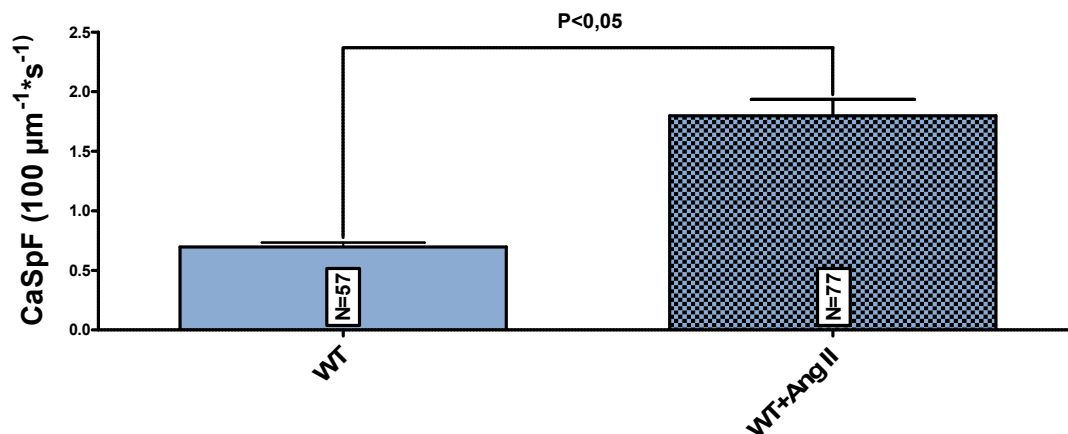
## WT



## WT + Ang II



**Abbildung 3-3a.** Diese Abbildung zeigt einen WT-Kardiomyozyten im Vergleich zu einem WT-Kardiomyozyten unter Angiotensin II Inkubation dar. Beide Bilder stellen repräsentative Originalregistrierungen dar. Die in der unteren Originalregistrierung deutlich erhöhte Sparkfrequenz ist für die Ergebnisse der Kardiomyozyten mit Angiotensin II Inkubation im Vergleich zu dem Basalwert ohne Angiotensin II charakteristisch. Die farbigen Balken stellen jeweils einen Intensitätsindikator dar.



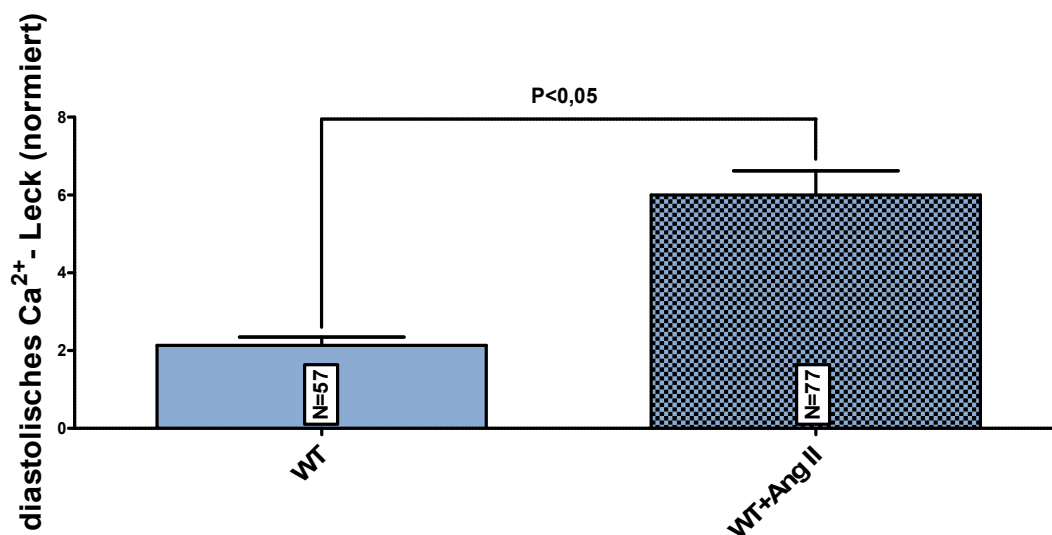
**Abbildung 3-3b.** In dieser Abbildung ist die Frequenz von Sparkereignissen in WT-Kardiomyozyten dargestellt. Dabei repräsentiert die linke Säule den Basalwert der Sparkfrequenz in WT-Kardiomyozyten, das heißt also den Wert ohne pharmakologische Intervention (57 Kardiomyozyten aus 39 Mäuseherzen). Die rechte Säule hingegen zeigt die mittlere Sparkfrequenz der WT-Kardiomyozyten nach einer mindestens 15-minütigen Inkubation mit Ang II (77 Kardiomyozyten aus 35 Mäuseherzen). Es ist deutlich zu erkennen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Sparkfrequenz von WT-Kardiomyozyten ohne Behandlung und der Sparkfrequenz von WT-Kardiomyozyten unter Anwendung von Ang II besteht. Dabei wurden alle Messungen nach einer 30 sec währender Stimulationspause durchgeführt, so dass es sich bei den Messungen um die Frequenz diastolischer Ca<sup>2+</sup>-Sparks handelt.

Die in den Experimenten aufgetretenen und dabei messbaren Sparks wurden neben ihrer Frequenz auch hinsichtlich des Kalziumlecks untersucht.

Die Größe des individuellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks eines Sparks wird errechnet. FDHM ist als *full duration at half maximum* definiert, FWHM als *full width at half maximum* (siehe 2.5). Um den Kalziumverlust der Zelle zu ermitteln, wurde die Summe aller individuellen Sparklecks addiert und auf die Zellbreite und die Zeit bezogen. Somit stellt der Wert des  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks dar, wie viel  $\text{Ca}^{2+}$  während eines Messzyklus in der Diastole durch die Summe der gemessenen Sparks freigesetzt wird.

In den Kardiomyozyten der WT-Mäuse betrug der mittlere Wert des Kalziumlecks der Summe aller Sparks eines Kardiomyozyten während einer Messdauer von 3,84 sec  $2,132 \pm 0,2144$  (57 Kardiomyozyten aus 33 Mäuseherzen).

Dieser Wert wurde durch die zusätzliche Inkubation mit Ang II signifikant auf  $6,0 \pm 0,6208$  (77 Kardiomyozyten aus 30 Mäuseherzen) erhöht. Diese Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck korreliert dabei mit der Steigerung der Sparkfrequenz durch Ang II in den WT-Kardiomyozyten.



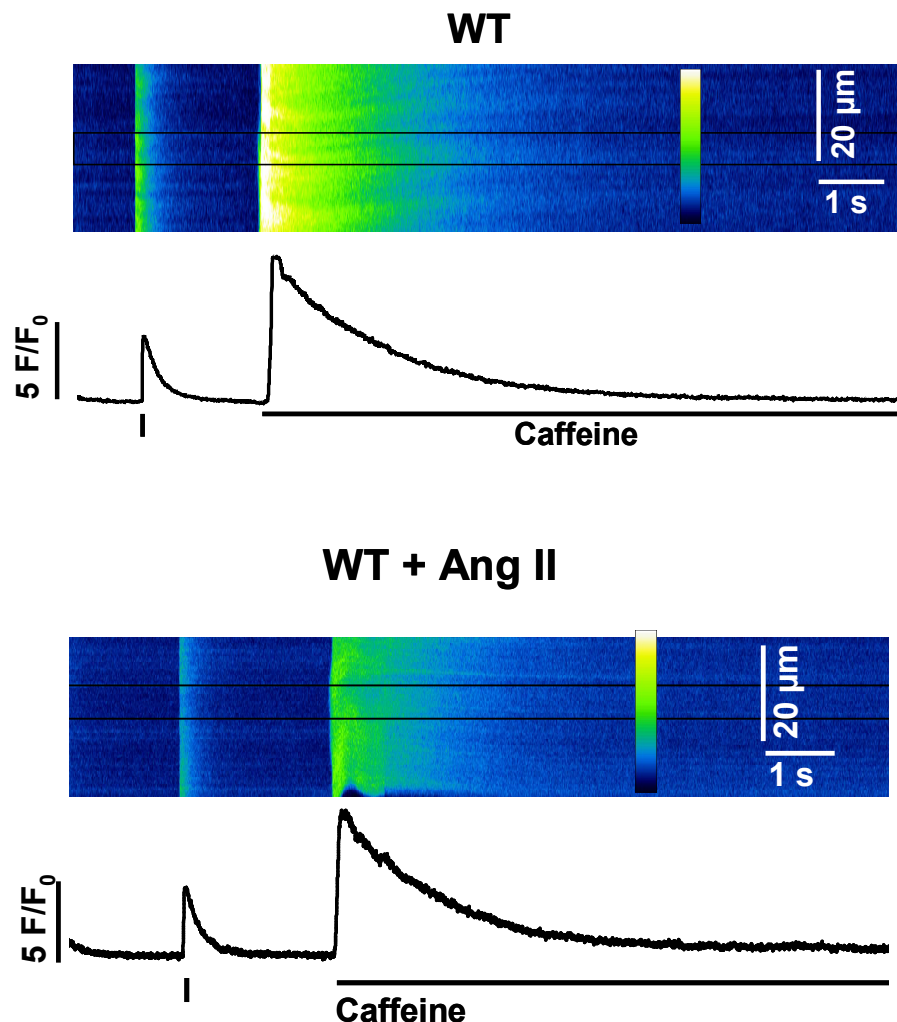
**Abbildung 3-4.** Es zeigt sich eine deutliche Steigerung des Kalziumlecks bei Inkubation der Kardiomyozyten der WT-Mäuse mit Ang II im Vergleich zu der ausschließlichen Inkubation mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Normaltyrode. Diese deutliche Erhöhung stellt einen signifikanten Unterschied dar.

Um die oben dargestellten Ergebnisse der durchgeführten Experiment im richtigen Kontext analysieren und interpretieren zu können, wurden zu den Sparkmessungen der Kardiomyozyten ergänzend auch immer Koffeinmessungen durchgeführt.

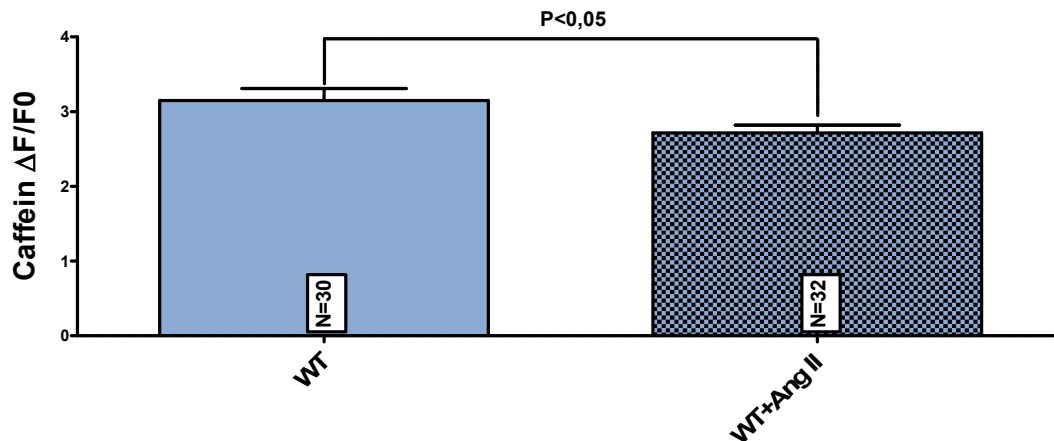
Die Ergebnisse dieser Koffeinmessungen fungieren als Indikatoren für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums, so dass mit diesen Messungen die jeweilige Kalziumbeladung des SR bestimmt werden kann.

Dabei sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass der SR Kalziumgehalt einen direkten Einfluss sowohl auf die Sparkfrequenz als auch auf die weiteren Charakteristika der Sparks hat. Demnach steigert ein erhöhter SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt sowohl die Sparkfrequenz als auch die Amplitude und Breite der Sparks (ZIMA et al. 2010).

Die Messungen des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt erfolgten durch die Zugabe von Koffein auf die Kardiomyozyten, bei anschließender Messung einer unter Koffeingabe stimulierten vollständigen Entleerung des SR. Anhand der Auswertungen der Koffeintransienten führt Ang II zu einer signifikanten Reduktion der Koffeintransientenamplitude als Maß für den SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt.



**Abbildung 3-5a.** Diese beiden Originalregistrierungen der Koffeinmessungen der gp91phox WT-Mäuse ohne und mit zusätzlicher Ang II-Inkubation zeigen schon im Verhältnis der Koffeingraphen, dass Ang II zu einer Reduktion des SR-Kalziumgehalts in den Kardiomyozyten geführt hat. Diese Originalregistrierungen sind auch für die Messungen der anderen Wildtypkardiomyozyten unter Koffeingabe repräsentativ. Die farbigen Balken stellen jeweils einen Intensitätsindikator dar.



**Abbildung 3-5b.** Die gezeigten Säulen repräsentieren die Koffeintransientenamplitude als Maß für den SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt. Dabei ist hier eine durch Ang II ausgelöste Reduzierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts unverkennbar.

Die zwei Säulen zeigen den Unterschied zwischen den Ergebnissen der Messungen der WT-Kardiomyozyten unter Inkubation mit Normaltyrode (30 Kardiomyozyten aus 24 Mäuseherzen) im Vergleich zu den Resultaten bei zusätzlicher Ang II-Gabe (32 Kardiomyozyten aus 22 Mäuseherzen).

### ***3.3 Die Angiotensin II-induzierte Steigerung der $\text{Ca}^{2+}$ - Sparkfrequenz***

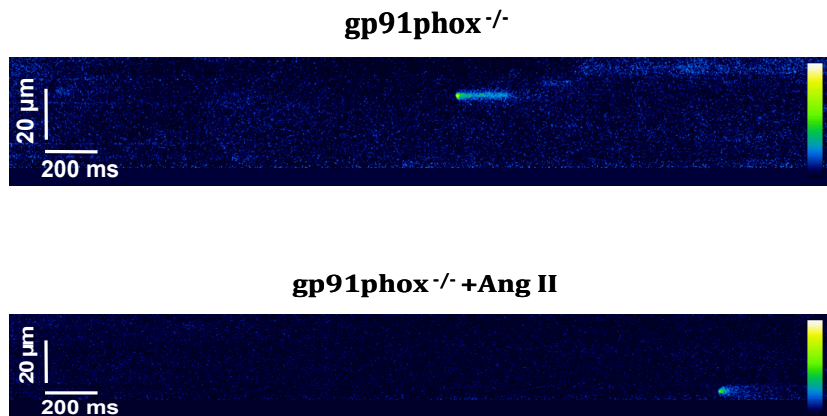
#### ***wird durch NOX2 vermittelt***

Um zu untersuchen, über welchen molekularen Mechanismus die durch Ang II bedingte Steigerung der Sparkfrequenz bedingt wird, wurde u.a. eine Mauslinie verwendet, bei welcher die katalytische Untereinheit der NOX 2 (gp91phox) aus dem Genom entfernt worden ist. Normalerweise führt Angiotensin II zu einer schnellen und effektiven Aktivitätserhöhung der NADPH-Oxidase II. Die vermehrte Aktivität der NADPH-Oxidase 2 führt dann zu einer gesteigerten Generierung von ROS.

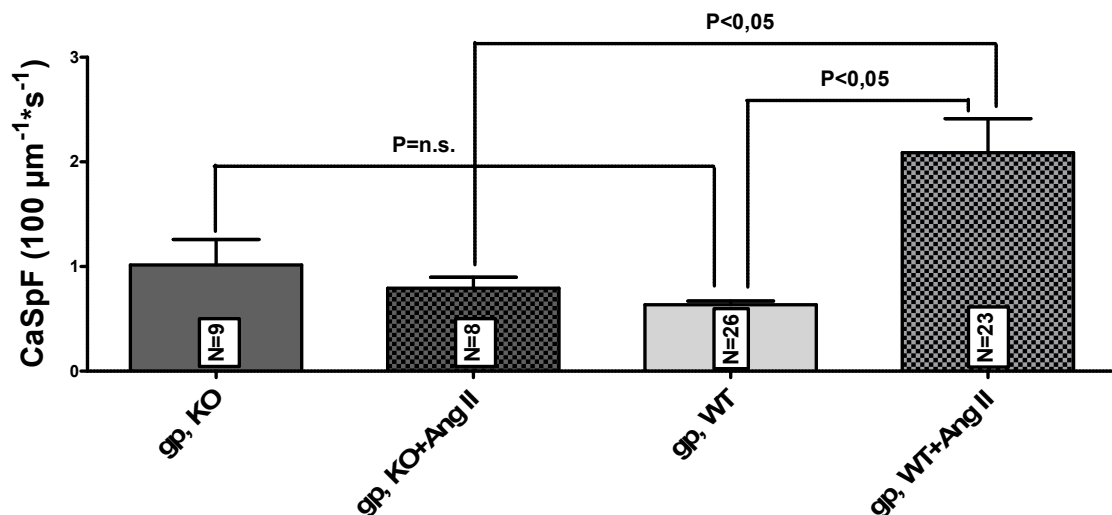
Die durchgeführten Experimente mit der Verwendung der gp91phox-knockout-Mäuse untersuchten daher, ob ein Fehlen von NOX2-generierten ROS zu einer Beeinflussung der durch Ang II induzierten Sparks führt. Es kann also der Frage nach der Redoxabhängigkeit der durch Ang II induzierten Sparks nachgegangen werden.

Die Experimente mit gp91phox KO-Mäusen unter Einsatz von Normaltyrode zeigten eine durchschnittliche Sparkfrequenz von  $1,016 \pm 0,2423$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Bei Inkubation der gp91phox-knockout-Mäuse mit Ang II wurde eine mittlere Sparkfrequenz von  $0,7935 \pm 0,1036$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) erreicht. Interessanterweise konnte Ang II die Frequenz in Knockout-Tieren also nicht steigern. Diese Messungen zeigen somit, dass eine funktionierende NOX2 für die Ang II Wirkung auf Kalziumsparks notwendig ist.



**Abbildung 3-6a.** Diese Originalregistrierungen repräsentieren die in den Messungen erhaltenen Ergebnisse. Die basale Sparkfrequenz einer Knockout-Herzmuskelzelle gleicht mit einem erkennbaren Spark der basalen Frequenz eines Wildtypkardiomyozyten, bei ebenfalls ausschließlicher Inkubation mit Normaltyrode. In einer gp91phox-knockout-Zelle führte die Inkubation dieses Kardiomyozyten nicht zu einer Erhöhung der Sparkfrequenz, so dass dementsprechend lediglich ein Spark in der Abbildung zu erkennen ist. Die farbigen Balken stellen jeweils einen Intensitätsindikator dar.



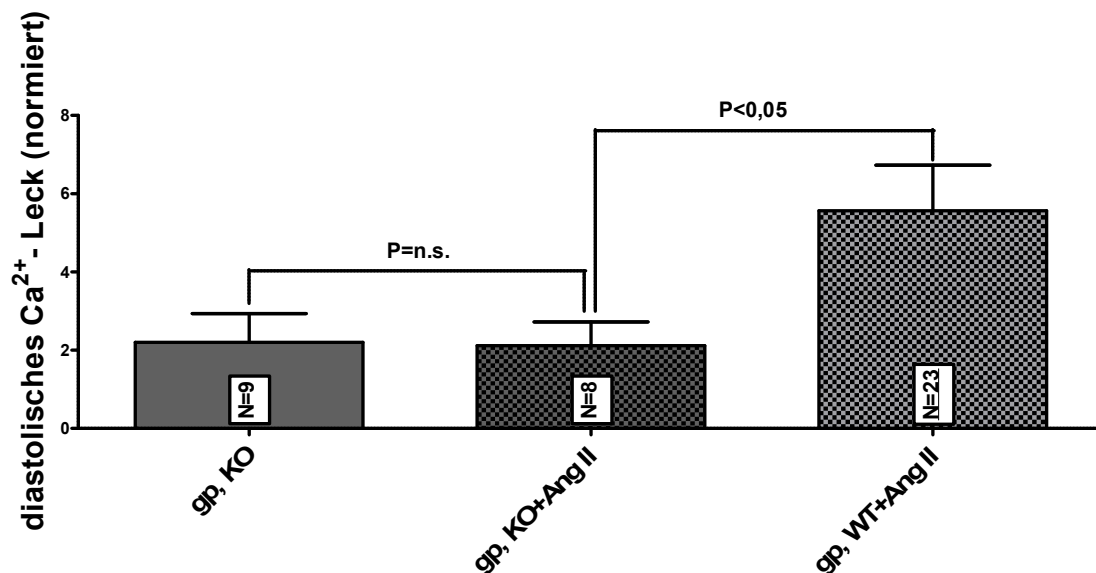
**Abbildung 3-6b.** Die dargestellten Säulen veranschaulichen die durchschnittliche Sparkfrequenz in den vier Gruppen gp-KO (9 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen), gp-KO+Ang (8 Kardiomyozyten aus 4 Mäuseherzen), gp-WT (26 Kardiomyozyten) und gp-WT+Ang (23 Kardiomyozyten aus 10 Mäuseherzen).

Durch diese Experimente wurde gezeigt, dass ein Knockout der gp91phox Untereinheit der NADPH-Oxidase zu einer deutlichen Inhibition des in WT-Kardiomyozyten durch Ang II ausgelösten Effektes der Frequenzerhöhung führt. Diese Hemmung ist von der Größenordnung so, dass ein signifikanter Unterschied ( $p<0,05$ ) zwischen der Sparkfrequenz der gp WT-Kardiomyozyten unter Ang II und der Sparkfrequenz der gp91phox-KO-Herzmuskelzellen besteht.

Auch der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Messungen der gp KO-Kardiomyozyten mit Ang II-Inkubation und den Resultaten der Messungen der gp91phox WT-Kardiomyozyten mit Ang II-Behandlung ist signifikant ( $p<0,05$ ).

Analog zur Kalziumsparkfrequenz war auch die durch Ang II signifikante Steigerung des SR Kalziumlecks nach Ausschaltung der NOX2-Funktion aufgehoben. Die Messungen der Kardiomyozyten der gp91phox KO-Mäuse ergaben folgenden

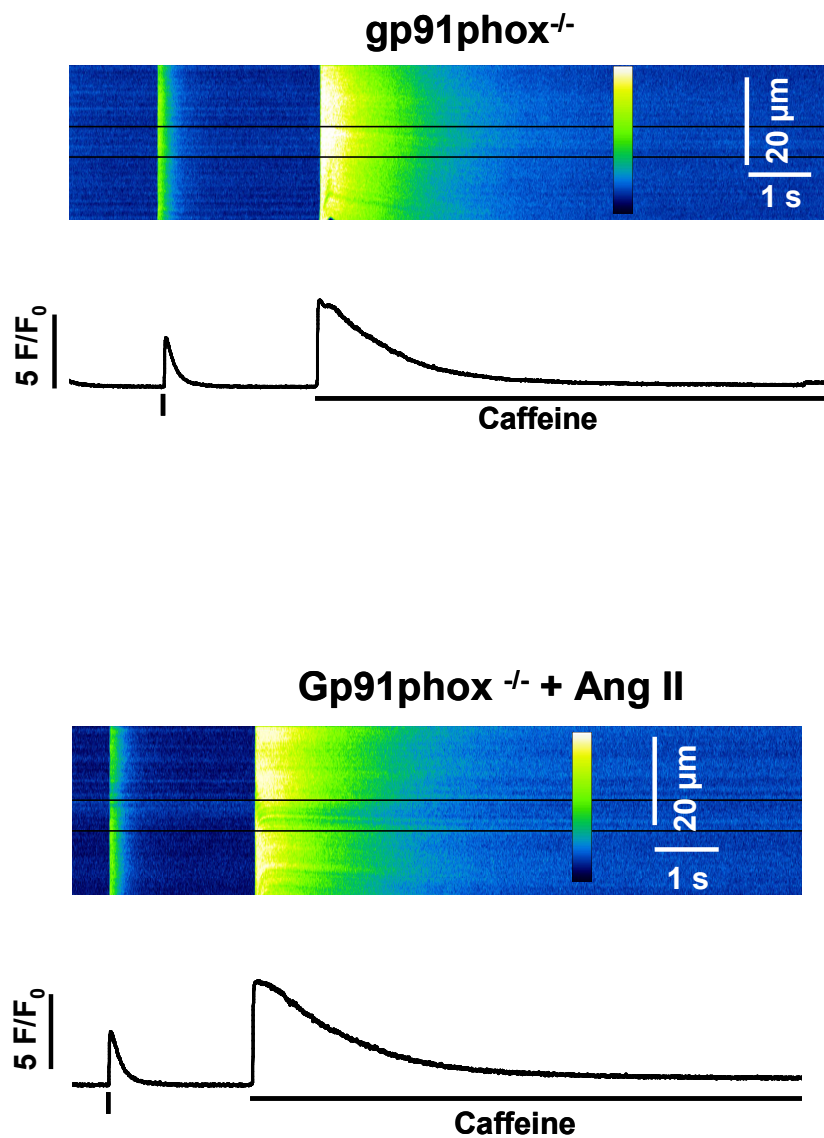
Mittelwert  $2,199 \pm 0,7345$  (9 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen). Eine Inkubation mit Angiotensin II in den Kardiomyozyten der gp KO-Mäuse zeigte einen durchschnittlichen Wert von  $2,133 \pm 0,6065$  (8 Kardiomyozyten aus 4 Mäuseherzen). Ein Vergleich der beiden Mittelwerte zeigt, dass die in den vorangegangenen Versuchen beobachtete Wirkung von Angiotensin II einer Steigerung des mittleren Kalziumlecks durch die Verwendung von gp KO-Mäusen verhindert wird.



**Abbildung 3-7.** Dieses Säulendiagramm veranschaulicht, dass durch den Knockout der gp91phox-Untereinheit der NADPH-Oxidase eine Verhinderung der durch Ang II induzierten deutlichen Steigerung des Kalziumlecks resultiert. Dabei zeigen die Säulen, welche den Wert der Messungen mit den Kardiomyozyten der gp KO-Mäuse mit Ang II-Inkubation im Vergleich zu den regulären Messungen mit Normaltyrode repräsentieren, ein sich gleichendes Niveau.

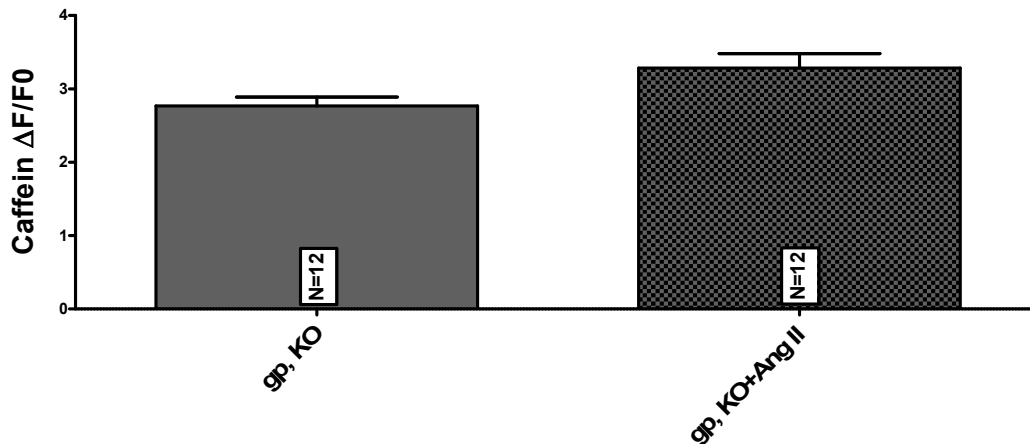
Das Fehlen einer Ang II-induzierten Steigerung des SR-Kalziumlecks hat möglicherweise Folgen für den SR-Kalziumgehalt. Im Gegensatz zum WT führt Ang II im KO zu einer Steigerung des SR-Kalziumgehaltes, gemessen als durch Koffein induzierter Kalziumtransient. Die durch transgene Veränderung erwirkte Inhibition der NADPH Oxidase II zeigt sowohl in den Messungen mit Ang II als auch in den Messungen mit gleichzeitiger Superfusion mit Ang II und AIP keine wie vorher beobachtete Senkung des SR-Kalziumgehaltes. Es stellt sich also die Frage nach der Ursache der Ang II induzierten Steigerung des SR-Kalziumgehaltes bei Fehlen einer funktionalen NOX 2. bzw. die Frage nach dem Mechanismus der Ang II-induzierten Steigerung der Sparks.





**Abbildung 3-8a.** Auch diese Originalregistrierungen zeigen, dass eine Hemmung der NADPH-Oxidase 2 zu einer Hemmung der durch Ang II-induzierten signifikanten Reduktion des SR-Kalziumgehalts. Eine funktionierende NOX2 scheint für diese Ang II-induzierte Reduktion daher eine notwendige Bedingung zu sein. Die farbigen Balken stellen jeweils einen Intensitätsindikator dar.





**Abbildung 3-8b.** Diese Abbildung mit den Messwerten von  $3,99 \pm 0,317$  (9 Kardiomyozyten aus 1 Mäuseherz) bei Superfusion mit Ang II sowie mit  $3,28 \pm 0,196$  (12 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen) im Vergleich zu  $2,77 \pm 0,12$  (12 Kardiomyozyten aus 4 Mäuseherzen) bei alleiniger Gabe der Normaltyrode liegt eindeutig keine Reduktion des SR-Kalziumgehalts durch Ang II vor. Somit kann dies als eine Inhibition des Ang II-Effektes auf den SR-Kalziumgehalt durch eine Hemmung der NADPH-Oxidase gesehen werden.

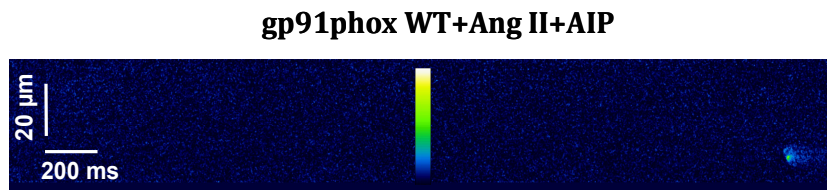
### ***3.4 Angiotensin II induziert das SR Kalziumleck über eine NOX2-***

#### ***abhängige Aktivierung der CaMKII***

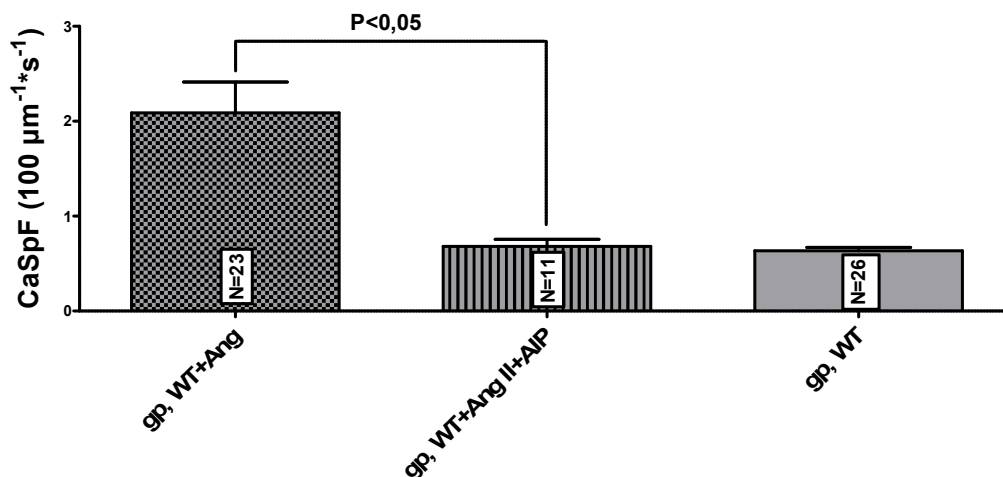
Die CaMKII ist sowohl für die Physiologie als auch für die Pathophysiologie des Kalziumstoffwechsels von Kardiomyozyten entscheidend. Daher stellte sich die Frage nach der Bedeutung der CaMKII für die durch Ang II induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks. Als erstes stellt sich die Frage inwieweit eine veränderte Sparkfrequenz durch Inhibition der CaMKII beeinflusst werden kann. Das heißt in den Experimenten wurde überprüft, ob die Zugabe von AIP, als akuter Inhibitor der CaMKII zu einer Veränderung der durch Inkubation mit Ang II verursachten Frequenzsteigerung von Sparkereignissen in gp91phox WT-Kardiomyozyten führt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die unter Ang II-Gabe vorliegende signifikante Frequenzsteigerung von Sparks in den Herzmuskelzellen durch AIP gehemmt wurde. Bei zusätzlicher Inkubation von AIP zu Ang II wurde der unter Ang II gemessene Mittelwert der Sparkfrequenz von  $2,088 \pm 0,3245$  ( $100 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) auf einen mittleren Wert von  $0,6814 \pm 0,07411$  ( $100 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) gesenkt. Somit führte der Einsatz des CaMKII Inhibitors AIP zu einer Reduktion der unter Ang II-Gabe aufgetretenen Sparkfrequenzsteigerung. Dieser Wert der Sparkfrequenz in gp91phox WT-

Kardiomyozyten bei gleichzeitiger Inkubation mit Ang II und AIP gleicht damit dem Wert der Basalfrequenz der Sparks ohne Ang II- Inkubation.



**Abbildung 3-9a.** Diese Abbildung zeigt eine Originalregistrierung der Messung eines gp91phox WT-Kardiomyozyten bei Inkubation mit Ang II und dem Inhibitor AIP. Das Auftreten von ausschließlich einem Spark während der abgebildeten Zeitspanne und dem gezeigten Messbereich ist dabei repräsentativ für die Ergebnisse der Experimente mit AIP. Der farbige Balken stellt auch hier einen Intensitätsindikator dar.



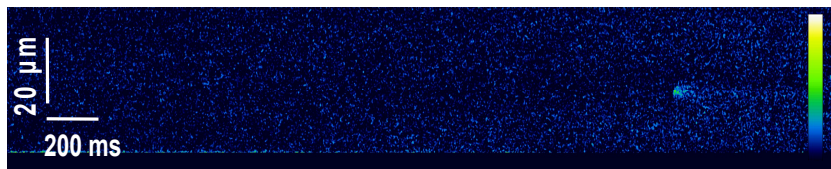
**Abbildung 3-9b.** Dieses Säulendiagramm zeigt die Sparkfrequenzen der Experimente in einer durch die Höhen der Säulen dargestellten Form. Dabei stellt die linke Säule die Frequenz der Sparkereignisse unter Ang II-Inkubation dar (23 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen). Die mittlere Säule zeigt die Sparkfrequenz in den WT-Kardiomyozyten bei zusätzlicher Gabe von AIP (11 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen). Durch den Vergleich dieser Säulen ist erkennbar, dass eine Hemmung der Sparkfrequenzsteigerung stattgefunden hat. Der aufgezeigte Unterschied zwischen den mit Ang II inkubierten gp91phox WT-Kardiomyozyten und den Kardiomyozyten bei zusätzlichem Einsatz von AIP ist signifikant ( $p < 0,05$ ). Die rechte Säule stellt an dieser Stelle die Sparkfrequenz von gp91phox WT-Kardiomyozyten bei ausschließlicher Behandlung mit Normaltyrode dar, um die Angleichung der Sparkfrequenz unter Verwendung des CaMKII-Hemmstoffes AIP an den Basalwert der Sparkfrequenz, aufzuzeigen.

Eine weitere Möglichkeit, die CaMKII zu inhibieren, stellt die Verwendung von CaMKII $\delta$ c KO-Mäusen dar. Aufgrund der transgenen Veränderung stellt dies eine chronische Inhibition der CaMK $\delta$ c dar. Die durch die Experimente gezeigte Sparkfrequenz bei ausschließlicher Inkubation der CaMKII $\delta$ c KO-Kardiomyozyten mit

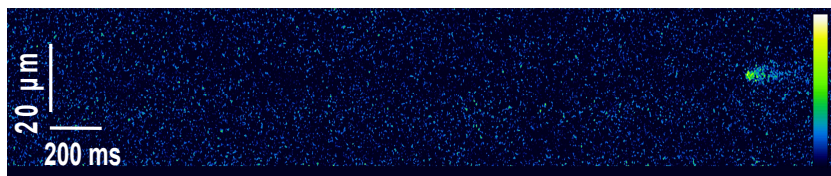
Normaltyrode beträgt  $0,6253 \pm 0,05049$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (11 Kardiomyozyten aus 8 Mäuseherzen).

Die gemessene Sparkfrequenz bei Gabe von Ang II zu den Kardiomyozyten der CaMKII $\delta$ c KO-Mäuse beträgt  $0,6119 \pm 0,04941$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (22 Kardiomyozyten aus 7 Mäuseherzen). Demnach gleicht der Mittelwert der Messungen mit Ang II in den Kardiomyozyten der CaMKII $\delta$ c KO-Mäusen dem basalen Wert ohne Ang II. Im Vergleich zu den Ergebnissen der WT-Kardiomyozyten mit Ang II-Inkubation stellt sich der Unterschied in der Sparkfrequenz als signifikant ( $p < 0,05$ ) dar. Diese Ergebnisse gleichen damit den Ergebnissen unter 3.3.1, welche bei akuter Hemmung der CaMKII ebenfalls eine Inhibition des Ang II-Effektes zeigten.

### CaMKII $\delta^{-/-}$



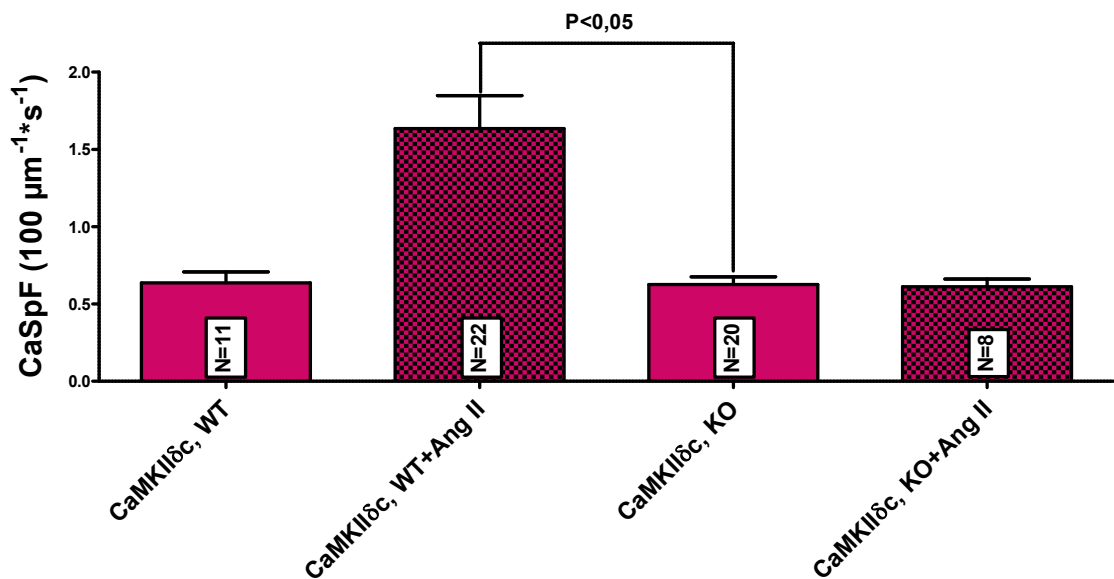
### CaMKII $\delta^{-/-}$ + Ang II



**Abbildung 3-10a.** Diese Abbildung zeigt zwei repräsentative Originalregistrierungen. Beide Messungen erfolgten in der Diastole, nach einem 30 sec dauernden Stimulationspause.

Die erste Originalregistrierung zeigt dabei die typische Sparkfrequenz bei ausschließlicher Inkubation der CaMKII $\delta$ c-KO-Kardiomyozyten mit  $\text{Ca}^{2+}$ haltiger Normaltyrode.

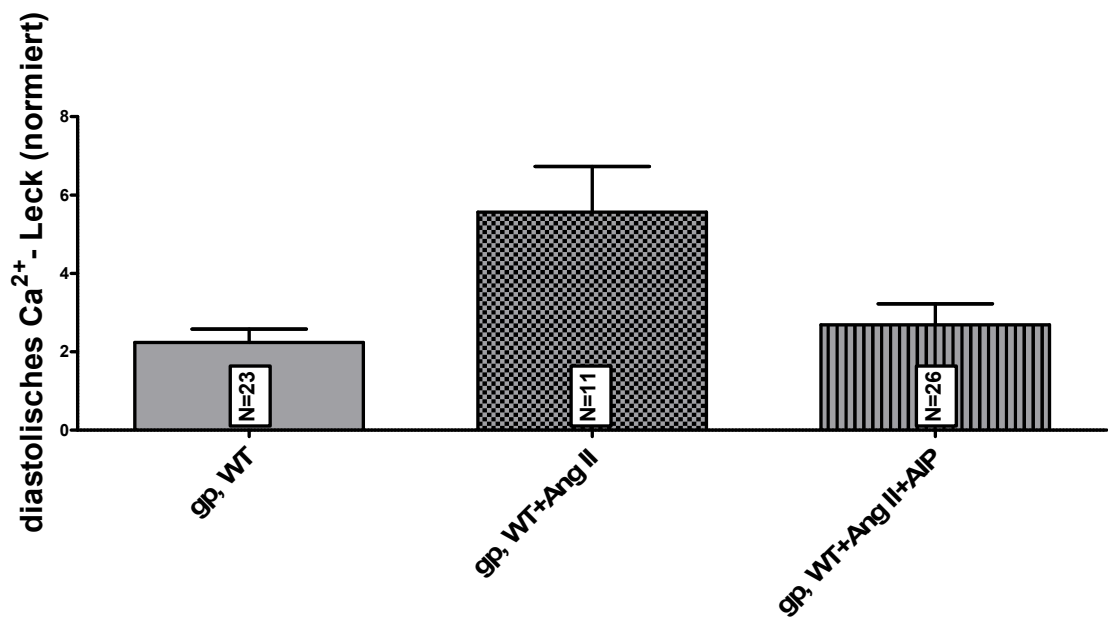
Die zweite Originalregistrierung stellt die in den Ergebnissen erlangte repräsentative Anzahl von Sparkereignissen pro Messung von CaMKII $\delta$ c-KO-Kardiomyozyten unter Ang II-Inkubation dar. Die farbigen Balken stellen jeweils einen Intensitätsindikator dar.



**Abbildung 3-10b.** Der Vergleich zwischen der Sparkfrequenz der Kardiomyozyten der CaMKIIδc-KO-Mäuse mit und ohne Ang II- Inkubation zeigt, dass kein bedeutender Unterschied in der Frequenz der Sparkereignisse vorliegt. Somit ist der in den WT-Kardiomyozyten vorliegende Effekt einer durch Ang II-Inkubation ausgelösten Steigerung der Sparkfrequenz aufgehoben. Die gemessene erhöhte Frequenz unter Ang II- Gabe in WT-Kardiomyozyten ist sogar signifikant ( $p<0,05$ ) höher als die Sparkfrequenz in den Kardiomyozyten der CaMKIIδc-KO-Mäuse bei sich gleichenden Bedingungen unter Angiotensin II Inkubation.

Mit dem Einsatz des CaMKII-Inhibitors AIP konnte untersucht werden inwiefern eine Veränderung des durch Ang II ausgelösten Effektes der Erhöhung des Kalziumlecks (siehe 3.2.) durch diese CaMKII-Inhibition bewirkt wird. Das heißt, es konnte der Frage nach der Bedeutung der CaMKII für das durch Sparks induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck nachgegangen werden.

Mit einem Mittelwert von  $2,687 \pm 0,5347$  (11 Kardiomyozyten aus 10 Mäuseherzen) bei Messungen der gp WT-Kardiomyozyten unter Inkubation mit Ang II und AIP zeigte sich eine eindeutige Hemmung dieser Steigerung. Das heißt, durch die Inhibition der CaMKII durch AIP wurde der durch Ang II induzierte Effekt einer deutlichen Anhebung des Mittelwertes der Kalziumfreisetzung gehemmt. Diese Hemmung des Ang II induzierten Effektes durch AIP in den gp WT Kardiomyozyten ist auch bei der Auswertung der Sparkfrequenzen zu finden.



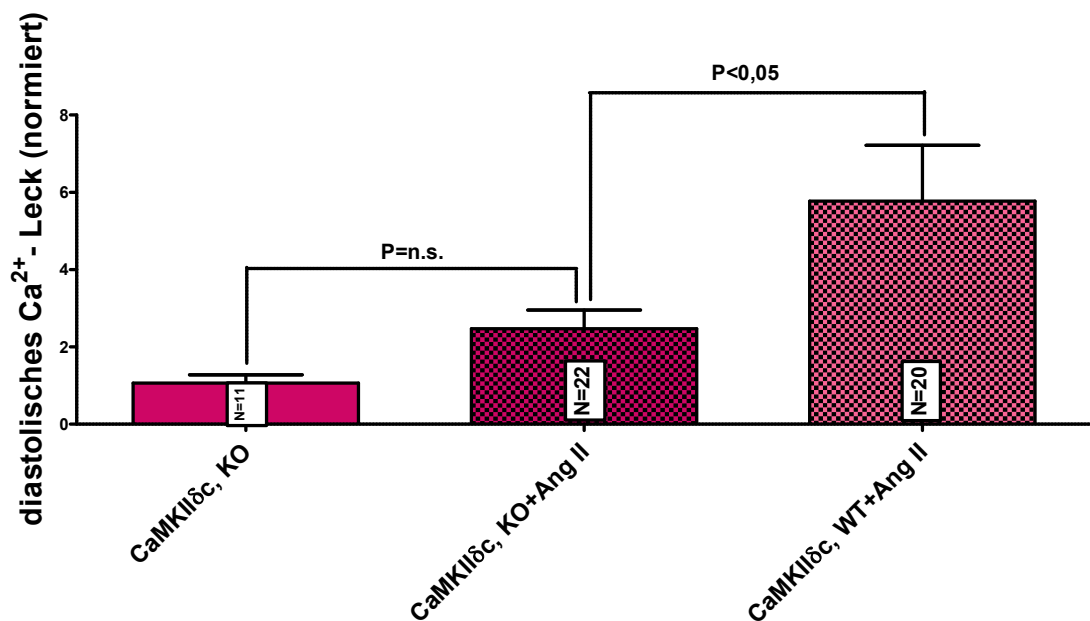
**Abbildung 3-11.** Der Vergleich dieser drei Säulen in dieser Abbildung zeigt eindeutig die Hemmung der durch Ang II induzierten Wirkung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecksteigerung durch den CaMKII-Hemmstoff AIP.

Dabei ist diese Inhibition in solch einem Ausmaße, dass der gemessene Mittelwert bei Inkubation mit Ang II und AIP dem Mittelwert der Messungen bei ausschließlicher Verwendung von Normaltyrode gleicht.

In den CaMKII-KO-Mäusen ergibt sich für das gemessene mittlere Kalziumleck bei regulärer Behandlung mit Normaltyrode ein Wert von  $1,062 \pm 0,2127$  (11 Kardiomyozyten aus 8 Mäuseherzen).

Bei einer zusätzlichen Inkubation mit Ang II zeigte sich der folgende Wert  $2,468 \pm 0,4867$  (22 Kardiomyozyten aus 7 Mäuseherzen).

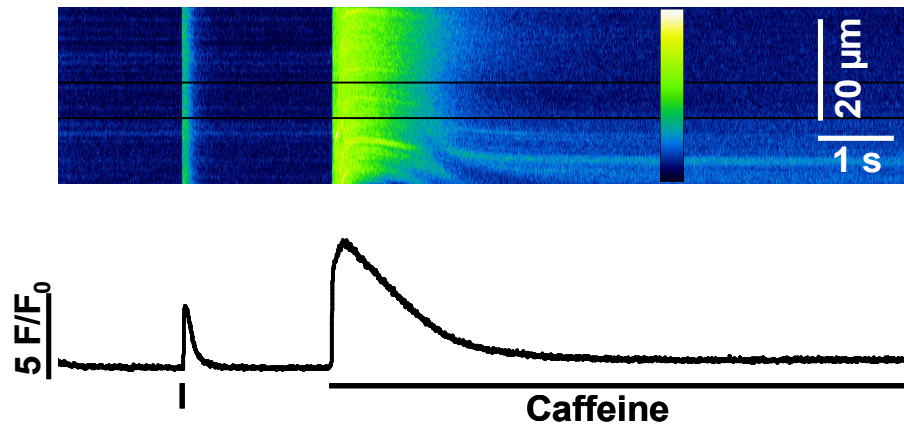
Somit zeigen beide Messungen ein nur geringes Kalziumleck, unabhängig davon ob eine Inkubation mit Ang II stattgefunden hat oder nicht. Demnach scheint eine funktionierende CaMKII für das unter Ang II gesteigerte Kalziumleck entscheidend zu sein.



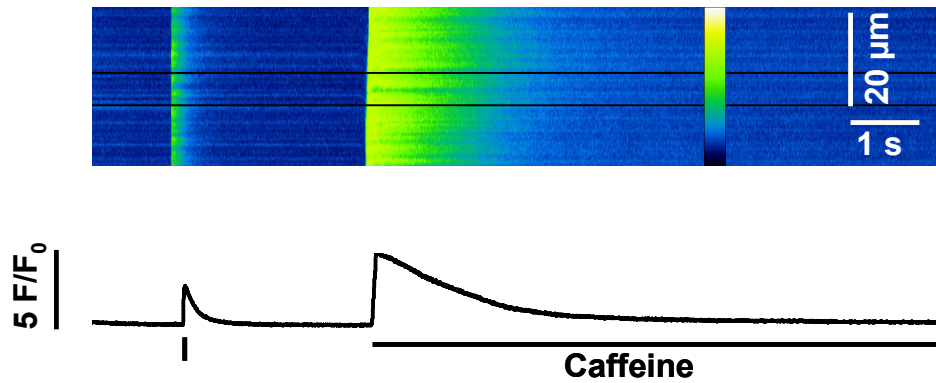
**Abbildung 3-12.** Beide Säulen zeigen im Vergleich zu den Messungen der CaMKII WT-Mäusen unter Ang II Superfusion ein geringes Kalziumleck, so dass von einer Hemmung der durch Ang II induzierten Wirkung einer Kalziumlecksteigerung durch den KO der CaMKII ausgegangen werden kann.

Um zu untersuchen, ob die CaMKII für die Reduktion des SR-Kalziumgehaltes eine notwendige Kinase darstellt, wurden auch Untersuchungen bei Zugabe von Ang II und zusätzlicher Gabe von AIP und damit der Hemmung der CaMKII, als auch bei der Verwendung von transgenen CaMKII-KO-Mäusen durchgeführt. Der in den vorangegangenen Untersuchungen gefundene Effekt einer signifikanten Reduktion des Kalziumlecks durch Ang II wurde, unabhängig von der Art der Hemmung (genetischer KO oder Inhibition mittels AIP) aufgehoben. Dies passt zu den Daten bezüglich einer signifikanten CaMKII-vermittelten Steigerung des Kalziumlecks und der signifikanten Steigerung der Ca<sup>2+</sup>-Sparkfrequenz. Das heißt, dass die Ang II vermittelte Verminderung des SR-Kalziumgehaltes über eine CaMKII-induzierte Steigerung des SR-Kalziumlecks passiert. Da diese Steigerung des SR-Kalziumlecks bei einer Inhibition der CaMKII fehlt, ist der SR-Kalziumgehalt in den vorliegenden Untersuchungen durch Ang II nicht mehr signifikant reduziert.

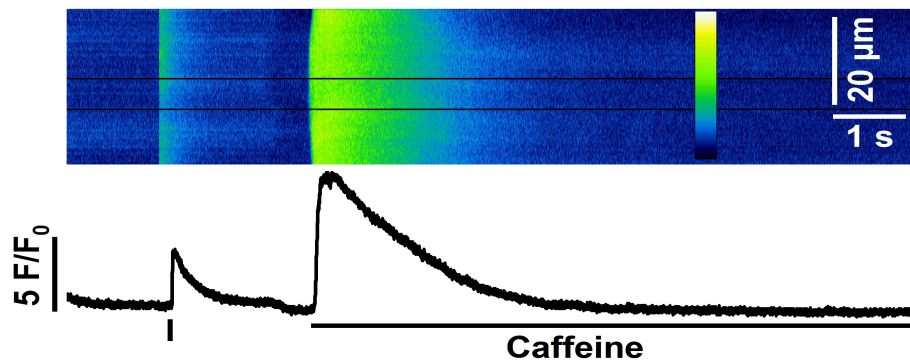
### gp91phox + Ang II + AIP



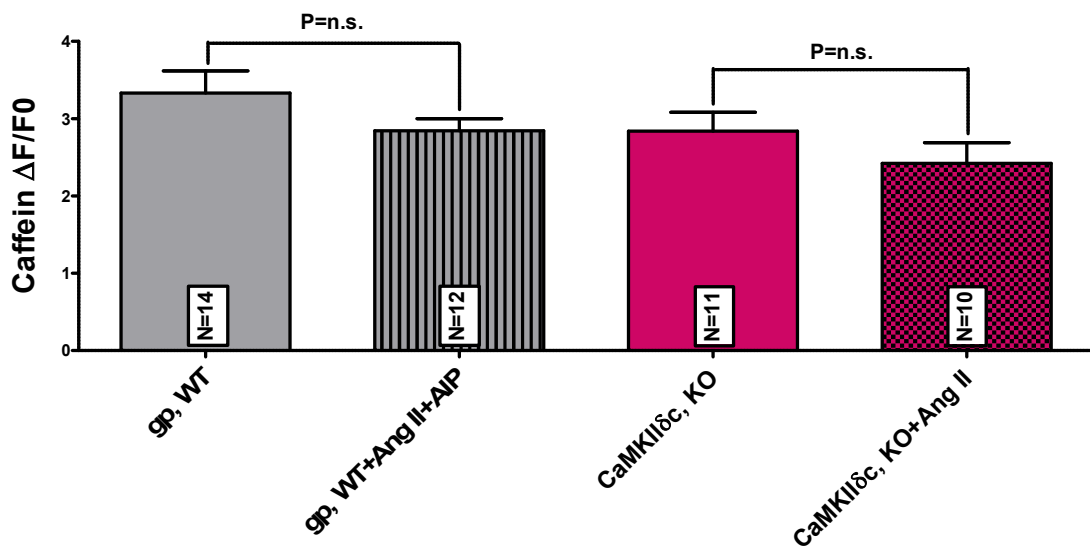
### CaMKII $\delta^{-/-}$



### CaMKII $\delta^{-/-}$ + Ang II



**Abbildung 3-13a.** Diese Originalregistrierungen veranschaulichen, dass bei einer Hemmung der CaMKII keine signifikante Reduktion des SR-Kalziumgehaltes mehr vorliegt. Demnach scheint der unter reiner Superfusion mit Ang II zu beobachtende Effekt einer signifikanten Reduktion des SR-Kalziumgehaltes durch eine Inhibition der CamKII aufgehoben zu sein. Die farbigen Balken stellen jeweils einen Intensitätsindikator dar.



**Abbildung 3-13b.** Diese Abbildung verdeutlicht, dass durch die Inhibition der CaMKII, unabhängig von dem Inhibitionsmechanismus, die vormals signifikante Reduktion des SR-Kalziumgehaltes aufgelöst wird. Der SR-Kalziumgehalt in den gp WT-Kardiomyozyten reduzierte sich von  $3,33 \pm 0,288$  bei ausschließlicher Verwendung von Normaltyrode auf  $2,84 \pm 0,131$  bei gleichzeitiger Superfusion mit Ang II und AIP (12 Kardiomyozyten aus 6 Mäuseherzen). Die Reduktion des SR-Kalziumgehaltes in den CaMKII-KO-Mäusen zeigte sich wie folgt: Von  $2,84 \pm 0,243$  (11 Kardiomyozyten aus 8 Mäuseherzen) bei Messung unter Gabe von Normaltyrode verminderte sich der SR-Kalziumgehalt auf  $2,42 \pm 0,266$  (10 Kardiomyozyten aus 4 Mäuseherzen) bei Superfusion mit Ang II.

### ***3.5 Die Proteinkinase A hat keinen Einfluss auf die Angiotensin II-abhängige Steigerung der Kalziumsparks***

Die Proteinkinase A hat für die Regulation des Kalziumstoffwechsels der Kardiomyozyten eine hohe Bedeutung. Um die genaue Auswirkung einer PKA-Aktivierung weiter zu verstehen, wurde die Kinase auch im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Dabei standen die Untersuchung der Sparks und ihrer Parameter im Vordergrund.

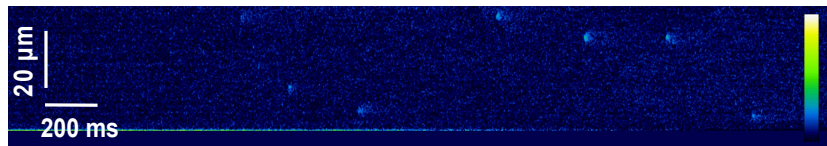
Zur weiteren Analyse der Bedeutung der PKA für die Entstehung von Sparks wurden Experimente mit zusätzlicher Verwendung des PKA-Inhibitors H89 durchgeführt. Die Hemmung der PKA mittels H89 beruht dabei auf einem kompetitiven Vorgang um ATP.

Auf diese Weise wurden folgende Ergebnisse generiert: Die durchschnittliche Sparkfrequenz der Kardiomyozyten von PKA WT- Mäusen bei gleichzeitiger Inkubation mit Ang II und dem Inhibitor H89 beträgt  $2,372 \pm 0,5225$  ( $100 \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (9 Kardiomyozyten aus 3 Mäuseherzen). Diese Frequenz ist gegenüber der Häufigkeit

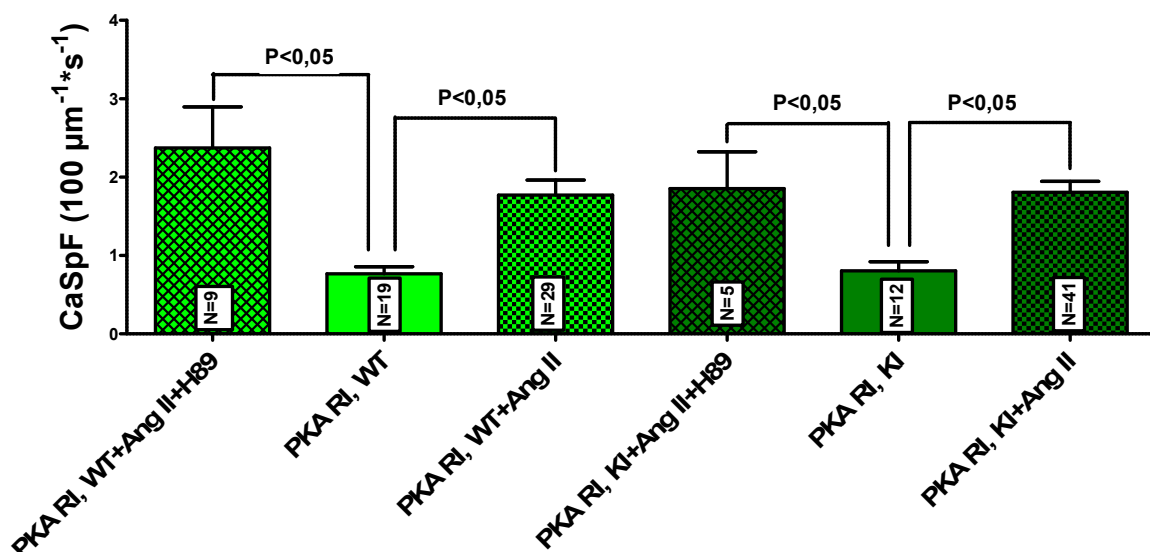


von Sparkereignissen in PKA WT-Kardiomyozyten ohne zusätzliche Inkubation signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht. Dagegen ist der Unterschied zwischen den Messergebnissen bei Inkubation mit Ang II und den Messergebnissen bei gleichzeitiger Inkubation mit Ang II und H89 nicht signifikant. Beide Mittelwerte der Messreihen zeigen aber eine signifikante Steigerung der Sparkfrequenz gegenüber der Sparkfrequenz bei ausschließlicher Verwendung von Normaltyrode. Die Hemmung der PKA durch den Inhibitor H89 führte somit in den vorliegenden Ergebnissen nicht zu einer Hemmung der durch Ang II induzierten Sparkfrequenzsteigerung.

### PKA R1 WT+Ang II+H-89



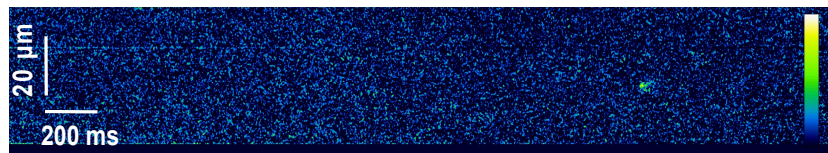
**Abbildung 3-14a.** Auch diese repräsentative Originalregistrierung zeigt, dass der Einsatz von H89 in Bezug auf die durch Ang II erhöhte Sparkfrequenz keinen hemmenden Einfluss hat. Somit weist diese Abbildung eine im Vergleich mit den Messergebnissen unter Normaltyrode eine erhöhte Sparkfrequenz auf. Der farbige Balken stellt einen Intensitätsindikator dar.



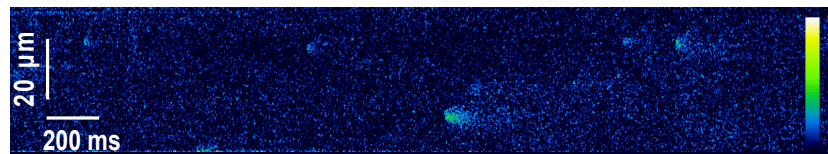
**Abbildung 3-14 b.** Im Vergleich dieser Messgruppen wird deutlich, dass die durch Ang II induzierte signifikante Steigerung der Sparkfrequenz durch die zusätzliche Gabe des Inhibitors H89 nicht verhindert wird. Die Sparkfrequenz von Herzmuskelzellen der PKA-WTMäuse bei paralleler Inkubation mit Ang II und H89 ist im Vergleich zur mittleren Sparkfrequenz bei Verwendung von Normaltyrode signifikant ( $p < 0,05$ ) gesteigert. Auch in den Kardiomyozyten von PKA-KI-Mäusen führt eine Zugabe von Ang II zu einer signifikant erhöhten Sparkfrequenz. Bei den Messungen mit dem PKA-Hemmstoff H89 ist ebenfalls keine Hemmung des Ang II induzierten Effektes zu messen. Auch im Vergleich der mittleren Sparkfrequenz zwischen den PKA-KI-Mäusen und den PKA-WT-Mäusen (19 Kardiomyozyten aus 10 Mäuseherzen) ist kaum ein Unterschied messbar.

Neben dem cAMP-abhängigen Aktivierungsweg der PKA-R1 gibt es auch eine Regulation durch ROS. Bei der Redoxaktivierung kommt es zu der Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den zwei regulativen Untereinheiten. Dies führt zu der Aktivierung der PKA. Um der Fragestellung der Bedeutung der PKA für das durch Ang II induzierte SR-Kalziumleck nachzugehen wurden sowohl Messungen mit dem PKA-Hemmstoff H89 als auch Messungen mit einem transgenen Mausmodell durchgeführt. Die hier verwendete transgene Mauslinie zeichnet sich durch eine Modifikation der PKA aus, welche im Folgenden eine redoxabhängige Aktivierung derselbigen verhindert. Die durchschnittliche Anzahl von Sparkereignissen bei ausschließlicher Behandlung mit Normaltyrode betrug in den vorliegenden Experimenten  $0,8052 \pm 0,1137$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Dieser Mittelwert der Sparkfrequenz wurde durch die Zugabe von Angiotensin II auf  $1,8052 \pm 0,1399$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) signifikant ( $p<0,05$ ) gesteigert.

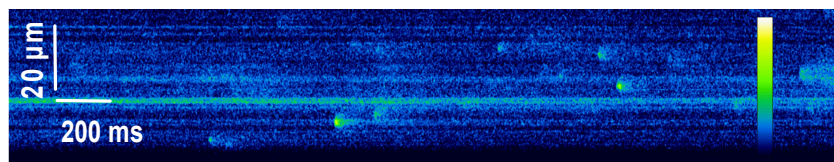
#### PKA R1 <sup>+/+</sup>



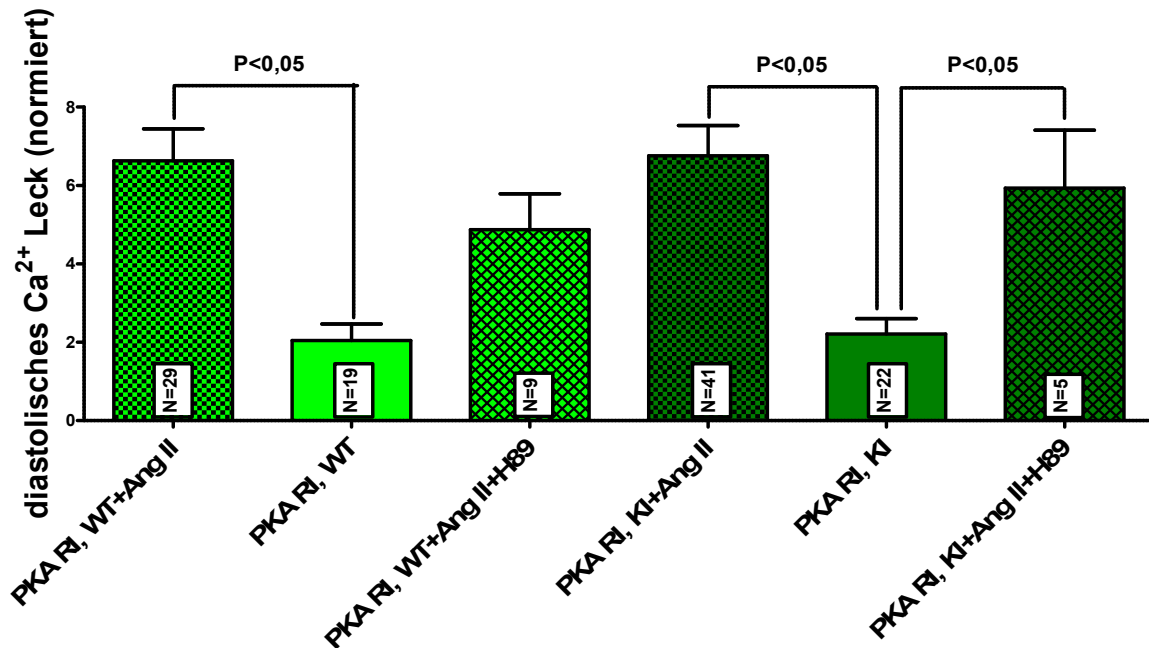
#### PKA R1 <sup>+/+</sup> +Ang II



#### PKA R1 <sup>+/+</sup> +Ang II+H-89



**Abbildung 3-15a.** Diese Abbildung präsentiert drei Originalregistrierungen, welche die Ergebnisse der vorliegenden Experimente veranschaulichen. Die Messung des Kardiomyozyten der PKA-KI-Gruppe mit Inkubation von Normaltyrode zeigt somit lediglich einen Spark. Die dargestellte Messung der PKA-KI-Gruppe mit Ang II Superfusion hingegen weist mehrere Sparkereignisse auf. Bei der Messung der PKA-KI-Maus mit Superfusion mit Ang II und H89 ist eine hohe Sparkanzahl erkennbar, welche sich als signifikant ( $p<0,05$ ) erhöht gegenüber der Frequenz unter regulären Bedingungen darstellt. Alle Messungen wurden in der Diastole nach einer Stimulationspause von 30 sec durchgeführt. Die farbigen Balken stellen jeweils einen Intensitätsindikator dar.



**Abbildung 3-15b.** Die in dieser Abbildung leicht zu erkennende deutliche Steigerung des Kalziumlecks durch Ang II, trotz Inhibition der PKA durch H89 stellt sich hier als klarer Trend dar. Auch in den PKA-KI-Mäusen bleibt die durch Ang II induzierte Erhöhung des Kalziumlecks durch den PKA-Hemmstoff H89 weitgehend unbeeinflusst.

Die durchschnittliche Sparkfrequenz bei gleichzeitigem Einsatz von Ang II und H89 beträgt in den vorliegenden Experimenten  $1,852 \pm 0,4694$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (5 Kardiomyozyten aus 3 Mäuseherzen). Somit ist diese mittlere Anzahl der Sparkereignisse signifikant ( $p<0,05$ ) erhöht gegenüber der Sparkrate in PKA-KI-Kardiomyozyten ohne zusätzliche Inkubation. Das heißt, trotz zweifacher und auf verschiedenen Mechanismen beruhender Hemmung der PKA erfolgte keine Aufhebung der durch Ang II induzierten Sparkfrequenzsteigerung.

Diese im Bezug auf das Kalziumleck wirkungslose Inhibition der PKA lässt sich in ihrer Wirkungslosigkeit in Bezug auf die Sparkfrequenz wiederfinden.

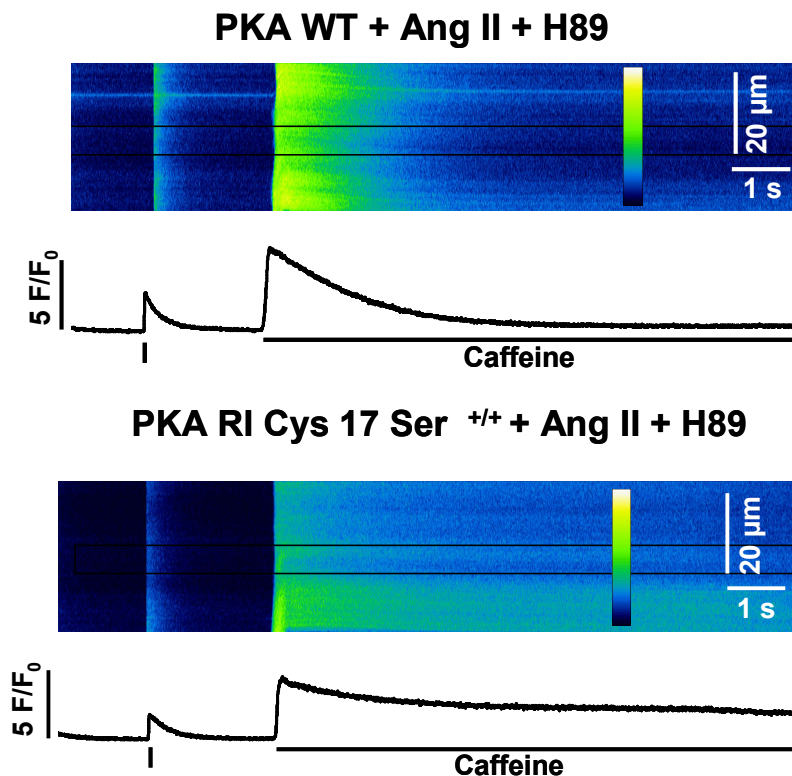
Vereinbar mit einer fehlenden Beeinflussung der Kalziumsparkfrequenz führt eine Hemmung der PKA bzw. einer möglichen Redoxreaktion auch nicht zu einer Hemmung der durch Ang II induzierten Steigerung des Kalziumlecks. Demnach ist der Mittelwert des Kalziumlecks der Kardiomyozyten des PKA WT-Mäusestamms bei Inkubation mit Ang II und H89 im Vergleich zu einer ausschließlichen Inkubation mit Normaltyrode ähnlich stark erhöht wie bei alleiniger Inkubation mit Ang II.

Der Mittelwert dieser Experimente mit gleichzeitiger Inkubation mit Ang II und H89 in PKA-WT-Kardiomyozyten ergab  $4,871 \pm 0,9163$  (9 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen).

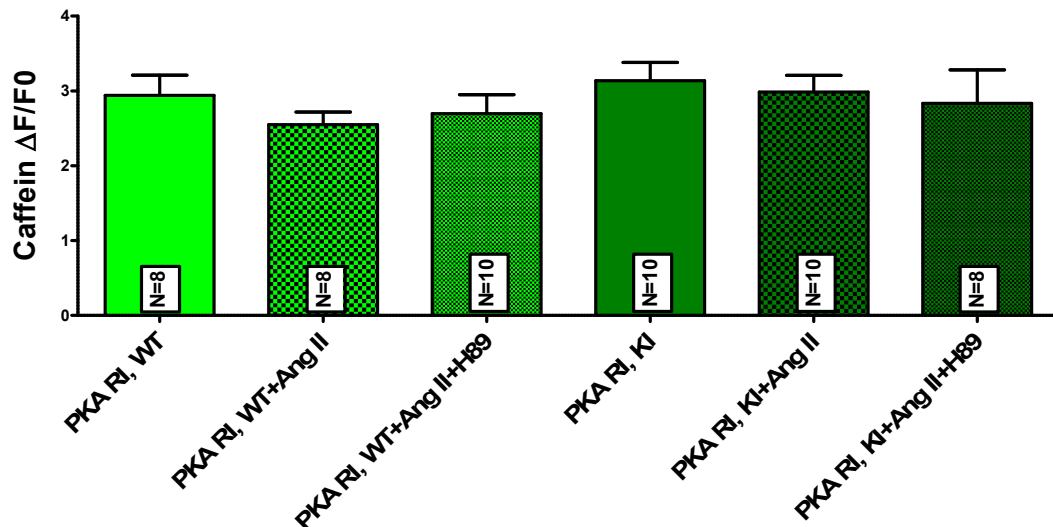
Der durchschnittliche Wert des Kalziumlecks der Kardiomyozyten der PKA-KI-Mäuse bei Inkubation mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Normaltyrode belief sich in den vorliegenden Messungen auf  $2,205 \pm 0,3932$  (22 Kardiomyozyten aus 15 Mäuseherzen). Damit gleicht der basale Wert des Kalziumlecks dem basalen Wert der Messungen der PKA-WT-Kardiomyozyten unter gleichen Bedingungen.

Eine zusätzliche Inkubation dieser PKA-KI-Kardiomyozyten mit Ang II führte zu einem starken Anstieg des Mittelwertes des Kalziumlecks auf  $6,756 \pm 0,7713$  (42 Kardiomyozyten aus 17 Mäuseherzen). Auch die Resultate einer Inhibition der PKA durch den PKA-Hemmstoff H89 zeigte wenig Auswirkung auf die durch Ang II gesteigerte Kalziumfreisetzung während der Sparkereignisse. Der Mittelwert des Kalziumlecks in den Herzmuskelzellen der PKA-KI-Mäuse bei Inkubation mit Ang II und H89 betrug  $5,932 \pm 1,478$  (5 Kardiomyozyten aus 3 Mäuseherzen). Dies stellt zum mittleren Wert des Kalziumlecks ohne zusätzliche Ang II oder H89-Inkubation eine deutliche Steigerung dar.

Vereinbar mit einer fehlenden Beeinflussung des Kalziumlecks, verhindert eine Hemmung der PKA bzw. die Inhibition einer möglichen Redoxreaktion auch nicht die Ang II-abhängige signifikante Reduktion des SR-Kalziumgehalts. Dies gilt sowohl für die Messungen in der PKA-WT-Mäusen als auch bei zweifacher Inhibition in den PKA-KI-Mäusen bei Gabe von Ang II.



**Abbildung 3-16a.** Auch die Graphen der Caffeintransienten dieser Originalregistrierungen zeigen, dass der Einsatz des PKA-Hemmstoffes H89 nicht den durch Ang II induzierten Effekt einer Reduktion des SR-Kalziumgehalts aufhebt. Die farbigen Balken stellen jeweils einen Intensitätsindikator dar.



**Abbildung 3-16b.** Dieses höhenproportionale Säulendiagramm zeigt mit einer Reduktion von  $2,94 \pm 0,269$  (8 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen) unter Normaltyrode auf  $2,7 \pm 0,252$  (10 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen) bei gleichzeitiger Superfusion von Ang II und H89 in den PKA-WT-Mäusen sowie einer Reduktion von  $3,14 \pm 0,244$  (10 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen) unter Normaltyrode auf  $2,83 \pm 0,046$  (8 Kardiomyozyten aus 6 Mäuseherzen) bei zusätzlicher Gabe des PKA-Inhibitors H89 in den PKA-KI-Mäusen, dass eine Hemmung der PKA R1 keine Inhibition des unter Superfusion mit Ang II auftretenden Effektes einer SR-Kalziumgehaltreduktion führt.

### ***3.6 Auch die Proteinkinase C hat keinen Einfluss auf die durch Angiotensin II induzierte Steigerung der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz***

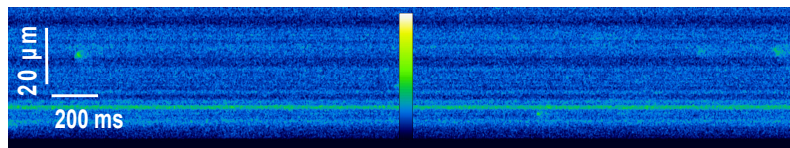
Auch die PKC und der mit ihr interagierende  $\text{IP}_3$ -Rezeptor haben eine wichtige Rolle in der Kalziumregulation der Kardiomyozyten. Die Aktivierung der PKC kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen fungiert DAG als Kofaktor für die PKC.  $\text{IP}_3$  hingegen führt durch eine Interaktion mit den  $\text{IP}_3$ - Rezeptoren zu einer zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg bewirkt dann zusammen mit DAG die Aktivierung der PKC. Zudem konnte eine ROS-abhängige Modulation der PKC-Aktivität gezeigt werden. Ob die durch die PKC-Aktivierung vollzogene Beeinflussung des Kalziumstoffwechsels auch über eine direkte oder indirekte Beeinflussung der Ryanodin-Rezeptoren passiert, soll hier anhand weiterer Sparkmessungen untersucht werden. Es stellt sich also die Frage nach der Bedeutung der PKC für die durch Ang II induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks.

Es erfolgten Untersuchungen bei Verwendung des PKC-Hemmstoffes BIS um zu beobachten inwieweit eine Inhibition der PKC eine durch Ang II veränderte Sparkfrequenz beeinflusst. Dabei zeigt Bisindolylmaleimide I bezüglich der verschiedenen Subtypen der PKC ( $\alpha, \beta_1, \beta_2, \gamma$ ) keine Spezifität.

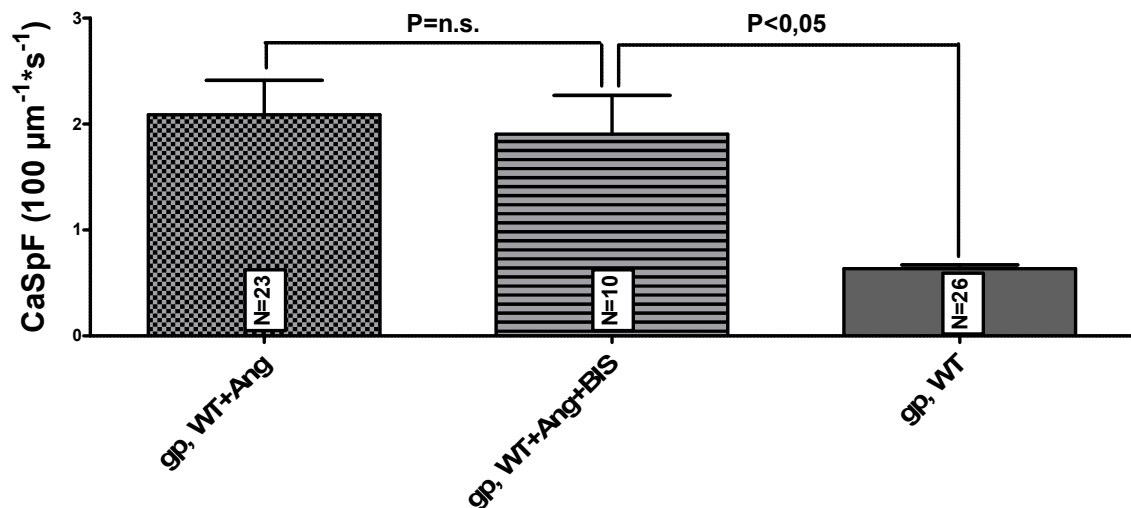


Die Messungen der Sparkfrequenz der Kardiomyozyten von gp91phox-WT-Mäusen zeigten bei gleichzeitiger Inkubation mit Ang II und dem Inhibitor BIS eine signifikante Frequenzsteigerung der Sparkereignisse im Vergleich zum Basalwert der Sparkfrequenz. Demnach zeigte sich in den Messungen trotz einer Inhibition der PKC eine durch Ang II verursachte signifikante Steigerung der Sparkfrequenz. Die gemessene Sparkfrequenz in den gp91phox-Kardiomyozyten unter Ang II- und BIS-Gabe beträgt  $1,905 \pm 0,3656$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (10 Kardiomyozyten aus 4 Mäuseherzen). Dies ist vergleichbar mit der Steigerung unter alleiniger Superfusion mit Ang II ohne BIS.

#### gp91phox WT+Ang II+BIS



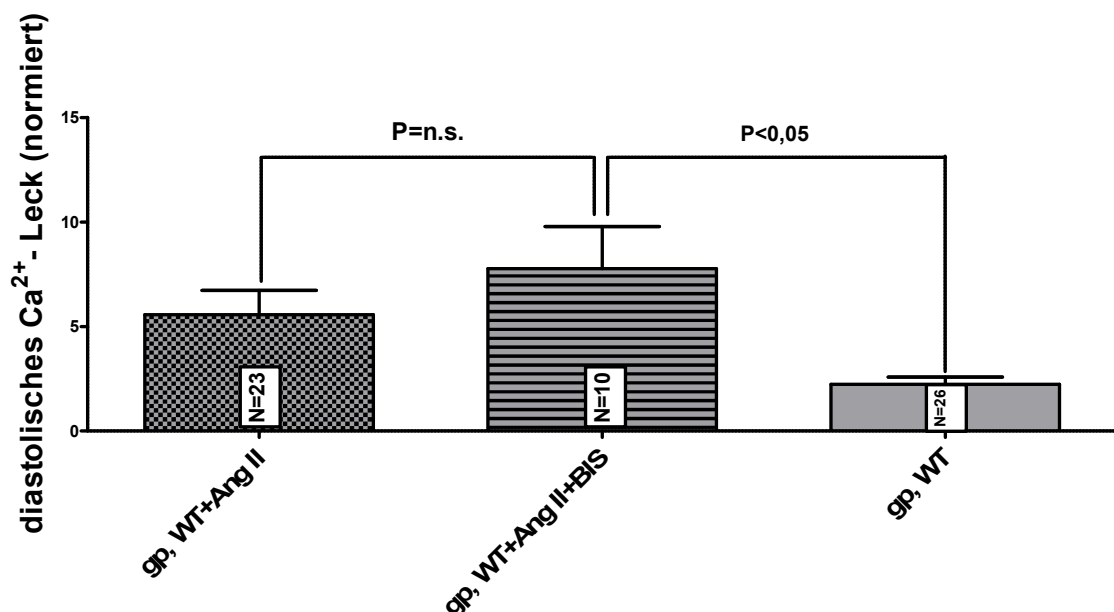
**Abbildung 3-17a.** Diese dargestellte Originalregistrierung zeigt die Messung einer gp91phox-WT-Herzmuskelzelle bei Inkubation mit Ang II und BIS. Diese Abbildung ist repräsentativ für die Messungen mit Ang II und BIS, da trotz PKC-Inhibition eine hohe Sparkfrequenz vorliegt. Auch bei dieser Messung wurden Standardbedingungen eingehalten, so dass die diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks nach einer Stimulationspause von 30 sec gemessen wurden. Der farbige Balken stellt einen Intensitätsindikator dar.



**Abbildung 3-17b.** Diese Abbildung zeigt, dass eine Inhibition der PKC nicht zu einer Inhibition des durch Ang II induzierten Effektes einer Erhöhung der Sparkfrequenz führt. Die in der linken Säule dargestellte Sparkfrequenz von  $2,088 \pm 0,3245$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) unter Ang II-Inkubation ist nur unwesentlich verschieden von der in der mittleren Säule dargestellten Frequenz der Sparkereignisse unter Ang II- und BIS-Gabe von  $1,905 \pm 0,3656$  ( $100\mu\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Hiermit wird erkennbar, dass durch BIS keine Hemmung der durch AngII induzierten Frequenzsteigerung bewirkt wird.

Dabei ist die unter Einsatz von Ang II und BIS gemessene Sparkfrequenz signifikant ( $p<0,05$ ) erhöht im Vergleich zu der gemessenen Sparkfrequenz bei Verwendung von Normaltyrode. Dies wird bei Betrachtung der zusätzlichen Säule, welche die Sparkfrequenz ohne pharmakologische Intervention darstellt, auch bildlich nachvollziehbar.

Der Einsatz von BIS zeigte bezüglich der durch Ang II bewirkten Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks keine Auswirkungen. Demnach ist die durch Ang II induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck-Steigerung durch BIS nicht gehemmt. Zu erkennen ist dies an dem im Vergleich zu dem Mittelwert der Kardiomyozyten bei Inkubation mit Normaltyrode signifikant erhöhtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bei Gabe von Ang II und BIS. In Werten zeigt sich eine Steigerung von  $2,237 \pm 0,3422$  (26 Kardiomyozyten aus 17 Mäuseherzen) bei ausschließlicher Gabe von Normaltyrode auf einen Mittelwert von  $7,767 \pm 2,012$  (10 Kardiomyozyten aus 4 Mäuseherzen) bei Inkubation mit Ang II und BIS. Die unter Ang II beobachtete Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks bleibt demnach also trotz Gabe des PKC Inhibitors BIS bestehen.



**Abbildung 3-18.** Im Vergleich mit der Säule, welche das  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck der gp91phox-WT-Kardiomyozyten repräsentiert, lassen die beiden anderen Säulen (gpWT+Ang und gpWT+Ang+BIS) einen deutlichen Anstieg der freigesetzten Kalziummenge erkennen. Dabei wird hier verbildlicht, dass die Verwendung von BIS zu keiner Inhibition des durch Ang II-induzierten Effektes führt. Die Ergebnisse der Messungen bei der gleichzeitigen Gabe von Ang II und BIS sind im Vergleich zu den Resultaten bei ausschließlicher Behandlung mit Normaltyrode als signifikant einzustufen ( $p < 0,05$ ).

Diese fehlende Inhibition der durch Ang II induzierten Veränderung durch BIS ist mit den Ergebnissen bezüglich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz komparabel.

### ***3.7 Neben dem Ryanodin-Rezeptor scheint auch eine Kalziumfreisetzung via $\text{IP}_3$ -Rezeptor an den durch Ang II induzierten Kalziumsparks beteiligt zu sein***

Wie in der Einleitung bereits dargestellt ist der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal des sarkoplasmatischen Retikulums, welcher zur Freisetzung des  $\text{Ca}^{2+}$  aus diesem beiträgt. Die Bedeutung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors für die kardiale Kalziumregulation wird als

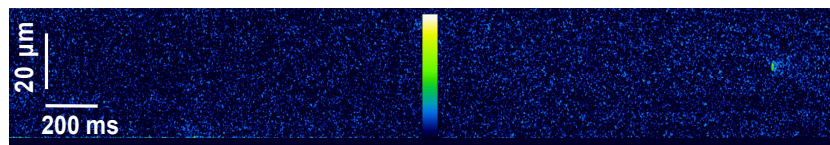
zunehmend als wichtig eingeschätzt. Um der Frage nach dem Einfluss des IP<sub>3</sub>-Rezeptors weiter nachzugehen, wurden auch Versuche unter Einsatz des IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonists 2-aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) durchgeführt.

Um den Einfluss des IP<sub>3</sub>-Rezeptors näher zu untersuchen, stellt sich als Arbeitshypothese die Frage, ob die IP<sub>3</sub>-Rezeptoren vielleicht unabhängig von der durch Ang II induzierten Aktivierung der NADPH-Oxidase II für die Steigerung der Ca<sup>2+</sup>-Sparkfrequenz verantwortlich sind.

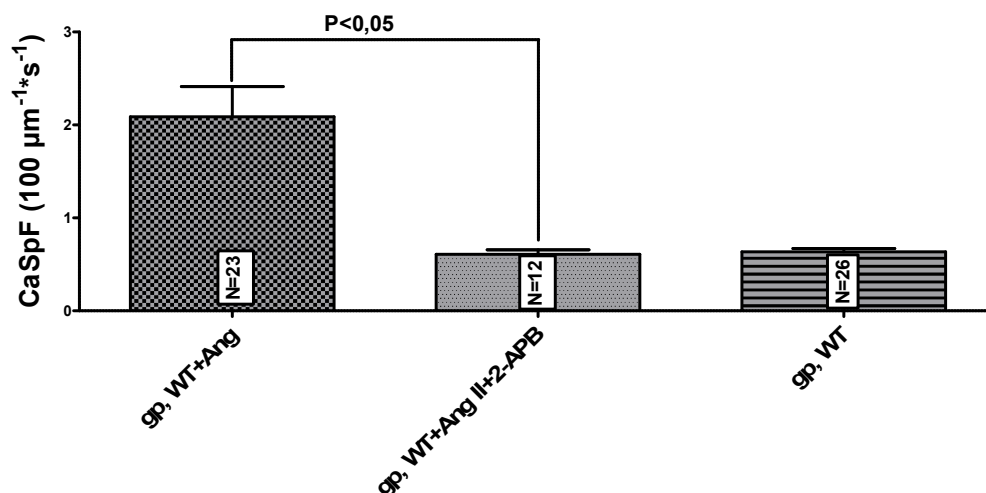
Die Zugabe von 2-APB konnte in den Experimenten eine durch Ang II induzierten Sparkfrequenzsteigerung in gp91phox-WT-Kardiomyozyten vollständig verhindern.

Der Mittelwert der Experimente mit Ang II und 2-APB bezüglich der Sparkfrequenz beträgt  $0,6082 \pm 0,04778$  ( $100 \mu\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (12 Kardiomyozyten aus 4 Mäuseherzen).

#### gp91phox WT+Ang II+2-APB



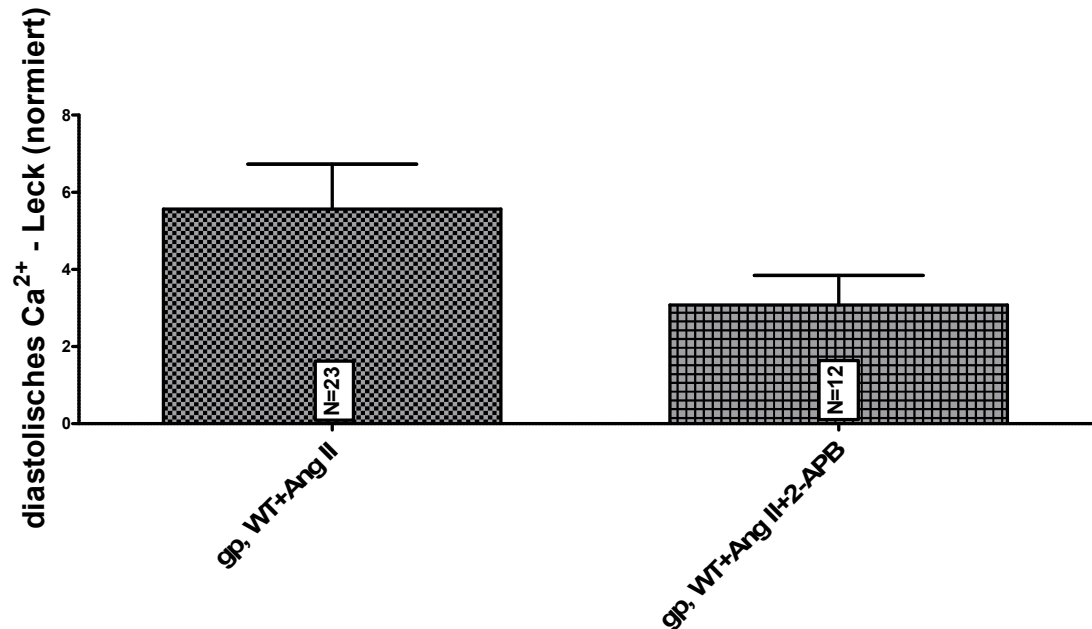
**Abbildung 3-19a.** Diese Originalregistrierung stellt mit der geringen Sparkanzahl ein repräsentatives Abbild einer Messung eines Kardiomyozyten von einer gp91phox-WT-Maus unter Inkubation mit Ang II und 2-APB dar. Auch diese Messung erfolgte unter Standardbedingungen. Demnach entstand diese Aufnahme nach einer 15 Minuten dauernden Superfusion mit Ang II und 2-APB und einem vor der Messung während der Stimulationspause von 30 sec. Der farbige Balken stellt einen Intensitätsindikator dar.



**Abbildung 3-19b.** Die mittlere Säule und die damit verbundene Darstellung der Sparkfrequenz der Kardiomyozyten unter Inkubation mit Ang II und 2-APB zeigt eine geringe Höhe, welche sich dem Basalwert der Sparkfrequenz bei ausschließlicher Superfusion mit Normaltyrode annähert. Im Vergleich zu der, mit der linken Säule dargestellten, signifikant erhöhten Frequenz der Sparks in den gp91phox-WT-Kardiomyozyten unter Ang II-Gabe, ist feststellbar, dass eine Inhibition der Steigerung der Sparkfrequenz unter Ang II durch 2-APB stattgefunden hat. Diese Inhibition scheint von solch einem Ausmaße zu sein, dass der Unterschied zwischen der bei Ang II-Inkubation gemessenen Sparkfrequenz und der Frequenz bei zusätzlicher Inkubation mit 2-APB signifikant ist ( $p<0,05$ ).



Analog zur Kalziumsparkfrequenz zeigt die Verwendung des Inhibitors 2-APB additional zu Ang II in den durchgeführten Experimenten eine deutliche Hemmung des durch Ang II induzierten Effektes der Erhöhung des Kalziumlecks. Der ermittelte Durchschnittswert des Kalziumlecks beträgt  $3,078 \pm 0,7672$  (12 Kardiomyozyten aus 5 Mäuseherzen).



**Abbildung 3-20.** Diese höhenproportionale Darstellung der beiden Gruppen zeigt, dass der Einsatz von 2-APB zu einer Hemmung des durch Ang II ausgelösten Anstiegs des Kalziumlecks führt.

Mausart:	Anzahl der Messungen:	Mittelwert FDHM:	Mittelwert FWHM:	Mittelwert Amplitude:
gp91,WT	29	30,39	2,538	1,876
gp91,WT+Ang	83	26,89	2,363	1,503
gp91,WT+Ang+AIP	13	27,77	2,600	2,163
gp91,WT+Ang+BIS	35	31,30	2,474	1,802
gp91,WT+Ang+APB	13	36,63	2,731	1,924
gp91,KO	16	27,18	2,656	1,232
gp91,KO+Ang	10	29,57	2,190	1,346
PKA,WT	25	31,33	2,184	1,521
PKA,WT+Ang	90	34,81	2,459	1,685
PKA,WT+Ang+H89	37	28,00	2,089	1,264
PKA,KI	31	30,07	2,155	1,504
PKA,KI+Ang	130	33,17	2,373	1,772
PKA,KI+Ang+H89	16	32,52	2,425	1,561
CaMKII,WT	9	30,93	2,233	1,613
CaMKII,WT+Ang	57	31,16	2,414	1,564
CaMKII,KO	12	24,96	2,092	1,295
CaMKII,KO+Ang	24	32,60	2,483	1,917

**Tabelle 3-1.** Die übrigen Kalziumsparkcharakteristika sind hier zusammengefasst.

<b>Mausart:</b>	<b>Anzahl Sparkmessungen:</b>	<b>Mittelwert Sparkfrequenz:</b>	<b>Mittelwert Kalziumleck:</b>	<b>Anzahl der Koffeinmessungen:</b>	<b>Mittelwert Koffeindelta:</b>
gp, WT	26	0,6345	2,285	14	3,330
gp, WT+Ang II	23	2,088	5,565	13	2,930
gp, WT+Ang II+AIP	11	0,6814	2,687	12	2,843
gp, WT+Ang II+BIS	10	1,905	7,510	12	1,828
gp, WT+Ang II+2-APB	12	0,6082	3,078	9	2,988
gp, KO	9	1,016	2,199	12	2,767
gp, KO+Ang II	8	0,7935	2,113	12	3,284
PKA RI, WT	19	0,7663	2,043	8	2,940
PKA RI, WT+Ang II	29	1,769	6,627	8	2,548
PKA RI, WT+Ang II+H89	9	2,372	4,871	10	2,697
PKA RI, KI	22	0,8052	2,209	10	3,136
PKA RI, KI+Ang II	41	1,805	6,756	10	2,986
PKA RI, KI+Ang II+H89	5	1,852	5,932	8	2,834
CaMKII $\delta$ c, WT	8	0,6360	1,729	8	3,036
CaMKII $\delta$ c, WT+Ang II	20	1,634	5,771	11	2,583
CaMKII $\delta$ c, KO	11	0,6253	1,062	11	2,839
CaMKII $\delta$ c, KO+Ang II	22	0,6119	2,468	10	2,422

**Tabelle 3-2.** Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich der Sparkmessungen.

## ***4. Diskussion***

Eine erhöhte Ang II- Ausschüttung, wie sie kompensatorisch bei Herzinsuffizienz auftritt (PIANO et al. 1998), führt zu Arrhythmien (GARG et al. 2006; FISCHER R et al. 2007; VON LEWINSKI et al. 2008; ZHAO et al. 2011). Dem liegt zugrunde, dass Ang II eine Veränderung des Kalziumstoffwechsels induziert, so dass eine Veränderung der Kalziumhomöostase resultiert. Ein Anstieg des intrazellulären Kalziums führt bei gleichzeitig vermehrter Expression des NCX, wie es für Herzinsuffizienz gezeigt werden konnte (HASENFUSS 1998), zu einem elektrogenen Natriumeinstrom (POGWIZD et al. 2001). Falls dadurch das Schwellenpotential des Kardiomyozyten erreicht wird, können sogenannte Nachdepolarisationen ausgelöst werden (VOLDERS et al. 2000). Diese Nachdepolarisationen können schlussendlich in Arrhythmien resultieren (WIT und ROSEN 1983). Das heißt, dass schon minimale Veränderungen in der Kalziumhomöostase der Kardiomyozyten massive Störungen bedingen können.

Um ein besseres Verständnis der Mechanismen dieser durch Ang II induzierten die Arrhythmien verursachende Dysfunktion des Kalziumhaushaltes zu erlangen, soll die vorliegende Arbeit beitragen. Es wurde also der Bedeutung der NADPH-Oxidase II für die Regulation des Ang II-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks des sarkoplasmatischen Retikulums nachgegangen. Dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck lässt sich messtechnisch als sogenannte Sparks erfassen. Im Folgenden sollen die durch die vorliegende Arbeit ermittelten Daten diskutiert werden.

### ***4.1 Ang II erhöht das Kalziumleck***

Die Daten der vorliegenden Erhebung konnten erstmals zeigen, dass Ang II die diastolische Sparkfrequenz in Mäusekardiomyozyten signifikant erhöht. In den vorliegenden Experimenten führte Ang II auch zu einer Erhöhung des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  - Lecks. Das heißt die Menge an  $\text{Ca}^{2+}$ , die während eines Messzyklus in der Diastole durch die Summe der gemessenen Sparks freigesetzt wird, wurde durch Ang II signifikant gesteigert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge des SR, quantitativ gemessen an dem  $\text{Ca}^{2+}$  -Transienten des SR nach Koffeingabe, zeigte unter Ang II-Superfusion eine signifikante Reduktion. Die anderen Sparkcharakteristika wie Amplitude, FDHM,

FWHM scheinen nach den hier vorliegenden Daten, nicht durch eine kurzfristige Ang II Exposition beeinflusst zu werden.

Eine Ang II-Ausschüttung bedingt unter anderem eine Aktivitätserhöhung der NADPH-Oxidase II (LI Y-L et al. 2007), was zu einer gesteigerten ROS-Generierung mit den vielen möglichen Folgereaktionen führt. Zudem aktiviert Ang II die Phospholipase C, was zu einer Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) führt (BERRIDGE 1997) und so weitere intrazelluläre Abläufe initiiert.

Eine dauerhafte Erhöhung der Ang II-Ausschüttung ist also mit verschiedenen pathologischen Folgen wie Hypertrophie (ACETO und BAKER 1990; GUL et al. 2012), Hypertension (FLEMING 2000), Herzinsuffizienz (GAVRAS und GAVRAS 2002) und Arrhythmien (YAHIRO et al. 2003; FISCHER R et al. 2007; VON LEWINSKI et al. 2008) assoziiert. Eine vermehrte Ausschüttung von Ang II konnte unter anderem bei herzinsuffizienten Patienten nachgewiesen werden (PIANO et al. 1998), so dass diese Patienten besonders von Arrhythmien bedroht sind (KANNEL et al. 1994). Therapeutisch wird die Erkenntnis einer langfristigen pathologischen Wirkung des Ang II bereits genutzt, wie der Einsatz von ACE-Hemmern und Ang II-Rezeptorblockern bei Hypertension und Herzinsuffizienz zeigt (GARG et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit führte eine Superfusion der Kardiomyozyten zu einer signifikanten Steigerung der Sparkfrequenz. Dies bestätigt die Ergebnisse von Untersuchungen an Kardiomyozyten von Ratten an anderer Forschungsstätte (LIU et al. 2005). Die Auswirkung einer vermehrten Sparkgenerierung unter Ang II im Sinne einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit von EADs und DADs wurde bereits experimentell gezeigt (ZHAO et al. 2011).

Es stellt sich also die Frage nach dem Mechanismus für diese Sparkfrequenzsteigerung bzw. nach der durch Ang II bedingten, erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR. Dieser Fragestellung soll mithilfe der vorliegenden Arbeit weiter nachgegangen werden.

Die Sparkentstehung, das heißt also die Ryanodin-Rezeptoraktivierung, kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Zum einen sind RyR  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiv (FILL und COPELLO 2002). Dies bedeutet, dass bei erhöhtem luminalen Kalzium die RyR sensibler gegenüber dem zytosolischem Kalzium sind (SITSAPESAN und WILLIAMS 1994) und die Instabilität und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit der Ryanodin-Rezeptoren erhöht ist. Demnach kann schon eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -

Konzentration ausreichend sein, um die RyR zu aktivieren und damit die Sparkentstehung herbeizuführen. Zudem können ROS, welche über eine durch Ang II induzierte Aktivierung der NADPH-Oxidase generiert werden, die RyR direkt beeinflussen (YAN et al. 2008). Des Weiteren aktivieren ROS die CaMKII (ERICKSON et al. 2011; ZHAO et al. 2011), welche wiederum auch die RyR phosphoryliert und damit aktiviert. Die PKA wird ebenfalls durch ROS aktiviert (BRENNAN et al. 2006). Auch eine Bedeutung dieser Kinase in Bezug auf eine Beeinflussung des RyRs wird diskutiert (REIKEN et al. 2003). Ein besseres Verständnis auf welchem Mechanismus die Ang II-abhängige Aktivierung der RyR dabei beruht, kann die Betrachtung der Daten bringen, welche unter Verwendung transgener Mäuse bzw. bei Verwendung von Inhibitoren erhoben worden sind. Die Diskussion dieser Daten folgt im weiteren Verlauf.

Die durchgeführten Ergebnisse zeigten einen unter Ang II-Exposition gesteigerten diastolischen SR-Kalziumverlust. Auch bei herzinsuffizienten Patienten ist der diastolische SR-Kalziumverlust erhöht (BERS et al. 2006; FISCHER TH et al. 2013b; SAG et al. 2014). Dies kann auf eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodin-Rezeptors (RyR) zurückgeführt werden (MARX et al. 2000). Somit stellt sich hier ebenfalls die Frage nach der Ursache der erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR. Es ist mittlerweile bekannt, dass der RyR eine vielfältige posttranslationale Modifikationen durchläuft (NIGGLI et al. 2013). Das heißt die Aktivität des RyR bzw. dessen Eigenschaften können durch verschiedene Proteine posttranslational beeinflusst werden. Im Vordergrund sind da vor allem die CaMKII (WEHRENS et al. 2004; GUO et al. 2012) und die PKA (HULME et al. 2006; MARKS 2013) zu nennen, welche durch Phosphorylierung die Aktivität des RyR verändern können. Zudem modifizieren ROS direkt die Funktion des RyR (YAN et al. 2008) und sind somit auch Teil der postrationalen Modifikation.

Da eine Ang II Exposition der Zellen zu einer gesteigerten ROS-Produktion führt (LI Y et al. 2002; NISHIDA et al. 2005; BEDARD und KRAUSE 2007), können diese über mehrere mögliche Wege posttranslational die Aktivität des RyR beeinflussen. Zum einen kann eine ROS-abhängige Aktivierung der CaMKII eine Aktivierung des RyR bedingen (GUO et al. 2012). Auch die PKA kann den RyR direkt aktivieren (MARKS 2013). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine funktionierende CaMKII eine notwendige Bedingung für eine Steigerung der RyR Aktivität darstellt. Die ROS-abhängige Aktivierung der PKA hingegen zeigte keine

Auswirkung auf die RyR Aktivität. Demnach scheint die CaMKII die relevante Kinase im Zusammenhang mit der Ang II induzierten Sparkfrequenzerhöhung und somit auch mit den durch Ang II induzierten kardialen Arrhythmien zu sein. Abgesehen von dieser direkten Aktivierung des RyR, hat auch der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt einen direkten Einfluss auf den RyR (GYORKE I und GYORKE 1998; XU und MEISSNER 1998; FILL und COPELLO 2002). Der Kalziumgehalt des SR ist bei verschiedenen pathologischen Umständen reduziert. Auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist diese Veränderung gegeben (SAG et al. 2014). Dies könnte der zentrale Grund für das bei Herzinsuffizienz vorliegende Kontraktionsdefizit sein (BERS 2002). Dies beruht darauf, dass die Konzentration des SR-Kalziums eine wesentliche Bedeutung für die zur Kontraktion erforderliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung hat. Somit beeinflusst der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt direkt die Eigenschaften der Kardiomyozyten. So wird die Größe des CICR aufgrund des Massenverteilungsgesetz durch die Höhe des  $\text{Ca}^{2+}$  im SR bestimmt (DOBREV et al. 2011).

Wie bereits beschrieben, zeigte sich in den erhobenen Daten eine signifikante Reduktion des SR-Kalziumgehaltes durch die Superfusion mit Ang II. Das heißt Ang II verursacht eine signifikante Reduktion des SR -Kalziumgehaltes. Diese Beobachtung ist mit den in der Literatur angegebenen Ergebnissen eines Anstieges des intrazellulären Kalziumtransienten unter Ang II kompatibel (WATANABE und ENDOH 1998).

Eine Verminderung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes kann dabei prinzipiell entweder durch einen erhöhten Kalziumverlust oder eine verminderte Füllung des SR mit Kalzium bedingt sein.

Ein gesteigerter Kalziumverlust kann durch die erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR hervorgerufen werden. Demnach führt eine Inhibition einer vermehrten RyR-Aktivierung zu Hemmung der signifikanten Reduktion des SR Kalzium-Gehaltes.

Wie bereits dargestellt, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Beeinflussung der weiter oben angeführten Sparkcharakteristika durch die verschiedenen Interventionen festgestellt werden. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass bei Hypertrophie weder eine Hemmung der PKA noch eine Hemmung der CaMKII eine Beeinflussung der Amplitude, von FWHM oder FDHM bedingt (FISCHER TH et al. 2013a).

Es wird jedoch beschrieben, dass eine Steigerung des SR-Kalziumgehaltes zu einer Steigerung von Amplitude, Sparkfrequenz und Breite der Sparks führt (LI Y et al. 2002; ZIMA et al. 2010). Da durch Ang II aber keine Steigerung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes bedingt wird, sind die vorliegenden Daten mit der Literatur kompatibel. Eine Bedeutung der CaMKII $\delta$ c für die genannten Sparkcharakteristika wurde ebenfalls beschrieben. So zeigten MAIER et al. (2003), dass eine Überexpression der CaMKII $\delta$ c zu einer Reduktion von Amplitude sowie Steigerung von FDHM und FWHM führt. Die Reduktion der Amplitude führen die Autoren auf einen verminderten SR-Kalziumgehalt geführt. Dies scheint auf den ersten Blick gegensätzlich zu den hier vorliegenden Ergebnissen zu sein, denn unter beiden Versuchsbedingungen zeigte sich eine Reduktion des SR- Kalziumgehaltes. Die Sparkamplitude hingegen war nur bei den Versuchen mit der CaMKII $\delta$ c-Überexpression reduziert. Einen bedeutenden Unterschied in den Untersuchungen stellt jedoch die zeitliche Komponente der Reduktion des SR- Kalziumgehaltes dar. Die transgene Veränderung der CaMKII $\delta$ c führt zu einer dauerhaften Reduktion des SR-Kalziumgehaltes (MAIER et al. 2003). Eine kurzfristige Superfusion durch Ang II hingegen bedingt eine reversible kurzfristige Reduktion des SR- Kalziumgehaltes. Aufgrund dieser kurzfristigen Reduktion des SR-Kalziumgehaltes, welche auf einer durch Ang II induzierten NADPH-abhängigen ROS-Produktion beruht, kann also eine Beibehaltung der Amplitude möglich sein. Somit kann dieser zeitliche Unterschied in der Reduktion des SR-Kalziumgehaltes für die verschiedenen Ergebnisse bezüglich der Amplitude als Ursache gesehen werden.

#### ***4.2 Die NADPH-Oxidase ist für die Ang II-induzierte Generierung von Kalziumsparks unerlässlich***

Um der Frage nach der ROS-Abhängigkeit der Sparkentstehung und damit der möglichen Ursache der Arrhythmien nachzugehen, wurden auch Sparkmessungen an Kardiomyozyten von gp91phox-KO-Mäusen durchgeführt. Daher erfolgt im nächsten Abschnitt zuerst eine Wiederholung der erfassten Daten mit den gp91phox-KO-Mäusen. Im Anschluss werden die einzelnen Ergebnisse ausführlicher diskutiert. Bei den mit gp91phox-KO-Mäusen durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass der Effekt einer Sparkfrequenzerhöhung durch Angiotensin II sowie die durch Ang II bedingte signifikante Steigerung des Kalziumlecks durch diese genetische

Modifikation aufgehoben wurden. Auch die Angiotensin II-abhängige Wirkung einer Reduktion des SR-Kalziumgehaltes wurde durch die Inhibition der NADPH-Oxidase verhindert. Die basale Sparkfrequenz hingegen scheint von dem Knockout nicht beeinflusst zu werden. Es zeigte sich also trotz der genetischen Veränderung eine unveränderte basale Sparkfrequenz.

Wie bereits beschrieben, stellt Ang II einen Agonisten der NADPH-Oxidase II Aktivierung dar (LI Y-L et al. 2007) (siehe 1.5). Eine Aktivierung der NADPH-Oxidase II führt dabei zu einer gesteigerten Produktion von ROS. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten zeigen also, dass der Einfluss von Ang II auf Mäusekardiomyozyten zumindest zum Teil über einen ROS-abhängigen Weg verläuft. Daraus folgt, dass sowohl die Sparkfrequenz, als auch das Kalziumleck sowie der Kalziumgehalt des SR durch ROS-abhängige Prozesse reguliert werden.

Eine Inhibition der NADPH-Oxidase durch die Verwendung von gp91phox-KO-Mäusen führte, wie bereits beschrieben, zu einer Hemmung der Ang II-Wirkung bezüglich der Sparkfrequenz. Demnach erfolgt die Ang II-induzierte Sparkgenerierung über einen ROS-abhängigen Weg. Einem antiarrhythmischen Effekt durch die Hemmung der NADPH-Oxidase II sollte daher weiter nachgegangen werden. Es gibt bereits Autoren die eine Hemmung der NADPH-Oxidase II als Therapieoption anregen, wobei zunächst die Entwicklung eines NOX-spezifischen Inhibitors erforderlich ist (ZHANG M et al. 2013).

Trotz vollständiger Inhibition der NADPH-Oxidase II abhängigen ROS-Produktion, zeigte sich eine reguläre basale Sparkfrequenz. Diese NADPH-Oxidase II-unabhängigen Sparks können entweder durch eine nicht ROS-abhängige RyR-Aktivierung induziert werden oder durch andere ROS-Quellen bedingt sein. Mögliche ROS-unabhängige Aktivierungsmechanismen der RyR wurden bereits weiter oben benannt. Weitere mögliche ROS-Quellen sind andere Stoffwechselsysteme (ZIMA und BLATTER 2006). Daher kann davon ausgegangen, dass einer oder mehrere dieser NADPH-Oxidase II-unabhängigen Mechanismen zu der basalen Sparkgenerierung beiträgt.

Auch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck scheint direkt oder indirekt von einer Aktivität der NADPH-Oxidase II reguliert zu werden. Unter Hemmung der NADPH-Oxidase II zeigte sich eindeutig eine Hemmung des durch Ang II induzierten Effektes einer Steigerung des Kalziumlecks. Auch hier bleibt der genaue Mechanismus unklar, und es müssen die



weiteren Ergebnisse dieser Arbeit zur Frage nach den beteiligten Kinasen herangezogen werden.

In Bezug auf den SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass die Ang II abhängige Beeinflussung des SR-Kalziumgehaltes über einen NADPH-Oxidase II abhängigen Weg verläuft. Folglich wurde in den hier vorliegenden Experimenten durch eine Inhibition der NADPH-Oxidase II durch Verwendung von gp91phox-KO-Mäusen eine eindeutige Hemmung des durch Ang II-induzierten Effektes einer signifikanten Reduktion des SR-  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes bewirkt.

#### ***4.3 Eine Aktivierung der CaMKII ist eine notwendige Voraussetzung für die Generierung von Ang II-induzierten Kalziumsparks***

Die CaMKII ist eine bedeutende Kinase für die Regulation des Kalziumstoffwechsels der Kardiomyozyten. Auch eine Bedeutung der CaMKII in der Pathophysiologie der Kardiomyozyten wurde bereits vielfach beschrieben. Eine vermehrte Aktivierung der CaMKII wird dabei vor allem im Zusammenhang mit Arrhythmien gesehen (WU Y et al. 2002; MAIER et al. 2003; GUO et al. 2006; WAGNER et al. 2006; SAG et al. 2009; SOSSALLA et al. 2011; ADAMEOVA et al. 2012). Auch ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten CaMKII Aktivierung und der Entwicklung von kardialer Hypertrophie (BOKNIK et al. 2001; HAGEMANN et al. 2001; ZHANG T et al. 2003; KOHLHAAS et al. 2006; WESTENBRINK et al. 2015) und Herzinsuffizienz (HOCH et al. 1999; KIRCHHEFER et al. 1999; NETTICADAN et al. 2000) wurde bereits gezeigt. Es zeigte sich, dass nur die CaMKII $\delta$ - Isoform bei herzinsuffizienten Patienten signifikant erhöht ist, die anderen CaMKII-Isoformen hingegen sind unverändert (HOCH et al. 1999). Für die Entwicklung bzw. den Progress der Herzinsuffizienz ist also vor allem die CaMKII $\delta$  von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Bezug auf die Sparkfrequenz bei additionaler Gabe des CaMKII-Inhibitors AIP der durch Ang II induzierte Effekt einer Sparkfrequenz-steigerung aufgehoben. Auch das durch Ang II deutlich gesteigerte SR-Kalziumleck wurde durch den Einsatz von AIP auf die ohne Ang II Gabe vorhandene Quantität zurückgebracht. In den CaMKII $\delta$ -KO-Mäusen zeigte sich ebenfalls eine trotz Ang II Superfusion niedrige Sparkfrequenz. Demnach war der in der Kontrollgruppe durch Ang II bedingte Effekt einer signifikanten Steigerung der Sparkfrequenz in den Experimenten mit den CaMKII $\delta$ -KO-Mäusen vollständig

aufgehoben. Auch in Bezug auf das SR-Kalziumleck zeigte sich durch Verwendung der CaMKII-KO-Mäuse eine Aufhebung der durch Ang II induzierten Steigerung desselbigen. Die Ergebnisse hinsichtlich des SR-  $\text{Ca}^{2+}$ - Gehaltes zeigten sich bei Hemmung der CaMKII analog zu einer durch die Inhibition fehlenden signifikanten Steigerung der Sparkfrequenz und des Kalziumlecks. Folglich zeigte die unter Ang II Superfusion gemessene signifikante Reduktion des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes, nach Hemmung der CaMKII keine signifikante Reduktion mehr. Der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Kalziumgehalt ist daher auch direkt von der Funktion der CaMKII abhängig.

Aus den dargestellten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die CaMKII eine Bedeutung für die Generierung diastolischer Sparks und auch für das diastolische SR- Kalziumleck und den SR-Kalziumgehalt hat.

#### ***4.3.1 Ang II vermittelt seine Wirkung auf das Kalziumleck über eine Aktivierung der CaMKII***

Die Ergebnisse bezüglich der Sparkfrequenz und einer Inhibition der CaMKII zeigen, dass die Aktivierung der CaMKII eine unabdingbare Bedeutung für die Sparkentstehung hat.

Dies wurde in dieser Form mit der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt. Eine Publikation dieser Daten hat stattgefunden (WAGNER et al. 2014). Ein Zusammenhang zwischen der CaMKII und Ang II in Bezug auf eine Arrhythmogenese wurde vorher erst für EADs nachgewiesen (ZHAO et al. 2011). Die weiteren aktuell verfügbaren Daten zeigen eine vielfältige pathologische Verknüpfung von Ang II und CaMKII (PALOMEQUE et al. 2009a; PALOMEQUE et al. 2009b; SAG et al. 2013). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber zum ersten Mal einen direkten Zusammenhang zwischen einer durch Ang II induzierten signifikanten Sparkfrequenzsteigerung und einer funktionierenden CaMKII (WAGNER et al. 2014). In Bezug auf die Sparkfrequenz und die CaMKII wurde bisher gezeigt, dass eine Überexpression der CaMKII zu einer signifikanten Steigerung der Sparkfrequenz führt, was durch einen CaMKII-Inhibitor verhindert werden kann (MAIER et al. 2003), bzw. dass eine Inhibition der CaMKII die Sparkfrequenz vermindert (CURRIE et al. 2004). In Zusammenschau der Daten mit den vorliegenden Ergebnissen stellt sich die Frage inwiefern, d.h. also bei welchem Abschnitt die CaMKII in die Sparkentstehung involviert ist. Dafür muss zuerst die Frage nach der Aktivierung der CaMKII im Zusammenhang mit der Sparkentstehung geklärt werden. Als mögliche Aktivierungswege der CaMKII kommen eine der Ang II

folgende Aktivierung der NADPH-Oxidase und die damit in Verbindung stehende ROS-Produktion in Frage (ERICKSON et al. 2011; ZHAO et al. 2011). Zudem kann eine durch Ang II direkt oder indirekt bedingte Erhöhung des Kalziums zu einer Aktivierung der CaMKII führen (RELLOS et al. 2010). Da eine Inhibition der NADPH-Oxidase ebenfalls zu einer Auflösung der Ang II-Wirkung auf das Kalziumleck führt, scheint diese Art der Aktivierung der CaMKII in den vorliegenden Versuchen die wahrscheinlichere zu sein.

Die basale Sparkfrequenzrate zeigte sich trotz Inhibition der CaMKII nicht verändert, so dass davon ausgegangen werden muss, dass noch andere, nicht CaMKII-abhängige Prozesse zu einer Sparkentstehung führen.

Eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenz führt auch zu einem gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust. Diesem liegt erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR zugrunde (CHENG et al. 1993; BERS 2002). Diese Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit ist durch chemisch-toxische bzw. durch oxidative Effekte (ABRAMSON et al. 1988; TERENCEV et al. 2008) oder durch eine CaMKII-Aktivierung bedingt (MAIER et al. 2003). Dabei zeigt sich die Öffnungswahrscheinlichkeit besonders dann erhöht, wenn die RyR im phosphorylierten Status an Position Ser-2808 (Maus) oder Ser-2814 (Maus) vorliegen (VALDIVIA et al. 1995; BERS 2002). Für diese Phosphorylierung kommen in der Herzmuskelzelle im Besonderen zwei Kinasen in Frage: die Proteinkinase A (PKA) und die CaMKII. Beide Kinasen phosphorylieren den RyR und können damit die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen (MARX et al. 2000; BERS 2011). Die Bedeutung der CaMKII wurde bereits dargestellt und eindeutig nachgewiesen. Nach den vorliegenden Ergebnissen bleibt hingegen eine PKA-abhängige Phosphorylierung des RyR nach ROS-abhängiger Aktivierung der Kinase ohne Auswirkung auf das Öffnungsverhalten des RyR.

In Bezug auf das Kalziumleck zeigte sich in den durchgeführten Untersuchungen, dass eine Hemmung der CaMKII zu einer Hemmung des gesteigerten Kalziumlecks führte, so dass die CaMKII in Zusammenhang mit dem gesteigerten Kalziumleck zu bringen ist. Die Folge eines langfristig gesteigerten Kalziumlecks beruht zum einen auf einer möglichen Reduktion des SR-Kalziumgehalts, zum anderen aber auch auf einer möglichen Erhöhung des diastolischen zytosolischen Kalziums. Eine langfristige Reduktion des SR Kalziumgehaltes ist die Ursache für die kontraktile Dysfunktion bei Herzinsuffizienz (BERS 2002). Demnach bedingt eine Erhöhung des zytosolischen Kalziums eine diastolische Dysfunktion (BERS 2002). Das heißt, dass

sich der Kalziumgehalt des SR bei bleibendem SR-Kalziumleck aufgrund der gesteigerten NCX-Funktion weiter entleert bzw. nicht mehr suffizient gefüllt werden kann (BERS 2002). Dieser gesteigerte späte Natriumeinstrom induziert proarrhythmische Bedingungen, was durch den CaMKII-abhängigen-SR-Kalziumverlust mediiert wird (SAG et al. 2014). Eine gestörte CaMKII-Aktivierung führt also zu einer gestörten  $\text{Na}^+$ -Kanalregulation (DYBKOVÁ et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die CaMKII über eine vermehrte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR zu einem erhöhten Kalziumleck beiträgt und zu einer Reduktion des SR-Kalziumgehaltes führt. Eine Reduktion des SR-Kalziumgehaltes kann prinzipiell auf zwei verschiedenen Mechanismen beruhen. Zum einen kann über einen vermehrten Kalziumverlust aus dem SR eine Reduktion des SR-Kalziumgehaltes bedingt sein. Dafür kann ein verändertes Öffnungsverhalten der RyR im Sinne einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit oder auch eine Veränderung der Sparkparameter wie FDHM, FWHM oder Amplitude die Ursache einer Reduktion des SR-Kalziumgehaltes ursächlich sein. Da ja nachweislich die Sparkfrequenz durch eine Hemmung der CaMKII reduziert ist und beim SR-Kalziumgehalt bei einer Hemmung der CaMKII keine signifikante Reduktion mehr nachzuweisen ist, scheint auch der SR-Kalziumgehalt primär durch die CaMKII reguliert zu sein. Dies entspricht einer CaMKII-abhängigen signifikanten Steigerung des Kalziumlecks sowie der Kalziumsparkfrequenz. Neben dem gesteigerten Kalziumverlust aus dem SR durch eine veränderte RyR-Aktivität stellt eine insuffiziente Füllung eine weitere Möglichkeit der Reduktion des SR-Kalziumgehaltes dar. Wie bereits beschrieben, ist die SERCA ( $\text{SR-Ca}^{2+}$ -ATPase) die Kalziumpumpe des SR. Abgesehen von der wichtigen Rolle der SERCA für den Kalziumgehalt des SR, trägt die SERCA in den Mäusekardiomyozyten auch einen >90% igen Anteil an der Reduktion des diastolischen zytosolischen Kalziums (LI L et al. 1998). Wie beschrieben, erfolgt die Regulation der SERCA entweder ROS-abhängig oder durch die Regulation des PLB. Dabei kann PLB durch die CaMKII-abhängige Phosphorylierung inhibiert werden, wodurch eine Des-inhibition der SERCA resultiert. Dies ist mit den vorliegenden Daten vereinbar, da bei einer Inhibition der CaMKII die signifikante Reduktion des SR Kalziumgehaltes aufgehoben ist. Es ist aber dennoch eine Reduktion des SR-Kalziumgehaltes im Vergleich zur Inkubation mit Normaltyrode zu sehen, was auf diese fehlende Desinhibition von PLB zurückzuführen ist. Dabei können theoretisch auch beide Mechanismen, d.h. sowohl

die direkte ROS-abhängige Regulation der SERCA als auch die indirekte ROS-vermittelte Regulation durch die CaMKII und PLB zu der Regulation der SERCA und damit zu der Reduktion des SR-Kalziums beitragen.

Neben der beschriebenen direkten Aktivierung der RyR durch die CaMKII, kann auch ein weiterer Mechanismus zur Sparkentstehung bzw. Beeinflussung des SR-Kalziumgehaltes beitragen. Demnach kann eine CaMKII-vermittelte Beeinflussung der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (LTCC) dazu führen, dass diese in einen Modus wechseln, welcher durch eine verlängerte Öffnungsphase charakterisiert ist (DZHURA et al. 2000; ABIRIA und COLBRAN 2010). Neben der Anhebung des zytosolischen Kalziums kann dies ebenfalls zu einer Generierung von Sparks führen (CANNELL et al. 1995). Neben einer übermäßigen Sparkbildung kann also auch eine direkte Beeinflussung des LTCC Arrhythmien bedingen (ANDERSON 2001).

Die physiologische Bedeutung dieser Beeinflussung des LTCC ist, dass in Verbindung mit einer Hyperphosphorylierung der RyR trotz einer möglichen Reduktion des SR-Kalziumgehaltes keine Reduktion des SR-Kalziumtransienten bedingt wird, so dass die Kontraktilität nicht negativ beeinflusst wird (KOHLHAAS et al. 2006). D.h. eine akute Aktivierung führt zu einer Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, um die intrazelluläre Kalziumaktivität zu kontrollieren (O-UCHI et al. 2005; ABIRIA und COLBRAN 2010).

Die pathologische Bedeutung einer CaMKII-abhängigen Sparkgenerierung ist, wie bereits beschrieben, dass Sparks über die Initiation von Nachdepolarisationen zu Arrhythmien führen können. Dabei ist vor allem eine chronische bzw. dauerhafte Aktivierung der CaMKII in den pathologischen Prozessen involviert. Aufgrund der unter 4.3 genannten Bedeutung der CaMKII in die verschiedenen pathologischen Umstände, wurde eine pharmakologische Hemmung der CaMKII als therapeutische Intervention bereits diskutiert. Es zeigte sich, dass eine Inhibition der CaMKII nach Herzinfarkt das Herz vor einem krankhaften strukturellem Umbau schützt (ZHANG R et al. 2005). Auch konnte eine Steigerung der Kontraktilität bei Herzinsuffizienz durch eine Inhibition der CaMKII $\delta$  gezeigt werden (SOSSALLA et al. 2010). Es muss aber bedacht werden, dass der CaMKII auch wichtige Funktionen außerhalb des Herzens zugeordnet sind, wie beispielsweise das räumliche Lernen (SILVA et al. 1992), so dass bei Inhibition eine CaMKII-Isoform spezifische Therapie erfolgen müsste (BACKS et al. 2009). Unter physiologischen Bedingungen zeigten die Kardiomyozyten der CaMKII-KO Mäuse eine intakte systolische Funktion sowie eine

in Bezug auf Herzstruktur und Funktion normale kardiale Entwicklung bis ins Erwachsenenalter hinein (BACKS et al. 2009). Mittlerweile konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine chronische Inhibition der CaMKII nicht nur positive Effekte aufweist, sondern auch zu einer deutlichen Reduktion der kardialen Fähigkeit, auf Stress (betaadrenerge Belastung oder körperliche Ausbelastung) zu reagieren, führt (XU et al. 2010). Auch konnte gezeigt werden, dass bei azidotischen Bedingungen eine deutliche kardiale Funktionsbeeinträchtigung vorliegt (BÄUMER 2012). Dies könnte im Rahmen von azidotischen Umständen wie beispielsweise bei einer Sepsis oder möglicherweise bei einem kardiogenen Schock zu negativen Auswirkungen im Sinne eines schlechteren Outcomes führen.

Die Veränderungen durch eine therapeutische Inhibition der CaMKII sind sehr vielschichtig und sollten daher erst nach ausgeprägter Abwägung der Vor- und Nachteile zum Einsatz kommen. Zudem sind natürlich weitere Untersuchungen zur besseren Abschätzung der klinischen Relevanz dieser Untersuchungen notwendig, vor allem auch im Hinblick auf die Speziesunterschiede zwischen Tier und Mensch.

#### ***4.4 Die PKA ist nicht wesentlich an der Regulation des Ang II-induzierten Kalziumlecks beteiligt***

Die Proteinkinase A hat durch ihre Funktion der Phosphorylierung von multiplen in den Kalziumstoffwechsel involvierten Substraten, wie beispielsweise den RyR (BERS 2002), einen hohen Stellenwert für den Kontraktionsablauf der Kardiomyozyten. Zudem konnte eine Regulation der PKA durch ROS nachgewiesen werden (BRENNAN et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der PKA keinen Einfluss auf das durch Ang II induzierte Kalziumleck hat. Demnach konnte weder die durch Ang II induzierte signifikante Steigerung der Sparkfrequenz noch das signifikant gesteigerte Kalziumleck oder die signifikante Reduktion des SR Kalziumgehaltes durch eine Inhibition der PKA verhindert werden. Eine Aktivierung der PKA erfolgt über eine Erhöhung von cAMP (RITTER 2005). Zudem kann auch eine Aktivierung durch ROS erfolgen (BRENNAN et al. 2006). Über die genaue Phosphorylierungsstelle wird noch diskutiert. So beschreiben XIAO et al. (2006) Ser-2030 als die wichtige PKA-Phosphorylierungsstelle. WEHRENS et al. (2006) hingegen beschreiben Ser-2808 als die relevante Phosphorylierungsstelle.

Einer Ang II Superfusion folgt eine NADPH-Oxidase II vermittelte Produktion von ROS (LI Y-L et al. 2007), so dass davon auszugehen ist, dass bei den vorliegenden Experimenten die Aktivierung der PKA über ROS erfolgte (WAGNER et al. 2014). Die PKA hat eine wichtige Funktion in der Kalziumhomöostase. So reguliert die PKA unter anderen folgende in den Kalziumkreislauf der Kardiomyozyten involvierte Substrate: Phospholamban, L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, Troponin I sowie das Myosin-bindende Protein C (BERS 2002).

Auch eine Beeinflussung der Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR durch die PKA wurde beschrieben. Valdivia et al. konnten zeigen, dass eine Aktivierung der PKA nach einem abrupten Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration in einer Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR resultiert. Bei gleichbleibender Kalziumkonzentration wurde die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR dagegen reduziert (VALDIVIA et al. 1995). Marx et al. (2000) hingegen zeigten, dass die PKA die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR steigert. Interessanterweise führte bei Abwesenheit von PLB wiederum eine PKA- abhängige Phosphorylierung der RyR zu keinem direkten Effekt auf deren Öffnungswahrscheinlichkeit (LI Y et al. 2002). Dies deutet daraufhin, dass bei der PKA-abhängigen Regulation des SR-Kalziumlecks indirekte Effekte über SERCA (PLB) ebenso wichtig sind wie die direkte Beeinflussung der RyR. Diese vermehrte SERCA-Aktivität resultiert in einem gesteigertem SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt. Aufgrund der Kalziumsensibilität des RyR kann durch diese Steigerung des SR-Kalziumgehaltes somit eine indirekte Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR durch die PKA erfolgen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente in Anwesenheit von H89 stützen die Idee einer fehlenden direkten Auswirkung der PKA-abhängigen Regulation der RyR im Rahmen der Sparkgenerierung. Weder der Einsatz des PKA-Inhibitors H89, noch die transgene Modifikation der PKA führte zu einer Verhinderung des durch Ang II induzierten Effektes einer signifikanten Steigerung der Sparkfrequenz. Damit ist deutlich, dass die PKA für die Sparkgenerierung über eine direkte RyR-Aktivierung keine vordergründige Rolle spielt. Diese Ergebnisse bestätigen die von LI et al. (2002) gezeigten Daten eines fehlenden direkten Effektes der PKA auf die Sparkgenerierung durch RyR-Aktivierung. Auch eine durch ISO-Gabe vermehrte Entwicklung von Kalziumwellen kann nicht durch eine Inhibition der PKA verhindert werden (CURRAN et al. 2010). Zudem wird beschrieben, dass trotz einer PKA-abhängigen Hyperphosphorylierung der RyR die Kontraktilität unbeeinflusst

bleibt (HOUSER 2014). Die kardiale Dysfunktion nach Myokardinfarkt wird ebenfalls nicht auf eine PKA-abhängige Hyperphosphorylierung der RyR zurückgeführt (ZHANG H et al. 2012). Neben den vorliegenden Daten gibt es also auch in der Literatur einige Untersuchungen die eine Rolle der PKA im Zusammenhang mit der ROS-abhängigen Arrhythmieentwicklung bezweifeln lassen. Für die Entwicklung von durch Sparkgenerierung induzierten Nachdepolarisationen scheint somit eher die CaMKII als die PKA von Bedeutung zu sein. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die CaMKII in einem pro-oxidativen Milieu, wie es beispielsweise unter herzinsuffizienten Bedingungen gegeben ist, länger aktiviert bleibt (ERICKSON et al. 2008). Zudem ist die CaMKII, wie bereits beschrieben, im Gegensatz zur PKA in herzinsuffizienten überexprimiert (KIRCHHEFER et al. 1999). Die genaue Rolle der PKA im Zusammenhang mit verschiedenen Pathologien bleibt aber weiter unklar, vor allem da eine Unterscheidung zwischen den Effekten der PKA auf den RyR, auf PLB und den Kalziumstrom schwierig ist (LI et al. 2002).

Für das SR-Kalziumleck gelten die gleichen Überlegungen wie zu der Sparkfrequenz. Auch hier zeigte sich in den Ergebnissen keine Inhibition des Ang II-Effektes bezüglich des gesteigerten SR-Kalziums. Demnach scheint die PKA in diesem Zusammenhang auch keine direkte Bedeutung für die Regulation des SR-Kalziumlecks zu haben. Klinische Untersuchungen an Patienten mit Herzinsuffizienz bzw. Hypertrophie zeigten ebenfalls, dass das Kalziumleck vor allem CaMKII-abhängig reguliert wird und die PKA in diesem Zusammenhang weniger bedeutend ist (FISCHER TH et al. 2013a). Andere Untersuchungen hingegen zeigten, dass die Phosphorylierung von PLB durch die PKA zu einem Anstieg des Kalziumlecks führt (ASCHAR-SOBBI et al. 2012). Dies scheint den hier vorliegenden Untersuchungen auf den ersten Blick zu widersprechen. Der entscheidende Unterschied zwischen diesen Untersuchungen ist aber das hohe ROS-Aufkommen, wie es bei Ang II-Superfusion und auch bei Herzinsuffizienz (PERRELLI et al. 2011) gegeben ist. Diese hohen ROS-Mengen können durch eine Hemmung der SERCA den PLB-abhängigen Effekt verhindern. Daher kann eine PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB im Rahmen der hier vorliegenden Versuche das Kalziumleck auf diesem Wege nicht beeinflussen. Damit ist der hier fehlende Einfluss der PKA auf das Kalziumleck erklärbar und mit den Angaben in der Literatur vereinbar.

Der bisher in den anderen Versuchen erhobene Befund einer Reduktion des SR-Kalziumgehaltes unter Ang II-Superfusion zeigte sich auch in den Daten der Gruppe



der PKA-Mäuse. Eine Inhibition der PKA durch den Einsatz von H89 oder durch die transgene Veränderung hat die durch Ang II induzierte signifikante Reduktion des SR- Kalziumgehaltes nicht aufgehoben. Demnach liegt auch hier eine primär ROS-abhängige Steigerung des Kalziumlecks vor. Bezüglich einer von dieser Ang II-induzierten Steigerung des Kalziumlecks konnte auch eine unabhängigen Regulation des SR- Kalziumgehaltes in Messungen, welche parallel zu den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten durchgeführt worden sind, gezeigt werden. Dabei zeigte sich bereits ohne Superfusion in den PKA-KI-Mäusen ein signifikant reduzierter SR-Kalziumgehalt bei gleichzeitig signifikant höherer diastolischer Kalziumkonzentration (Daniel et al. 2012). Es scheint also, dass durch die Veränderung der Redoxsensibilität der PKA eine Beeinflussung des SR-Kalziumgehaltes stattfindet. Es kann also angenommen werden, dass die Reduktion der PKA und damit ihre Aktivierung für die Regulation des SR-Kalziumgehaltes relevant sein kann. Dies kann entweder durch eine Veränderung der Befüllung des SR oder durch eine Steigerung des SR-Kalziumlecks bedingt sein. Das Kalziumleck ist nach den hier vorliegenden Ergebnissen im Vergleich zwischen den PKA-WT und den PKA-KI-Mäusen nicht verändert. Demnach scheint eine Aufhebung der Reduktionsfähigkeit der PKA das Kalziumleck nicht zu erhöhen. Daher muss die Reduktion des SR-Kalziumgehaltes sich über eine veränderte Regulation der Kalziumbefüllung und damit über eine reduzierte Aktivität der SERCA2a abspielen. Weitere, ebenfalls zur gleichen Zeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maier durchgeführte Untersuchungen des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms via Patch Clamp, untermauern die Vorstellung einer Regulation der SERCA2a durch die PKA bzw. eine Beeinflussung der SERCA2a Funktion durch Inhibition einer möglichen Reduktion der PKA (Daniel et al. 2012). Es zeigte sich ein signifikant gesteigerter L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Strom, welcher als Kompensation für die Aufrechterhaltung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei reduziertem SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt gesehen werden kann. Insgesamt bedeutet dies, dass die elektro-mechanische Kopplung in den PKA-KI-Mäuse verändert ist und die PKA damit für die Regulation der SERCA-Aktivität von Bedeutung sein kann (Daniel et al. 2012). Aufgrund der physiologischen Kopplung und Regulation der SERCA durch PLB und die physiologische Regulation von PLB durch die PKA (LEHNART und MARKS 2007) ist anzunehmen, dass die Regulation der SERCA2a über eine Steuerung von PLB erfolgt. Dabei kann PLB abgesehen von der PKA-abhängigen Regulation (TADA und TOYOFUKU 1996) bzw. von einer

Regulation durch die CaMKII (MAIER et al. 2003; BERS und DESPA 2009) auch direkt durch oxidativen Stress beeinflusst werden, was schlussendlich in einer Reduktion der Aktivität der SERCA resultiert (BIGELOW und SQUIER 2005).

Die Regulation der SERCA kann zusammenfassend wie folgt dargestellt werden: Die SERCA wird zum einen direkt durch ROS beeinflusst, wobei hohe Mengen an ROS zu einer verminderten Aktivität derselbigen führten. Niedrige Mengen hingegen führten zu einer erhöhten Aktivität (KUKREJA et al. 1988; CSORDAS und HAJNOCZKY 2009). Bei herzinsuffizienten Patienten konnte eine gesteigerte ROS-Produktion gezeigt werden (PERRELLI et al. 2011), so dass dies mit der erniedrigten SERCA-Aktivität vereinbar ist. Physiologischerweise reguliert das Protein Phospholamban die Aktivität der SERCA (BERS 2002). PLB wird u. a. durch die PKA reguliert (LEHNART und MARKS 2007), so dass auch eine indirekte Regulation der SERCA durch die PKA vorliegt. Auch eine Aktivierung der CaMKII kann zu einer Phosphorylierung von PLB und damit zu einer Aktivierung der SERCA führen (KOSS und KRANIAS 1996; MAIER et al. 2003; BERS und GRANDI 2009). Eine veränderte bzw. verminderte SERCA-Aktivität resultiert in einer verminderten Füllung des SR. Solch eine verminderte Füllung des SR ist in insuffizienten Herzen nachzuweisen. Dies kann auf die dort bestehende reduzierte Expression der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) und/oder die gleichzeitige Erhöhung der Aktivität des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) zurückzuführen sein (HASENFUSS 1998). In der Regulation dieser beiden sind multiple Mechanismen involviert. Der NCX wird vor allem durch die PKC phosphoryliert und damit aktiviert (IWAMOTO et al. 1996). Entscheidend für den SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt ist auch, dass die Flussrichtung des NCX durch die transsarkolemmalen elektrochemischen Gradienten für  $\text{Na}^{+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  sowie vom Membranpotenzial beeinflusst wird (BERS 2002). Bei einem deutlichen intrazellulärem Anstieg der Natriumkonzentration, wie er unter herzinsuffizienten Bedingungen zu finden ist (DESPA et al. 2002), kommt es aufgrund einer Umkehr der Transportrichtung sogar zu einem Netto-Kalziumverlust aus dem SR (PIESKE et al. 1999). Es zeigt sich also, dass die Regulation des Natriumhaushaltes der Kardiomyozyten ebenfalls für die Kalziumhomöostase und damit den Kontraktionsablauf von entscheidender Bedeutung ist.

#### ***4.5 Angiotensin II und die Proteinkinase C***

Auch die PKC hat verschiedene Zielsubstrate, die im Zusammenhang mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Kardiomyozyten stehen (IWAMOTO et al. 1996; KAMP und HELL 2000). Zudem ist eine Bedeutung der PKC für die Entwicklung mehrerer kardialer Pathologien beschrieben worden. So scheint die PKC unter anderem zur Entwicklung von Herzinsuffizienz (BOWLING et al. 1999; SABRI und STEINBERG 2003; SIMONIS et al. 2003; MONTGOMERY et al. 2005; HINKEN et al. 2012; SONG X et al. 2014) und Hypertrophie (INAGAKI et al. 2002; SABRI und STEINBERG 2003; SIMONIS et al. 2003; VLAHOS et al. 2003; DORN und FORCE 2005) beizutragen. SENTEX et al. (2006) hingegen beschreiben, dass die PKC nicht für die Entwicklung von Herzinsuffizienz und Hypertrophy verantwortlich ist. In den Untersuchungen wurde aber nur dem speziellen Fall einer Volumenbelastung durch aortokavalen Shunt nachgegangen, was den Unterschied in den Resultaten zu den anderen Studien erklären kann. Außerdem beschreiben die Autoren in ihren Versuchen einen Anstieg in der Konzentration der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen PKC-Aktivität (SENTEX et al. 2006). Auch lassen sich diese verschiedenen Resultate über die Rolle der PKC durch die Existenz multipler Isoformen erklären.

Eine Bedeutung der PKC für die Entwicklung von Arrhythmien wird in der Literatur weniger beschrieben. Die Hypertrophie und die Herzinsuffizienz bleiben stets im Vordergrund der beschriebenen PKC-abhängigen Pathologien.

Eine Inhibition der PKC als Therapieansatz in der Behandlung der Herzinsuffizienz oder Hypertrophie wurde bereits angeregt (BOYLE et al. 2005; JOHNSEN et al. 2005). Dabei ist es natürlich von großer Bedeutung, dass die PKC-Isoform Expression im humanen Ventrikel sehr divers ist (SHIN et al. 2000).

Eine ROS-abhängige Regulation der PKC konnte bereits nachgewiesen werden (GOPALAKRISHNA und ANDERSON 1989).

Der Einsatz des PKC-Inhibitors BIS zeigte in den Messungen der vorliegenden Arbeit keine Veränderung des durch Ang II-Superfusion ausgelösten Effektes einer signifikanten Steigerung der Sparkfrequenz. Auch das Kalziumleck war trotz Verwendung von BIS signifikant reduziert. Der Einsatz des  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-Blockers 2-APB veränderte hingegen die Sparkfrequenz. Durch Verwendung dieses Inhibitors wurde also der durch Ang II induzierte Effekt einer Sparkfrequenzsteigerung

gehemmt. Auch die Auswirkung von Ang II auf das Kalziumleck wurde durch 2-APB vollständig aufgehoben. Bezüglich des SR- Kalziumgehaltes zeigte sich, dass weder der Einsatz des PKC-Hemmers BIS noch die Verwendung des IP<sub>3</sub>-Rezeptorblockers 2-APB zu einer Aufhebung der, durch Ang II induzierten signifikanten Reduktion des SR Kalziumgehaltes führte.

Eine Aktivierung der Proteinkinase C kann über verschiedene Wege ausgelöst werden. Zum einen erfolgt die Aktivierung der klassischen PKC über eine der Phospholipase C-

Aktivierung folgende Generierung von IP<sub>3</sub> und DAG (KLINKE et al. 2009). DAG fungiert dabei als direkter Kofaktor der PKC. Das IP<sub>3</sub> bindet an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren, welche Kalziumkanäle darstellen, so dass eine Kalziumfreisetzung induziert wird. Diese Kalziumerhöhung in Verbindung mit dem Kofaktor DAG bedingt schlussendlich die Aktivierung der PKC. Neben diesem klassischen Weg wurde auch eine Aktivierung der PKC durch ROS beschrieben (GOPALAKRISHNA und ANDERSON 1989). Niedrige ROS-Mengen zeigen einen aktivierenden Einfluss auf die PKC, hohe ROS Konzentrationen hingegen führen zu einer irreversiblen Hemmung (GOPALAKRISHNA und ANDERSON 1989).

Nach den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten scheint die PKC aber trotz der möglichen ROS-abhängigen Aktivierung im Hinblick auf die durch Ang II induzierten diastolischen Kalziumsparks keine bedeutende Rolle zu spielen. Dies unterstützt die Idee einer primär CaMKII-abhängigen Regulation der RyR. Auch sind diese Daten mit der in der Literatur nur spärlichen Darstellung einer PKC-abhängigen Arrhythmieentwicklung kompatibel. Ein Zusammenhang der PKC und der Entwicklung von kardialen Pathologien ist also vor allem im Bereich der Herzinsuffizienz und Hypertrophie zu sehen.

In Bezug auf das Kalziumleck konnte kein Einfluss der PKC auf die durch Ang II induzierte Reduktion beobachtet werden. Dies untermauert die Vorstellung einer, wie unter 4.4.6 bereits erläutert, in erster Linie ROS- und PKA-abhängigen Regulation des SR- Kalzium-gehaltes.

#### ***4.5.1 Angiotensin II- und IP<sub>3</sub> - Rezeptoren in Kardiomyozyten***

Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor stellt einen ligandenaktivierten Kalziumkanal des endoplasmatischen Retikulums (ER) dar (MIGNERY und SUDHOF 1990). Eine Aktivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors erfolgt über die Bindung des spezifischen Liganden

IP<sub>3</sub>. Im Herzen ist der IP<sub>3</sub>-Rezeptor Typ II die dominante Form (PEREZ et al. 1997; MACKENZIE et al. 2004) und ist vor allem im Bereich der Kernhülle lokalisiert (BARE et al. 2005). Die physiologische Bedeutung dieses Kalziumkanals wurde bisher in der, durch die Kalziumfreisetzung bedingte Erleichterung des ECCs und dem damit einhergehenden positiv inotropen Effekt gesehen (DOMEIER et al. 2008). Die pathophysiologische Bedeutung ist noch nicht vollständig erforscht. Es wird aber beschrieben, dass bei verschiedenen Pathologien des Herzens eine Hochregulation des Rezeptors zu beobachten sei. So konnte gezeigt werden, dass der IP<sub>3</sub>-Rezeptor sowohl in hypertrophierten Herzen (NAKAYAMA et al. 2010) als auch bei Herzinsuffizienz (GO et al. 1995) und dilatativer Kardiomyopathie (HARZHEIM et al. 2010) vermehrt exprimiert ist. Daher stellt sich Frage nach der Bedeutung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors in Zusammenhang mit diesen pathologischen Veränderungen. Da der IP<sub>3</sub>-Rezeptor wie beschrieben die elektromechanische Kopplung des Kontraktionsvorganges beeinflusst, kann dieser auch zur Entstehung von Arrhythmien beitragen (DOMEIER et al. 2008). Erste Hinweise auf einen Einfluss des IP<sub>3</sub>-Rezeptors zeigten Experimente, in welchen durch Einsatz des IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Inhibitors 2-APB sowohl die durch IP<sub>3</sub>-Rezeptorstimulation bedingten Arrhythmien, als auch der proarrhythmische diastolische Kalziumtransient gehemmt wurde (MACKENZIE et al. 2004). Zudem konnte eine durch IP<sub>3</sub>-Rezeptorstimulation medierte Generierung von Kalziumsparks und Wellen durch eine der alpha1-adrenergen Stimulation folgende Aktivierung der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren gezeigt werden (LUO et al. 2008). In IP<sub>3</sub>-Rezeptor-KO-Mäusen konnte dieser Zusammenhang ebenfalls gezeigt werden. Das heißt, in den Experimenten mit diesen KO-Mäusen wurde der durch Scherkraft induzierte Effekt einer IP<sub>3</sub>-Rezeptor abhängigen Kalziumfreisetzung und der dadurch getriggerten Ca<sup>2+</sup>-Wellengenerierung verhindert (KIM und WOO 2015). Eine Bedeutung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors für die durch Kalziumsparks medierte Arrhythmien kann durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Es bleibt also festzuhalten, dass der IP<sub>3</sub>-Rezeptor eine wichtige Funktion in der Sparkgenerierung und in der Beeinflussung des diastolischen Kalziumlecks innehat. Über welchen Mechanismus sich diese Wirkung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors entwickelt, ist aber noch unklar. Zum einen kann die IP<sub>3</sub>-Rezeptor-abhängige Kalziumfreisetzung durch die beschriebene Wirkung auf den RyR zu der Sparkentstehung beitragen. Auch eine Bedeutung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors in der RyR unabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung wird diskutiert (ZIMA et al. 2010).

## ***4.6 Limitationen der Arbeit***

Bei allen hier durchgeführten Untersuchungen bleibt zu bedenken, dass die Funktion der Kardiomyozyten im Vergleich zur Situation wenn diese in einem Blutkreislauf eingebunden sind, verändert ist. Dies bedeutet, dass beispielsweise verschiedene Schutzmechanismen oder Puffersysteme in der *in vitro* Situation nicht mehr aktiv sind. Alle Kardiomyozyten wurden aber unter den gleichen Bedingungen untersucht. Demnach wurden sowohl die Versuche mit der Interventionsgruppe als auch die Experimente mit der Kontrollgruppe nach einem gleich bleibendem Standardprotokoll untersucht.

Wie unter 2.7.3 bereits beschrieben, wird der PKA-Inhibitor H89 verschieden bewertet. CHIJIWA et al. (1990) stuften diesen Inhibitor als selektiv und spezifisch ein. DAVIES et al. (2000) hingegen beschreiben, dass bei hohen Konzentrationen auch eine Hemmung anderer Kinasen erfolgt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration von 5  $\mu\text{mol/l}$  liegt aber deutlich unter der von Davies beschriebenen Grenze, so dass von einem überwiegend spezifischen Effekt des PKA-Inhibitors ausgegangen werden kann. Bezüglich des Inhibitors 2-APB werden ebenfalls verschiedene Stellungen bezogen: Zum einen wird dieser Inhibitor als spezifisch beschrieben (MARUYAMA et al. 1997). Andererseits beschreiben MISSIAEN et al. (2001), dass durch diesen Inhibitor auch weitere den Kalziumstoffwechsel regulierende Elemente gehemmt werden. Auch wenn durch 2-APB vielleicht keine alleinige Inhibition der  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren erreicht werden kann, so ist doch davon auszugehen, dass die Hauptwirkung in der Hemmung der  $\text{IP}_3$  - Rezeptoren liegt. In Hinblick auf den PKC-Inhibitor BIS wird eine PKC-spezifische Inhibition beschrieben. Es konnte jedoch keine Spezifität bezüglich der PKC Subtypen nachgewiesen werden (TOULLEC et al. 1991). Da es aber viele verschiedene Isoformen der PKC gibt und die Expression auch sehr verschieden ist (SHIN et al. 2000), bleibt letztendlich unklar, welche oder wieviele der Isoformen durch den Einsatz von BIS gehemmt werden. Demnach kann trotz der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Wirkungslosigkeit der PKC in Bezug auf die durch Ang II induzierten Kalziumsparks, eine Bedeutung der PKC nicht vollständig ausgeschlossen. Um dieser Frage weiter nachgehen zu können, müsste ein auch subtypenspezifischer Inhibitor entwickelt werden. Das in der Arbeit verwendete Softwareprogramm ImageJ stellt eine Möglichkeit dar, Sparks computergestützt

auszuwerten (PICHT et al. 2007). Dabei ist auch diese Software in geringem Maße fehleranfällig. Manche Sparks werden von der Analyse ausgeschlossen, wenn diese von der Software nicht als solche erkannt werden. Zudem können lokale Fluoreszenzveränderungen durch die Software als Sparks gewertet werden, auch wenn diesen kein Spark zugrunde liegt. Um diese Problematik zu minimieren, wurde bei allen Sparks auch manuell kontrolliert und bei der Wahl der Filtereigenschaften zur Auswertung der Fluoreszenzintensität, welche das wichtige Kriterium zur Unterscheid Spark vs. Nicht-Spark darstellt, die Empfehlung des Softwareentwicklers berücksichtigt. Auf diese Weise soll eine hohe Sensitivität bei einer sehr geringen Rate an Falsch-positiven gewährleistet werden (PICHT et al. 2007). Zudem ist ein Auftreten dieses Phänomens von falsch-negativen bzw. falsch-positiven Sparks in beiden Versuchsgruppen möglich, so dass die Schlüsse aus den Versuchen dadurch weniger beeinflusst wurden.

In den Experimenten dieser Arbeit kamen bei der Verwendung von 73% Männchen zu 27% Weibchen deutlich mehr männliche als weibliche Versuchstiere zum Einsatz. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine Beeinflussung der Daten durch diesen Umstand gegeben ist, denn es wird über geschlechtsspezifische Differenzen in der Regulation des Kalziumhaushaltes in Kardiomyozyten berichtet (FARRELL et al. 2010; PARKS et al. 2014). Da aber in jedem Mäuseherz sowohl Kontroll- als auch Interventionsmessungen durchgeführt wurden, ist das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Versuchstieren im Vergleich der Gruppen untereinander homogen.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten sind bezüglich ihrer schlussendlichen Bedeutung für eine mögliche pharmakologische Therapie von Patienten sehr interessant. Es bleibt aber zu berücksichtigen, dass erhebliche Speziesunterschiede zwischen Maus und Mensch vorliegen. Für die Regulation des Kalziumhaushaltes der Kardiomyozyten konnten schon einige Unterschiede gezeigt werden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Quantität der SERCA in ventrikulären Mäusekardiomyozyten ungefähr der von Ratten entspricht (BASSANI et al. 1994). Dabei zeigt sich die Aktivität der SERCA in Ratten-Kardiomyozyten deutlich höher als in Kaninchenkardiomyozyten (HOVE-MADSEN und BERS 1993). Kaninchenkardiomyozyten hingegen ähneln den menschlichen Kardiomyozyten vor allem in Hinblick auf den Kalziumstrom (BERS 2002), so dass letztendlich von einem Unterschied bezüglich der Kalziumregulation zwischen Maus und Mensch ausgegangen werden muss.

## 5. Zusammenfassung

Für Patienten mit Herzinsuffizienz stehen vor allem zwei pathophysiologische Veränderungen als Probleme im Vordergrund.

Zum einen stellen die bei herzinsuffizienten Patienten häufig auftretenden Arrhythmien, lebensbedrohliche Situationen dar. Die Ursachen dieser Arrhythmien bzw. die genauen pathophysiologischen Mechanismen, die zu diesen Arrhythmien beitragen, sind bis heute Gegenstand der aktuellen Forschung. Es ist jedoch anerkannt, dass sogenannte diastolische Kalziumsparks zur Entstehung von Arrhythmien beitragen können. Dieser Zusammenhang wird durch die Folgen bedingt, die ein diastolisches Sparkereignis auslösen kann. Das heißt, unter pathologischen Veränderungen kann ein diastolisches Sparkereignis eine sogenannte Kalziumwelle initiieren. Diese Wellen sind die Grundlage für späte Nachdepolarisationen (DADs). Somit können diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks als Grundlage der durch die Wellen getriggerten extrasystolischen Kontraktionen angesehen werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten können einen Teil zum besseren Verständnis dieser Pathophysiologie beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass Ang II über eine NADPH-abhängige ROS-Produktion zu einer Aktivierung der CaMKII führt. Diese aktivierte CaMKII bedingt die Generierung von Sparks. Auch die Kalziumfreisetzung über  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren ist eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für eine Ang II-induzierte ROS-abhängige Generierung von diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks.

Die zweite pathophysiologische Problematik für herzinsuffiziente Patienten ergibt sich aus der dauerhaften Reduktion des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes. Der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt ist auf langfristige Zeit gesehen entscheidend für die Kontraktionskraft des Herzens, so dass eine Reduktion desselbigen die wichtigste Komponente des kontraktiven Defizits bei Herzinsuffizienz darstellt. Daher wurden auch die Regulationsmechanismen des SR-Kalziumgehaltes im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes vor allem durch ein gesteigertes SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck bedingt ist. Dem liegt eine durch Ang II induzierte NOX 2-vermittelte und CaMKII-abhängige signifikante Steigerung der Sparkfrequenz sowie signifikanten Steigerung des Kalziumlecks zugrunde.



Die vorliegenden Daten sind für eine mögliche pharmakologische Therapie der Herzinsuffizienz von großer Bedeutung. Eine spezifische Inhibition der übermäßigen diastolischen Sparkgenerierung könnte einen neuartigen interessanten Therapieansatz darstellen. Damit könnten möglicherweise beide pathophysiologischen Probleme der Herzinsuffizienz, also die Arrhythmien sowie der Progress verhindert werden. Dabei muss eine Inhibition der die Sparks induzierenden Kinasen vor allem in Hinblick auf die mannigfaltigen physiologischen Funktionen kritisch bedacht werden.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Abiria SA, Colbran RJ (2010): CaMKII associates with CaV1.2 L-type calcium channels via selected beta subunits to enhance regulatory phosphorylation. *J Neurochem* 112, 150-161
- Abramson JJ, Salama G (1989): Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. *J Bioenerg Biomembr* 21, 283-294
- Abramson JJ, Buck E, Salama G, Casida JE, Pessah IN (1988): Mechanism of anthraquinone-induced calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263, 18750-18758
- Aceto JF, Baker KM (1990): [Sar1]angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells. *Am J Physiol* 258, H806-813
- Adameova A, Carnicka S, Rajtik T, Szobi A, Nemcekova M, Svec P, Ravingerova T (2012): Upregulation of CaMKII $\delta$  during ischaemia-reperfusion is associated with reperfusion-induced arrhythmias and mechanical dysfunction of the rat heart: involvement of sarcolemmal Ca<sup>2+</sup>-cycling proteins. *Can J Physiol Pharmacol* 90, 1127-1134
- Anderson ME (2001): Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels: is a unifying mechanism at hand? *J Mol Cell Cardiol* 33, 639-650
- Anderson ME (2011): Pathways for CaMKII activation in disease. *Heart Rhythm* 8, 1501-1503
- Anderson ME (2015): Oxidant stress promotes disease by activating CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 89, 160-167
- Antzelevitch C, Sicouri S (1994): Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations. Role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes. *J Am Coll Cardiol* 23, 259-277
- Aschar-Sobbi R, Emmett TL, Kargacin GJ, Kargacin ME (2012): Phospholamban phosphorylation increases the passive calcium leak from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Arch* 464, 295-305
- Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, Grueter CE, Qi X, Richardson JA, Hill JA, et al. (2009): The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2342-2347
- Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM, Mignery GA (2005): Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 280, 15912-15920

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1994): Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476, 279-293

Bäumer H (2012): Die Bedeutung der  $\delta$ -Isoform der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) für die Azidose bei isolierten Kardiomyozyten. Med. Diss., Georg-August-Universität Göttingen

Bean BP (1985): Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86, 1-30

Bedard K, Krause KH (2007): The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245-313

Bellmann S (2012): Die Bedeutung der CaMKII für sauerstoffradikalvermittelte zytosolische Natrium- und Kalziumüberladung sowie Arrhythmogenese in Herzmuskelzellen. Med. Diss., Georg-August-Universität Göttingen

Belloni AS, Andreis PG, Macchi V, Gottardo G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG (1998): Distribution and functional significance of angiotensin-II AT1- and AT2-receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Endocr Res* 24, 1-15

Berlin JR, Bassani JW, Bers DM (1994): Intrinsic cytosolic calcium buffering properties of single rat cardiac myocytes. *Biophys J* 67, 1775-1787

Berridge MJ (1997): Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499 ( Pt 2), 291-306

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000): The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21

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

Bers DM (2011):  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II regulation of cardiac excitation-transcription coupling. *Heart Rhythm* 8, 1101-1104

Bers DM, Despa S (2009): Na/K-ATPase--an integral player in the adrenergic fight-or-flight response. *Trends Cardiovasc Med* 19, 111-118

Bers DM, Grandi E (2009): Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 54, 180-187

Bers DM, Despa S, Bossuyt J (2006): Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  in normal and failing cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1080, 165-177

Bigelow DJ, Squier TC (2005): Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 17, 121-134

Boknik P, Heinroth-Hoffmann I, Kirchhefer U, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller T, Schmitz W, Brodde O, Neumann J (2001): Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy. *Cardiovasc Res* 51, 717-728

Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow MR, et al. (1999): Increased protein kinase C activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 99, 384-391

Boyle AJ, Kelly DJ, Zhang Y, Cox AJ, Gow RM, Way K, Itescu S, Krum H, Gilbert RE (2005): Inhibition of protein kinase C reduces left ventricular fibrosis and dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 39, 213-221

Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, et al. (2004): PKC- $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10, 248-254

Brennan JP, Bardswell SC, Burgoyne JR, Fuller W, Schroder E, Wait R, Begum S, Kentish JC, Eaton P (2006): Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. *J Biol Chem* 281, 21827-21836

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

Brochet DX, Yang D, Di Maio A, Lederer WJ, Franzini-Armstrong C, Cheng H (2005): Ca<sup>2+</sup> blinks: rapid nanoscopic store calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3099-3104

Burgoyne JR, Rudyk O, Cho H-j, Prysyazhna O, Hathaway N, Weeks A, Evans R, Ng T, Schröder K, Brandes RP, et al. (2015): Deficient angiogenesis in redox-dead Cys17Ser PKAR1a knock-in mice. *Nat. Commun.* 6, 7920

Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ (1995): The control of calcium release in heart muscle. *Science* 268, 1045-1049

Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM (2006): NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 8, 691-728

Chadwick CC, Saito A, Fleischer S (1990): Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2132-2136

Chen W, Wasserstrom JA, Shiferaw Y (2009): Role of coupled gating between cardiac ryanodine receptors in the genesis of triggered arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H171-180

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

Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB (1996a): Calcium sparks and  $[Ca^{2+}]_i$  waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 270, C148-159

Cheng H, Lederer MR, Xiao RP, Gomez AM, Zhou YY, Ziman B, Spurgeon H, Lakatta EG, Lederer WJ (1996b): Excitation-contraction coupling in heart: new insights from  $Ca^{2+}$  sparks. *Cell Calcium* 20, 129-140

Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H (1990): Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 265, 5267-5272

Churchill EN, Mochly-Rosen D (2007): The roles of PKCdelta and epsilon isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Biochem Soc Trans* 35, 1040-1042

Cleland JG, Khand A, Clark A (2001): The heart failure epidemic: exactly how big is it? *Eur Heart J* 22(8), 623-626.

Clement O, Puceat M, Walsh MP, Vassort G (1992): Protein kinase C enhances myosin light-chain kinase effects on force development and ATPase activity in rat single skinned cardiac cells. *Biochem J* 285 (Pt 1), 311-317

Coetzee WA, Opie LH (1992): Effects of oxygen free radicals on isolated cardiac myocytes from guinea-pig ventricle: electrophysiological studies. *J Mol Cell Cardiol* 24, 651-663

Cooper LL, Li W, Lu Y, Centracchio J, Terentyeva R, Koren G, Terentyev D (2013): Redox modification of ryanodine receptors by mitochondria-derived reactive oxygen species contributes to aberrant  $Ca^{2+}$  handling in ageing rabbit hearts. *J Physiol* 591, 5895-5911

Corbin JD, Sugden PH, Lincoln TM, Keely SL (1977): Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J Biol Chem* 252, 3854-3861

Cranefield PF (1977): Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circ Res* 41, 415-423

Csordas G, Hajnoczky G (2009): SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1352-1362

Curran J, Brown KH, Santiago DJ, Pogwizd S, Bers DM, Shannon TR (2010): Spontaneous  $Ca$  waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II. *J Mol Cell Cardiol* 49, 25-32

Currie S, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL (2004): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J* 377, 357-366

Daniel H, Wagner S, Neumann K, Dantz C, Moellencamp J, Eaton P, Maier LS (2012): Redox-dead protein kinase A disturbs excitation-contraction coupling. 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim. *Clin Res Cardiol* 101, <http://www.abstractserver.de/dgk2012/ft/abstracts/V842.htm>

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351, 95-105

Despa S, Islam MA, Weber CR, Pogwizd SM, Bers DM (2002): Intracellular Na<sup>(+)</sup> concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Circulation* 105, 2543-2548

Di Benedetto G, Zoccarato A, Lissandron V, Terrin A, Li X, Houslay MD, Baillie GS, Zaccolo M (2008): Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ Res* 103, 836-844

DiBona GF (2000): Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 36, 1083-1088

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 Heart J* 29, 2388-2442

Dobrev D, Voigt N, Wehrens XH (2011): The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: pathophysiological and therapeutic implications. *Cardiovasc Res* 89, 734-743

Domeier TL, Zima AV, Maxwell JT, Huke S, Mignery GA, Blatter LA (2008): IP<sub>3</sub> receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, 30

Dorn GW, 2nd, Force T (2005): Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115, 527-537

Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, Baker KM (1997): Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol* 29, 2893-2902

Dybкова N, Wagner S, Backs J, Hund TJ, Mohler PJ, Sowa T, Nikolaev VO, Maier LS (2014): Tubulin polymerization disrupts cardiac beta-adrenergic regulation of late I<sub>Na</sub> *Cardiovasc. Res* 103, 168-177

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

Eckert R, Chad JE (1984): Inactivation of Ca channels. *Prog Biophys Mol Biol* 44, 215-267

Edman CF, Schulman H (1994): Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 10, 89-101

Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, et al. (2008): A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462-474

Erickson JR, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME (2011): CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol Rev* 91, 889-915

Farrell SR, Ross JL, Howlett SE (2010): Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, 7

Ferreira T, Rasband W (2012). Image J User Guide. Verfügbar unter: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>. Zugriff am: 19.02.2016

Ferdinandy P, Schulz R (2003): Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 138, 532-543

Fill M, Copello JA (2002): Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82, 893-922

Fischer R, Dechend R, Gapelyuk A, Shagdarsuren E, Gruner K, Gruner A, Gratze P, Qadri F, Wellner M, Fiebeler A, et al. (2007): Angiotensin II-induced sudden arrhythmic death and electrical remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, 6

Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, Ellenberger D, Forster A, Schmitto JD, Gummert J, et al. (2013a): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in human cardiac pathology. *Circulation* 128, 970-981

Fischer TH, Maier LS, Sossalla S (2013b): The ryanodine receptor leak: how a tattered receptor plunges the failing heart into crisis. *Heart Fail Rev*. 4, 475-83.

Fischer TH, Eiringhaus J, Dybkova N, Forster A, Herting J, Kleinwachter A, Ljubojevic S, Schmitto JD, Streckfuss-Bomeke K, Renner A, et al. (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

Fleming S (2000): Malignant hypertension - the role of the paracrine renin-angiotensin system. *J Pathol* 192, 135-139

Fukuda K, Davies SS, Nakajima T, Ong BH, Kupersmidt S, Fessel J, Amarnath V, Anderson ME, Boyden PA, Viswanathan PC, et al. (2005): Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels. *Circ Res* 97, 1262-1269

Garg S, Narula J, Marelli C, Cesario D (2006): Role of angiotensin receptor blockers in the prevention and treatment of arrhythmias. *Am J Cardiol* 97, 921-925

Garrido AM, Griendling KK (2009): NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 302, 148-158

Gavras I, Gavras H (2002): Angiotensin II as a cardiovascular risk factor. *J Hum Hypertens* 16 Suppl 2, S2-6

Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Marks AR (1995): Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 95, 888-894

Gopalakrishna R, Anderson WB (1989):  $\text{Ca}^{2+}$ - and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6758-6762

Graw J (2007): Nobelpreis 2007 in Medizin: Herstellung von *knockout*-Mäusen. *Biologie in unserer Zeit* 37, 352-354

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

Guatimosim S, Guatimosim C, Song LS (2011): Imaging calcium sparks in cardiac myocytes. *Methods Mol Biol* 689, 205-214

Gul R, Shawl AI, Kim SH, Kim UH (2012): Cooperative interaction between reactive oxygen species and  $\text{Ca}^{2+}$  signals contributes to angiotensin II-induced hypertrophy in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, 2

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

Guo T, Zhang T, Ginsburg KS, Mishra S, Brown JH, Bers DM (2012): CaMKII $\delta$  slows  $[\text{Ca}]_i$  decline in cardiac myocytes by promoting Ca sparks. *Biophys J* 102, 2461-2470

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



Gyorke I, Gyorke S (1998): Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal  $\text{Ca}^{2+}$  involves luminal  $\text{Ca}^{2+}$  sensing sites. *Biophys J* 75, 2801-2810

Gyorke S, Hagen BM, Terentyev D, Lederer WJ (2007): Chain-reaction  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the heart. *J Clin Invest* 117, 1758-1762

Hagemann D, Bohlender J, Hoch B, Krause EG, Karczewski P (2001): Expression of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II delta-subunit isoforms in rats with hypertensive cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 220, 69-76

Hajnoczky G, Thomas AP (1994): The inositol trisphosphate calcium channel is inactivated by inositol trisphosphate. *Nature* 370, 474-477

Harzheim D, Talasila A, Movassagh M, Foo RS, Figg N, Bootman MD, Roderick HL (2010): Elevated InsP3R expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extra-systolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes. *Channels* 4, 67-71

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

Hell JW (2010): Beta-adrenergic regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\text{Ca}_v1.2$  by PKA rekindles excitement. *Sci Signal* 3(141), 33

Hinken AC, Hanft LM, Scruggs SB, Sadayappan S, Robbins J, Solaro RJ, McDonald KS (2012): Protein kinase C depresses cardiac myocyte power output and attenuates myofilament responses induced by protein kinase. *A J Muscle Res Cell Motil* 33, 439-448

Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D (1993): Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88, 107-115

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

Hoffman BF, Rosen MR (1981): Cellular mechanisms for cardiac arrhythmias. *Circ Res* 49, 1-15

Horn T, Ullrich ND, Egger M (2013): 'Eventless' InsP3-dependent SR- $\text{Ca}^{2+}$  release affecting atrial  $\text{Ca}^{2+}$  sparks. *J Physiol* 591, 2103-2111

House C, Kemp BE (1987): Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 238, 1726-1728

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

Hove-Madsen L, Bers DM (1993): Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes. *Circ Res* 73, 820-828

Huang WH, Wang Y, Askari A (1992):  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase: inactivation and degradation induced by oxygen radicals. *Int J Biochem* 24, 621-626

Hudmon A, Schulman H (2002): Structure/function of the multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II *Biochem. J.* 364, 593-611

Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS (2005): CaMKII tethers to L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, establishing a local and dedicated integrator of  $\text{Ca}^{2+}$  signals for facilitation. *J Cell Biol* 171, 537-547

Hulme JT, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA (2006): Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac  $\text{CaV}1.2$  channels during  $\beta_1$ -adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16574-16579

Hülsmann M (2003): Neurohumorale Aspekte der Herzinsuffizienz. *J Kardiologie* 10, 491-495

Ikemoto N, Yamamoto T (2000): Postulated role of inter-domain interaction within the ryanodine receptor in  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation. *Trends Cardiovasc Med* 10, 310-316

Inagaki K, Iwanaga Y, Sarai N, Onozawa Y, Takenaka H, Mochly-Rosen D, Kihara Y (2002): Tissue angiotensin II during progression of ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC  $\epsilon$  and PKC  $\beta$ . *J Mol Cell Cardiol* 34, 1377-1385

Inoué S (2006). Foundation of the confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. In Pawley JB, Handbook of biological confocal microscopy (S.7). New York: Springer. ISBN: 9780387259215

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

Ishihata A, Endoh M (1993): Pharmacological characteristics of the positive inotropic effect of angiotensin II in the rabbit ventricular myocardium. *Br J Pharmacol* 108, 999-1005

Iwamoto T, Pan Y, Wakabayashi S, Imagawa T, Yamanaka HI, Shigekawa M (1996): Phosphorylation-dependent regulation of cardiac  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger via protein kinase C. *J Biol Chem* 271, 13609-13615

Johnsen DD, Kacimi R, Anderson BE, Thomas TA, Said S, Gerdes AM (2005): Protein kinase C isozymes in hypertension and hypertrophy: insight from SHHF rat hearts. *Mol Cell Biochem* 270, 63-69

Johnston AS, Lehnart SE, Burgoyne JR (2015): Ca<sup>2+</sup>-signaling in the myocardium by (redox) regulation of PKA/CaMKII. *Front Pharmacol* 6, 166

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

Kannel WB, Ho K, Thom T (1994): Changing epidemiological features of cardiac failure. *Br Heart J* 72, S3-9

Kassmann M, Hansel A, Leipold E, Birkenbeil J, Lu SQ, Hoshi T, Heinemann SH (2008): Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. *Pflugers Arch* 456, 1085-1095

Kim JC, Woo SH (2015): Shear stress induces a longitudinal Ca<sup>2+</sup> wave via autocrine activation of P2Y1 purinergic signalling in rat atrial myocytes. *J Physiol* 593, 5091-5109

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

Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH, Chien KR (1993): The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 268, 15374-15380

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

Korbmacher C (2014). Die IP3-Kaskade. In Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, *Physiologie* (S.65). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. ISBN: 978313796007

Koss KL, Kranias EG (1996): Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 79, 1059-1063

Krizanova O, Holotnakova T, Jurkovicova D, Polakova E, Zahradnikova A, Lacinova L, Kvetnansky R, Myslivecek J, Pastorekova S (2008): Type 1 and 2 IP3 receptors respond differently to catecholamines and stress. *Ann N Y Acad Sci*, 023

Kukreja RC, Okabe E, Schrier GM, Hess ML (1988): Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 261, 447-457

Kushnir A, Marks AR (2010): The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease. *Adv Pharmacol* 59, 1-30

Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Archiv der gesamten Physiologie* 61, 291-332

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

Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM (1998): Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol* 274, H1335-1347

Li Q, Dale WE, Hasser EM, Blaine EH (1996): Acute and chronic angiotensin hypertension: neural and nonneural components, time course, and dose dependency. *Am J Physiol* 271, R200-207

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

Li Y-L, Gao L, Zucker IH, Schultz HD (2007): NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-enhanced carotid body chemoreceptor sensitivity in heart failure rabbits. *Cardiovasc Res* 75, 546-554

Lindqvist L (1960): A flash photolysis study of fluorescein. *Arkiv för Kemi* 16, 79-138

Liu XL, Wang PY, Liu J (2005): [Effects of angiotensin II on Ca<sup>2+</sup> signal in cultured rat cardiac myocytes revealed by confocal laser scanning microscopy. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 21, 163-165

Lochner A, Moolman JA (2006): The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev* 24, 261-274

Lopez-Lopez JR, Shacklock PS, Balke CW, Wier WG (1995): Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science* 268, 1042-1045

Lüllmann-Rauch R (2006). Taschenlehrbuch Histologie (2.Auflage, S. 227). Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2006. ISBN: 3131292423

Luo D, Yang D, Lan X, Li K, Li X, Chen J, Zhang Y, Xiao RP, Han Q, Cheng H (2008): Nuclear Ca<sup>2+</sup> sparks and waves mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Calcium* 43, 165-174

Mackenzie L, Roderick HL, Proven A, Conway SJ, Bootman MD (2004): Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the heart. *Biol Res* 37, 553-557

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

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

Marks AR (2013): Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest* 123, 46-52

Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K (1997): 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biochem* 122, 498-505

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit 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

Maxwell JT, Natesan S, Mignery GA (2012): Modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 channel activity by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 287, 39419-39428

Mayer P, Mohlig M, Schatz H, Pfeiffer A (1994): Additional isoforms of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat heart tissue. *Biochem J* 298 Pt 3, 757-758.

Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H (1992): Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256, 1199-1202

Mignery GA, Sudhof TC (1990): The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor. *Embo J* 9, 3893-3898

Mignery GA, Sudhof TC, Takei K, De Camilli P (1989): Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* 342, 192-195

Mishra S, Gray CB, Miyamoto S, Bers DM, Brown JH (2011): Location matters: clarifying the concept of nuclear and cytosolic CaMKII subtypes. *Circ Res* 109, 1354-1362

Missiaen L, Callewaert G, De Smedt H, Parys JB (2001): 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca<sup>2+</sup> pump and the non-specific Ca<sup>2+</sup> leak from the non-mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* 29, 111-116

Molecular Probes, (2010). Acetoxymethyl (AM) and Acetate Esters. Verfügbar unter: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/g002.pdf>. Zugriff am 19.02.2016

Molecular Probes, (2011). Fluo Calcium Indicators. Verfügbar unter: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01240.pdf>. Zugriff am 19.02.2016

Montgomery DE, Rundell VL, Goldspink PH, Urboniene D, Geenen DL, de Tombe PP, Buttrick PM (2005): Protein kinase C epsilon induces systolic cardiac failure marked by exhausted inotropic reserve and intact Frank-Starling mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, 10

Murray KT, Hu NN, Daw JR, Shin HG, Watson MT, Mashburn AB, George AL, Jr. (1997): Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Circ Res* 80, 370-376

Nakayama H, Bodi I, Maillet M, DeSantiago J, Domeier TL, Mikoshiba K, Lorenz JN, Blatter LA, Bers DM, Molkenstein JD (2010): The IP<sub>3</sub> receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res* 107, 659-666

Naruse K, King GL (2000): Protein kinase C and myocardial biology and function. *Circ Res* 86, 1104-1106

Netticadan T, Temsah RM, Kawabata K, Dhalla NS (2000): Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase is altered in heart failure. *Circ Res* 86, 596-605

Niggli E, Ullrich ND, Gutierrez D, Kyrychenko S, Polakova E, Shirokova N (2013): Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca(2+) signaling and EC-coupling. *Biochim Biophys Acta* 1883, 866-875

Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, Mangmool S, Urayama K, Nagamatsu Y, Takagahara S, Turner JH, Kozasa T, Kobayashi H, et al. (2005): G $\alpha$  12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* 280, 18434-18441

O-Uchi J, Komukai K, Kusakari Y, Obata T, Hongo K, Sasaki H, Kurihara S (2005):  $\alpha$ 1-adrenoceptor stimulation potentiates L-type Ca<sup>2+</sup> current through Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent PK II (CaMKII) activation in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9400-9405

Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, MacLennan DH (1990): Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265, 13472-13483

Palomeque J, Delbridge L, Petroff MV (2009a): Angiotensin II: a regulator of cardiomyocyte function and survival. *Front Biosci* 14, 5118-5133

Palomeque J, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV, Mattiazzi A (2009b): Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca<sup>2+</sup> dependence of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circ Res* 105, 1204-1212

Parks RJ, Ray G, Bienvenu LA, Rose RA, Howlett SE (2014): Sex differences in SR Ca(2+) release in murine ventricular myocytes are regulated by the cAMP/PKA pathway. *J Mol Cell Cardiol* 75, 162-173

Peach MJ (1977): Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 57, 313-370

Perez PJ, Ramos-Franco J, Fill M, Mignery GA (1997): Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272, 23961-23969

Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C (2011): Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol* 3, 186-200

Piano MR, Bondmass M, Schwartz DW (1998): The molecular and cellular pathophysiology of heart failure. *Heart Lung* 27, 3-19

Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM (2007): SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1073-1081

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

Pitt B (1997): Evaluation of Losartan in the Elderly (ELITE) Trial: clinical implications. *Eur Heart J* 18, 1197-1199

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM (2001): Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 88, 1159-1167

Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuk CM, Dinanier MC (1995): Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet* 9, 202-209

Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ (2010): Subcellular Ca<sup>2+</sup> signaling in the heart: the role of ryanodine receptor sensitivity. *J Gen Physiol* 136, 135-142

Qu Y, Rogers J, Tanada T, Scheuer T, Catterall WA (1994): Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3289-3293

Ramay HR, Liu OZ, Sobie EA (2011): Recovery of cardiac calcium release is controlled by sarcoplasmic reticulum refilling and ryanodine receptor sensitivity. *Cardiovasc Res* 91, 598-605

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie*. 2007

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

Rellos P, Pike AC, Niesen FH, Salah E, Lee WH, von Delft F, Knapp S (2010): Structure of the CaMKII $\delta$ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol* 8, e1000426

Ritter M (2005). Prinzipien der endokrinen Regulation. In Deetjen P, Speckmann EJ, Hescheler J, Physiologie (S. 766). München: Elsevier. ISBN: 9783437413179

Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, et al. (2008): Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117, e25-146

Sabri A, Steinberg SF (2003): Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure. *Mol Cell Biochem* 251, 97-101

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S (1993): Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75, 977-984

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

Sag CM, Wagner S, Maier LS (2013): Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 63, 338-349

Sag CM, Mallwitz A, Wagner S, Hartmann N, Schotola H, Fischer TH, Ungeheuer N, Herting J, Shah AM, Maier LS, et al. (2014): Enhanced late INa induces proarrhythmic SR Ca leak in a CaMKII-dependent manner. *J Mol Cell Cardiol* 76, 94-105

Schworer CM, Rothblum LI, Thekkumkara TJ, Singer HA (1993): Identification of novel isoforms of the delta subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. Differential expression in rat brain and aorta. *J Biol Chem* 268, 14443-14449

Scriven DR, Dan P, Moore ED (2000): Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79, 2682-2691

Sentex E, Wang X, Liu X, Lukas A, Dhalla NS (2006): Expression of protein kinase C isoforms in cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 227-238

Shin HG, Barnett JV, Chang P, Reddy S, Drinkwater DC, Pierson RN, Wiley RG, Murray KT (2000): Molecular heterogeneity of protein kinase C expression in human ventricle. *Cardiovasc Res* 48, 285-299

Silbernagl S (2014). Renin und Nierenhormone. In Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Physiologie (S.431). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. ISBN: 9783137960072



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

Simonis G, Dahlem MH, Hohlfeld T, Yu X, Marquetant R, Strasser RH (2003): A novel activation process of protein kinase C in the remote, non-ischemic area of an infarcted heart is mediated by angiotensin-AT1 receptors. *J Mol Cell Cardiol* 35, 1349-1358

Sitsapesan R, Williams AJ (1994): Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel by luminal Ca<sup>2+</sup>. *J Membr Biol* 137, 215-226

Sobie EA, Guatimosim S, Gomez-Viquez L, Song LS, Hartmann H, Saleet Jafri M, Lederer WJ (2006): The Ca<sup>2+</sup> leak paradox and rogue ryanodine receptors: SR Ca<sup>2+</sup> efflux theory and practice. *Prog Biophys Mol Biol* 90, 172-185

Song L, Hennink EJ, Young IT, Tanke HJ (1995): Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 68, 2588-2600

Song LS, Guatimosim S, Gomez-Viquez L, Sobie EA, Ziman A, Hartmann H, Lederer WJ (2005): Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Ann N Y Acad Sci* 1047, 99-111

Song X, Qian X, Shen M, Jiang R, Wagner MB, Ding G, Chen G, Shen B (2014): Protein kinase C promotes cardiac fibrosis and heart failure by modulating galectin-3 expression. *Biochim Biophys Acta* 2015, 513-521

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittkopper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, et al. (2010): Inhibition of elevated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107, 1150-1161

Sossalla S, Maurer U, Schotola H, Hartmann N, Didie M, Zimmermann WH, Jacobshagen C, Wagner S, Maier LS (2011): Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKII $\delta$ (C) can be reversed by inhibition of late Na<sup>(+)</sup> current. *Basic Res Cardiol* 106, 263-272

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

Strack S, Barban MA, Wadzinski BE, Colbran RJ (1997): Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *J Neurochem* 68, 2119-2128

Su JY, Hasselbach W (1984): Caffeine-induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Pflugers Arch* 400, 14-21

Sun XH, Protasi F, Takahashi M, Takeshima H, Ferguson DG, Franzini-Armstrong C (1995): Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle. *J Cell Biol* 129, 659-671

Tada M, Toyofuku T (1996): SR Ca(2+)-ATPase/phospholamban in cardiomyocyte function. *J Card Fail* 2, S77-85

Takayanagi T, Kawai T, Forrester SJ, Obama T, Tsuji T, Fukuda Y, Elliott KJ, Tilley DG, Davisson RL, Park JY, et al. (2015): Role of epidermal growth factor receptor and endoplasmic reticulum stress in vascular remodeling induced by angiotensin II. *Hypertension* 65, 1349-1355

Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Valdivia HH, Escobar AL, Gyorke S (2002): Luminal Ca<sup>2+</sup> controls termination and refractory behavior of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in cardiac myocytes. *Circ Res* 91, 414-420

Terentyev D, Gyorke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, de Blanco EC, Khanna S, Sen CK, Cardounel AJ, et al. (2008): Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in chronic heart failure. *Circ Res* 103, 1466-1472

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, et al. (1991): The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266, 15771-15781

Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ (1995): Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg<sup>2+</sup> and phosphorylation. *Science* 267, 1997-2000

van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, Wang Q, De Almeida AC, Skapura DG, Anderson ME, et al. (2010): Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation* 122, 2669-2679

Vermeulen JT (1998): Mechanisms of arrhythmias in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9, 208-221

Vila Petroff MG, Mattiazzi AR (2001): Angiotensin II and cardiac excitation-contraction coupling: questions and controversies. *Heart Lung Circ* 10, 90-98

Vlahos CJ, McDowell SA, Clerk A (2003): Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nat Rev Drug Discov* 2, 99-113

Volders PG, Vos MA, Szabo B, Sipido KR, de Groot SH, Gorgels AP, Wellens HJ, Lazzara R (2000): Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts. *Cardiovasc Res* 46, 376-392

von Lewinski D, Kockskamper J, Rubertus SU, Zhu D, Schmitto JD, Schondube FA, Hasenfuss G, Pieske B (2008): Direct pro-arrhythmogenic effects of angiotensin II can be suppressed by AT1 receptor blockade in human atrial myocardium. *Eur J Heart Fail* 10, 1172-1176

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, et al. (2006): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3138

Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, et al. (2011): Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II $\delta$  is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res* 108, 555-565

Wagner S, Azizian A, Engel S, Peters T, Shah A, Backs J, Maier LM (2011). Angiotensin II enhances late I<sub>Na</sub> via activation of Ca/Calmodulin Kinase II independent from NADPH oxidase? In ESC Congress 365, Paris. Verfügbar unter: <http://spo.escardio.org/eslides/view.aspx?eevtid=48&fp=307>. Zugriff am 19.02.2016

Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS (2012): Redox regulation of sodium and calcium handling Antioxid Redox Signal. 18(9): 1063-1077

Wagner S, Dantz C, Flebbe H, Azizian A, Sag CM, Engels S, Mollencamp J, Dybkova N, Islam T, Shah AM, et al. (2014): NADPH oxidase 2 mediates angiotensin II-dependent cellular arrhythmias via PKA and CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 75, 206-215

Watanabe A, Endoh M (1998): Relationship between the increase in Ca<sup>2+</sup> transient and contractile force induced by angiotensin II in aequorin-loaded rabbit ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 37, 524-531

Wehrens XH, Marks AR (2004): Molecular determinants of altered contractility in heart failure. *Ann Med* 36 Suppl 1, 70-80

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70

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

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR (2006): Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 511-518

Westenbrink BD, Ling H, Divakaruni AS, Gray CB, Zambon AC, Dalton ND, Peterson KL, Gu Y, Matkovich SJ, Murphy AN, et al. (2015): Mitochondrial reprogramming induced by CaMKII $\delta$  mediates hypertrophy decompensation. *Circ Res* 116, 20

Wiederkehr MR, Zhao H, Moe OW (1999): Acute regulation of Na/H exchanger NHE3 activity by protein kinase C: role of NHE3 phosphorylation. *Am J Physiol* 276, C1205-1217

Wit AL, Rosen MR (1983): Pathophysiologic mechanisms of cardiac arrhythmias. *Am Heart J* 106, 798-811

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

Wojcikiewicz RJ, Luo SG (1998): Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cAMP-dependent protein kinase. Type I, II, and III receptors are differentially susceptible to phosphorylation and are phosphorylated in intact cells. *J Biol Chem* 273, 5670-5677

Wu X, Bers DM (2006): Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected Ca<sup>2+</sup> store throughout cardiac myocyte. *Circ Res* 99, 283-291

Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM (2006): Local InsP<sub>3</sub>-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest* 116, 675-682

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

Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H, Chen SR (2006): Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J* 396, 7-16

Xiao B, Tian X, Xie W, Jones PP, Cai S, Wang X, Jiang D, Kong H, Zhang L, Chen K, et al. (2007): Functional consequence of protein kinase A-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: sensitization of store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biol Chem* 282, 30256-30264

Xu L, Meissner G (1998): Regulation of cardiac muscle Ca<sup>2+</sup> release channel by sarcoplasmic reticulum lumenal Ca<sup>2+</sup>. *Biophys J* 75, 2302-2312

Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998): Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279, 234-237

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

- Yahiro E, Ideishi M, Wang LX, Urata H, Kumagai K, Arakawa K, Saku K (2003): Reperfusion-induced arrhythmias are suppressed by inhibition of the angiotensin II type 1 receptor. *Cardiology* 99, 61-67
- Yamawaki H, Haendeler J, Berk BC (2003): Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ Res* 93, 1029-1033
- Yan Y, Liu J, Wei C, Li K, Xie W, Wang Y, Cheng H (2008): Bidirectional regulation of Ca<sup>2+</sup> sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 77, 432-441
- Yang L, Liu G, Zakharov SI, Morrow JP, Rybin VO, Steinberg SF, Marx SO (2005): Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 280, 207-214
- Yuan W, Bers DM (1994): Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 267, H982-993
- Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007): Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem* 76, 367-385
- Zeiss (2005). LSM 5 Pascal Laser Scanning Microscopy. Verfügbar unter: <http://otolic.stanford.edu/documents/LSM5-Pascal-full.pdf>. Zugriff am: 19.02.2016
- 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 M, Perino A, Ghigo A, Hirsch E, Shah AM (2013): NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers? *Antioxid Redox Signal* 18, 1024-1041
- Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE, Jr., Thiel W, Guatimosim S, Song LS, et al. (2005): Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 11, 409-417
- Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH (2003): The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912-919
- Zhang T, Guo T, Mishra S, Dalton ND, Kranias EG, Peterson KL, Bers DM, Brown JH (2010): Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca(2+) handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKII $\delta$ (C) transgenic mice. *Circ Res* 106, 354-362
- Zhao Z, Fefelova N, Shanmugam M, Bishara P, Babu GJ, Xie LH (2011): Angiotensin II induces afterdepolarizations via reactive oxygen species and calmodulin kinase II signaling. *J Mol Cell Cardiol* 50, 128-136

Zima AV, Blatter LA (2006): Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res* 71, 310-321

Zima AV, Bovo E, Bers DM, Blatter LA (2010):  $\text{Ca}^{2+}$  spark-dependent and -independent sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak in normal and failing rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 588, 4743-4757

### ***Publikation zum Thema der Dissertation***

Wagner S, Dantz C, Flebbe H, Azizian A, Sag CM, Engels S, Mollencamp J, Dybkova N, Islam T, Shah AM, et al. (2014): NADPH oxidase 2 mediates angiotensin II-dependent cellular arrhythmias via PKA and CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 75, 206-215

## ***7. Danksagung***

Zuallererst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Wagner für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas bedanken. Zudem möchte ich mich herzlich bedanken, dass Prof. Dr. Stefan Wagner mich in die Methodik einarbeitete und durch seine stets zuverlässige Betreuung und sein enormes Wissen sehr gute Rahmenbedingungen zur Vollendung dieser Promotion schuf.

Ein ganz großes Dankeschön richtet sich auch an Prof. Dr. Lars Maier für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Auch möchte ich mich sehr herzlich bei allen Menschen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Maier für das durchweg angenehme Arbeitsklima und die vielen schönen Stunden im Labor bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn T. Schulte, Herrn T. Sowa und Frau F. Steuer, die durch ihre hervorragende Arbeit die technische Durchführung des Promotionsprojektes erst ermöglichten.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau H. Daniel, Herrn C. Dantz und Frau H. Flebbe bedanken, die diesen Lebensabschnitt des Doktorandendaseins mit mir teilten und einen Austausch über die damit einhergehenden Fragestellungen ermöglichten.

## ***8. Lebenslauf***