

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II

Direktor: Prof. Dr. Lars Maier

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Bedeutung der Ca²⁺-Calmodulin-abhängigen
Proteinkinase II (CaMKII) für die Entstehung von
Nachdepolarisationen in *vivo* und ventrikulären
Arrhythmien in *vitro* im Herzinsuffizienzmodell**

INAUGURAL - DISSERTATION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sepideh Khabbazzadeh

aus
Teheran (Iran)

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lars S. Maier

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Daniele Camboni

Tag der mündlichen Prüfung: 01. August 2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs-, Tabellen-, Formelverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	9
1.1 Die Herzmuskelzelle.....	10
1.2 Die elektromechanische Kopplung am Herzen.....	11
1.2.1 Das ventrikuläre Aktionspotential.....	11
1.3 Der Kalziumstoffwechsel der Herzmuskelzelle.....	14
1.3.1 Die SR Ca ²⁺ -Aufnahme: Das Phospholamban und die sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase (SERCA2a).....	14
1.3.2 Die SR Ca ²⁺ -Ausschüttung: Ryanodin-Rezeptoren (RyR2).....	15
1.4 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII).....	16
1.4.1 Struktur und Aktivierung der CaMKII.....	16
1.4.2 Inaktivierung der CaMKII.....	18
1.5 Pathophysiologische Vorgänge bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz im Zusammenhang mit der CaMKII.....	19
1.6 Der Einfluss der CaMKII auf die elektromechanische Kopplung.....	20
1.7 Das Aktionspotential im Zusammenhang mit der CaMKII.....	21
1.8 Zielsetzung und Fragestellungen.....	23
2 Methoden.....	24
2.1 Herzmuskelzellisolation.....	24
2.1.1 Isolation von Herzmuskelzellen aus Mäuseherzen.....	24
2.1.2 Versuchsaufbau zur Isolation von Kardiomyozyten aus Mäusemyokard.....	24
2.1.3 Erhebung biometrischer Daten.....	26
2.2 Messung von Aktionspotentialen an isolierten Kardiomyozyten mittels Patch-Clamp-Technik.....	27
2.2.1 Zum Prinzip der Whole-cell Voltage-Clamp-Technik.....	27
2.2.2 Elektrophysiologische Messung von Aktionspotentialen mittels Patch-Clamp-Technik.....	27
2.2.3 Versuchsdurchführung und Versuchsprotokoll.....	29
2.3 Datenauswertung.....	31
2.4 EKG Messungen in vivo.....	31
2.5 Statistik.....	32

2.6 Lösungen.....	33
Zu 2.1 Isolation von ventrikulären Zellen aus Mäusemyokard.....	33
Zu 2.2 Messung von Aktionspotentialen an isolierten Kardiomyozyten mittels Patch-Clamp-Technik.....	34
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Auswertung des Herz- zu Körpergewicht Verhältnisses von transgenen CaMKII δ c-überexprimierenden Mäusen.....	35
3.2 Einfluss einer transgenen CaMKII δ c-Überexpression auf die Aktionspotentialmorphologie von Kardiomyozyten.....	36
3.2.1 Effekte einer CaMKII δ c-Inhibition mittels AIP auf die Aktionspotentiale in transgenen CaMKII δ c-überexprimierenden Kardiomyozyten.....	39
3.2.2 Die Auswirkung der CaMKII δ c-Überexpression auf das Auftreten von spontanen Aktionspotentialen.....	40
3.2.3 Die Auswirkung der CaMKII δ c-Überexpression auf das Auftreten von spontanen Aktionspotentialen unter Isoproterenol.....	41
3.3 Die Auswirkung der CaMKII δ c-Überexpression auf das Auftreten von kardialen Arrhythmien in vivo unter Isoproterenol.....	42
4 Diskussion.....	45
4.1 Die erhöhte CaMKII δ c-Aktivität führt zu einer erhöhten Inzidenz von frühen Nachdepolarisationen in vitro.....	46
4.2 Die erhöhte CaMKII δ c-Aktivität führt zu einer erhöhten Inzidenz von frühen und späten Nachdepolarisationen in vitro.....	47
4.3 Die erhöhte CaMKII δ c-Aktivität führt zu einer Zunahme von kardialen Arrhythmien bei transgenen Versuchstieren	49
4.4 Mögliche Bedeutung der CaMKII für die Entstehung von kardialen Arrhythmien.....	50
4.5 Mögliche klinische Bedeutung der CaMKII-Inhibition.....	51
5 Zusammenfassung.....	52
6 Literaturverzeichnis.....	53
Publikationsverzeichnis.....	62

Abbildungs-, Tabellen-, Formelverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Der Ablauf des Aktionspotentials in Phasen	S.12
Abb. 1.2: Die elektromechanische Kopplung am Herzen	S.13
Abb. 1.3: Struktur und Aktivierung der CaMKII	S.17
Abb. 1.4: Übersicht der CaMKII-Aktivierung	S.18
Abb. 1.5: Vergleich von WT und TG Herzen bei CaMKII δ c-Überexpression	S.20
Abb. 1.6: Die elektromechanischen Kopplung in Zusammenhang mit der CaMKII δ c	S.21
Abb. 1.7: Frühe Nachdepolarisation (EAD) und späte Nachdepolarisation (DAD)	S.22
Abb. 2.1: Fixierung des Herzens an der Kanüle mithilfe der Bulldog-Klemme	S.25
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der elektrophysiologischen Messung	S.29
Abb. 3.1: Herz- zu Körpergewicht Verhältnis von den WT Tieren zu den TG Mäusen, im Vergleich dazu das Alter der Tiere	S.36
Abb. 3.2.1: Repräsentatives Aktionspotential einer WT Kardiomyozyte und repräsentatives Aktionspotential einer TG Kardiomyozyte mit EAD	S.36
Abb. 3.2.2: Inzidenz von frühen Nachdepolarisationen (EAD) bei transgenen und wildtyp Zellen im Vergleich bei 1 Hz	S.37
Abb. 3.2.3: Zeit bis zum Erreichen der 90 % Depolarisation bei 1 Hz, WT Tiere im Vergleich zu den TG Tieren	S.38
Abb. 3.2.4: Zeit bis zum Erreichen der 90 % Depolarisation bei 0,5 Hz, WT Tiere im Vergleich zu den TG Tieren	S.38
Abb. 3.2.5: Aktionspotentialamplitude bei 0,5 Hz und 1 Hz Herzmuskelzellen aus WT Tieren im Vergleich zu den TG Tieren	S.39

Abb. 3.2.6: Inzidenz von frühen Nachdepolarisationen (EAD) bei transgenen und wildtyp Zellen im Vergleich, sowie EAD-Inzidenz in TG Zellen unter AIP bei 0,5 Hz	S.40
Abb. 3.2.7: Repräsentative unter ISO-Einfluss gemessene Aktionspotentiale mit spontanem Aktionspotential an einer Herzmuskelzelle aus einer CaMKII δ c transgenen Maus	S.41
Abb. 3.2.8 Die Inzidenz von spontanen Aktionspotentialen unter Isoproterenolwirkung beim Wildtyp im Vergleich zum transgenen Mausmodell	S.42
Abb. 3.3.1: Originalregistrierung eines EKGs	S.43
Abb. 3.3.2: Prozentualer Anteil von kardialen Arrhythmien bei den Versuchstieren unter alleiniger Katecholamingabe und nach Injektion von KN-92 bzw. KN-93	S.44
Abb. 3.3.3: Die Herzfrequenz der Tiere und deren Anstieg unter Isoproterenol, sowie der Effekt von KN-92 und KN-93 auf diese	S.44

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Die bei der Mäuseherzisolierung verwendeten Lösungen	S.33
Tab. 2.2.1: Die bei der Patch-Clamp-Technik verwendeten Badlösungen	S.34
Tab. 2.2.2: Die bei der Patch-Clamp-Technik verwendeten Pipettenlösungen	S.34
Tab. 3.1: Herz- zu Körpergewicht Verhältnis	S.35

Formelverzeichnis

Formel 2.1: Herzgewicht zu Körpergewicht Berechnung	S.26
---	------

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIP	Autocamtide 2-related inhibitory peptide
AP	Aktionspotential
APD _{30%}	Aktionspotentialdauer bis 30% Repolarisation
APD _{50%}	Aktionspotentialdauer bis 50% Repolarisation
APD _{80%}	Aktionspotentialdauer bis 80% Repolarisation

APD _{90%}	Aktionspotentialdauer bis 90% Repolarisation
Ca ²⁺ , [Ca ²⁺] _i	Kalziumion, intrazelluläre Kalziumkonzentration
CaM	Calmodulin
CaMKII	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKII δ c	zytosolische Isoform der CaMKII δ
DAD	Delayed Afterdepolarization = späte Nachdepolarisation
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
EAD	Early Afterdepolarization = frühe Nachdepolarisation
HG	Herzgewicht
I _{Ca}	Sarkolemmaler L-Typ Kalziumkanal vermittelter Kalziumeinstrom
I _{Na}	Sarkolemmaler Natriumeinstrom
i.p.	intraperitoneal
ISO	Isoproterenol
KG	Körpergewicht
Na ⁺ , [Na ⁺] _i	Natriumion, intrazelluläre Natriumkonzentration
NCX	Natrium/Kalzium-Austauscher
n.s.	nicht signifikant
PLB	Phospholamban
RyR2	Ryanodin-Rezeptor Typ 2
RT	Raumtemperatur
SERCA2a	SR Ca ²⁺ -ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TG	Transgen
WT	Wildtyp

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Bedeutung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) für die Entstehung von Nachdepolarisationen *in vivo* und ventrikulären Arrhythmien *in vitro* im Herzinsuffizienzmodell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

1 Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist zum heutigen Zeitpunkt eine der am weitesten verbreiteten kardialen Erkrankungen (McMurray und Stewart 2000; Mosterd und Hoes 2007). Laut der Framingham-Studie erkrankt einer von fünf Menschen im Laufe seines Lebens an dieser kardialen Erkrankung (Lloyd-Jones et al. 2002). Aufgrund des demographischen Wandels wird langfristig die Inzidenz der Herzinsuffizienz noch weiter zunehmen, da die Erkrankung gerade in höherem Alter eine erhöhte Prävalenz zeigt (McMurray und Stewart 2000; Mosterd und Hoes 2007).

Die Grundlagenforschung der Herzinsuffizienz in den letzten Jahrzehnte zeigte, dass für die Pathogenese der Herzinsuffizienz unter anderem eine Fehlregulation des Kalziumstoffwechsels mitverantwortlich ist (Neef und Maier 2013). Ursächlich hierfür scheint vor allem eine Störung der Kalziumspeicherung und -Freisetzung aus dem SR zu sein. Darüber hinaus scheint der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKII) eine größere Bedeutung in der Entstehung der ischämischen und dilatativen Kardiomyopathie zuzukommen (Fischer et al. 2013).

Im Rahmen der Herzinsuffizienz kann es sowohl durch ein fortschreitendes Pumpversagen des Herzens, als auch durch das Auftreten von kardialen Arrhythmien zum Exitus letalis kommen. Studien zeigten, dass in ca. 50% der Fälle die Todesursache der Patienten mit einer Herzinsuffizienz kardiale Arrhythmien waren (Packer 1985; Farr und Basson 2004).

Ein Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und einer erhöhten Neigung zu kardialen Arrhythmien konnte bereits an diversen Tiermodellen gezeigt werden (u.a. Wu et al. 2002; Khoo et al. 2006, Wagner et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, zu untersuchen, ob in einem allgemein akzeptierten Herzinsuffizienz-Modell (Maier et al. 2003; Zhang et al. 2003) vermehrt kardiale Arrhythmien vorliegen und die hierfür potentiell ursächlichen Mechanismen zu untersuchen.

In diesem Zusammenhang war es ein Ziel, eine Verbindung zwischen den Ergebnissen auf zellulärer Ebene elektrophysiologisch *in vitro* und dem Organ *in vivo* zu schaffen. Dabei wurden isolierte Kardiomyozyten aus herzinsuffizienten transgenen Tieren auf zellulä-

rer Ebene, und unter vergleichbaren Bedingungen, herzinsuffiziente Tiere mittels *in vivo* EKG-Registrierungen untersucht.

In der Einleitung werden zunächst die Grundlagen der Herzmuskelzelle dargestellt. Weiterhin wird die Entstehung des Aktionspotentials beschrieben und der Begriff der elektromechanischen Kopplung erläutert. Darauf folgt eine Beschreibung des Kalziumstoffwechsels und der CaMKII, sowie der physiologische Funktion der CaMKII im Rahmen der elektromechanischen Kopplung.

Abschließend wird der Zusammenhang der CaMKII-Überexpression mit der Herzinsuffizienz erörtert.

1.1 Die Herzmuskelzelle

Der Herzmuskel besteht, wie alle anderen Muskeln, aus vielen spezialisierten quergestreiften Muskelzellen, den sogenannten Kardiomyozyten. Die Zellmembran dieser wird als Sarkolemm, das Zytoplasma als Sarkoplasma und das endoplasmatische Retikulum einer jeden Herzmuskelzelle als sarkoplasmatisches Retikulum (SR) bezeichnet.

Jeder Muskel kann durch Verkürzung Kraft erzeugen. Dabei ist der Grundstein dieser Funktion die Bewegung der sogenannten Myofilamente gegeneinander. Die Myofilamente selbst sind Proteine, welche den Hauptbestandteil einer jeden Muskelzelle bilden.

Damit es jedoch zu einer gerichteten Erregungsausbreitung und somit regelhaften Kontraktion kommen kann, werden die Kardiomyozyten an den Glanzstreifen über gap junctions untereinander zu einem „funktionellem Synzytium“ zusammengeschlossen (Junqueira und Carneiro 1998).

Das Sarkolemm enthält transversale Einstülpungen die sogenannten T-Tubuli. Aufgrund der tiefen Einstülpungen der T-Tubuli kann das elektrische Signal, das Aktionspotential, in kürzester Zeit in einer Verkürzung der Sarkomere umgesetzt werden. Dies verdeutlicht die enorme Bedeutung der T-Tubuli für die elektromechanische Kopplung.

Anzumerken ist, dass die Kardiomyozyten, wie jede andere Zelle auch, noch eine Reihe von Zellorganellen wie zum Beispiel Lysosomen, Mitochondrien, sowie verschiedenste Proteine anderer Funktion enthalten, welche für die Aufrechterhaltung der Zellphysiologie unerlässlich sind, auf die jedoch in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird (Bers 2001).

1.2 Die elektromechanische Kopplung am Herzen

Das Aktionspotential (AP) ist das elektrische Signal, welches entsteht, wenn eine Herzmuskelzelle stimuliert wird. Der Zusammenhang zwischen der elektrischen Antwort der Zelle, im engeren Sinne dem Aktionspotential, und der mechanischen Antwort der Kontraktion, wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet.

1.2.1 Das ventrikuläre Aktionspotential

Das Ruhemembranpotential von Kardiomyozyten liegt bei ungefähr - 85 mV und entspricht in etwa dem Kalium Gleichgewichtspotential. Wird eine Zelle elektrisch angeregt so verändert sich das Membranpotential. Als Folge dieser Veränderung des Membranpotentials entsteht ein Aktionspotential. Dieses wird am Herzen in Fünf Phasen (siehe Abb. 1.1) eingeteilt (Couchonnal und Anderson 2008). In Phase 0 werden, sobald ein gewisses Schwellenpotential überschritten ist, spannungsabhängige Natrium-Kanäle geöffnet.

Aufgrund der hohen Differenz zwischen intra- und extrazellulärer Natriumkonzentration, kommt es zu einem schnellen Natriumeinwärtsstrom (I_{Na}). Dieser führt zu einer weiteren Depolarisation der Membran. Dies zeigt sich in dem sogenannten „Overshoot“, zu Beginn des Aktionspotentials (Bers 2001). Diese Phase wird auch als Depolarisations- oder Aufstrichphase bezeichnet. Als nächstes öffnen sich transiente auswärtsgleichrichtete Kaliumkanäle („transient outward current“, I_{to}). Die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle (I_{Na}) hingegen werden nach bzw. noch in Phase 0 inaktiv. Die Öffnung der I_{to} wird als Phase 1 des Aktionspotentials bezeichnet, dabei kommt es zu einer kurzen Repolarisation, durch die Inaktivierung der I_{Na} .

In der darauf folgenden Phase 2 kommt es als Folge jener Veränderung des Membranpotentials, zur Öffnung spannungsabhängiger L-Typ-Kalziumkanäle (sogenannte „Dihydropyridin“- (DHP-) Rezeptoren). Kalzium strömt entlang seines elektrochemischen Gradienten in die Zelle ein (I_{Ca}). Dabei ist die Triebkraft für den Kalziumeinstrom geringer als die des Natriums, folglich ist der Kalziumeinstrom langsamer und dauert länger an. In dieser Phase des AP sind zugleich auswärtsgerichtete delayed rectifier-Kaliumkanäle (I_{Ks} und I_{Kr}) geöffnet und halten sich mit dem Kalziumeinstrom die Waage.

Jenes Phänomen entspricht dem Aktionspotentialplateau von 200 - 400 ms, je nach Herzfrequenz und Spezies.

In enger räumlicher Lage zu den L-Typ Kalziumkanälen liegen die sogenannten Ryanodin-Rezeptoren (RyR2), welche als Kalzium Freisetzungs-Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) fungieren. Diese Kanäle werden durch das von außen einströmende Kalzium aktiviert und geöffnet. Als Folge jener Öffnung resultiert ein kalziumgetriggert Kalzium-Ausstrom aus dem SR (Birkeland et al. 2005, Fabiato A und Fabiato F 1975). Die Kalziumkonzentration der Zelle steigt von 100 nM auf Werte von ca. 1 mM (Bers 2001), dieser Anstieg führt zur Aktivierung des Kontraktionszyklus in der Zelle (Blinks 1986).

Aktionspotential

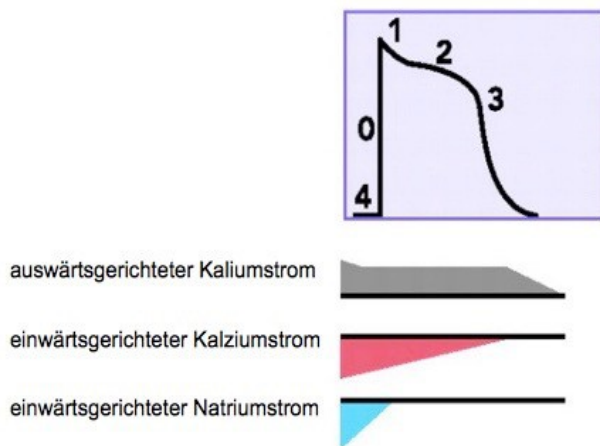


Abb. 1.1 Der Ablauf des Aktionspotentials in Phasen.

Modifiziert nach Couchonnal und Anderson, Seite 153.

Damit die intrazelluläre Kalziumkonzentration absinkt sind vor allem zwei Vorgänge in der Herzmuskelzelle von Bedeutung. Durch eine in der Membran des SR befindliche, ATP-getriebene Kalziumpumpe (SR Ca^{2+} -ATPase oder SERCA2a) kommt es zur aktiven Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen in das SR.

Dieser aktive Vorgang hat eine rasche Abnahme der Kalziumkonzentration zur Folge. Zum anderen wird Kalzium über die Zellmembran in den Extrazellulärraum befördert. Dies geschieht durch eine Ca^{2+} -ATPase und einen Austausch-Carrier innerhalb der Zellmembran, den sogenannten Natrium/Kalzium- Austauscher (NCX).

Dieser transportiert drei Na^{+} -Ionen entlang ihres elektrochemischen Gefälles in die Zelle und im Austausch ein Ca^{2+} -Ion aus der Zelle hinaus. Die Triebkraft für den Natriumein-

strom, ist die niedrigere intrazelluläre Natriumkonzentration. Dieser Gradient wird durch die membranständige Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut, welcher zugleich den Motor des sekundär aktiven Kalziumtransportes in den Extrazellulärraum darstellt. Somit wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration wieder auf Ihren Ausgangswert von ungefähr 100 nM abgesenkt. In dieser Phase des AP nimmt zudem der Kaliumausstrom über die delayed rectifier-Kaliumkanäle aufgrund des elektrochemischen Gradienten zu. Dies entspricht der Phase 3 des Aktionspotentials der Repolarisationsphase (siehe Abb. 1.1).

Als Folge dessen wird das Membranpotential wieder auf Ruhewerte von - 85 mV absinken (siehe Abb. 1.2).

Um das Membranpotential, bis zur Auslösung des nächsten Aktionspotentials auf Ruheni-
veau zu halten, sind in der Phase 4, der Phase des Ruhemembranpotentials des Aktions-
potentials, einwärts gerichtete Kaliumkanäle (inward rectifier channels) aktiv (Birke-
land et al. 2005; Bers 2008).

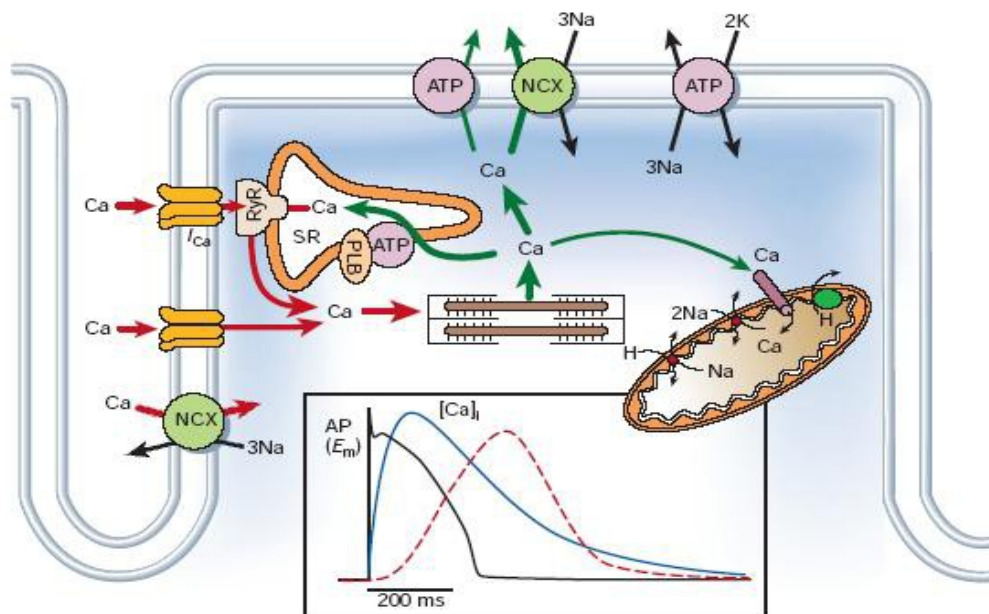


Abb. 1.2 Die elektromechanische Kopplung am Herzen. Kasten: Aktionspotential (schwarz, AP) in Relation zur intrazellulären Kalziumkonzentration (blau, $[\text{Ca}]_i$), so wie die Kontraktion der Zelle (rot gestrichelt). Systolischer Ca^{2+} -Einstrom und die daraus resultierende Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (rote Pfeile), als Antwort auf die zelluläre Erregung durch das Aktionspotential. Diastolischer Rücktransport des Ca^{2+} ins SR (grüne Pfeile).

Modifiziert nach Bers 2002, Seite 200.

1.3 Der Kalziumstoffwechsel der Herzmuskelzelle

In diesem Abschnitt werden die zytoplasmatischen Strukturen sowie dessen Proteine und Signalwege, welche zur Regulation des Kalziumhaushalts beitragen, näher erläutert. Dieses detaillierte Bild der Regulation des Kalziumhaushalts ist notwendig, da die Kalziumkonzentration innerhalb der Zelle eine enorme Bedeutung für die Kontraktion und Relaxation der Herzmuskelzelle hat. Zusammengefasst gilt, dass Kalzium das Bindeglied zwischen elektrischer Zellerregung und mechanischer Kontraktion der Zelle darstellt. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sei darüber hinaus darauf hingewiesen, dass ein insuffizienter Kalziumhaushalt, der sich zum Beispiel in Form eines sogenannten Kalziumlecks zeigen kann (siehe unten) für das Entstehen von kardialen Arrhythmien verantwortlich sein kann (Maier et al. 2003).

Eine irreguläre diastolische Freisetzung von Kalzium aus dem SR kann somit zu unregelmäßigen Ionenverschiebungen bis hin zu kardialen Arrhythmien führen. Dieser Problematik wird, unter anderem, in der vorliegenden Arbeit nachgegangen

1.3.1 Die SR Ca^{2+} -Aufnahme: Das Phospholamban und die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a)

Das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist ein wichtiger Kalziumspeicher der Kardiomyozyten. Die Kontraktionskraft des Myokards ist von der Menge des während der Systole freigesetztem Kalziums abhängig, dies korreliert wiederum mit der Menge des im SR gespeicherten Kalziums. Das SR stellt somit ein bedeutendes Zellorganell für den myokardialen Kontraktionszyklus und den kardialen Rhythmus dar. Es ermöglicht die Kalziumaufnahme während der Diastole und dessen Freisetzung während der Systole. Über eine aktive sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) in der Membran des SR werden Ca^{2+} -Ionen in das SR befördert und in den terminalen Zisternen am luminalen Calsequestrin gespeichert (Bers 2001). Das Phospholamban (PLB), ein kleines Homopentamer, welches sich an der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums befindet, reguliert wiederum die Aktivität der SERCA2a. Jenes geschieht, indem es im dephosphorierten (monomeren) Zustand die SERCA2a, durch Herabsetzen ihrer Kalziumaffinität sowie Erhöhung der mittleren effektiven Konzentration für Kalzium, inhibiert (Bers 2001). Wird das PLB phosphoryliert geht es in eine pentamere Struktur über, womit die Affinität zum regu-

lierendem Protein sinkt. Es kommt zur Abdissoziation des PLB von der SR Ca^{2+} -ATPase und folglich zur Aktivitätssteigerung der SERCA2a.

Die Phosphorylierung des Phospholamban kann über verschiedene Mechanismen und an verschiedenen Stellen des Proteins erfolgen. Kommt es, zum Beispiel physiologischerweise durch Katecholamine, zu einer β -adrenergen Stimulation, so wird PLB (an Serin-16) durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. Des Weiteren kann die Phosphorylierung auch über die Ca^{2+} /Phospholipid-abhängige Proteinkinase C am Serin-10 und über die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) an Threonin-17 erfolgen (Haghighi et al. 2014). Dies ist entscheidend für die Muskelrelaxation während der Diastole und für die Bereitstellung von Kalzium in der Systole.

1.3.2 Die SR Ca^{2+} -Ausschüttung: Ryanodin-Rezeptoren (RyR2)

Die Öffnung der SR Ca^{2+} -Freisetzungskanäle (RyR2) Kanäle wird durch eine steigende intrazelluläre Kalziumkonzentration bedingt. Dies ist eine Besonderheit der Herzmuskelzelle und wird als „ Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release“ bezeichnet (Fabiato 1983). Dafür sind im Wesentlichen die intrazellulär gerichteten Kalzium-Kanäle des L-Tubulus (sogenannte Kalziumstrom oder „ I_{Ca} “) verantwortlich. Die aus der Öffnung dieser Kanäle resultierende erhöhte Kalziumkonzentration aktiviert den Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) der Herzmuskelzelle. Dieser Rezeptor ist ein über Ryanodin hemmbarer, sowie durch Koffein aktivierbarer Rezeptor, der die Aktivität der Ca^{2+} -Freisetzungskanäle des L-Tubulus reguliert. Wie bereits oben erwähnt, kann es im Rahmen eines sogenannten „leckenden“

Ryanodin-Rezeptors zur spontanen, proarrhythmischen Ausschüttung von Kalzium kommen. Ein möglicher Auslöser solch eines SR Ca^{2+} -Lecks stellt, neben einer intrazellulären Kalziumüberladung, auch eine Phosphorylierung der RyR2 an spezifischen Aminosäuren dar. Hauptverantwortlich scheinen hierfür Ser-2808 (PKA-Phosphorylierungsstelle) sowie Ser-2814 (CaMKII-Phosphorylierungsstelle) zu sein (siehe unten).

Dabei ist in humanen Kardiomyozyten die Menge des aus dem SR freigesetzten Kalziums weitaus größer (60-70%) als die durch die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle freigesetzte Menge (30-40%), je nach Spezies und Herzfrequenz (Bers 2001; Maier et al. 2000). Anzumerken ist jedoch, dass die Bedeutung des aus dem longitudinalen System freigesetzten Kalzium in

Mäusemyozyten, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, mit 90 % des systolischen Kalziumaufstrichs weitaus größer ist, als in humanen Myozyten.

1.4 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

Die CaMK ist eine vom Kalzium/Calmodulin-Komplex abhängige multifunktionelle Serin/Threonin Proteinkinase. Sie lässt sich unter anderem in Kardiomyozyten, aber auch in Neuronen nachweisen. Von den vier verschiedene Isoformen der CaMK: I, II, III und IV, wird in dieser Arbeit das Augenmerk auf die Isoform II, welche die vorherrschende Form der CaMK in der Herzmuskelzelle ist, gelegt (Braun und Schulman 1995; Maier und Bers 2007).

1.4.1 Struktur und Aktivierung der CaMKII

Nach heutigem Wissensstand, wird die CaMKII von vier Genen kodiert: α , β , γ und δ . Bei der CaMKII δ liegen wiederum zwei Splicevarianten vor. Die Splicevariante CaMKII δ c als zytosolische Variante, und die CaMKII δ B, welche die Zellkernvariante der CaMKII darstellt (Rokita und Anderson 2012).

Anzumerken ist, dass in Kardiomyozyten die Isoform CaMKII δ , die dominierende Form ist. Ein CaMKII-Monomer, wovon sechs bis zwölf das radartige Holoenzym der CaMKII bilden, besteht aus jeweils drei Domänen.

Die carboxyterminalen Enden dienen der Oligomeration und Enzymassoziation und befinden sich im Zentrum des Holoenzym. Die aminoterminal, katalytische Domäne der CaMKII ragt aus dem radartigen Holoenzym nach außen. Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich der zentral-regulatorische Anteil des Enzyms, welcher einerseits die Bindungsregion des Calmodulins beinhaltet als auch eine autoinhibitorische Funktion ausübt (Erickson 2014).

Das Calmodulin, welches durch die Bindung von vier Kalziumionen, bei steigender intrazellulärer Kalziumkonzentration aktiviert wird, interagiert in der Folge mit der regulatorischen Domäne der CaMKII. Als Folge dieser Interaktion wird der autoinhibitorische Anteil inaktiviert und die außen liegende katalytische Domäne erhält Zugang zu den Zielproteinen.

Somit ist die Kinase aktiviert und kann wiederum über die Phosphorylierung des Threonin-287, der benachbarten CaMKII, diese in eine aktive Form überführen (Zhang und Brown 2004; Mattiazzi et al. 2015).

Das bedeutet das Holoenzym wird durch die benachbarten CaMKII autophosphoryliert. Dies führt zu einer ca. 700 fachen Affinitätssteigerung für Calmodulin (Braun und Schulman 1995; Meyer et al. 1992) wodurch der Calmodulin-Kinase Komplex bis zur vollständigen Aktivierung des Enzyms erhalten bleibt (Maier und Bers 2002).

Parallel dazu kommt es am Threonin-287 zu einer Autophosphorylierung, welche dazu führt, dass eine 20-80-prozentige Aktivierung des Enzyms auch bei Abdiffusion des Calmodulin noch gewährleistet ist (Maier und Bers 2002) (siehe Abb. 1.3).

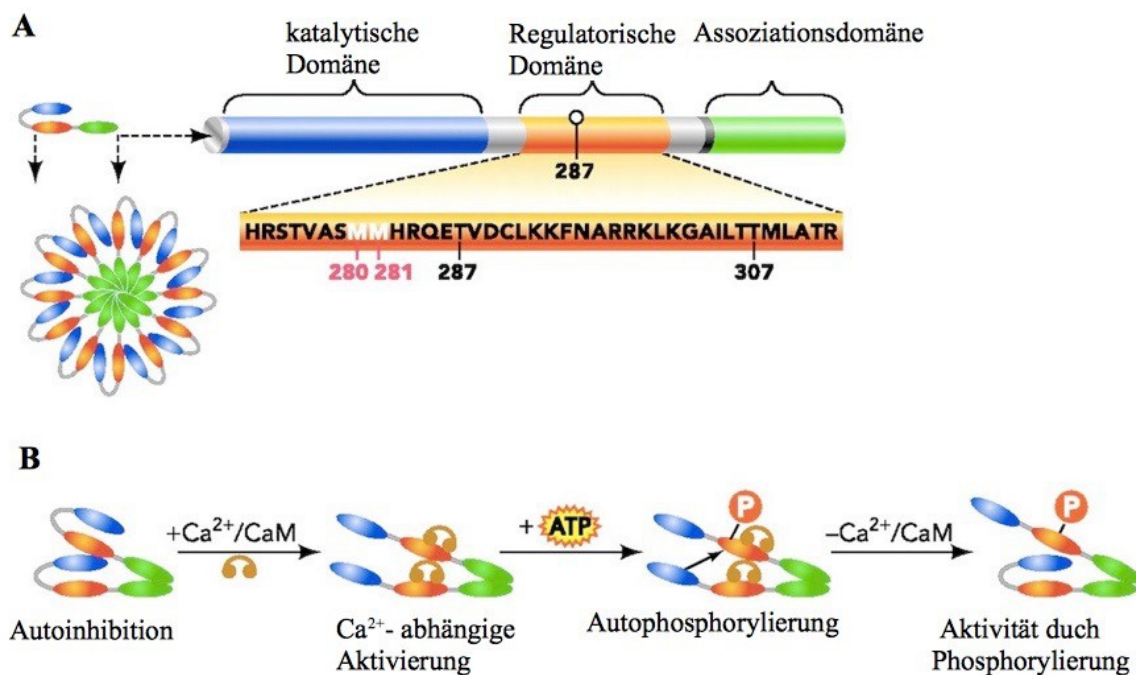


Abb.1.3 Struktur und Aktivierung der CaMKII.

A: Das Monomer, welches aus drei Domänen besteht: Die carboxyterminalen Enden (grüner Kreis), dienen der Oligomerisation und bilden das radartige Holoenzym.

B: An der zentral-regulatorischen Domäne bindet Ca/CaM (Calmodulin) und aktiviert die CaMKII. An Thr-287 erfolgt durch Autophosphorylierung benachbarter CaMKII-Monomere eine Aktivierung, welche eine 20-80-prozentige Aktivität bei Abdiffusion von Ca/CaM gewährleistet.

Modifiziert nach Couchonnal und Anderson, 2008.

Neuere Ergebnisse zeigen außerdem, dass die CaMKII an zwei Aminosäuren in der regulatorischen Domäne oxidiert und somit gleichfalls aktiviert werden kann (Erickson 2014). Außerdem kommt es im Zusammenhang mit akuten Hyperglykämien zu einer O-Glykosylierung an SER-279, welche zu einer Ca^{2+} -Unabhängige Aktivierung der CaMKII führt (Erickson et al. 2013).

Eine weitere mögliche Ca^{2+} -Unabhängige Aktivierung der CaMKII erfolgt durch eine NO vermittelte Nitrosylierung im Rahmen einer β -adrenergen Stimulation (Gutierrez et al. 2013) (siehe Abb. 1.4).

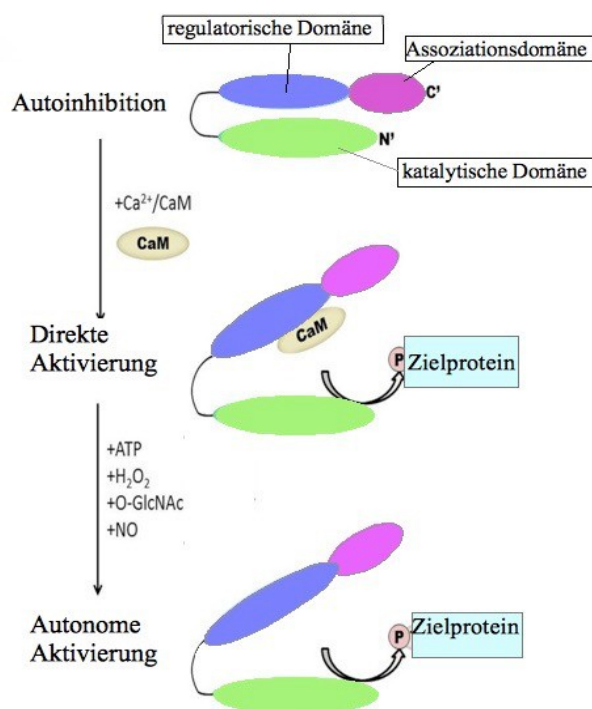


Abb. 1.4 Übersicht der CaMKII-Aktivierung.

Modifiziert nach Erickson, 2014.

1.4.2 Inaktivierung der CaMKII

Physiologischerweise wird die CaMKII durch Dephosphorylierung deaktiviert. Dies geschieht durch diverse Phosphatasen (Zhang und Brown 2004).

Des weiteren gibt es die Möglichkeit, die Aktivität des Enzyms wie in der vorliegenden Arbeit, durch diverse Pharmaka zu unterbinden.

Hierbei verwendeten wir für die Patch-Clamp Untersuchungen den spezifischen CaMKII-Inhibitor AIP (autocamtide-2-related inhibitory Peptide P).

Ein Peptid, welches zwar die CaMKII-Aktivität unterbindet jedoch keinen Einfluss auf weitere Enzyme zu haben scheint. Zudem ist die inhibitorische Potenz des AIP unabhängig vom Kalzium/Calmodulin-Komplex (Ishida et al. 1995).

In den EKG-Registrierungen verwendeten wir ein Methoxybenzenesulfonamid, KN-93. Dieses wirkt jedoch im Gegensatz zu AIP Kalzium-Calmodulin-abhängig, indem es als kompetitiver Antagonist an der regulatorischen Domäne der CaMKII fungiert.

Jedoch konnten Studien zeigen, dass es zu einer suffizienten Inhibition der CaMKII führt (Maier und Bers 2002) und somit die Wirkung der CaMKII auf pathophysiologische Mechanismen unterbunden werden konnte (Anderson et al. 1998).

1.5 Pathophysiologische Vorgänge bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz im Zusammenhang mit der CaMKII

Die kontraktile Dysfunktion, bedingt durch die Überexpression der CaMKII δ c, führt zu einer enormen kardialen Dilatation mit der Folge der Herzinsuffizienz (Zhang et al. 2003).

Weitere Arbeiten zeigten ergänzend, dass nicht nur die Überexpression der zytosolischen Variante, sondern auch die Überexpression der nukleären CaMKII δ B zu einer, nicht ganz so starken, aber dennoch vorhandenen kardialen Dilatation führte (Zhang et al. 2002).

Diese Arbeiten widerlegten die ursprüngliche These von Hoch et al. (1999) und Kirchhefer et al. (1999), welche davon ausgingen, dass die Herzinsuffizienz per se zu einer erhöhten CaMKII Aktivität und Expression führt.

Die Autoren dieser Arbeiten stützten dabei ihre Vermutung darauf, dass die kontraktile Dysfunktion der Myozyten mit der Expression der CaMKII positiv korrelierte. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt zeigten jedoch Maier et al. (2003), dass die erhöhte CaMKII Expression und Aktivität zu einer Hyperphosphorylierung des RyR2 führt, welche wiederum in einem CaMKII-abhängigem Ca²⁺-Leck des SR resultiert. Dieser Kalziumverlust führt im weiteren Kontraktionszyklus zu einem vermindertem Ca²⁺-Transienten und folglich zu einer verminderten Kontraktionskraft, welche sich letztendlich in einer kontraktile Dysfunktion und somit in der Herzinsuffizienz äußert (Maier et al. 2003).

Die Herzinsuffizienz der transgenen CaMKII-überexprimierenden Tiere, zeigte sich nicht nur auf zelluläre Ebene, sondern auch am ganzen Organ, im Sinne einer kardialen Hypertrophie. Es konnte gezeigt werden, dass in den transgenen Tieren (TG), der Herz- zu Körpergewicht - Quotient fast doppelt so groß war wie in gleichaltrigen wildtyp Tieren (WT), damit kann dieser Quotient als Maß für die Herzinsuffizienz herangezogen werden (Maier et al. 2003; Zhang et al. 2003, siehe Abb. 1.5).



Abb. 1.5 Vergleich von WT und TG Herzen bei CaMKII δ c Überexpression.

Modifiziert nach Zhang et al. , 2002

1.6 Der Einfluss der CaMKII auf die elektromechanische Kopplung

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt wird die CaMKII als Folge der steigenden intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert. Somit kann sie wiederum, in ihrer aktiven Form, weitere Proteine durch Phosphorylierung in Ihrer Aktivität modulieren (Hook und Means 2001).

Zudem wurde gezeigt, dass die CaMKII direkt die transsarkolemmalen L-Typ Ca²⁺-Kanäle (Kohlhaas et al. 2006; Mattiazzi et al. 2015), sowie den Ryanodin-Rezeptor (Currie et al. 2004; Kohlhaas et al. 2006; Maier et al. 2003; Mattiazzi et al. 2015), aber auch die SERCA2a über PLB (Desantiago et al. 2002; Vincent et al. 2014) durch Phosphorylierung moduliert.

Im transgenen CaMKII überexprimierenden Tiermodell, welches für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, führt die CaMKII zu einer Hyperphosphorylierung des RyR2.

Folglich kommt es zu einer vermehrten Öffnung des RyR2, sowie einem vermehrten Kalziumverlust aus dem SR während der Diastole (siehe Abb. 1.6).

Zusammenfassend bewirkt die Überexpression der CaMKII. Ein Ca^{2+} -Leck des SR und somit eine kontraktile Dysfunktion, da während der Systole weniger Kalzium für den Kontraktionszyklus bereit steht (Maier et al. 2003). Ob selbiges Kalziumleck allerdings auch proarrhythmogen wirken könnte, ist bislang unklar und Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

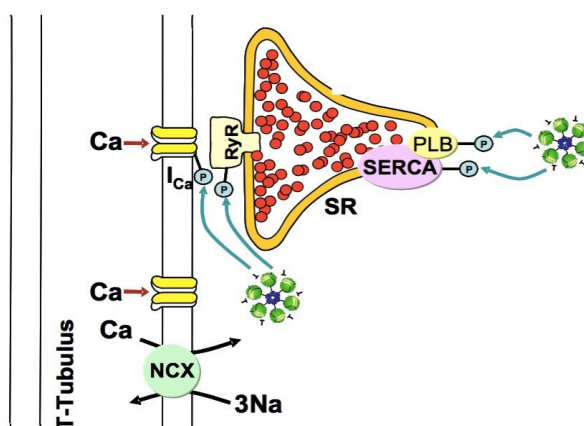


Abb. 1.6 Die elektromechanische Kopplung in Zusammenhang mit der CaMKIIδc:

Die CaMKIIδc wird durch den Anstieg der zytosolischen $[\text{Ca}]_i$ aktiviert. Diese phosphoryliert in der aktiven Form ihre Zielproteine (hellblaue Pfeile). Als Folge wird der intrazelluläre Kalziumstoffwechsel beeinflusst. Modifiziert nach Maier und Bers 2007.

1.7 Das Aktionspotential im Zusammenhang mit der CaMKII

Zusammenfassend gilt, dass die CaMKII durch ihre Aktivität zu einem gesteigerten transmembranösem Kalziumeinstrom (Kohlhaas et al. 2006) führt, folglich nimmt die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu. Als Folge dessen ergibt sich eine erhöhte kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung aus dem SR, welche in einer Zunahme der Aktionspotentialdauer mündet. Unter physiologischen Bedingungen wird die Amplitude des peak I_{Na} zu einem Prozent durch den späten Natriumeinstrom (late I_{Na}) gebildet. Durch die CaMKII kommt es zu einer Erhöhung dieses Anteils (Wagner et al. 2006). Weiterführende Arbeiten konnten zeigen, dass im Rahmen von pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel myokardialen Ischämien der Anteil des late I_{Na} bis zu 5 % des Aktionspotentialauftritts ausmacht. Als

Folge kommt es zu einer erhöhten Natriumüberladung der Zelle, mit dem Resultat einer elektrischen Instabilität und Zunahme der Aktionspotentialdauer (APD) (Sossalla et al. 2008). Durch die erhöhte CaMKII-Aktivität kommt es zu einer Reduktion der auswärtsgerichteten Kaliumströme. Bei mangelnder Kompensationsmöglichkeit ist das Resultat eine positive Ladungsverschiebung in den intrazellulärraum (Maier et al. 2003; Wu et al. 2002). Die erhöhte CaMKII-Aktivität und die Verlängerung der Aktionspotentialdauer wirken sich als prädisponierende Faktoren für die Entstehung von späten Nachdepolarisationen (DAD) und frühen Nachdepolarisationen (EAD) aus (Anderson et al. 1998). Der genaue Pathomechanismus hierfür ist bislang noch nicht geklärt. Es wird diskutiert, ob für die frühen Nachdepolarisationen, der späte Natriumstrom (Burashnikov und Antzelevitch 2006; Undrovinas et al. 2006) verantwortlich ist oder ob es im Rahmen des verlängerten Aktionspotentials zu einer Reaktivierung des Kalziumeinstroms kommt (Wu et al. 1999; Wu et al. 2002; Zeng und Rudy 1995).

Als frühe Nachdepolarisationen gelten dabei Oszillationen im Membranpotential der Zelle, welche in der Repolarisationsphase auftreten, die APD verlängern und kein neues Aktionspotential hervorrufen (Burashnikov und Antzelevitch 2006). Nach Überschreitung eines gewissen Schwellenwerts in der Repolarisationsphase des Aktionspotentials wird ein weiteres Aktionspotential ausgelöst, dieses wird als spätes Aktionspotential (DAD) bezeichnet. Hierzu führen spontane Kalziumfreisetzungen aus dem SR, welche in einer Aktivierung des Natrium-Kalziumaustauschers resultieren und in einem Natriumeinstrom in die Zelle münden (Bers 2002). Diese späten Nachdepolarisationen entsprechen Extrasystolen im Elektrokardiogramm, welche wiederum ein prädisponierender Faktor für kardiale Arrhythmien sein könnten (Burashnikov und Antzelevitch 2006, siehe Abb. 1.7).

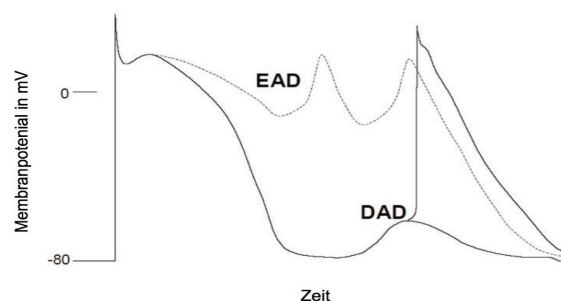


Abb. 1.7 Frühe Nachdepolarisation (EAD) und späte Nachdepolarisation (DAD).

Modifiziert nach Bers 2001, Seite 98.

1.8 Zielsetzung und Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Bedeutung der CaMKII δ c für die Entstehung von Nachdepolarisationen *in vivo* und ventrikulären Arrhythmien *in vitro* im Herzinsuffizienzmodell zu untersuchen. Zusätzlich ist es von besonderem Interesse, ob eine CaMKII-Inhibition zu einem Rückgang möglicher proarrhythmogener Ereignisse führt. Entsprechend wurden in allen Versuchsreihen transgene Tiere mit einer chronischen CaMKII δ c Überexpression und folgender Herzinsuffizienz verwendet, die mit gleichaltrigen gesunden wildtyp Tieren verglichen.

Es ergeben sich somit folgende Fragestellungen:

Chronische CaMKII δ c-Überexpression im transgenen Mausmodell *in vitro*:

1. Gibt es einen Einfluss der transgenen CaMKII δ c-Überexpression im herzinsuffizienten Mausmodell auf das Aktionspotential?
2. Sind die Veränderungen des Aktionspotentials CaMKII-abhängig?
3. Lässt sich durch eine Inhibition der CaMKII die Aktionspotentialmorphologie normalisieren?

Chronische CaMKII δ c-Überexpression im transgenen Mausmodell *in vivo*:

1. Gibt es einen Einfluss einer transgenen CaMKII δ c-Überexpression im herzinsuffizienten Mausmodell auf die Häufigkeit von ventrikulären Arrhythmien?
2. Sind diese Arrhythmien CaMKII-abhängig?
3. Lässt sich durch eine CaMKII-Blockade dieser Effekt rückgängig machen?

2 Methoden

2.1 Herzmuskelzellisolation

2.1.1 Isolation von Herzmuskelzellen aus Mäuseherzen

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden genehmigt (Aktenzeichen Az 33.9.42502-04/088/06+ T15.06, Bezirksregierung Braunschweig) und sind unter Berücksichtigung des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (NIH Publikationsnummer 85-23, 1996 überarbeitet) durchgeführt worden.

In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tierexperimenten wurden WT und TG CaMKII δ c Mäuse verwendet.

Die transgenen Tiere überexprimierten die zytosolische Splicevariante der CaMKII δ c (Zhang et al. 2002; Maier et al. 2003; Wagner et al. 2006).

2.1.2 Versuchsaufbau zur Isolation von Kardiomyozyten aus Mäusemyokard

Die Mäuseherz-Isolation erfolgte an einer Perfusionsanlage nach Langendorff (Langendorff 1895).

Um optimale Bedingungen für das Verdauungsenzym sowie möglichst physiologische Voraussetzungen für die koronare Perfusion zu erzeugen, wurde die Anlage vor Versuchsbeginn zweimal mit der Isolationslösung (siehe Tab. 2.1) gespült und mithilfe eines Wärmebades auf 37°C erwärmt. Die Präparierschale wurde anschließend mit 8 ml, die Isolations-einrichtung mit 50 ml der Isolationslösung gefüllt. Mithilfe einer gewichtsadaptierten Menge des Narkotikums Isofluran (500-900 μ l = 20 μ l/g/KG, Eurim-Pharma Arzneimittel GmbH, Deutschland) konnte das Versuchstier in einer luftdichten Kammer narkotisiert und anschließend durch einen zügigen Genickbruch schmerzlos getötet werden. Darauf folgend wurde der Thorax eröffnet und das Herz nach Absetzen der Gefäße entnommen und so-

fort gewogen. Unter einem binokularen Mikroskop, wurde nach Darstellung der Aorta, diese retrograd kanüliert.

Zur Fixierung der Hauptschlagader an der Kanüle wurde eine Bulldog-Klemme (FST # 18055-05 von Fine Science Tools) sowie ein 3,0 Polyesterfaden (Mersilene EH6483) verwendet.

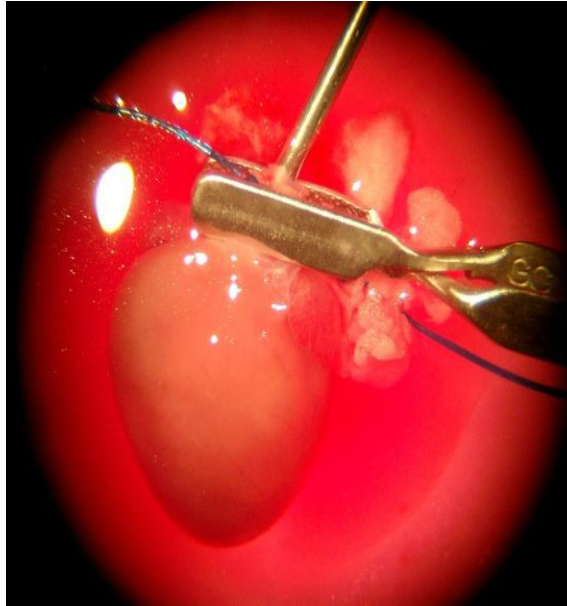


Abb. 2.1 Fixierung des Herzens an der Kanüle mithilfe der Bulldog-Klemme.

Anschließend konnte das isolierte Herz mit einer kalziumfreien Tyrode-Lösung (siehe Tab. 2.1) retrograd perfundiert werden. Dieser Schritt diente der Entfernung des noch in den Koronararterien verbliebenen Blutes.

Im nächsten Schritt sollte die extrazelluläre Matrix aufgelöst werden, um die einzelnen Zellen aus Ihrem Synzytium zu lösen. Im Rahmen dessen wurde das Herz erneut retrograd perfundiert. Die Perfusion erfolgte mit einer Tyrode-Lösung mit einer herzwichtadaptierten Menge des Verdauungsenzyms Liberase (7,5 mg/ml Liberase 1, Roche Diagnostik, Mannheim, Germany), Trypsin 0,6 % und 0,125 nM CaCl_2 (siehe Tab. 2.1).

Als Ergebnis des erfolgreichen Verdauungsvorgangs wurde das Herz transparenter und nahm an Volumen zu. Ursächlich hierfür ist die Auflösung der extrazellulären Matrix.

Als Folge zeigte sich eine Beschleunigung der Perfusionsgeschwindigkeit, bis nach ca. 9 Minuten das Herz abgehängt und zerkleinert werden konnte. Anschließend wurde das Herz zerschnitten und in der Verdauungslösung belassen. Nach weiteren 5 Minuten konn-

te das nun in seine zellulären Bestandteile aufgelöste Mäuseherz durch einen Filter gegeben werden (Nylongaze Porendurchmesser von 200 μm) um die gröberen Überstände zu trennen und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt werden. Nachdem sich die Kardiomyozyten am Boden des Röhrchens abgesetzt hatten, konnte der Überstand der Verdauungslösung abgetragen werden und der Kalziumaufbau schrittweise stattfinden.

Dabei wurde die Kalziumkonzentration der Zellslösung in vier Schritten mit jeweils 7 min Inkubationszeit, von 0,125 mM über 0,25 mM und 0,5 mM auf

1 mM $[\text{Ca}]_i$ erhöht. Die daraus entstandene Zellsuspension war nun bereit für die Messung.

2.1.3 Erhebung biometrischer Daten

Nach der Isolation des Herzens wurde mithilfe einer Feinwaage (Sartorius) das Herzgewicht (in mg) bestimmt. Aus dem Kadavergewicht des Tieres, welches zum Herzgewicht addiert wurde ergab sich das Körpergewicht. Somit konnte hieraus das Herz-zu Körpergewicht Verhältnis des Versuchstieres bestimmt werden.

Das Herz-zu Körpergewicht Verhältnis der Mäuse, diente als Maß des herzinsuffizienzassoziierten Remodellings, das mit einer Gewichtszunahme des erkrankten Herzens einhergeht. Im Rahmen dieser Arbeit sollten TG CaMKII δ c Mäuse untersucht werden, die ein erhöhtes Herz-zu Körpergewicht Verhältnis als Ausdruck der Herzinsuffizienz vorwiesen.

Formel 2.1 $\text{Herzgewicht zu Körpergewicht (mg/g)} = \text{Herzgewicht(mg)} : (\text{Kadavergewicht(g)} + \text{Herzgewicht(g)})$

2.2 Messung von Aktionspotentialen an isolierten Kardiomyozyten mittels Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht es, Ströme über die Membran intakter Zellen hinweg zu messen. Neher und Sakmann haben diese Technik auf dem heutigen Stand weiterentwickelt.

2.2.1 Zum Prinzip der Whole-cell Voltage-Clamp-Technik

Die Aktivität von Ionenkanälen in der Zellmembran führt zu elektrischen Impulsen (Strömen und Spannungen), die mittels der Patch-Clamp-Technik gemessen werden können. Dazu wird eine feine Glaspipette mit einem Überdruck direkt an die Zelle herangeführt. Im Anschluss wird durch einen negativen Druck an der Pipette ein kleines Membranstück (Patch) aus der Zellmembran angesaugt. Dabei muss der Widerstand, den die Glaspipette mit der Zellmembran bildet, im Gigaohm-Bereich liegen (Hamill et. al 1981). Das so entstandene „Giga-Seal“ (aus dem englischen seal = Dichtung) führt wiederum dazu, dass einzelne Kanäle abgeschirmt werden können (on-cell-Konfiguration). Durch weiteres Ansaugen der Membran wird jenes Areal aus der Zelle entfernt („rupture“). Es entsteht damit eine Verbindung zwischen Pipette und Zellinnerem: die whole-cell-Konfiguration. Der Intrazellulärraum und das Pipetteninnere bilden eine Einheit, welche durch einen sehr hohen Abdichtungswiderstand von der Außenlösung (Badlösung) isoliert ist. Dieses ermöglicht es, die transmembranöse Spannung (current-clamp-Konfiguration) beziehungsweise Ströme (voltage-clamp-Konfiguration) über die Zellmembran hinweg zu messen.

2.2.2 Elektrophysiologische Messung von Aktionspotentialen mittels Patch-Clamp-Technik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Spannungen, sogenannte Aktionspotentiale, unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik gemessen und aufgezeichnet.

Um unerwünschte Bewegungen der Pipette zu verhindern, war ein schwingungsgedämpfter Tisch notwendig. Auf diesem befand sich ein inverses Mikroskop (Nikon Eclipse, Tokyo), welches von einem geerdeten Faraday'schen Käfig umgeben war. Dieser Käfig ver-

hinderte, dass elektromagnetische Schwingungen die Messungen beeinträchtigten. Des Weiteren gehörte ein Verstärker (EPC 10 von HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) zum Messplatz. Dieser Verstärker bestand aus einem Vorverstärker, welcher die Spannung registrierte und zudem als Erdung der Badelektrode fungierte. Der Verstärker beinhaltete gleichzeitig einen Hauptverstärker, der die Signale, die vom Vorverstärker ausgingen, nochmals filterte und verstärkte.

Darüber hinaus bildete der Hauptverstärker die Verbindung zum PC. Dies beinhaltete den AD/DA Wandler, der die analogen Signale in digitale umwandelte, sowie die Steuer- und Stimulationseinheit.

Damit konnte eine Verbindung zwischen Computer und Verstärker hergestellt werden. Die Verbindung zwischen Vorverstärker und Pipette wurde durch den Pipettenhalter, in welchem sich ein chlorierter Silberdraht befand, hergestellt.

Ein Mikromanipulator diente zur Steuerung dieser Pipette und wurde über den Rechner gesteuert, dies erfolgte mit Hilfe der Software POS2.1 und der Steuereinheit MIM4 von HEKA Electronics.

Der PC diente, sowohl der Steuerung der Pipette, als auch der Datenaufnahme und Speicherung. Dabei wurde das HEKA EPC 10 Patch-Clamp-Setup (Heka Electronics Inc., Lambrecht, Germany) als Datenverarbeitende Software verwendet. Die Datenspeicherung erfolgte mittels des Programms PATCHMASTER 2.0 von HEKA Electronics.

Die Pipetten wurden mit einem Pipetten-Puller (DMZ Universal Puller, Zeitz Puller GmbH, München) aus Glasfilamenten (350 pcs. borosilicate glass capillaries, 1.2 mm O.D. X 0.94 mm I.D., World Precision Instruments, Sarasota, USA) vor jedem Versuch in ihre Form gezogen („pulling“). Zu beachten war es hierbei einen möglichst optimalen Pipettenwiderstand von ca. 3 M Ω durch die Form der Pipette zu erlangen. Unmittelbar vor Benutzung wurden die Pipetten mittels Einfüllhilfen (Microfil / World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) mit zusätzlichem vorgeschaltetem Filter (Filtropur / Sarstedt AG, Porengröße 0,2 μ m) befüllt. Dies diente der Vermeidung von Verschmutzungen und Verstopfen der Pipette.

Um Messungen bei 37 °C durchzuführen bestand der Messplatz zusätzlich aus einer Heizung, die gleichzeitig als Zulauf für die verschiedenen Lösungen fungierte.

2.2.3 Versuchsdurchführung und Versuchsprotokoll

Auf Superperfusionskammern, deren Glasboden zur Zellfixierung mit 1-2 μl des Proteins Laminin (Gibco, Grand Island, NY) benetzt wurde, wurden ca. 500 μl der Zellösung ausplattiert. Nach 15 Minuten Adhäsionszeit im Inkubations-schrank (37°C bei 5% CO_2), wurde die Kammer in die Halterung auf dem Objektisch des Mikroskops eingesetzt. Die Heizung, sowie die Absaugung wurden auf der Kammer justiert (siehe Abb. 2.2). Der Zulauf mit der Superperfusionslösung (siehe Tab. 2.2.1) stellte den ersten Schritt des Messprotokolls dar. Nach 10 Minuten war gewährleistet, dass der nicht fixierte Zellüberstand ausgewaschen war und die Messung begonnen werden konnte.

Die Badelektrode wurde hierfür an einer beliebigen Seite der Kammer in die Lösung getaucht und fixiert.

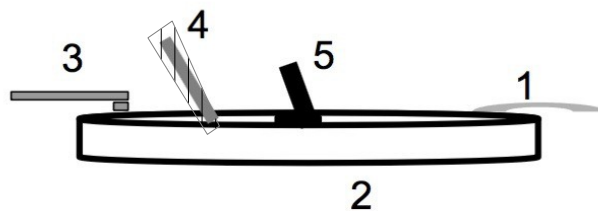


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der elektrophysiologischen Messung:

Kammer (2) mit beheiztem Zulauf (3) und Absaugung (1), über diese wird die Lösung zugeführt und abgesaugt, so dass eine Superperfusion entsteht. Desweiteren Pipette mit chloriertem Silberdraht (4) und Badelektrode (5).

Als nächstes wurde die Pipette mit der Pipettenlösung (siehe Tab. 2.2.2) befüllt und fest in die Halterung eingespannt. Um ein kontinuierliches Austreten der Pipettenlösung gewährleisten zu können, sowie ein Verstopfen der Pipettenöffnung zu vermeiden, wurde ein geringer Überdruck auf die Pipette gegeben.

Mithilfe des Mikromanipulators wurde die Pipette in die Badlösung getaucht und der initiale Pipettenwiderstand bestimmt.

Unter Sichtkontrolle wurde nun die Spitze an die gewünschte Kardiomyozyte herangefahren. Diese Bewegung musste unmittelbar vor der Zelle gestoppt werden. Die weitere An-

näherung an die Zielzelle erfolgte ab diesem Zeitpunkt unter Kontrolle des Messsignals. Durch weiteres Heranfahen an die Zelloberfläche erhöhte sich der Pipettenwiderstand am Bildschirm. Durch Ablassen des Überdruckes konnte das Gigaseal erzeugt werden.

Auf dem Bildschirm ergab sich als Resultat eine gerade Stromlinie, mit kleinen kapazitiven Artefakten am Anfang und am Ende. Um diese Artefakte auszugleichen wurde in den on-cell-Modus gewechselt. Um das Potential der ganzen Zelle abzuleiten musste ein leichter, ruckartiger Unterdruck an der Pipette erfolgen.

Damit das Signal auch weiterhin korrekt abgeleitet wurde, war es jetzt von Nöten, in den whole-cell Modus zu wechseln.

Nach ungefähr drei Minuten, in denen ein ausreichender Austausch zwischen Pipettenflüssigkeit und Zytoplasma stattfand, konnte die Messung der Aktionspotentiale beginnen.

Dabei war es erforderlich, in den current-clamp Modus zu wechseln. In diesem Modus konnte der Strom vorgegeben werden, so dass das Membranpotential bei allen Myozyten in ungefähr dem gleichen Bereich (ca. -70 mV) lag.

Im Rahmen des Versuchsprotokolls wurden Aktionspotentiale bei 0,5 und 1 Hz gemessen. Dabei musste ein Stimulationsimpuls, mit einer je nach Zelle variablen Amplitude und Dauer, generiert werden.

Es erfolgte jeweils die Aufzeichnung von 10 Aktionspotentialen in einer Messreihe an ein und derselben Zelle. Infolge dessen, durfte es während eines Messzyklus zu keiner Manipulation bei der Stimulation oder an der Zelle selbst kommen.

Nach erfolgreicher Messung der Aktionspotentiale unter Normalbedingungen (Messlösung ohne Zusätze) konnte daraufhin ein Messzyklus mit einer Messlösung mit Isoproterenol (ISO) (siehe Tab. 2.2.1) erfolgen.

Hierzu wurde die Superfusion Normaltyrode beendet und durch eine Superfusion mit der Isoproterenol-Lösung ersetzt. Bei diesem Schritt waren 5 Minuten Inkubationszeit notwendig um einen langsamen aber vollständigen Austausch der Lösung sicherzustellen. Nach erfolgreichem Austausch der die Zelle umgebenden Lösung, konnte an der gleichen Zelle ohne jegliche Manipulation am System, erneut Aktionspotentiale bei 0,5 und 1 Hz gemessen werden.

Wichtig war es, bei der Messung unter Verwendung der Isoproterenol-Lösung, dass die Tyrode-Lösung vor Lichteinfluss geschützt wurde, da die in der Lösung befindliche Ascorbinsäure durch das Licht zerfallen und die Tyrode-Lösung unbrauchbar gemacht hätte.

Aufgrund dieser Tatsache fanden alle Messungen unter Verwendung der Isoproterenol-Lösung in einem abgedunkelten Raum bei Rotlicht statt.

Die Messung der Aktionspotentiale mit dem CaMKII-Inhibitor AIP musste jeweils an einer neuen Zelle durchgeführt werden, da sich das AIP in der Pipettenlösung befand. Auch hier erfolgte die Versuchsdurchführung wie oben mit der Normaltyrode-Lösung beschrieben.

2.3 Datenauswertung

Die Verarbeitung der gemessenen Aktionspotentiale erfolgte zunächst direkt an der Messanlage.

Die Daten wurden gesichtet und verwertbare Messungen ausgewählt, dies erfolgte mit dem schon zur Datenaufnahme verwendeten Programm. Die Messdaten wurden weiter, mit Hilfe eines zusätzlichen Programms (ABF File Utility v2.1.75 by Justin Lee) konvertiert, so dass diese nun in einer Excel-Datei dargestellt und gespeichert werden konnten.

Des Weiteren wurden die Aktionspotentiale durch das Programm gemittelt. Der Mittelwert, der ein durchschnittliches Aktionspotential der Zelle darstellte, wurde in eine weitere Excel-Datei überführt. In dieser war es nun möglich alle Zeit- und Amplituden-Werte abzulesen.

Erneute Depolarisationen des Membranpotentials, welche mindestens 10 % der Aktionspotentialgesamtamplitude erreichte und noch vor Ende der vollständigen Repolarisation auftraten, wurden als EADs gewertet.

Entstand eine erneute Depolarisation hingegen nach vollständiger Repolarisation und es entstand hieraus ein erneutes, spontanes Aktionspotential, so wurde dies als DAD gewertet.

2.4 EKG Messungen in vivo

Die in vivo Ableitungen der Mäuse-EKGs erfolgten in Kooperation mit der AG von Prof. Dr. med. Sebastian Maier am Universitätsklinikum in Würzburg. Es handelte sich dabei um eine Methode zur Ableitung eines EKGs, im Rahmen derer ausschließlich TG Mäuse verwendet wurden. Selbige wurden zunächst mit einer körperrgewichtsadaptierten Menge einer 2,5 prozentigen Avertinlösung narkotisiert. Nach Überprüfung der Reflexlosigkeit als Zeichen der suffizienten Narkotisierung wurden zwei kleine Nadeln (Octopolar EP Cathe-

ter 1.1F, Scisense), die mit zwei zu einem Spannungsdetektor (Powerlab 16/30; AD Instruments) führenden Kabeln verbunden waren, in Höhe der linken bzw. rechten Axilla der Mäuse vorsichtig subkutan platziert. Mittels eines Konvertierungsprogrammes (Chart 7.3.1, ADInstruments) ließen sich die so gewonnenen Signale dann auf einem Computer als Spannungen und somit als EKG-Signal (einem Äquivalent der 1. Ableitung im Standard-EKG) darstellen. In der Folge wurde dann ein „Ruhe-EKG“ abgeleitet, welches für mindestens 5 Minuten aufgezeichnet wurde.

Anschließend wurde den Mäusen 2 mg/kg/KG ISO i.p. (intraperitoneal) gespritzt (gegebenfalls unter vorheriger intraperitonealer Injektion des CaMKII-Inhibitors KN-93 bzw. dessen inaktiver Kontrollsubstanz KN-92 (je 20 µmol/L/kg)). Das EKG wurde dann für weitere 20 Minuten aufgezeichnet und im Anschluss hinsichtlich etwaiger Arrhythmien in den Gruppen ausgewertet. Es gilt zu betonen, dass die Untersuchungen mit den CaMKII-Inhibitoren jeweils nach einer 24h-stündigen Ruhephase, in denen sich die Mäuse von der vorherigen Untersuchung erholen konnten, an derselben Maus durchgeführt wurden, so dass die Wirkung des CaMKII-Inhibitors direkt an einer Maus demonstriert werden konnte.

2.5 Statistik

Die Daten wurden mithilfe des Standardfehlers des Mittelwerts (englisch Standard Error of the mean, SEM) ausgewertet. Zudem wurde der Student's t-test für die Abbildung 3.3.2 und für alle weiteren Abbildungen der Fisher 2-sided Exact Test angewendet. Die hierfür verwendeten Programme waren SigmaPlot oder GraphPad Prism.

Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

2.6 Lösungen

Zu 2.1 Isolation von ventrikulären Zellen aus Mäusemyokard

Verwendete Isolationslösungen sowie Verdauungsenzyme

Lösung	Ion/ Substanz	Konzentration	
Tyrode-Lösung ohne Kalzium	NaCl	113 mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,4 bei RT
	KCl	4,7 mmol/l	
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,2 mmol/l	
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0,6 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
	Glukose	5,5 mmol/l	
	Taurine	30 mmol/l	
	KHCO ₃	10 mmol/l	
	NaHCO ₃	12 mmol/l	
	KH ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0,6 mmol/l	
	2,3 – butanedione	10 mmol/l	
Phenol Rot	0,032 mmol/l		
Tyrode-Lösung mit Kalzium	CaCl ₂	0,125 mmol/l	gelöst in Tyrode-Lösung ohne Kalzium; pH 7,4 bei RT
Enzymlösung	Liberase 1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)	7,5 mg/mL	gelöst in Tyrode-Lösung mit Kalzium; pH 7,4 bei RT
	Trypsin	0,6 %	

Tab. 2.1 Die bei der Mäuseherzisolierung verwendeten Lösungen
(ddH₂O = zweifach destilliertes Wasser).

Zu 2.2 Messung von Aktionspotentialen an isolierten Kardiomyozyten mittels Patch-Clamp-Technik

Verwendete Badlösung sowie Lösung für die Messung von Nachdepolarisationen

Lösung	Ion/ Substanz	Konzentration	
Badlösung	NaCl	135 mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,4 bei RT
	KCl	5,4 mmol/l	
	MgCl ₂	1 mmol/l	
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0,33 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
	Glukose	10 mmol/l	
	CaCl ₂	1 mmol/l	
Isoproterenol- lösung	Isoproterenol	10 ⁻⁸ M	gelöst in Badlösung bei RT
	Ascorbinsäure	50 mg/l	

Tab. 2.2.1 Die bei der Patch-Clamp-Technik verwendeten Badlösungen (ddH₂O = zweifach destilliertes Wasser).

Für die Pipette verwendete Lösungen:

Lösung	Ion/Substanz	Konzentration	
Pipettenlösung	K- Aspartatic Acid	120 mmol/l	bei RT; pH 7,2 mit KOH
	KCl	8 mmol/l	
	NaCl	7 mmol/l	
	MgCl ₂	1 mmol/l	
	Mg – ATP	5 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
Pipettenlösung mit AIP	AIP	0,1 µmol/l	gelöst in Pipettenlösung bei RT

Tab. 2.2.2 Die bei der Patch-Clamp-Technik verwendeten Pipettenlösungen

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung des Herz- zu Körpergewicht Verhältnisses von transgenen CaMKII δ c-überexprimierenden Mäusen

Das Herz- zu Körpergewicht Verhältnis der CaMKII δ c-Mäuse zeigte sich im Gegensatz zu dem der Wildtyp-Kontrolltiere um das ca. 1,7-fache größer, obwohl die Tiere der Kontrollgruppe (Wildtyp) signifikant älter waren (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.1).

Folglich wiesen die transgenen Tiere, trotz des geringeren Lebensalters, ein erhöhtes Herz- zu Körpergewicht auf, welches auf die Assoziation von CaMKII-Expression und Herzinsuffizienz-Entstehung hindeutete und mit Voruntersuchungen übereinstimmte (u.a. Zhang et al. 2003).

	WT	CaMKII δ c	p
Herzgewicht (in mg)	338 \pm 18	436 \pm 53	n.s.
Körpergewicht (in g)	28,4 \pm 1,7	26,0 \pm 1,9	n.s.
Herzgewicht/ Körpergewicht (in mg/g)	8,0 \pm 0,5	13,4 \pm 0,3	<0,05
Alter (in Wochen)	18,7 \pm 1,3	14,5 \pm 0,8	<0,05

Tab. 3.1 Herz- zu Körpergewicht Verhältnis. Die transgenen CaMKII δ c Mäuse (n=43) zeigten im Vergleich zu den WT Mäusen (n=26) signifikant erhöhte Werte des Herz- zu Körpergewicht Verhältnisses (in mg/g) auf, dies deutete auf eine Herzhypertrophie in der Gruppe der transgenen Tiere hin (n.s. = nicht signifikant).

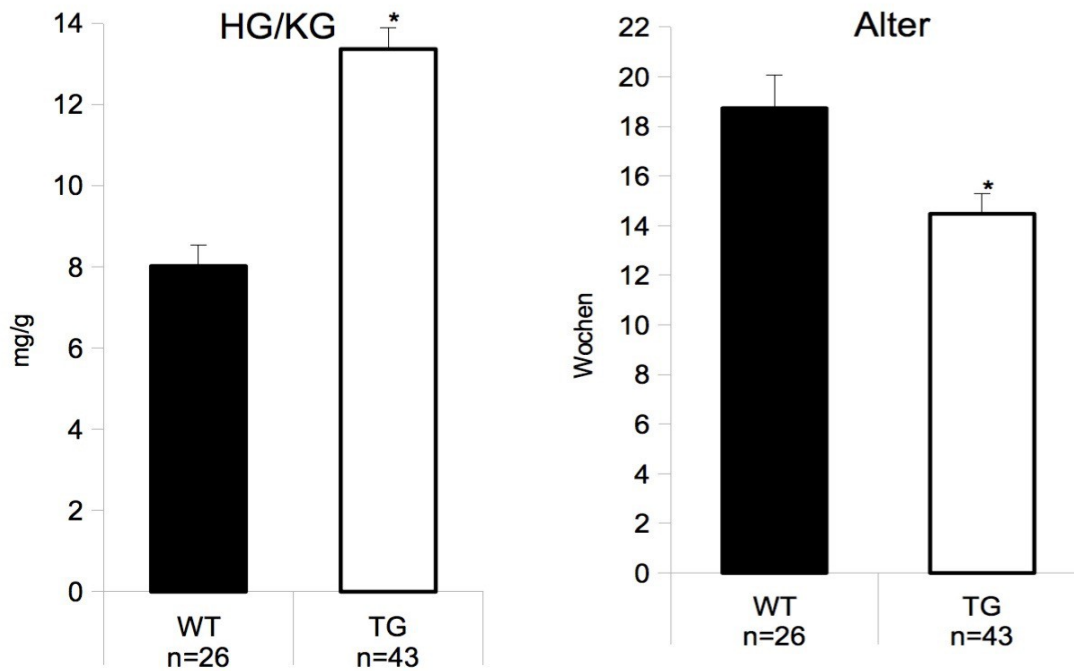


Abb. 3.1 Herz- zu Körpergewicht Verhältnis von den WT Tieren zu den TG Mäusen, im Vergleich dazu das Alter der Tiere (* = $p < 0,05$).

3.2 Einfluss einer transgenen CaMKII δ c-Überexpression auf die Aktionspotentialmorphologie von Kardiomyozyten

In diesem Teil der Versuchsreihe sollte verdeutlicht werden, dass eine CaMKII δ c-Überexpression zu einer morphologischen Veränderung des Aktionspotentials der Kardiomyozyten führte (siehe Abb.3.2.1).

Aktionspotential WT und Aktionspotential TG



Abb. 3.2.1 Repräsentatives Aktionspotential einer wildtyp Kardiomyozyte (links) und repräsentatives Aktionspotential einer transgenen Kardiomyozyte mit EAD (rechts).

Bei den Messungen mit Stimulationsfrequenzen von 1 Hz (siehe Abb.3.2.2) zeigten sich an den 15 untersuchten transgenen Tieren mit 30 Zellen und den 661 daraus abgeleiteten Aktionspotentialen 55 frühe Nachdepolarisationen. Hingegen wurden in den 14 Kontrollherzen mit 24 untersuchten Zellen und 456 abgeleiteten Aktionspotentialen, lediglich 13 EADs registriert ($p < 0,05$).

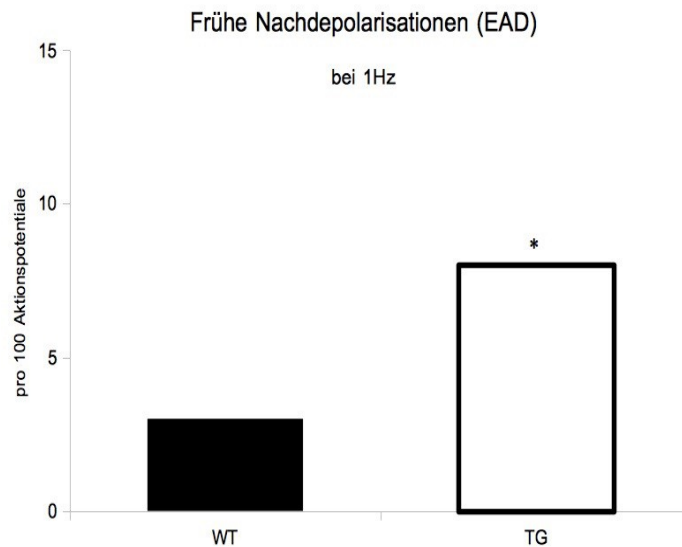


Abb. 3.2.2 Inzidenz von frühen Nachdepolarisationen (EAD) bei transgenen und wildtyp Zellen im Vergleich bei 1 Hz (* = $p < 0,05$).

Des Weiteren zeigte sich auch bei 0,5 Hz ein signifikanter Unterschied in der EAD-Inzidenz der transgenen Tiere im Gegensatz zu den wildtyp Tieren. Es ergaben sich bei 0,5 Hz 44 EADs in 227 AP aus 31 transgenen Tieren zu 4 EADs in 150 AP gemessen aus 25 Wildtypherzen ($p < 0,05$) (siehe Abb.3.2.6).

Aber auch in der grundlegenden Aktionspotentialstruktur unterschieden sich die transgenen Herzen vom Wildtyp. So wurde ein Anstieg der Zeit bis zum Erreichen der 90 % Repolarisation (APD 90) in den CaMKII δ c-überexprimierenden Zellen beobachtet. Die Zeit bis zum Erreichen der APD 90 betrug im transgenen Modell 29,6 +/- 3,2 ms (0,5 Hz, 22 Myozyten) bzw. 26,7 +/- 2,8 ms (1 Hz, 26 Myozyten), zum Vergleich 18,7 +/- 2,8 ms (0,5 Hz, 9 Myozyten, $p < 0,5$) und 15,5 +/- 1,6 ms (1 Hz, 10 Myozyten) im Wildtyp (siehe Abb. 3.2.3 und 3.2.4).

Ergebnisse

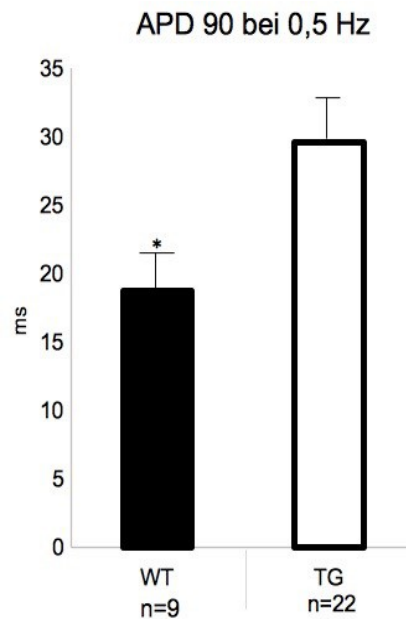


Abb. 3.2.3 Zeit bis zum Erreichen der 90 % Depolarisation bei 0,5 Hz, WT Tiere im Vergleich zu den TG Tieren (* = $p < 0,05$).

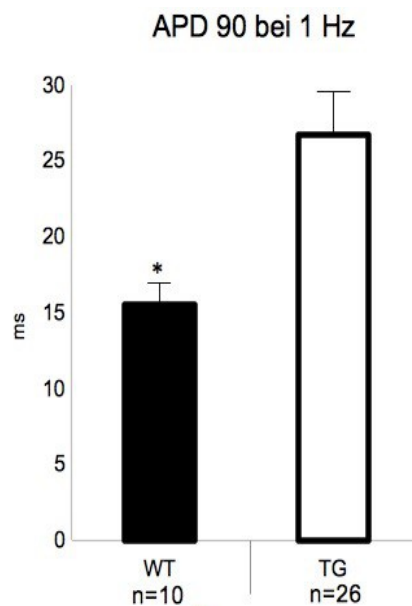


Abb. 3.2.4 Zeit bis zum Erreichen der 90 % Depolarisation bei 1 Hz, WT Tiere im Vergleich zu den TG Tieren (* = $p < 0,05$).

Bei der Auswertung der Aktionspotentialdauer wurde in beiden Gruppen lediglich die APs ohne EADs berücksichtigt. Dies gewährleistete, dass auch unabhängig von den frühen Nachdepolarisationen, die Aktionspotentialdauer verglichen werden konnte.

Ergebnisse

Die Aktionspotentialamplitude in den beiden Gruppen unterschied sich jedoch nicht signifikant: 117,4 +/- 2,1 mV (0,5 Hz) und 119,5 +/- 2,7 mV (1 Hz) bei CaMKII-Überexpression, im Gegensatz zu 114,7 +/- 3,7 mV (0,5 Hz, $p = 0,5$) und 116,5 +/- 2,8 mV (1 Hz, $p = 0,53$) im Wildtyp (siehe Abb. 3.2.5). Dies zeigte, dass bei den transgenen Myozyten, trotz gleicher Amplitude des Aktionspotentials, die Repolarisationsphase länger andauerte und somit die gesamte Aktionspotentialdauer verlängert war (siehe Abb. 3.2.3 und 3.2.4).

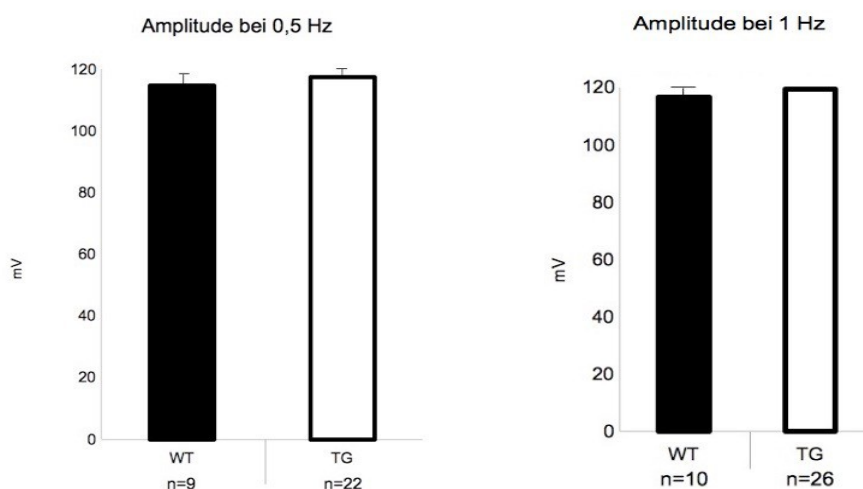


Abb. 3.2.5 Aktionspotentialamplitude bei 0,5 Hz und 1 Hz Herzmuskelzellen aus WT Tieren im Vergleich zu den TG Tieren.

3.2.1 Effekte einer CaMKII δ c-Inhibition mittels AIP auf die Aktionspotentiale in transgenen CaMKII δ c-überexprimierenden Kardiomyozyten

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde überprüft, ob die Inhibition der CaMKII δ c einen Einfluss auf die Inzidenz der frühen Nachdepolarisationen im transgenen Tiermodell hat. Dabei zeigte sich durch die Inhibition der CaMKII δ c mittels AIP eine signifikante Reduktion der registrierten EADs (0 EADs in 140 AP aus 7 Zellen aus 7 Mäusen).

Daraus ließ sich schließen, dass die CaMKII δ c die Entstehung früher Nachdepolarisation trotz vorhandener Herzinsuffizienz maßgeblich begünstigt (siehe Abb. 3.2.6).

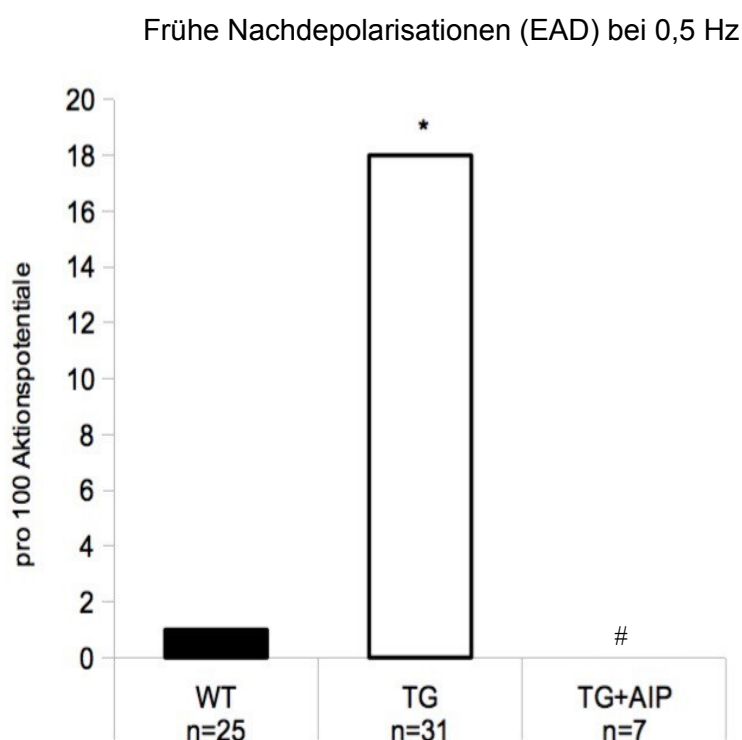


Abb. 3.2.6 Inzidenz von frühen Nachdepolarisationen (EAD) bei transgenen und wildtyp Zellen im Vergleich, sowie EAD-Inzidenz in TG Zellen unter AIP bei 0,5 Hz.

(* = $p < 0,05$ TG vs. WT, # = $p < 0,05$ TG vs. TG + AIP).

3.2.2 Die Auswirkung der CaMKII δ c-Überexpression auf das Auftreten von spontanen Aktionspotentialen

In einem weiteren Versuchsteil sollte der Einfluss der CaMKII δ c-Überexpression auf das Auftreten von spontanen verspäteten Aktionspotentialen (DADs) untersucht werden. Da sich unter „nicht-stimulierten Standardbedingungen“ bei 0,5 und 1 Hz jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, was mutmaßlich an einer bekanntermaßen geringeren SR Ca²⁺-Beladung in der transgenen Gruppe lag (Maier et al. 2003), entschieden wir uns in einem nächsten Schritt das Auftreten von DADs unter ISO-Stimulation zu untersuchen. Die ISO-Stimulation diente dazu, die SR Ca²⁺-Speicher in beiden Gruppen mit Kalzium zu beladen, um so ein mögliches SR Ca²⁺-Leck aufzudecken.

3.2.3 Die Auswirkung der CaMKII δ c-Überexpression auf das Auftreten von spontanen Aktionspotentialen unter Isoproterenol

Aus anderen Arbeiten ist hervorgegangen, dass die CaMKII δ c-Überexpression zu vermehrten Kalzium-Sparks führt was zu einer Verringerung des Kalziumgehaltes des SRs führt (Maier et al. 2003).

Dies ließ die Annahme zu, dass die freigesetzte Kalzium-Menge unter physiologischen Bedingungen nicht ausreichend war, um zu der Entstehung von verzögerten Aktionspotentialen zu führen. Somit erfolgte eine weitere Messreihe der spontanen Aktionspotentiale unter ISO Einfluss, dessen Konzentration den pathophysiologischerweise erhöhten Katecholamin-Spiegel im Rahmen der Herzinsuffizienz glich.

Zu erwähnen ist, dass eine Vielzahl von Zellen bereits während des Einwaschens von Isoproterenol in den Zelltod gingen, was die Toxizität von ISO unter diesen Bedingungen verdeutlicht.

Trotz der Komplexität dieses Versuchsprotokolls, war es möglich, eine ausreichend große Anzahl von Zellen zu messen, um statistisch verwertbare Aussagen zu treffen .

Wie in Abb. 3.2.8 gezeigt traten unter ISO-Einfluss in der transgenen Gruppe mit 23,6% signifikant häufiger DADs auf, als in der Gruppe der Herzen ohne CaMKII-überexpression mit 8,1% ($p < 0,05$).

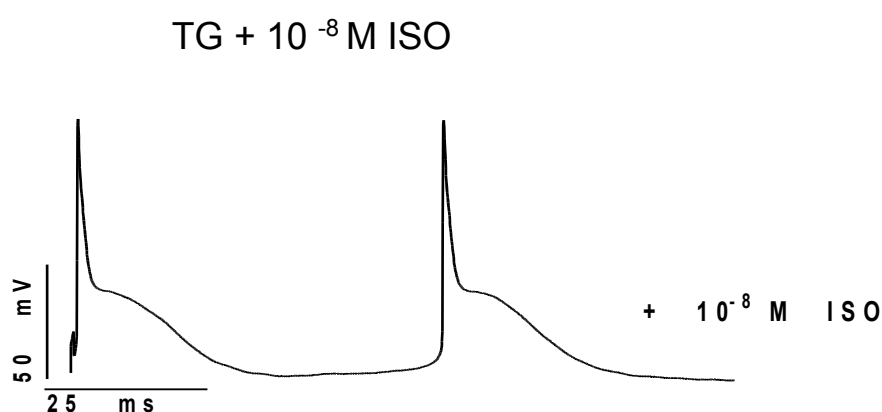


Abb. 3.2.7 Repräsentative unter ISO-Einfluss gemessene Aktionspotentiale mit spontanem Aktionspotential an einer Herzmuskelzelle aus einer CaMKII δ c transgenen Maus.

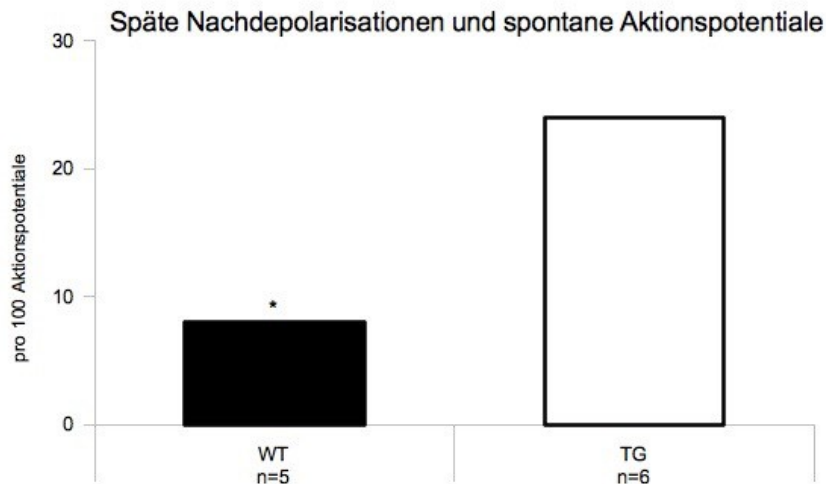


Abb.3.2.8 Die Inzidenz von spontanen Aktionspotentialen unter Isoproterenolwirkung beim Wildtyp im Vergleich zum transgenen Mausmodell (* = $p < 0,05$).

3.3 Die Auswirkung der CaMKII δ_c -Überexpression auf das Auftreten von kardialen Arrhythmien *in vivo* unter Isoproterenol

Gerade im lebenden Ganztier erschien der Einfluss von Isoproterenol als besonders bedeutend. Somit wurde die Rolle der CaMKII δ_c -Überexpression *in vivo* unter Isoproterenoleinfluss als Ergänzung in dieser Arbeit untersucht, um die auf zellulärer Ebene erhobenen Daten auf ihre Übertragbarkeit auf das gesamte Organ „Herz“ zu prüfen. Für die *in vivo* Untersuchungen wurden herzinsuffiziente transgene Mäuse verwendet. Dabei erfolgte jeweils die gesamte Versuchsreihe (ISO, ISO + KN-92, ISO + KN-93, siehe Abb. 3.3.1) an ein und demselben Tier an unterschiedlichen Versuchstagen. Bei den transgenen Tieren ließen sich unter alleinigem Isoproterenoleinfluß, als auch nach Zugabe von ISO zusammen mit KN-92, kardiale Arrhythmien aufzeichnen (siehe Abb. 3.3.1 mitte). Diese sind jedoch nach Gabe des CaMKII δ_c -Inhibitors KN-93 nicht mehr zu beobachten gewesen (siehe Abb. 3.3.1 unten).

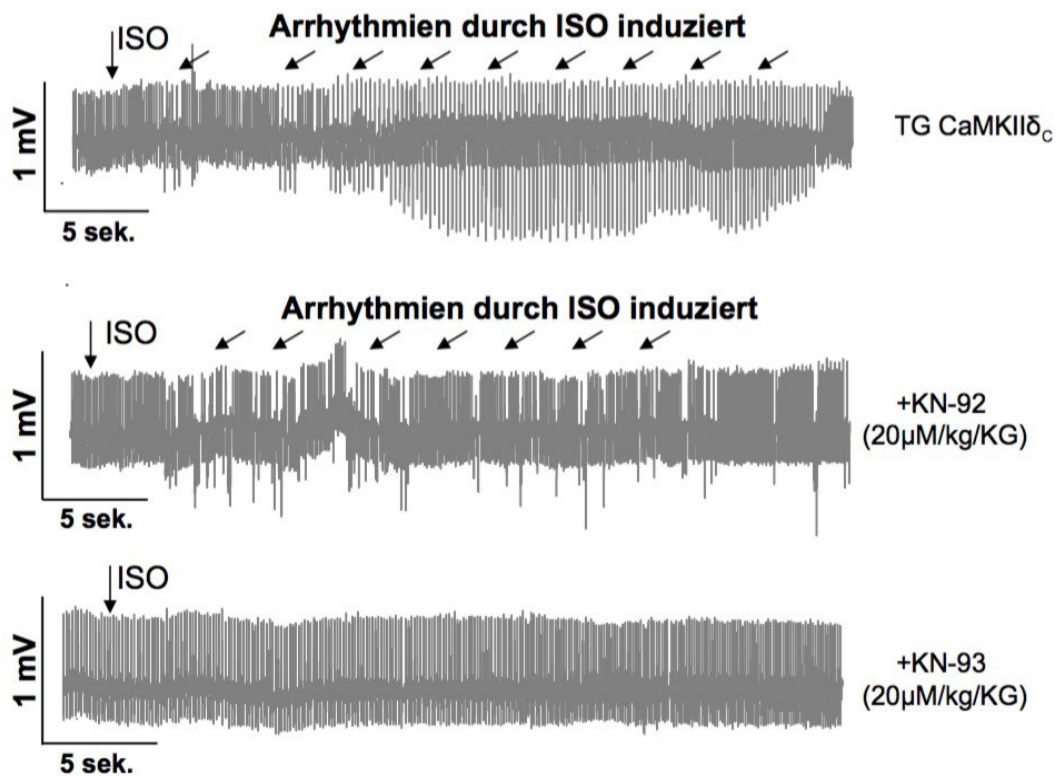


Abb. 3.3.1 Originalregistrierung eines EKGs.

Oben: EKG des transgenen Tieres mit Isoproterenol-induzierten kardialen Arrhythmien.

Mitte: EKG des selben Tieres und Ausbleiben einer Inhibition der kardialen Arrhythmien durch KN-92.

Unten: EKG des selben transgenen Tieres und Inhibition der kardialen Arrhythmien durch Zugabe von KN-93.

Keine der untersuchten 4 Mäuse, welche mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 behandelt wurden, zeigten kardiale Arrhythmien. Hingegen wiesen alle EKGs (6 von 6) der nur mit ISO behandelten transgenen Mäuse in den ersten zehn Minuten Arrhythmien auf ($p < 0,05$ mittels Fisher's exact test). Zwar führt die KN-92 Gabe auch zu einem tendenziellen Rückgang des Auftretens von Rhythmusstörungen, jedoch zeigten sich diese Zahlen nicht signifikant (siehe Abb. 3.3.2).

Ergebnisse

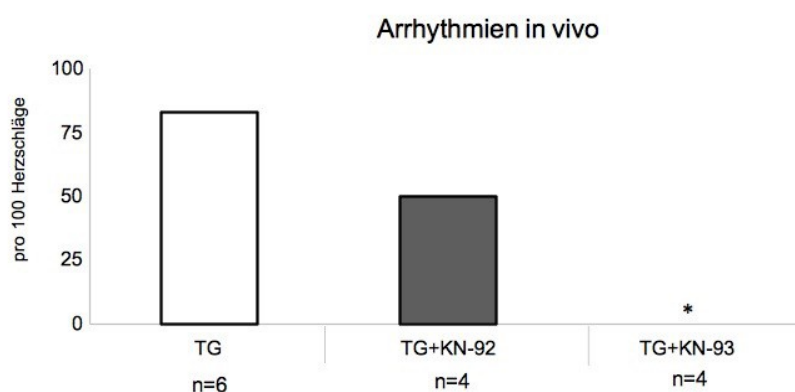


Abb. 3.3.2 Prozentualer Anteil von kardialen Arrhythmien bei den Versuchstieren unter alleiniger Katecholamingabe und nach Injektion von KN-92 bzw. KN-93 (* = $p < 0,05$ mittels Fisher's exact test).

Um zu gewährleisten, dass trotz KN-92 bzw. KN-93 Gabe der Isoproterenol-Effekt nicht moduliert wird, dient der Anstieg der Herzfrequenz nach Isoproterenolgabe als Marker für den erfolgreichen Katecholamineinfluss.

Die Herzfrequenz war in allen drei Gruppen nach Katecholamingabe nahezu gleich angestiegen (siehe Abb. 3.3.3). Somit ist sichergestellt, dass nicht ein Ausbleiben der ISO-Wirkung in der KN-93-Gruppe für dessen antiarrhythmische Wirkung verantwortlich ist.

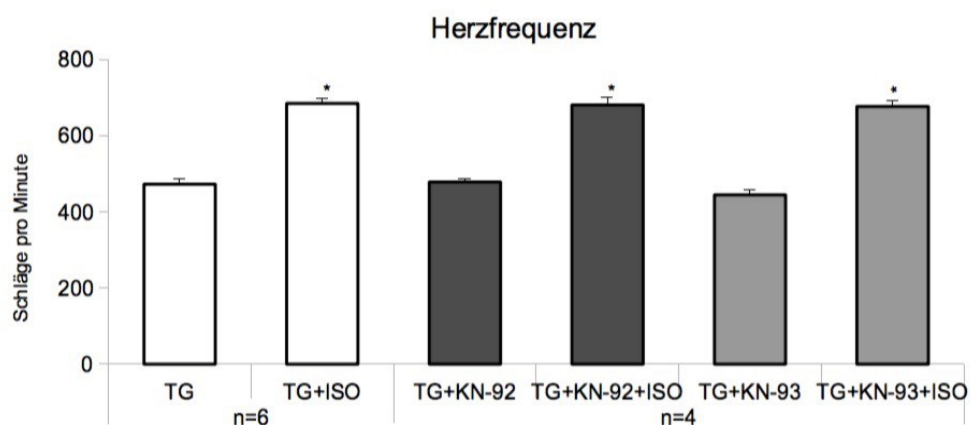


Abb. 3.3.3 Die Herzfrequenz der Tiere und deren Anstieg unter Isoproterenol, sowie der Effekt von KN-92 und KN-93 auf diese (*= $p < 0,05$ vs. ohne ISO).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung der CaMKII δ c für die Entstehung von kardialen Arrhythmien in CaMKII δ c-überexprimierenden herzinsuffizienten Mäuserzen, die als ein Modell des insuffizienten Herzens fungieren.

Eine erhöhte CaMKII δ c-Aktivität erzielt Veränderungen der Aktionspotentialmorphologie (siehe Kapitel 3.2) und der Ca²⁺-Beladung des SRs (Maier et al. 2003).

Hauptbefund dieser Arbeit ist jedoch, dass die Inhibition der CaMKII δ c sowohl *in vitro* (siehe Kapitel 3.2.1) als auch *in vivo* (siehe Kapitel 3.3) zur Verringerung der arrhythmiefördernden Ereignisse geführt hat. Jener Effekt hebt die Bedeutung der CaMKII δ c für das Entstehen von kardialen Arrhythmien während der Herzinsuffizienz hervor.

Die Inhibierung der CaMKII δ c *in vivo* und damit die Reduzierung der Rhythmusstörungen könnte damit einen neuen Ansatz in der Therapie von kardialen Arrhythmien im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz darstellen.

In diversen Arbeiten wurde schon gezeigt, dass die Überexpression der CaMKII δ c im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz steht (Maier et al. 2003). Auch die Rolle der CaMKII δ c an der Entstehung von kardialen Arrhythmien wurde bereits in anderen Arbeiten vermutet (Wagner et al. 2006).

In den transgenen Tieren ist die CaMKII δ c-Aktivität in etwa dreimal höher, als in vergleichbaren wildtyp Mäusen (Zhang et al. 2003). Dies entspricht annähernd dem Aktivitätsanstieg der CaMKII δ c, welcher im menschlichen herzinsuffizienten Herzen beschrieben wurde (Kirchhefer et al. 1999 und Hoch et al. 1999). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Versuchstieren zeigte sich im transgenen Modell ein 1,7-fach größeres Herz-zu Körpergewicht Verhältnis, welches auf eine kardiale Hypertrophie hindeutete (siehe Kapitel 3.1). Folglich kann die transgene CaMKII δ c-Maus nicht nur als Modell für erhöhte CaMKII δ c Aktivität, sondern auch als ein pathophysiologisches Modell der Herzinsuffizienz betrachtet werden.

Jedoch wurde in keiner der vorherigen Arbeiten der Pathomechanismus welcher zu der Entstehung von kardialen Arrhythmien bei CaMKII δ c-Überexpression zugrunde liegt, geklärt.

Somit konnte sowohl die CaMKII δ c-Überexpression selbst, als auch die Herzinsuffizienz der Tiere, als Ursache der beobachteten kardialen Arrhythmien angesehen werden (Wagner et al. 2006).

Für die Herzinsuffizienz als Ursache der Arrhythmien ließe sich insbesondere anbringen, dass es durch diese zu einer veränderten Expression von im Kalziumstoffwechsel involvierten Proteinen führt (Maier et al. 2003 und Wagner et al. 2006).

4.1 Die erhöhte CaMKII δ c-Aktivität führt zu einer erhöhten Inzidenz von frühen Nachdepolarisationen in vitro

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die erhöhte CaMKII δ c-Aktivität in transgenen Tieren zu einem gehäuften Auftreten von Arrhythmien auf zellulärer Ebene führt.

In der Patch-Clamp Versuchsreihe konnten wir unter Standardbedingungen eine erhöhte Inzidenz der EADs im transgenen Modell feststellen. Es zeigten sich bei 1 Hz in 8 % der transgenen untersuchten Herzen EADs. Dagegen ließen sich nur in ca. 3 % der wildtyp Herzen EADs nachweisen ($p < 0,05$, siehe Kapitel 3.2, Abb. 3.2.3). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch, bei 0,5 Hz, dort wurde in 19 % der AP aus den transgenen Herzen EADs registriert, demgegenüber sich im Wildtyp nur in 3 % EADs zeigten (siehe Kapitel 3.2). Dies deckt sich mit der Arbeit von Anderson et al. 1998, in der das Phänomen der frühen Nachdepolarisationen schon in ähnlicher Weise beschrieben worden ist.

In anderen Arbeiten wurde aufgezeigt, dass die CaMKII δ c-Überexpression durch ihren Einfluss auf den L-Typ Ca²⁺-Kanal zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer führt (Maier et al. 2003, Kohlhaas et al. 2006; Grandi et al. 2007). Die verlängerte Dauer des Aktionspotentials schien eine entscheidende Wirkung für die vermehrte Entstehung von EADs in den transgenen Herzen zu haben (Anderson et al. 1998 und Wu et al. 2002). Dabei wird vermutet, dass ein reduzierter Kaliumausstrom und ein kontinuierlicher Kalzium- und Natriumeinstrom, welche die Zelle über einen längeren Zeitraum depolarisieren, zu einer verlängerten Aktionspotentialdauer führt (Thomsalli und Zipes 2004). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, dass sich eine verlängerte Aktionspotentialdauer in den CaMKII δ c-überexprimierenden Zellen bestätigen ließ. So zeigte die transgene Gruppe eine signifikante Verlängerung der APD 90 bei 0,5 und 1 Hz (siehe Kapitel 3.2, Abb. 3.2.4 und 3.2.5).

In der Arbeit von Anderson et al. (1998) und Bers (2003), wurde zudem beschrieben, dass das Auftreten von EADs durch die Verwendung von Kalziumantagonisten gesenkt werden konnte. Die oben erwähnten Arbeiten zeigten bereits eine CaMKII-abhängige Häufung von EADs. Weiterhin blieb die Frage unzureichend geklärt, ob die CaMKII δ c-Überexpression oder die Herzinsuffizienz ursächlich für die Entstehung von kardialen Arrhythmien war.

Einen spannenden Aspekt dazu zeigte die Arbeit von Mazur et al. (1999). In dieser führte die Inhibition der Calmodulinkinase zu einer Abnahme von Torsade-de-pointes Arrhythmien. Wir vermuteten folglich, dass die frühen Nachdepolarisationen auf zelluläre Ebene die Ursache dieser in vivo gezeigten Arrhythmien darstellten.

In den Patch-Clamp Untersuchungen zeigten wir, dass es durch die Verwendung des CaMKII-Inhibitors AIP zu einer signifikanten Verringerung der registrierten EADs kam. In den mit AIP behandelten transgenen Kardiomyozyten konnten keine EADs mehr nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.1, Abb. 3.2.6).

Als möglichen Pathomechanismus konnten wir vor allem die Tatsache in Betracht ziehen, dass die CaMKII δ c modulierende Effekte auf den Kalzium-Strom des L-Typ-Ca²⁺-Kanals besitzt (Maier et al. 2003; Kohlhaas et al. 2006), so dass eine Reduktion von kardialen Arrhythmien in vitro und demzufolge dann auch in vivo, aus der Blockade der CaMKII δ c resultiert.

4.2 Die erhöhte CaMKII δ c-Aktivität führt zu einer erhöhten Inzidenz von frühen und späten Nachdepolarisationen in vitro

Wie zuvor beschrieben zeigten die Aktionspotentialmessungen unter Basalbedingungen ein erhöhtes Auftreten von arrhythmiefördernden Ereignissen, im Sinne von EADs bei den TG-Tieren (siehe Kapitel 3.2.1, Abb. 3.2.6). Jedoch konnten kaum DADs und spontane Aktionspotentiale unter Basalbedingungen beobachtet werden (siehe Kapitel 3.2.2). Diese hätte man, aufgrund des in Zusammenhang mit der CaMKII-Überexpression beschriebenen Kalzium-Leaks des SRs, vermuten können (Maier et al. 2003; Kohlhaas et al. 2006; Guo et al. 2006). Bedingt durch eine CaMKII-abhängige Hyperphosphorylierung des RyR2 konnte im transgenen CaMKII δ c- Mausmodell ein Kalziumleck des SR nachgewiesen werden, welches in einem erniedrigten SR-Kalziumgehalt mündet (Maier et al. 2003).

Diese Kalzium-Sparks konnten bereits in anderen Arbeiten durch die Behandlung von Kaninchenmyozyten mit dem Inhibitor AIP reduziert werden (Currie et al. 2004).

Um eine erhöhte Kalziumbelastung des SRs zu erzielen und somit diesen Effekt der CaMKII auf Aktionspotentialebene zu zeigen, wurden die Zellen in der vorliegenden Arbeit unter dem Einfluss von Isoproterenol untersucht. Dies simuliert die bei der Herzinsuffizienz gesteigerte Sympathikusaktivierung mit folglich erhöhten Katecholaminspiegeln. In Folge der β -adrenergen Stimulation werden durch Proteinkinasen (PKA) Proteine phosphoryliert, welche maßgeblich an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind (Bers 2002).

Die Anwendung von ISO (bei einer Konzentration von 10^{-8} M) führte zu einer erhöhten Inzidenz von späten Nachdepolarisationen und spontanen Aktionspotentialen in den transgenen Zellen hier zeigte sich in ca. 24 % DADs, wohingegen sich nur in ca. 8 % der WT DADs registrieren ließen ($p < 0,05$, siehe Kapitel 3.2.3, Abb. 3.2.8).

Nach Wu et al. 1999 führt die Verwendung von Isoproterenol zu einem einwärtsgerichteten Ausgleichstrom während der Diastole. Weiterhin wird von jenen Autoren aufgezeigt, dass der Natrium-Kalzium Austauscher für diesen einwärtsgerichteten Ausgleichstrom verantwortlich ist. Bewiesen wurde diese Vermutung durch den Rückgang der Rhythmusstörungen unter Verwendung von XIP (einem Inhibitor des NCX). Im weiteren Verlauf zeigten Wu et al. (1999), dass die Kalziumfreisetzung durch das SR zur Entstehung von Arrhythmien beiträgt. Zudem führt die β -adrenerge Stimulation, durch die CaMKII vermittelt, zu einer Phosphorylierung des RyR2 (Ferrero et al. 2007). Bereits andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass das diastolische Kalziumleck durch Katecholamineinfluss CaMKII-vermittelt ist (Curran et al. 2007). Neuere Ergebnisse von Curran et al. (2014) zeigten zudem, dass es nach β -adrenerger Stimulation mittels ISO, zu einer NO-vermittelten Aktivierung der CaMKII und folglich zu vermehrten Kalzium-Sparks des SRs kommt.

Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe überein. Dort wurde gezeigt, dass die CaMKII δ c-Überexpression zu einer Zunahme des Kalzium-Leaks, im Sinne von Kalzium Sparks führt, welche unter Einfluss von KN-93 oder AIP beziehungsweise durch direkte Blockade des SR-Leaks mit Tetracain gesenkt werden konnten (Maier et al. 2003; Kohlhaas et al. 2006; Sossalla et al. 2010; Fischer et al. 2013).

Weitere Ergebnisse der AG Maier zeigten, dass die Isoproterenolabhängige Zunahme des Kalziumtransienten in den konfokalen Messungen der transgenen Zellen stark gemindert war. Hingegen zeigten sowohl transgene als auch wildtyp Zellen eine ähnliche Zunahme

der Relaxationsgeschwindigkeit unter ISO. Im Gegensatz dazu stieg der diastolische Kalziumgehalt der transgenen Zellen aus CaMKII δ c überexprimierenden Mäusen signifikant bei Katecholaminzugabe, dies zeigte sich in einer verdoppelten Zunahme der Kalzium-Sparks des Sarkoplasmatischen Retikulums, im Gegensatz zu den wildtyp Zellen unter gleichen Bedingungen. Im Weiteren konnte in der Arbeit von Sag et al. (2009) die Abnahme der Kalzium-Sparks unter CaMKII-Inhibition auf das Niveau der wildtyp Zellen gezeigt werden. Um zu beweisen, dass die Abnahme der Kalzium-Sparks direkt von der CaMKII-Inhibition und nicht von der Abnahme der Kalziumbeladung des SR abhängig war, wurden die Zellen zusätzlich mit Koffein behandelt. Dabei zeigte sich eine Zunahme des sarkoplasmatischen Kalziumgehalts, als Resultat konnte das Arrhythmie fördernde Kalzium-Leak ursächlich auf die CaMKII zurückgeführt werden (Sag et al. 2009).

Dieses beschriebene Kalzium-Leak und die daraus resultierenden Kalzium-Sparks stellen die Ursache, der auf der Aktionspotentialebene beschriebenen späten Nachdepolarisationen dar. Folglich decken und ergänzen sich die Erkenntnisse von Sag et al. 2009 mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Auch in der Arbeit von Sag et al. 2009 gelang es erst unter Isoproterenolanwendung (10^{-7} M) späte Kalzium-Leaks (LSNEs) aufzuzeigen, dies wiederum untermauert die in dieser Arbeit erhobenen Daten auf Aktionspotentialebene. In beiden Arbeiten führte der β -adrenerge Einfluss bei den transgenen Zellen zu einem signifikanten Anstieg der arrhythmiefördernden Ereignisse als

LSNEs beziehungsweise DADs.

4.3 Die erhöhte CaMKII δ c-Aktivität führt zu einer Zunahme von kardialen Arrhythmien bei transgenen Versuchstieren

Sowohl in dieser, als auch in anderen Arbeiten zeigten die transgenen herzinsuffiziente Tiere eine erhöhte Inzidenz von kardialen Arrhythmien in vivo (Wagner et al. 2006). Es musste allerdings noch der direkte Zusammenhang zur CaMKII δ c hergestellt werden. Somit sollte aufgezeigt werden, ob die ventrikulären Arrhythmien primär von der erhöhten CaMKII δ c-Aktivität oder ursächlich durch die Herzinsuffizienz der transgenen Tiere bedingt waren (Maier et al. 2003; Wagner et al. 2006; Sag et al 2007).

Um dies nachzuweisen wurde den transgenen herzinsuffizienten Mäusen der CaMKII δ c-Inhibitor KN-93 injiziert. Hier zeigte sich ein signifikanter Rückgang der kardialen Arrhythmien, die zuvor in selbigen Versuchstieren in vivo mittels ISO erfasst wurden. Kein einziges der mit KN-93 behandelten Versuchstiere zeigte kardiale Arrhythmien, wohingegen alle Tiere unter ISO-Einfluss Herzrhythmusstörungen aufwiesen ($p < 0,05$).

Wurde den Tieren jedoch das inaktive KN-92 injiziert, so zeigte sich kein Rückgang der kardialen Arrhythmien (siehe Kapitel 3.3, Abb.3.3.1).

Dies zeigt, dass eine Inhibition der CaMKII-Aktivität, zu einem signifikanten Rückgang der kardialen Ereignisse führt. Dies korreliert mit den Ergebnissen der in vitro Versuchsreihe (siehe Kapitel 3.3).

4.4 Mögliche Bedeutung der CaMKII für die Entstehung von kardialen Arrhythmien

Die CaMKII-Überexpression führt zu einer Herzinsuffizienz (Maier et al. 2003). Zudem zeigt sich bei CaMKII-Überexpression ein vermehrtes Auftreten von kardialen Arrhythmien (Wagner et al. 2006; Wu et al. 2002; Khoo et al. 2006; Said et al. 2008).

Demzufolge wirkt die Inhibition der CaMKII dem kardialen Remodelling, zum Beispiel nach massivem β -adrenergen Einfluss entgegen (Zhang et al. 2005).

In anderen Arbeiten konnte durch Verminderung des CaMKII-Aktivitätslevels das Auftreten von kardialen Arrhythmien gesenkt werden (Wu et al. 2002; Khoo et al. 2006; Said et al. 2008; Said et al. 2011). In diesen Arbeiten wurde die Inzidenz von DADs durch die Verwendung des Inhibitors KN-93 gesenkt.

Sag et al. (2009) zeigten, dass das Korrelat der Arrhythmien in transgenen CaMKII-Überexprimierenden Tieren dem sarkoplasmatische Kalzium-Leak entspricht. Dieses entspricht den DADs auf Aktionpotentialebene, welche sich im EKG als Arrhythmien darstellen. Diese Arrhythmien konnten trotz vorhandener Herzinsuffizienz durch eine CaMKII-Inhibition unterbunden werden (siehe Kapitel 3.3).

Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die CaMKII physiologisch wichtige Funktionen ausübt, wie unter anderem die Erhaltung der Kontraktilität während der Azidose (Sag et al. 2007; Mattiazzi et al. 2007; Desantiago et al. 2004).

4.5 Mögliche klinische Bedeutung der CaMKII-Inhibition

Die Herzinsuffizienz ist eine zunehmende Erkrankung unserer Zeit. Einer der wichtigsten Gründe für die Letalität dieser Erkrankung liegt im Auftreten von kardialen Arrhythmien im Rahmen der Herzinsuffizienz (siehe Kapitel 1). Demzufolge ist die Erforschung der Ursachen zur Entstehung dieser von deutlicher klinischer Relevanz. Es konnte gezeigt werden, dass im Myokard von herzinsuffizienten Patienten eine erhöhte CaMKII-Aktivität und -Expression vorlag. In Untersuchungen aus humanen Zellen bei Vorhofflimmern konnte eine Hyperphosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII ebenso wie ein CaMKII-abhängiges Kalzium-Leak des SRs nachgewiesen werden (Neef et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die in anderen Arbeiten beschriebenen Kalzium-Leaks des SR sich im Aktionspotential als DADs darstellen und den kardialen Arrhythmien in vivo entsprechen. Am bedeutendsten ist jedoch der signifikante Rückgang all jener Ereignisse bei CaMKII-Inhibition (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.3).

Zu beachten ist dennoch, dass Neef et al. (2013) eine verminderte Erholungsfähigkeit von CaMKII δ c-Knockout Mäusen im Rahmen der Azidose zeigten, diese war durch eine insuffiziente SR-Kalzium-Rückaufnahme bei fehlender CaMKII-Aktivität bedingt.

Somit leistet die CaMKII einen essentiellen Beitrag zur Erhaltung der Inotropie im Rahmen der Azidose, zum Beispiel bedingt durch einen Schockzustand. Dies muss beim therapeutischen Überlegungen in der Verwendung von CaMKII-Inhibitoren unbedingt beachtet werden. In neueren Arbeiten zeigten Woods et al. (2016), dass es auch nach einem Herzstillstand mit anschließender Reperfusion, zu einer vermehrten Aktivierung der CaMKII kommt, welche letztendlich in einer kontraktile Dysfunktion mündet.

Eine selektive Inhibition der CaMKII δ c könnte somit perspektivisch ein neuer Ansatz für die Behandlung von kardialen Arrhythmien bei Patienten mit Herzinsuffizienz sein. Dabei stellen die Erkenntnisse aus den Untersuchungen im Rahmen der Azidose mögliche Therapielimitierungen dar. Zudem ist der Langzeiteffekt der CaMKII-Inhibition auf die Herzmuskelzelle noch nicht hinreichend geklärt. Insbesondere ist unklar, wie sich die langfristige CaMKII-Inhibition auf die Herzmuskelzelle auswirkt. Schlussendlich könnte jedoch die Inhibition der CaMKII auf genetischer oder pharmakologischer Ebene einen neuen Therapieansatz in der Behandlung von kardialen Arrhythmien im Rahmen der Herzinsuffizienz darstellen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass im Rahmen der Herzinsuffizienz vermehrt kardiale Arrhythmien aufgrund einer erhöhten CaMKII Aktivität, auftreten. Dabei sind diese direkt CaMKII-abhängig, da sie durch die Inhibition dieser multifunktionalen Proteinkinase rückläufig sind.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die CaMKII auf zellulärer Ebene die Aktionspotentialstruktur in isolierten Kardiomyozyten beeinflusst. Dieser Einfluss äußerte sich im Sinne einer Aktionspotentialverlängerung, sowie dem Auftreten von frühen Nachdepolarisationen und schlussendlich unter Katecholamineinfluss in der erhöhten Inzidenz von späten Nachdepolarisationen.

Die auf zelluläre Ebene erhobenen Daten konnten auf transgene Tiere auf Organebene übertragen werden. Hier äußerte sich als Resultat der veränderten Aktionspotentialstruktur in einem signifikant vermehrtem auftreten von kardialen Arrhythmien bei CaMKII-Überexpression, im Gegensatz zu gleichaltrigen wildtyp Tieren. Durch die Inhibition der CaMKII kam es, sowohl in vivo als auch in vitro, zu einem signifikanten Rückgang der Arrhythmieereignisse.

Somit konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von kardialen Arrhythmien ursächlich durch die erhöhte CaMKII-Aktivität zu Stande kommt und die These widerlegt werden, dass allein die Herzinsuffizienz zu diesen führt. Dies ist vor allem für zukünftige therapeutische Überlegungen auf dem Gebiet der Arrhythmie- Therapie im Rahmen der Herzinsuffizienz unbedingt zu beachten.

6 Literaturverzeichnis

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

Bers DM (2001): *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. 2nd ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands

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

Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH (2003): Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and heart failure: roles of diastolic leak and Ca^{2+} transport. *Circ Res* 93: 487-90

Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I (2005): EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J* 39, 13–23

Blinks J (1986): Intracellular $[Ca^{2+}]$ measurements, *The Heart and Cardiovascular System*, Edited by Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM and Morgan HE. Raven Press, New York, 671-701

Braun AP, Schulman H (1995): A non-selective cation current activated via the multifunctional Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase in human epithelial cells. *J Physiol* 488 (Pt 1), 37–55

Burashnikov A, Antzelevitch C (2006): Late-Phase 3 EAD. A Unique Mechanism Contributing to Initiation of Atrial Fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 29, 290–295

Couchonnal LF, Anderson ME (2008): The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)* 23, 151–159

Curran J, Hinton MJ, Ríos E, Bers DM, Shannon TR (2007): Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res* 100, 391-398

Curran J, Tang L, Roof SR, Velmurugan S, Millard A, Shonts S, Wang H, Santiago D, Ahmad U, Perryman M (2014): Nitric oxide-dependent activation of CaMKII increases diastolic sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes in response to adrenergic stimulation. *PLoS one* 9, e87495

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

DeSantiago J, Maier LS, Bers DM (2002): Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 34, 975–984

DeSantiago J, Maier LS, Bers DM (2004): Phospholamban is required for CaMKII-dependent recovery of Ca transients and SR Ca reuptake during acidosis in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 36, 67–74

Erickson JR (2014): Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Front Pharmacol* 5

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

Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245, C1-14

Fabiato A, Fabiato F (1975): Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249, 469–495

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

Ferrero P, Said M, Sánchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P, Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C. (2007): Ca^{2+} /calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca^{2+} -induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 43, 281-291

Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, Ellenberger D, Forster A, Schmitto JD, Gummert J, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS, Sossalla S (2013): Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in human cardiac pathology. *Circulation* 128, 970–981

Grandi E, Puglisi JL, Wagner S, Maier LS, Severi S, Bers DM (2007): Simulation of Ca-calmodulin-dependent protein kinase II on rabbit ventricular myocyte ion currents and action potentials. *Biophys J* 93, 3835–3847

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

Gutierrez DA, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E (2013): NO-dependent CaMKII activation during β -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 100, 392-401

Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG (2014): Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol* 77, 160–167

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cellfree membrane patches. *Pflügers Archiv Eur. J. Physiol* 391, 85–100

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

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

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

Junqueira LCU, Carneiro J, Kelley RO, Gratzl M (Eds.) (2002): *Histologie: mit 14 Tabellen*, 5., neu übers., überarb. und aktualisierte Aufl. ed, Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin

Khoo MS, Li J, Singh MV, Yang Y, Kannankeril P, Wu Y, Grueter CE, Guan X, Oddis CV, Zhang R (2006): Death, cardiac dysfunction, and arrhythmias are increased by calmodulin kinase II in calcineurin cardiomyopathy. *Circulation* 114, 1352–1359

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

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

Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen, *Pflügers Arch* 61: 291–332

Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D (2002): Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106, 3068–3072

Maier LS (2005): CaMKII δ overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling. *Braz J of Med Biol Res* 38, 1293–1302

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

Maier LS, Bers DM (2007): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73, 631–640

Maier LS, Bers DM, Pieske B (2000): Differences in Ca²⁺-handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2249–2258

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII δ C Overexpression Uniquely Alters Cardiac Myocyte Ca²⁺ Handling Reduced SR Ca²⁺ Load and Activated SR Ca²⁺ Release. *Circ Res* 92, 904–911

Mattiazzi A, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C (2007): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis. *Cardiovasc Res* 73, 648–656

Mattiazzi A, Bassani RA, Escobar AL, Palomeque J, Valverde CA, Vila-Petroff M, Bers DM (2015): Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308, H1177-1191

Mazur A, Roden DM, Anderson ME (1999): Systemic administration of calmodulin antagonist W-7 or protein kinase A inhibitor H-8 prevents torsade de pointes in rabbits. *Circulation* 100, 2437–2442

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

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

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

National Research Council: GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS (1996)

Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010): CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 106, 1134-1144

Neef S und Maier LS (2013). Novel aspects of excitation-contraction coupling in heart failure. *Basic Res Cardiol* 108, 360

Neef S, Sag CM, Daut M, Bäumer H, Grefe C, El-Armouche A, DeSantiago J, Pereira L, Bers DM, Backs J, Maier LS (2013): While systolic cardiomyocyte function is preserved, diastolic myocyte function and recovery from acidosis are impaired in CaMKII δ -KO mice. *J Mol Cell Cardiol* 59, S. 107-116

Neher E, Sakmann B (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802

Packer M (1985): Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation* 72, 681–685

Rokita AG, Anderson ME (2012): New therapeutic targets in cardiology: arrhythmias and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII). *Circulation* 126, 2125–2139

Sag CM, Dybkova N, Neef S, Maier LS (2007): Effects on recovery during acidosis in cardiac myocytes overexpressing CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 43, 696–709

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

Said M, Becerra R, Palomeque J, Rinaldi G, Kaetzel MA, Diaz-Sylvester PL, Copello JA, Dedman JR, Mundina-Weilenmann C, Vittone L (2008): Increased intracellular Ca²⁺ and SR Ca²⁺ load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H1669–H1683

Said M, Becerra R, Valverde CA, Kaetzel MA, Dedman JR, Mundina-Weilenmann C, Wehrens XH, Vittone L, Mattiazzi A (2011): Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol* 51, 936–944

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J (2010): Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107, 1150–1161

Sossalla S, Wagner S, Rasenack EC, Ruff H, Weber SL, Schöndube FA, Tirilomis T, Tenderich G, Hasenfuss G, Belardinelli L (2008): Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts-role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *J Mol Cell Cardiol* 45, 32–43

Undrovinas AI, Belardinelli L, Undrovinas NA, Sabbah HN (2006): Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17 Suppl 1: S169-S177

Vincent KP, McCulloch AD, Edwards AG (2014): Toward a hierarchy of mechanisms in CaMKII-mediated arrhythmia. *Front Pharmacol* 5, 110

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH (2006): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 116: 3127-38

Woods CE, Shang C, Taghavi F, Downey P, Zalewski A, Rubio GR, Liu J, Homburger JR, Grunwald Z, Qi W, Bollensdorff C, Thanaporn P, Ali A, Riemer RK, Kohl P, Mochly-Rosen D, Gerstenfeld E, Large S, Ali ZA, Ashley EA (2016): In Vivo Post-Cardiac Arrest Myocardial Dysfunction Is Supported by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Mediated Calcium Long-Term Potentiation and Mitigated by Alda-1, an Agonist of Aldehyde Dehydrogenase Type 2. *Circulation* 134, 961–977

Wu Y, Roden DM, Anderson ME (1999): Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res* 84, 906–912

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

Zeng J, Rudy Y (1995): Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. *Biophys J* 68, 949

Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE, Thiel W, Guatimosim S, Song LS (2005): Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 11, 409–417

Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H (2002): The cardiac-specific nuclear δ B isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277, 1261–1267

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

Zhang T, Brown JH (2004): Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63, 476–486

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten mit kompletten Reviewprozess

Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neef S, Maier SKG, Maier LS, CaMKII contributes to cardiac arrhythmogenesis in transgenic CaMKII δ C mice having heart failure. *Circ Heart Fail.* 2:664-75.2009.

Kongressbeiträge

Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Sag CM, Neef S, Maier LS. Die Rolle der β -adrenergen Stimulation für den intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsel sowie das Auftreten von proarrhythmogenen Ereignissen in CaMKII-überexprimierenden Kardiomyozyten, 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-Herz-und Kreislaufforschung e.V.

Lebenslauf

Ich, Sepideh Khabbazzadeh wurde am 11. Februar 1984, als Tochter von Gholamali Khabbazzadeh und Fathieh Bahrami, in Teheran (Iran) geboren.

Nach der Grundschule und Orientierungsstufe beendete ich 2003 meine schulische Laufbahn am humanistischem Gymnasium Altes Gymnasium Bremen mit der Hochschulreife.

Zum Wintersemester 2003/2004 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Dieses schloss ich im November 2010 mit dem zweiten Staatsexamen ab.

Während des Studiums begann ich 2007 mit dem praktischen Teil meiner Promotion in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Lars S. Maier. Die im Rahmen der Arbeit entstandenen Ergebnisse wurden unter dem Titel "CaMKII contributes to cardiac arrhythmogenesis in transgenic CaMKII δ_c mice having heart failure" im Juli 2009 in der Zeitschrift Circulation Heart Failure publiziert.

Von Februar 2011 bis Oktober 2011 war ich als Assistenzärztin in der Inneren Medizin am Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende im Bereich Pneumologie tätig.

Im Februar 2012 trat ich an der Universitätsmedizin Göttingen in der Klinik für Anästhesiologie eine Stelle als Assistenzärztin an. Seit Oktober 2016 bin ich dort als Fachärztin tätig.

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lars S. Maier für die Bereitstellung dieses spannenden Promotionsthemas. Während der gesamten wissenschaftlichen Arbeit hat er mich stets unterstützt, stand mir mit seinem Fachwissen zur Seite und hat wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Can-Martin Sag für die geduldige und passionierte Einarbeitung in die Elektrophysiologie.

Bedanken möchte ich mich noch bei der gesamten Arbeitsgruppe für die hervorragende Zusammenarbeit, insbesondere durch Herrn Timo Schulte und Thomas Sowa.

Mein zusätzlicher Dank gilt meinen Mitdoktoranden für die fortwährende Hilfe und gegenseitige Motivation.