

**Die Rolle der Ca²⁺/Calmodulin abhängigen
Proteinkinase II in der akuten Phase der
Nachlasterhöhung im Herzen**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
Universität Regensburg

vorgelegt von

Maria Baier
aus Kollnburg

im Jahr
2020

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

30.04.2020

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Hayo Castrop

Unterschrift:

Inhalt

1. Zusammenfassung & Abstract	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Abstract.....	3
2. Einleitung	5
2.1. Herzinsuffizienz.....	5
2.1.1. Klinische Relevanz	5
2.1.2. Ursachen und Auswirkungen	6
2.1.3. Therapie.....	7
2.2. Myokard.....	8
2.2.1. Aufbau	8
2.2.2. Erregungsleitungssystem	9
2.2.3. Arbeitsmyokard	9
2.3. Elektromechanische Kopplung	11
2.3.1. Ablauf	11
2.3.2. Pathophysiologie	13
2.3.2.1. Der L-Typ Calcium-Kanal	13
2.3.2.2. Der Ryanodinrezeptor Typ 2	13
2.3.2.3. Die SR-Calcium-ATPase und Phospholamban.....	13
2.3.2.4. Der Natrium/Calcium-Austauscher.....	14
2.4. Die Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Proteinkinase II	15
2.4.1. Regulation	15
2.4.2. Aufgaben	17
2.4.3. Pathophysiologie	17
2.5. Zielsetzung der Arbeit.....	20
3. Material und Methoden.....	22

3.1.	Versuchstiere	22
3.2.	Versuchsdurchführung	22
3.3.	Transverse aortic constriction (TAC)-Operation.....	23
3.4.	Echokardiographie.....	23
3.5.	Elektrokardiogramm (EKG)	24
3.6.	Histologie	25
3.6.1.	Wheat germ agglutinin (WGA)-Färbung	25
3.6.2.	Isolectin B ₄ -Färbung	26
3.6.3.	Masson-Trichrom-Färbung.....	27
3.7.	RNA-Isolation und quantitative Real-Time PCR.....	27
3.7.1.	RNA-Isolation.....	27
3.7.2.	DNA-Verdau.....	28
3.7.3.	cDNA-Synthese	28
3.7.4.	quantitative Real-Time PCR.....	29
3.8.	Western Blot.....	30
3.8.1.	Homogenisierung	30
3.8.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
3.8.3.	Transfer	32
3.8.4.	Antikörper und Entwicklung.....	33
3.9.	CaMKII-Aktivitätsassay	35
3.10.	Isolation der Herzmuskelzellen.....	36
3.11.	Epifluoreszenzmikroskopie	37
3.11.1.	Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops.....	37
3.11.2.	Der Ca ²⁺ -Farbstoff X-Rhod1	39
3.11.3.	Versuchsdurchführung	40
3.12.	Calcium-Kalibrierung.....	41

3.13.	Datenauswertung und Statistik	42
4.	Ergebnisse	43
4.1.	AC3-I Mäuse.....	43
4.1.1.	CaMKII-Expression & -Aktivität	43
4.1.2.	Überleben.....	44
4.1.3.	Hypertrophie	47
4.1.4.	Echokardiographie & Elektrokardiogramm.....	50
4.1.5.	Fibrose & Inflammation.....	53
4.1.6.	Proteinexpression.....	56
4.1.7.	Einzelzellmessungen am Epifluoreszenzmikroskop	59
4.1.8.	Akute CaMKII-Inhibition mit AiP	62
4.2.	AC3-C Mäuse.....	64
4.2.1.	Überleben & Hypertrophie	64
4.2.2.	Echokardiographie	66
4.2.3.	Proteinexpression.....	68
4.2.4.	Einzelzellmessungen am Epifluoreszenzmikroskop	72
4.2.5.	Akute eGFP-Messungen am Epifluoreszenzmikroskop.....	73
4.3.	CaMKII δ -Knockout Mäuse	75
4.3.1.	CaMKII-Expression & -Aktivität	75
4.3.2.	Überleben & Hypertrophie	77
4.3.3.	Echokardiographie & Elektrokardiogramm.....	81
4.3.4.	Fibrose & Inflammation.....	83
4.3.5.	Proteinexpression.....	85
4.3.6.	Einzelzellmessungen am Epifluoreszenzmikroskop	88
4.3.7.	Akute CaMKII-Inhibition mit AiP	90
5.	Diskussion	91

5.1.	CaMKII-Aktivität in der akuten Phase der Nachlasterhöhung.....	92
5.2.	CaMKII-Inhibition in der akuten Phase der Nachlasterhöhung.....	92
5.2.1.	Unspezifische CaMKII-Inhibition	92
5.2.2.	Spezifische CaMKII δ -Inhibition.....	93
5.3.	Hypertrophie, Inflammation & Fibrose	93
5.3.1.	Unspezifische CaMKII-Inhibition	93
5.3.2.	Spezifische CaMKII δ -Inhibition.....	94
5.4.	Auswirkungen der CaMKII-Inhibition auf die Proteinexpression	95
5.4.1.	Unspezifische CaMKII-Inhibition	95
5.4.2.	Spezifische CaMKII δ -Inhibition.....	96
5.5.	Auswirkungen der CaMKII-Inhibition auf den Ca ²⁺ -Haushalt	96
5.5.1.	Unspezifische CaMKII-Inhibition	96
5.5.2.	Spezifische CaMKII δ -Inhibition.....	97
5.6.	Auswirkungen der eGFP-Expression.....	98
5.7.	Limitationen.....	99
5.8.	Schlussfolgerung und Ausblick	99
6.	Anhang	101
6.1.	Abkürzungsverzeichnis	101
6.2.	Abbildungsverzeichnis	105
6.3.	Tabellenverzeichnis	107
6.4.	Literaturverzeichnis	108
6.5.	Publikationen.....	117
6.6.	Danksagung	118

1. Zusammenfassung & Abstract

1.1. Zusammenfassung

Die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) gilt sowohl im Menschen als auch im Tiermodell als wichtiger intrazellulärer Trigger für die Entstehung vieler kardialer Erkrankungen wie z.B. Herzhypertrophie, Herzinsuffizienz oder Arrhythmien. Die CaMKII ist somit ein sehr interessantes Zielprotein für die Entwicklung neuer Therapieoptionen zur Behandlung kardialer Krankheiten. Die physiologische Rolle der CaMKII und ihrer beiden im Herzen exprimierten Isoformen γ und δ ist hingegen weit weniger gut untersucht.

Um die Rolle der beiden im Herzen exprimierten Isoformen der CaMKII in der akuten Nachlasterhöhung genauer zu untersuchen, wurde mit Hilfe der *transverse aortic constriction* (TAC)-Operation eine akute Nachlasterhöhung in den Mäusen induziert und die Effekte auf das Überleben, die Herzfunktion, die Gen- und Proteinexpression und die elektromechanische Kopplung der Tiere 2 Tage nach der Operation untersucht. Dabei wurden AC3-I Mäuse, bei denen der CaMKII-Inhibitor *autocamtide-3 related inhibitory peptide* (AiP) herzspezifisch exprimiert und somit beide CaMKII-Isoformen inhibiert werden, mit WT Geschwistertieren verglichen. Zusätzlich wurden spezifische CaMKII δ -Knockout (CKO) Tiere verwendet, um insbesondere die Rolle der im Herzen weniger stark exprimierten γ -Isoform genauer zu analysieren.

Die CaMKII-Aktivität war 2 Tage nach der Operation in WT TAC vs. sham Mäusen signifikant erhöht. Interessanterweise verstarben die AC3-I TAC Mäuse ausschließlich in den ersten 5 Tagen nach der Operation infolge einer kardialen Dysfunktion, während die WT TAC und CKO TAC Mäuse vor akutem Herzversagen geschützt waren. Die Proteine, die wesentlich an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind, wie der Ryanodinrezeptor Typ 2 (RyR2) und Phospholamban (PLB), zeigten in den WT TAC vs. sham Mäusen 2 Tage post-OP eine signifikante Hyperphosphorylierung an den CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstellen. Die AC3-I TAC Mäuse wiesen hingegen eine signifikante Hypophosphorylierung auf, während die Phosphorylierung bei den CKO TAC Mäusen intermediär zwischen den AC3-I TAC und WT TAC Mäusen lag, was auf die Aktivität der γ -Isoform schließen lässt. In isolierten Kardiomyozyten zeigte sich in AC3-I TAC Mäusen 2 Tage post-OP eine signifikant verringerte

Kontraktilität und Ca^{2+} -Transienten, während beide Parameter in den WT TAC vs. sham Tieren signifikant erhöht waren. In den CKO TAC Mäusen war die Kontraktilität ebenfalls im Vergleich zu den sham Mäusen signifikant erhöht, was zeigt, dass die γ -Isoform die fehlende δ -Isoform kompensieren kann und ausreicht, um die zelluläre Kontraktilität aufrechtzuerhalten. Das arrhythmogene Potential gemessen an spontanen Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) während einer 30 s-Stimulationspause war hingegen in den AC3-I Mäusen 2 Tage post-TAC signifikant geringer als in den WT Mäusen, was die anti-arrhythmische Wirkung einer CaMKII-Inhibition darlegt.

Diese Arbeit zeigt, dass die CaMKII in der akuten Phase der Nachlasterhöhung eine wichtige physiologische, aber bislang unbekannt Rolle einnimmt, um die Kontraktilität des Herzens aufrechtzuerhalten. Eine exzessive CaMKII-Inhibition, wie sie in den AC3-I Mäusen vorliegt, kann hingegen in akuten Stresssituationen schädlich sein. Die spezifische Inhibition der im Herzen am stärksten exprimierten δ -Isoform der CaMKII stellt einen guten Kompromiss dar, um die Adaptation des Herzens an akute Stresssituationen zu gewährleisten, gleichzeitig aber die maladaptiven Folgen der CaMKII-Aktivierung zu unterbinden. Diese Ergebnisse sollten bei zukünftigen Studien zur Entwicklung klinisch anwendbarer CaMKII-Inhibitoren berücksichtigt werden.

1.2. Abstract

Activation of the Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) is established as a central intracellular trigger for various cardiac pathologies such as hypertrophy, heart failure or arrhythmias in animals and humans suggesting CaMKII as a promising target protein for future medical treatments. However, the physiological role of CaMKII and its two cardiac isoforms γ and δ is scarcely well defined.

To further investigate the physiological role of CaMKII and its isoforms in acute pressure overload, we induced acute pressure overload by *transverse aortic constriction* (TAC) surgery and evaluated the effect on survival, cardiac function, gene and protein expression and excitation-contraction coupling in AC3-I mice vs. WT littermates 2 days post-TAC. AC3-I mice express the CaMKII inhibitor *autocamtide-3 related inhibitory peptide* (AiP) heart-specific which inhibits both cardiac CaMKII isoforms. In addition, specific CaMKII δ knockout (CKO) mice were used in order to analyze the role of the less expressed γ -isoform in the heart.

CaMKII activation is significantly increased in WT TAC vs. sham mice 2 days after surgery. Interestingly, survival is significantly reduced in AC3-I animals within the first 5 days after TAC surgery compared to WT littermates and CKO mice. While systolic cardiac function is markedly reduced in AC3-I TAC mice, it is preserved in CKO TAC and WT TAC mice. Proteins regulating excitation-contraction coupling such as ryanodine receptors type 2 (RyR2) or phospholamban (PLB) are significantly hypophosphorylated at their CaMKII phosphorylation site in AC3-I mice, but hyperphosphorylated in WT mice 2 days post-TAC. Phosphorylation in CKO TAC mice is intermediate between WT and AC3-I TAC mice suggesting residual activity of the γ -isoform. In isolated cardiomyocytes contractility and Ca²⁺ transients are significantly lower in AC3-I TAC vs. sham mice 2 days after surgery while both parameters are significantly increased in WT TAC vs. sham mice. In CKO TAC cells, contractility is significantly higher compared to AC3-I TAC cells, albeit lower than in WT TAC cells indicating sufficient compensation of the δ -isoform presumably through the γ -isoform to preserve cellular contractility. However, proarrhythmic spontaneous Ca²⁺ release events (SCRs) appear less frequent in cardiomyocytes from AC3-I TAC mice than in WT TAC mice indicating anti-arrhythmic effects of a CaMKII inhibition.

These data indicate that in acute pressure overload activation of CaMKII is a pivotal, but previously unknown part of acute stress physiology in the heart to maintain cardiac contractility. Excessive CaMKII inhibition as present in AC3-I mice can be detrimental in acute

stress situations. Specific inhibition of the isoform with the highest expression level in the heart might be a promising option to assure adaptation to acute stress situations and simultaneously prevent maladaptive effects of CaMKII activation. This should be taken into account for future studies regarding CaMKII inhibitors as therapeutic agents.

2. Einleitung

2.1. Herzinsuffizienz

2.1.1. Klinische Relevanz

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen mit 31.5% zu den häufigsten Todesursachen weltweit [1]. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung und der verbesserten medizinischen Versorgung nimmt die Anzahl der Patienten mit einer chronischen Herzerkrankung stetig zu [2]. Die häufigste chronische Erkrankung stellt dabei mit einer Prävalenz von 10 - 20% bei den 70- bis 80-Jährigen die chronische Herzinsuffizienz dar [3].

Die Herzinsuffizienz ist eine komplexe und multifaktorielle Erkrankung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass das Herz nicht mehr genügend Blut pumpen und somit den Körper nicht mehr mit ausreichend Sauerstoff versorgen kann [4,5]. Die häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz in Industrieländern sind eine koronare Herzerkrankung und arterieller Hypertonus [6], jedoch können auch andere Krankheitsbilder wie Ischämie, Herzklappenerkrankungen, Infektionen oder Stoffwechselerkrankungen wie der Diabetes mellitus Typ 2 zu einer chronischen Herzinsuffizienz führen [7].

Die Einteilung der Herzinsuffizienz kann nach verschiedenen Merkmalen wie dem Schweregrad, der Lokalisation, dem Krankheitsverlauf oder dem Pathomechanismus erfolgen. Die Einteilung der Herzinsuffizienz in Schweregrade erfolgt nach der *New York Heart Association* (NYHA-Klassifikation) mit den Stadien I bis IV, wobei NYHA I eine Herzerkrankung ohne körperliche Einschränkung und NYHA IV eine Herzerkrankung mit Beschwerden bereits in Ruhe bezeichnet [3]. Je nach Lokalisation der Dysfunktion kann eine Rechtsherz-, Linksherz- oder Globalinsuffizienz unterschieden werden. Zudem kann berücksichtigt werden, ob sich die Herzinsuffizienz innerhalb von Stunden oder Tagen, z.B. infolge eines Herzinfarktes, entwickelt (akute Herzinsuffizienz) oder der Krankheitsverlauf sich über Monate und Jahre erstreckt (chronische Herzinsuffizienz). Die Einteilung nach dem Pathomechanismus unterscheidet die systolische Herzinsuffizienz, bei der die Ejektionsfraktion stark vermindert ist (EF <40%), von der diastolischen Herzinsuffizienz, bei der die Ejektionsfraktion erhalten bleibt, jedoch die Relaxationsfähigkeit des Ventrikels vermindert und somit die Füllung in der Diastole beeinträchtigt ist. [8]

2.1.2. Ursachen und Auswirkungen

Eine Herzhypertrophie und die Progression zur Herzinsuffizienz können in Folge einer andauernden Volumen- oder Druckbelastung entstehen. Bei der Volumenbelastung ist das enddiastolische Füllungsvolumen erhöht (Vorlast) und die Kardiomyozyten werden übermäßig gedehnt, sodass die Kontraktilität abnimmt. Bei der Druckbelastung hingegen arbeitet das Herz gegen einen erhöhten vaskulären Widerstand an (Nachlast), wodurch trotz erhöhter Kontraktionskraft das Schlagvolumen abnimmt. Infolge der Volumenbelastung entsteht eine exzentrische, bei der Druckbelastung eine konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels [9].

In beiden Fällen versucht das Herz die verminderte Leistung kurzfristig zu kompensieren, indem das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) und das sympathoadrenerge Nervensystem aktiviert werden [6]. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Kontraktilität der Muskelzellen, was zum einen zu einer Steigerung der Herzfunktion, zum anderen zu einer Erhöhung des Blutdrucks sowohl durch direkte Vasokonstriktion als auch indirekt durch ein erhöhtes intravasales Volumen aufgrund einer Wasserretention führt.

Zudem werden bei länger andauernden Leistungsdefiziten vermehrt Hypertrophie- und neurohumorale Signale ausgeschüttet, die zuerst zu einer Hypertrophie des Herzens und dann zu einem linksventrikulären Umbau (*adverse remodeling*) führen [10]. Diese Phase der kompensierten Herzinsuffizienz ist neben dem progredienten Verlust der Kardiomyozyten und der normalen Herzarchitektur von einer zunehmenden Fibrosierung und Dilatation des Herzens geprägt. In Folge dessen kommt es zu einer weiteren Leistungs- und Kontraktilitätsminderung des Ventrikels, zu einer gestörten Kraft-Frequenz-Beziehung und zur Aktivierung inflammatorischer Signalwege sowie fötaler kardialer Proteine, was zu einer Manifestation der Symptome und Progression zur dekompenzierten Herzinsuffizienz führt [6,11].

Auf zellulärer Ebene wird die elektromechanische Kopplung verändert und der Ca^{2+} -Haushalt gestört [10,12], was die Entstehung von Arrhythmien fördert und zur Abnahme der Zellkontraktilität führt [13]. Die Arrhythmien können durch EADs (*early afterdepolarizations*) aufgrund verlängerter Aktionspotentialdauer [14] oder durch DADs (*delayed afterdepolarizations*) aufgrund spontaner diastolischer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Ca^{2+} -Leck) [15] entstehen. Diese Arrhythmien sind in vielen

Fällen die eigentliche Todesursache bei herzinsuffizienten Patienten und tragen wesentlich zu der hohen Mortalität dieser Erkrankung bei.

2.1.3. Therapie

Die Therapie der Herzinsuffizienz wird auf den jeweiligen Patienten und wenn möglich auf die zugrundeliegende Ursache abgestimmt. So trägt oftmals neben der medikamentösen Therapie auch eine nicht-medikamentöse Therapie mit körperlicher Aktivität, Ernährungsumstellung und verminderter Alkohol- und Tabakkonsum sehr zur Erhaltung oder Verbesserung der Lebensqualität bei. Bei Arrhythmien oder Herzklappenerkrankungen kann zusätzlich ein operativer Eingriff hilfreich sein.

Die medikamentöse Therapie zielt vor allem darauf ab, die als Kompensationsmechanismus übermäßig aktivierten sympathoadrenergen Signalwege sowie die Aktivierung des RAAS zu inhibieren. So werden häufig ACE-Hemmer, Angiotensinrezeptorblocker, Betarezeptorblocker oder Diuretika als Basismedikation gegen Herzinsuffizienz eingesetzt [7].

Im Allgemeinen wird die Auswahl der Therapie durch häufig auftretende Komorbiditäten wie z.B. Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2 und die multifaktoriellen Ursachen kardialer Erkrankungen erschwert. Neue Therapieansätze und die frühzeitige Diagnostik und Intervention sind deshalb für die Zukunft unabdingbar.

2.2. Myokard

2.2.1. Aufbau

Das Myokard bildet die funktionelle Grundlage des Herzens. Dabei sind einzelne Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) in Muskelketten und in mehreren Schichten zu einem dreidimensionalen Gewebeverbund angeordnet. Die einzelnen Kardiomyozyten sind ca. 100 μm lang und haben einen Durchmesser von 15 - 20 μm . Strukturell sind sie ähnlich wie Skelettmuskelfasern aufgebaut, besitzen aber im Gegensatz zu Skelettmuskelzellen meist nur einen, höchstens zwei zentral gelegene Zellkerne [16]. Die Kardiomyozyten bestehen ungefähr zur Hälfte aus den Myofilamenten Aktin und Myosin, die den kontraktilem Apparat des Herzmuskels bilden. Dabei lassen sich lichtmikroskopisch helle und dunkle Banden unterscheiden (A-, H-, M-, I- und Z-Streifen) (Abbildung 1 A), weshalb die Herzmuskulatur zur quergestreiften Muskulatur gezählt wird. Die kleinste funktionelle Einheit bilden die Sarkomere. Sie sind ca. 1.5 – 2.2 μm lang und werden durch die Z-Streifen begrenzt (Abbildung 1 B) [16]. Während einer Kontraktion verkürzen sich die Sarkomere, indem sich die Aktin- und Myosinfilamente ineinander schieben. In der anschließenden Relaxationsphase kehren die Myofilamente in ihre Ausgangsposition zurück und die Sarkomere verlängern sich wieder [17].

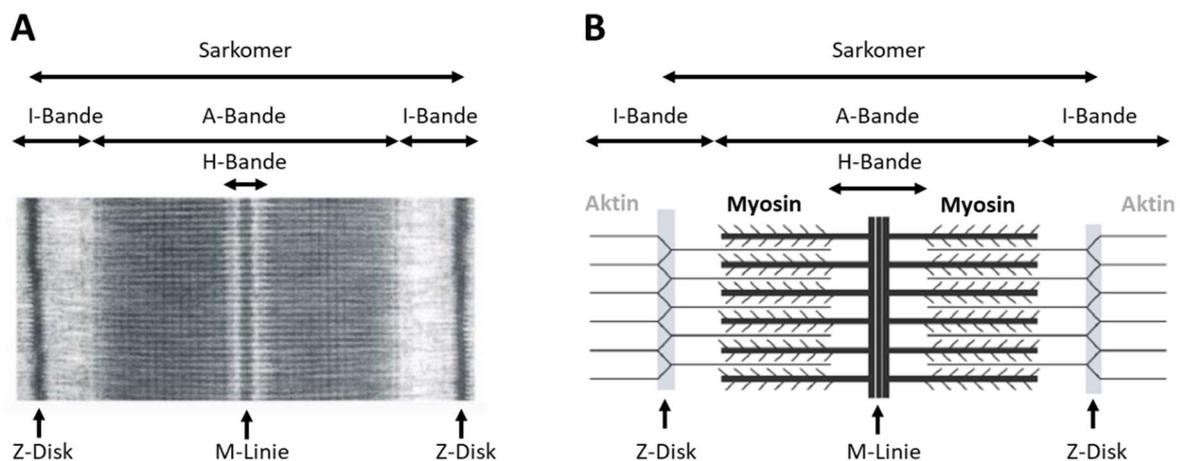


Abbildung 1: Aufbau eines Sarkomers

A: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sarkomers, das durch die beiden Z-Streifen begrenzt wird. Zudem werden verschiedene helle und dunkle Banden unterschieden: H-Bande, A-Bande, I-Bande und M-Linie. Abbildung nach [18]. **B:** Schematische Darstellung eines Sarkomers in Relaxation. Die Anordnung der Myofilamente Aktin und Myosin bestimmt die elektronenmikroskopisch sichtbaren Banden: Verankerung der Myosinfilamente (M-Linie), Verankerung der Aktinfilamente (Z-Disk), Überlappung von Aktin und Myosin (A-Bande), nur Myosin (H-Bande), nur Aktin (I-Bande). Abbildung nach [19].

2.2.2. Erregungsleitungssystem

Ein wichtiger Bestandteil des Myokards ist die Erregungsausbreitung und -weiterleitung. Das Erregungsleitungssystem des Herzens besteht aus spezialisierten Herzmuskelzellen, den Schrittmacherzellen, die die Fähigkeit zur spontanen Depolarisation besitzen [20]. Ausgehend vom Sinusknoten im rechten Vorhof breitet sich die Erregung über die Vorhöfe zum Atrio-Ventrikulär-Knoten (AV-Knoten) am Übergang zwischen dem rechten Vorhof und Ventrikel aus. Der AV-Knoten verzögert die Erregungsausbreitung in die Kammern, um eine vollständige Kontraktion der Vorhöfe und somit Ausleerung des Bluts in die Kammern zu garantieren. Anschließend wird die elektrische Erregung an die His-Bündel im Septum, über den rechten und linken Tawaraschenkel bis hin zu den Purkinjefasern in der Herzspitze weitergeleitet [21]. Diese übertragen den elektrischen Impuls direkt auf die eigentlichen Herzmuskelzellen des Arbeitsmyokards.

2.2.3. Arbeitsmyokard

Die einzelnen Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards sind über die sogenannten Glanzstreifen (*Disci intercalares*) miteinander verbunden. Die darin enthaltenen *Gap junctions* bestehen aus Connexonen, kleinen Kanälen, die einen direkten Stoff- und Ionenaustausch zwischen benachbarten Zellen ermöglichen [22]. Sie sorgen außerdem für die elektrische Reizweiterleitung, sodass das gesamte Myokard ein funktionelles Synzytium bildet und eine synchrone Myokarderregung stattfinden kann. Die ebenfalls in den Glanzstreifen enthaltenen Desmosomen und *Fascia adherentes* dienen der mechanischen Stabilität sowie der Kraftübertragung [21].

Die Kardiomyozyten sind von einer Zellmembran (Sarkolemm) umgeben, die aus einer Lipiddoppelschicht mit zahlreichen eingebauten integralen Proteinen wie Ionenkanälen und -pumpen besteht. Die Zellmembran bildet eine Permeabilitätsbarriere, sodass ein elektrochemischer Gradient aufrechterhalten werden kann. Der Austausch von Ionen und Stoffen erfolgt teils passiv entlang dieses Gradienten oder durch aktiven, energieverbrauchenden Transport über Ionenpumpen. Um den hohen Energiebedarf der Kardiomyozyten zu decken, nehmen die Mitochondrien zur aeroben ATP-Gewinnung einen Hauptbestandteil der Zellen ein [23].

Eine weitere Besonderheit der Herzmuskelzellen stellt die sogenannte Diade bzw. der diadische Spalt dar. Durch die Einstülpung der Zellmembran zu transversalen (T-) Tubuli befinden sich die in der Zellmembran angeordneten Ionenkanäle in unmittelbarer Nähe zu dem in longitudinalen (L-) Tubuli angeordneten sarkoplasmatischen Retikulum (SR), dem intrazellulären Calcium-Speicher [16]. Diese räumliche Verbindung ist essentiell für den schnellen Ablauf der elektromechanischen Kopplung.

2.3. Elektromechanische Kopplung

2.3.1. Ablauf

Jeder Kontraktion geht die Entstehung eines Aktionspotentials voraus, welches über die *Gap junctions* und die Membran weitergeleitet wird. Das Ruhemembranpotential der Herzmuskelzellen liegt je nach Art der Zelle bei ca. -80 bis -60 mV und wird hauptsächlich durch das Gleichgewichtspotential von Kalium (K^+) (-89 mV) bestimmt [24,25].

Zu Beginn eines Aktionspotentials führt die Öffnung spannungsgesteuerter Natrium (Na^+)-Kanäle zu einem schnellen Na^+ -Einstrom entlang des chemischen Gradienten für Natrium (+70 mV) und zur Depolarisation der Zelle (Aufstrich des Aktionspotentials) (Abbildung 2). Sobald die Triebkraft für Na^+ nachlässt, steigt im Gegenzug der elektrochemische Gradient für K^+ , sodass es zu einem kurzen, repolarisierenden K^+ -Auswärtsstrom kommt und der *peak* des Aktionspotentials (+40 mV) das Natrium-Gleichgewichtspotential (+70 mV) nicht ganz erreicht.

Nach einer kurzen Latenzzeit öffnen sich spannungsabhängige L-Typ Calcium (Ca^{2+})-Kanäle, sodass Ca^{2+} -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle strömen. Da sich Einwärts- und Auswärtsströme nahezu im Gleichgewicht befinden, entsteht die für Kardiomyozyten typische Plateauphase des Aktionspotentials (Abbildung 2). Durch die relativ langsame Inaktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle wird die Dauer des Aktionspotentials maßgeblich durch diese Phase bestimmt.

Der kurzzeitige Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in den diadischen Spalt triggert zudem die Freisetzung einer wesentlich größeren Menge an Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, dem Ca^{2+} -Speicher der Herzmuskelzelle (Abbildung 2). Diese Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung erfolgt über den Ryanodinrezeptor Typ 2 (RyR2), der seine Öffnungswahrscheinlichkeit erst bei einer Ca^{2+} -Konzentration von über 10 $\mu\text{mol/l}$ ändert [16]. Das freigesetzte Ca^{2+} bindet an das Troponin C, sodass durch eine Konformationsänderung die Bindungsstelle zwischen Aktin und Myosin frei wird. Unter Verbrauch eines ATP knickt das Myosinköpfchen ab und schiebt die Aktinfilamente ineinander, wodurch sich die Sarkomere verkürzen und die Kontraktion der Myofilamente zustande kommt [17,26,27].

Für die Relaxation wird das Ca^{2+} zum größten Teil mit Hilfe der SR-Calcium-ATPase (SERCA2a) zurück in das SR geschafft (Abbildung 2). Ein geringer Anteil wird über den Natrium/Calcium-Austauscher (NCX) und die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase aus der Zelle hinaus befördert. Ein Teil

des Ca^{2+} wird auch über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) in den Mitochondrien gespeichert.

Zusätzlich öffnen sich spannungsabhängige K^+ -Kanäle für einen transienten Auswärtsstrom, sodass die Zelle wieder repolarisiert und ihr negatives Ruhemembranpotential erreicht [6,10].

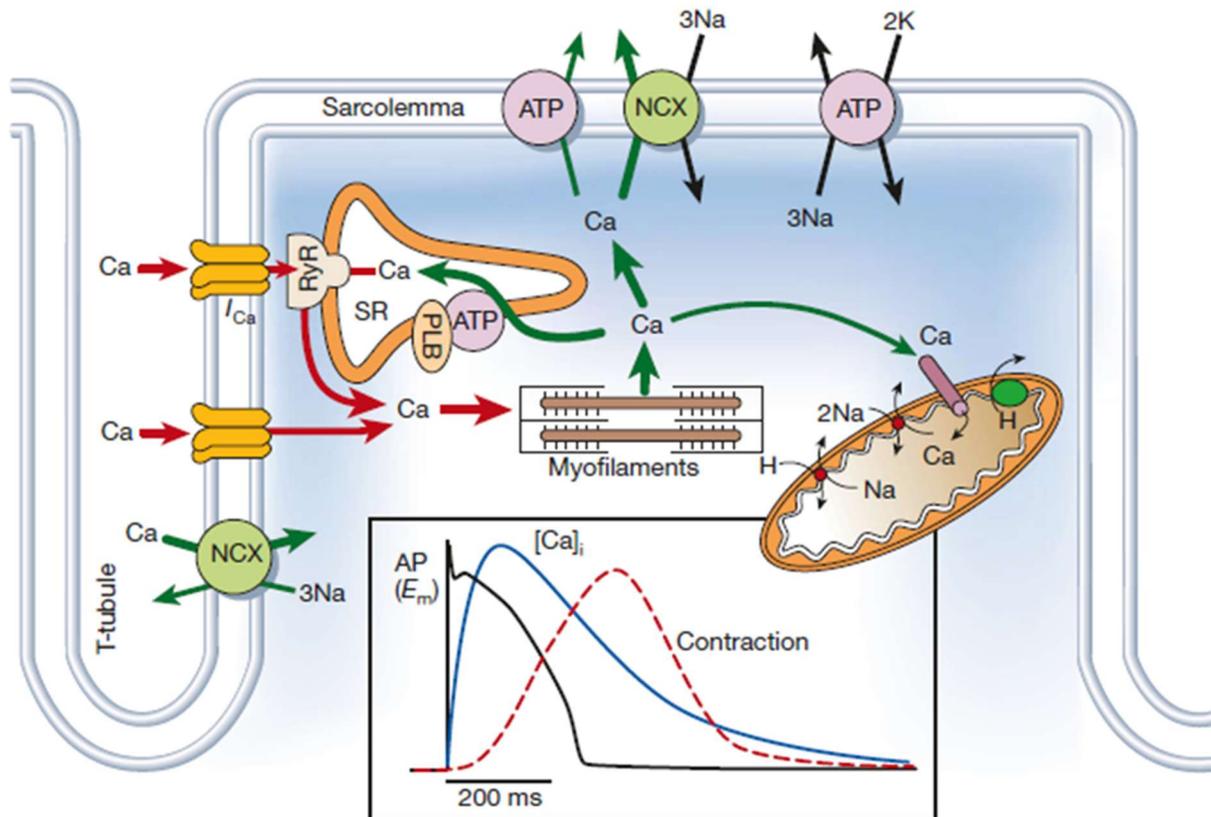


Abbildung 2: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung

Das Aktionspotential beginnt mit der Öffnung schneller Na^+ -Kanäle, die eine Depolarisation der Zelle auslöst. Dadurch öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (I_{Ca}), wodurch eine wesentlich größere Menge an Ca^{2+} über den Ryanodinrezeptor (RyR) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt wird. Die Ca^{2+} -Ionen aktivieren die Myofilamente und lösen eine Kontraktion aus. Gleichzeitig wird das Ca^{2+} über die SERCA2a wieder in das SR oder über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) aus der Zelle transportiert, sodass es zur Relaxation der Myofilamente kommt. Im unteren Teil ist der zeitliche Zusammenhang zwischen dem Aktionspotential (AP), der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Kontraktion dargestellt. Abbildung nach [28].

2.3.2. Pathophysiologie

2.3.2.1. Der L-Typ Calcium-Kanal

Der L-Typ Calcium-Kanal (LTCC) spielt eine wichtige Rolle bei der Limitation des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle [29]. Die Phosphorylierung des LTCC, u.a. durch die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII), führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals und somit zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Stroms in die Zelle [30]. Dadurch kommt es zu einer erheblichen Verlängerung der Aktionspotentialdauer [6] und zur Entstehung von Arrhythmien.

2.3.2.2. Der Ryanodinrezeptor Typ 2

Der Ryanodinrezeptor Typ 2 (RyR2) ist ein wichtiger Calcium-Freisetzungskanal des sarkoplasmatischen Retikulums im erregbaren Gewebe [31]. Während des Aktionspotentials kommt es über den LTCC zu einem Ca^{2+} -Einstrom, welcher eine weitaus größere Ca^{2+} -Freisetzung über den RyR2 aus dem SR bewirkt (*calcium-induced calcium release*) [32]. Über die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 wird die Höhe des Ca^{2+} -Transienten und somit die Härte der systolischen Kontraktion bestimmt [11,33]. Die Regulation der Öffnungswahrscheinlichkeit erfolgt über akzessorische Bindungsproteine wie Calsequestrin, Junctin, Triadin oder das FK506-bindende Protein (FKBP12.6) [11,34]. Ebenso kann über die Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII oder Proteinkinase A (PKA) die Kanalaktivität verändert und die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht werden, indem die akzessorischen Bindungsproteine vom Molekülkomplex dissoziieren [31,35]. Konstitutive Phosphorylierung, insbesondere durch die CaMKII, kann zur spontanen Öffnung des RyR2 und einem sogenannten SR Ca^{2+} -Leck führen, was zum einen die Entwicklung einer Herzinsuffizienz fördern [36], zum anderen vor allem späte Nachdepolarisationen (DADs) initiieren und somit zu ventrikulären Arrhythmien beitragen kann [6,36].

2.3.2.3. Die SR-Calcium-ATPase und Phospholamban

Die SR-Calcium-ATPase (SERCA2a) ist für den Rücktransport des zytosolischen Calciums in das SR verantwortlich. Phospholamban (PLB) ist ein inhibitorisches Protein, welches die SERCA2a hemmt. Eine Phosphorylierung des PLB durch die CaMKII oder PKA verringert die PLB-abhängige Inhibition der SERCA2a und es kommt zu einer verstärkten Ca^{2+} -Aufnahme in das

SR [37]. Ein erhöhter SR Ca^{2+} -Gehalt kann jedoch zu spontanen Öffnungen des RyR2 und somit zu Arrhythmien aufgrund später Nachdepolarisationen (DADs) führen [38].

2.3.2.4. Der Natrium/Calcium-Austauscher

Der Natrium/Calcium-Austauscher (NCX) spielt eine wichtige Rolle bei der Eliminierung des Ca^{2+} aus der Zelle während der Relaxationsphase. Während der NCX im gesunden Herzen nur für ca. 20 - 30% der Ca^{2+} -Beseitigung verantwortlich ist [6], wird seine Expression im insuffizienten Herzen hochreguliert [39]. Aufgrund seines elektrogeneren Transports kommt es zu einem depolarisierenden Einwärtsstrom, was zu einem abnormalen Aktionspotential und Arrhythmien führen kann [15].

2.4. Die Ca²⁺/Calmodulin abhängige Proteinkinase II

2.4.1. Regulation

Die Ca²⁺/Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die in Muskeln, Nerven und Immungewebe exprimiert wird [40]. Es gibt vier verschiedene Isoformen der CaMKII (α , β , γ und δ), wobei im Herzen hauptsächlich die Isoform δ , von welcher wiederum zwei unterschiedliche Spleißvarianten CaMKII δ_B und CaMKII δ_C bekannt sind, exprimiert wird [29]. Die Isoform γ kommt ebenfalls im Herzen vor, allerdings nur im Verhältnis 1:2.5 zu der stärker exprimierten CaMKII δ [41]. Das gesamte Enzym besteht aus zwei aufeinandergestapelten Ringen mit jeweils 6 Untereinheiten (Abbildung 3). Jede Untereinheit ist ein 478 Aminosäuren langes Peptid und besitzt eine katalytische, eine regulatorische und eine Assoziationsdomäne (Abbildung 3), die für die Oligomerisation und die richtige Konformation des Holoenzym eine wichtige Rolle spielt [39].

Im Ruhezustand ist die CaMKII durch Autoinhibition, d.h. die Bindung der katalytischen Domäne an die regulatorische Domäne, inaktiv (Abbildung 3). Erst durch die Bindung von Ca²⁺/Calmodulin an die regulatorische Domäne ändert sich die Konformation, wobei sich die katalytische von der regulatorischen Untereinheit löst und die CaMKII dadurch aktiviert wird [40]. Durch die unmittelbare Nachbarschaft der katalytischen Untereinheiten können sich die Untereinheiten auch gegenseitig phosphorylieren (Autophosphorylierung der Aminosäure Threonin an der Position 287), was dazu führt, dass die CaMKII auch nach Dissoziation von Ca²⁺/Calmodulin aktiv bleibt. Das kann bei dauerhaft hohen Ca²⁺-Konzentrationen oder durch die Oxidation des Methionins an der Position 281 und 282 in Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eintreten (Abbildung 3). Sowohl die Phosphorylierung als auch die Oxidation ist durch Phosphatasen bzw. durch die Methionin-Sulfoxid-Reduktase A (MrsA) reversibel [40]. Zusätzlich gibt es eine Phosphorylierungsstelle der Aminosäure Threonin an Position 306, die die CaMKII inaktiviert, indem die Kinase insensitiv gegenüber einer Ca²⁺/Calmodulin-Aktivierung wird [42].

Kürzlich haben Erickson et al. zwei weitere Mechanismen beschrieben, zum einen ein O-linked N-Acetylglukosamin an Ser280, zum anderen S-nitrosylierte Cysteinreste an den Positionen 280, 289 und 290, die ebenfalls zu einer autonomen CaMKII-Aktivität führen können [43,44].

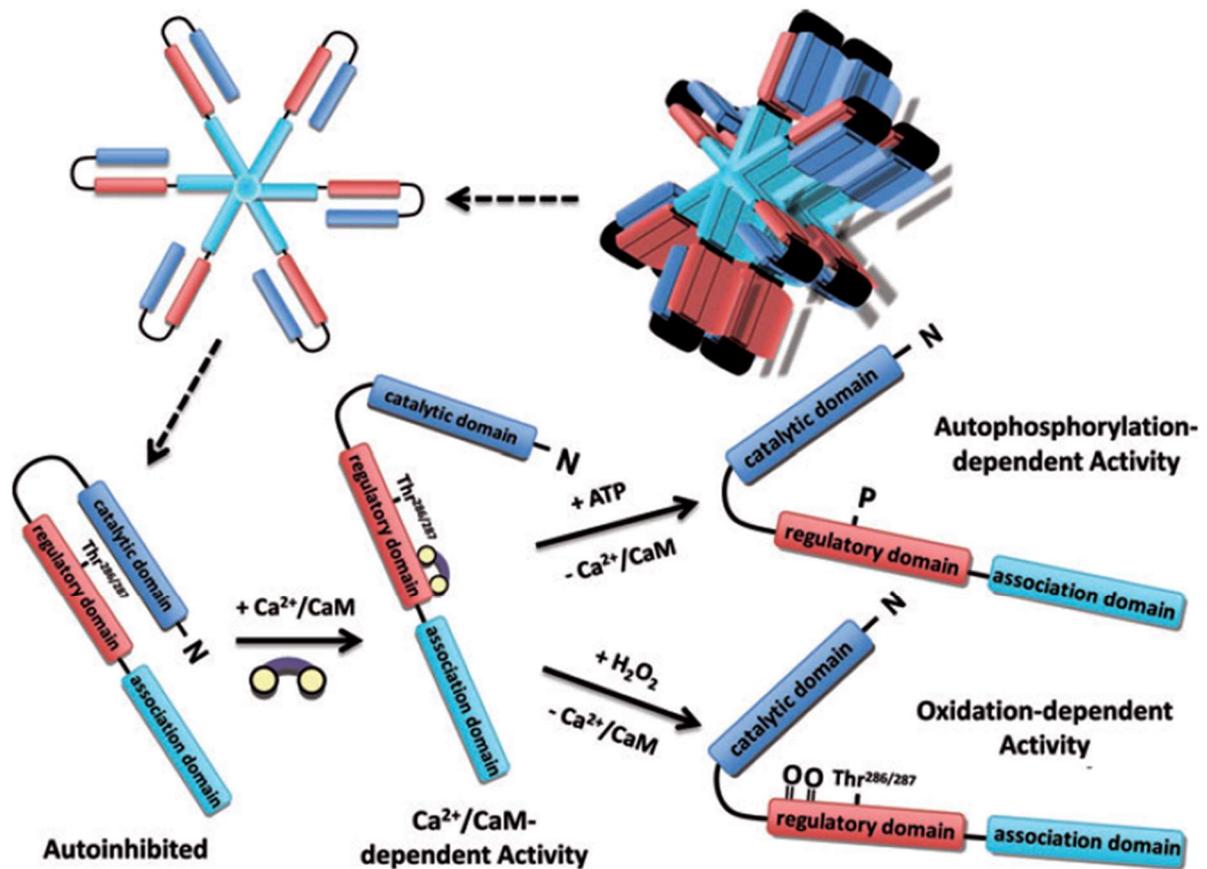


Abbildung 3: Aufbau und Aktivierungswege der CaMKII

Oben: Das Holoenzym der CaMKII besteht aus zwei aufeinander gestapelten Ringen mit je 6 Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten besteht wiederum aus einer katalytischen, einer regulatorischen und einer Assoziationsdomäne. **Unten:** Im inaktiven Zustand ist die katalytische Domäne an die regulatorische Domäne gebunden. In Anwesenheit von Ca^{2+} /Calmodulin ändert sich die Konformation, sodass die CaMKII aktiv werden kann. Durch die Autophosphorylierung von Thr287 oder durch die Oxidation von Met281/282 bleibt die CaMKII auch ohne Ca^{2+} /Calmodulin dauerhaft aktiv. Abbildung nach [45].

2.4.2. Aufgaben

Die physiologischen Aufgaben der CaMKII wurden weitestgehend aus Beobachtungen und Rückschlüssen aus der Pathophysiologie abgeleitet. So reguliert die CaMKII verschiedene Prozesse wie die elektromechanische Kopplung und den Ca^{2+} -Haushalt, die mitochondriale Integrität und das Überleben der Kardiomyozyten [46–48]. Im normalen Herzen spielt die Aktivierung der CaMKII eine wichtige Rolle in Stresssituationen (*fight or flight*-Reaktionen) und bei erhöhten Herzfrequenzen, die eine Verstärkung der kardialen Kontraktilität erforderlich machen [29,49]. Jedoch zeigt sich auch im insuffizienten Myokard eine erhöhte CaMKII-Expression und -Aktivität [50,51]. Eine chronische Überexpression wird zudem mit dem pathologischen Umbau des Herzens und fortschreitender Herzinsuffizienz assoziiert [52,53].

Die beiden Spleißvarianten CaMKII δ_B und CaMKII δ_C unterscheiden sich zum einen in ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle, zum anderen auch in ihren Aufgaben. Während die CaMKII δ_B hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist und deshalb die Gentranskription und das hypertrophe Wachstum moduliert, ist die CaMKII δ_C vor allem im Zytosol und in der Zellmembran zu finden und beeinflusst Ionenkanäle und Proteine, die an der Regulation des Ca^{2+} -Haushalts beteiligt sind [52,54].

2.4.3. Pathophysiologie

Die zytosolische CaMKII δ_C kann zum einen den L-Typ Ca^{2+} -Kanal, den Ryanodinrezeptor Typ 2 und Phospholamban, zum anderen verschiedene Na^+ - und K^+ -Kanäle phosphorylieren (Abbildung 4 A). Die Phosphorylierung von PLB an Thr17 durch die CaMKII δ reduziert den inhibitorischen Effekt auf die SERCA2a, was zu einer erhöhten Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR und zu einer Beschleunigung der Relaxation führt [29,40]. Am RyR2 verursacht die CaMKII δ -abhängige Phosphorylierung an Ser2814 eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals, sodass es zu spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR (Ca^{2+} -Leck) kommt, was wiederum eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und eine Verringerung des SR Ca^{2+} -Gehalts zur Folge hat [40]. Durch die Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird der elektrogene NCX aktiviert, um das Ca^{2+} aus der Zelle zu schaffen, wodurch späte Nachdepolarisationen (DADs) und ventrikuläre Arrhythmien entstehen können (Abbildung 4 B) [55].

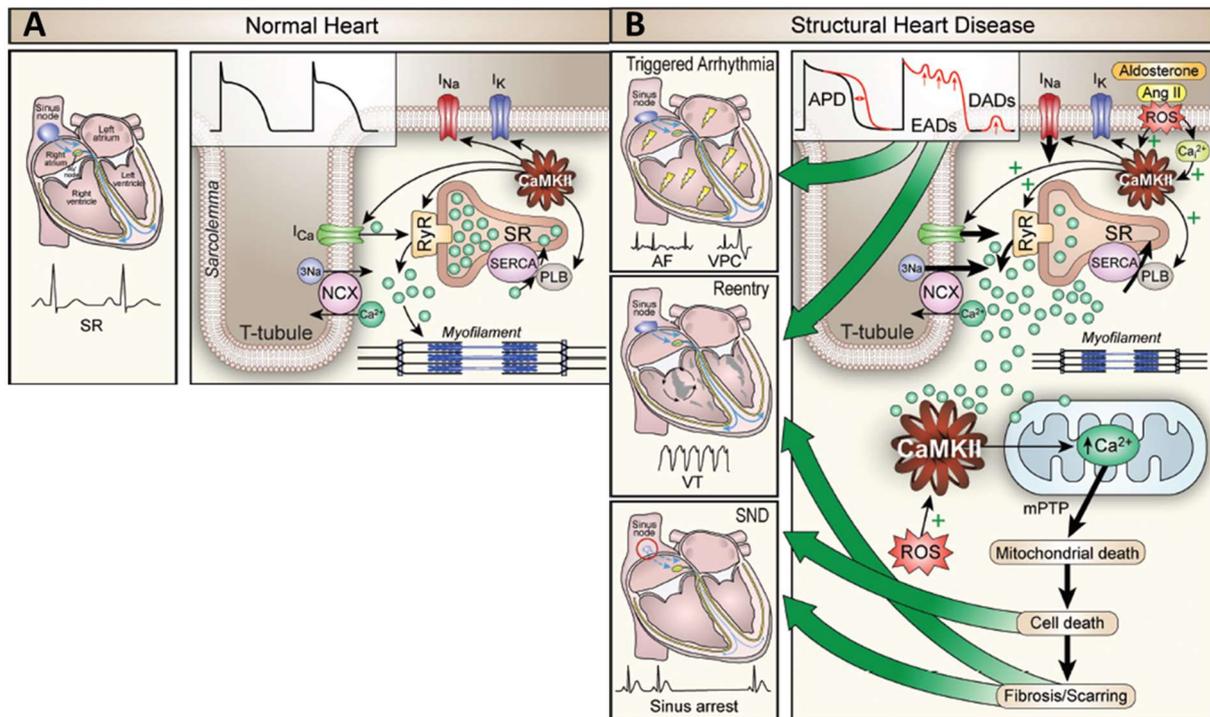


Abbildung 4: Die Rolle der CaMKII im gesunden Herzen und in der Pathophysiologie

A: Im gesunden Herzen bewirkt die Aktivierung der CaMKII und Phosphorylierung verschiedener Zielproteine der CaMKII (RyR: Ryanodinrezeptor, PLB: Phospholamban, I_{Ca} : L-Typ Calcium-Kanal) eine Verstärkung der Kontraktion (rechts) im Sinusrhythmus (SR, links). **B:** Eine dauerhafte Aktivierung der CaMKII führt hingegen zu Veränderungen im Aktionspotential (APD: Aktionspotentialdauer, EAD: frühe Nachdepolarisation, DAD: späte Nachdepolarisation) (rechts oben), was die Entstehung und Aufrechterhaltung von Arrhythmien begünstigt (links oben). Zusätzlich kommt es durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu einem vermehrten Zelltod und infolge dessen zu einem Umbau des Herz- in Narbengewebe (rechts unten), sodass die elektrische Weiterleitung gestört wird (SND: Sinusknotendysfunktion) (links unten). Abbildung nach [40].

Die Verstärkung des späten Na^+ -Stroms (I_{Na}) durch die CaMKII δ bewirkt eine intrazelluläre Na^+ -Akkumulation und vermindert den Ca^{2+} -Export über den NCX, da dessen Antriebskraft gehemmt ist, was eine Destabilisierung des Ruhemembranpotentials zur Folge hat [6].

Der I_{to} , ein K^+ -Kanal, der eine wichtige Rolle beim frühen Aktionspotential spielt, wird durch die CaMKII δ verlangsamt inaktiviert und schneller wieder aktiviert [39]. Dadurch kommt es zu einer Verkürzung des Aktionspotentials und der Refraktärzeit, was einen proarrhythmogenen Effekt auf die Herzmuskelzellen hat [29].

Der K^+ -Kanal I_{K1} stabilisiert das Ruhemembranpotential. Chronische CaMKII δ -Aktivität sorgt für eine reduzierte Aktivierung des I_{K1} und trägt somit zur Destabilisierung des Ruhemembranpotentials bei [10,29].

Die erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration führt zudem über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) zu einer erhöhten Ca^{2+} -Aufnahme in die Mitochondrien, was zum Sterben der Mitochondrien und in Folge dessen zum Zelltod führt. Die fehlenden Kardiomyozyten werden durch Fibrose als Narbengewebe ersetzt, was jedoch die elektrische Weiterleitung verzögert und die Entstehung von Arrhythmien begünstigt (Abbildung 4 B) [40].

Die nukleäre $\text{CaMKII}\delta_B$ reguliert und aktiviert das genetische Hypertrophieprogramm über die Phosphorylierung der Klasse II Histondeacetylasen (HDAC4 und HDAC5) [56]. Dephosphorylierte HDACs binden und unterdrücken hypertrophe Transkriptionsfaktoren wie den *myocyte enhancer factor 2* (MEF2). Durch die Phosphorylierung können die HDACs aus dem Nukleus translozieren und das gebundene MEF2 freisetzen, welches die Transkription von Hypertrophie-induzierenden Proteinen fördert [5,54].

2.5. Zielsetzung der Arbeit

Nach aktuellem Stand der Forschung ist die CaMKII vor allem unter pathologischen Bedingungen, wie erhöhter Nachlast durch Aortenstenose oder Herzinsuffizienz, im humanen Myokard vermehrt exprimiert und aktiviert. Auch in verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass die CaMKII-Überaktivierung wesentlich zur Progression und Manifestation kardialer Erkrankungen beiträgt. Die CaMKII-Aktivierung gilt somit als früher Biomarker kardialer Krankheiten für die Transition der kompensierten nachlastinduzierten Herzhypertrophie zur dekompensierten Herzinsuffizienz.

Die Rolle der CaMKII während der akuten Phase der Nachlasterhöhung im Herzen ist hingegen weit weniger gut verstanden. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass es neben verschiedenen maladaptiven Veränderungen in der elektromechanischen Kopplung bereits in einer sehr frühen Phase (d.h. 7 Tage) nach Nachlastinduktion im Herzen zu einer CaMKII-abhängigen Erhöhung der Zellkontraktilität kommt. Ursache für die verstärkte Kontraktilität waren zum einen ein erhöhter L-Typ Ca^{2+} -Strom in die Zelle, zum anderen daraus folgend ein erhöhter Ca^{2+} -Transient [9]. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass die CaMKII Teil einer bislang unbekanntenen intrazellulären Stressantwort bei akuter Nachlasterhöhung ist, um die Kontraktilität der Zellen und folglich des gesamten Herzens aufrecht zu erhalten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Effekt einer akuten Nachlasterhöhung durch eine *transverse aortic constriction* (TAC)-Operation in Wildtyp (WT) und AC3-I Mäusen untersucht. AC3-I Mäuse exprimieren den CaMKII-Inhibitor *autocamtide-3 inhibitory peptide* (AiP) herzspezifisch unter der Kontrolle des *α -myosin heavy chain* (α -MHC) Promotors [57,58], wodurch beide im Herzen vorkommenden CaMKII-Isoformen γ und δ inhibiert sind. Für Rückschlüsse hinsichtlich der Rolle der im Herzen stark exprimierten Isoform δ und der weniger stark exprimierten Isoform γ wurden zusätzlich zu den AC3-I Mäusen spezifische CaMKII δ -Knockout (CKO) Mäuse verwendet.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der CaMKII, insbesondere der beiden kardialen Isoformen γ und δ , in der akuten Phase der Nachlasterhöhung im Herzen genauer zu untersuchen. Dabei sollen die Auswirkungen einer generellen CaMKII-Inhibition mit den Folgen einer spezifischen CaMKII δ -Inhibition hinsichtlich der Entstehung einer Herzhypertrophie, der Sterblichkeitsrate, der Auswirkung auf die elektromechanische Kopplung sowie auf den Ca^{2+} -Haushalt und die Kontraktilität der Herzmuskelzellen in der akuten Phase der Nachlasterhöhung verglichen

werden. Ferner wird untersucht, ob auch andere Reaktionen wie eine Fibrosierung des Herzens oder Entzündungsprozesse in der akuten Nachlasterrhöhung eine Rolle spielen.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Alle Tierexperimente sind von der zuständigen Tierschutzkommission im Rahmen des Antrags „Der Einfluss der CaMKII auf die Kontraktilität und den Calciumhaushalt bei der akuten Nachlasterhöhung im Herzen“ (Regierung von Unterfranken, AZ 55.2-2532-2-211) genehmigt und unter Berücksichtigung der *Guide for the care and use of Laboratory Animals* [59] durchgeführt worden. Die Tierzucht und -haltung erfolgte in den Zentralen Tierlaboratorien (ZTL) am Universitätsklinikum Regensburg unter Standardbedingungen (Temperatur: $23\pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit: $55\pm 5\%$, Hell-Dunkel-Intervall: 12 h, Futter und Wasser *ad libitum*).

Als Versuchstiere wurden zum einen AC3-I Mäuse, die den CaMKII-Inhibitor *autocamtide-3-related inhibitory peptide* (AiP) herzspezifisch unter der Kontrolle des *α -myosin heavy chain* (α -MHC) Promotors gekoppelt an *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) exprimieren und beide kardialen CaMKII-Isoformen γ und δ inhibieren, sowie deren Wildtyp (WT) Geschwistertiere verwendet. Zum anderen wurden spezifische CaMKII δ -Knockout (CKO) Tiere untersucht, bei denen nur die δ -Isoform der CaMKII deletiert ist. Als zusätzliche Kontrollen dienten AC3-C Mäuse, die eine inaktive Form des AiP, jedoch wie die AC3-I Mäuse eGFP exprimieren, um mögliche Nebenwirkungen der transgenen Proteinüberexpression sowie des eGFP auszuschließen. Sämtliche verwendeten Tiere waren weiblich sowie zwischen 8 und 12 Wochen alt.

3.2. Versuchsdurchführung

Die Mäuse erhielten entweder eine transversale Aortenkonstriktion (*transverse aortic constriction*, TAC) oder als Kontrollgruppe eine sham-Operation. Die Echokardiographie am Tag vor dem Eingriff sowie an Tag 2, Tag 5 und anschließend einmal wöchentlich nach der Operation gab Aufschluss über die Herzleistung und kardiale Veränderungen. Das Überleben der Tiere wurde bis zu 5 Wochen nach der OP beobachtet, wobei infolge des Eingriffs verstorbene Mäuse (bis zu 6 h post-TAC) nicht mitgezählt wurden. Anschließend wurde der Fokus der Studie auf den akuten Zeitpunkt der Nachlasterhöhung (Tag (d)2 bis d5) gelegt, sodass die Tiere an d2 post-OP getötet und die Herzen für Einzelzellmessungen, Gen- und Proteinexpressionsanalysen sowie für die Histologie entnommen wurden.

3.3. Transverse aortic constriction (TAC)-Operation

Für die peri- und postoperative Analgesie wurde den Tieren zwei Tage vor der Operation bis sieben Tage nach der Operation Metamizol im Trinkwasser (1.33 mg/ml) verabreicht. Eine Stunde vor der Operation wurde den Mäusen zusätzlich 60 µg/kg Körpergewicht (KG) Buprenorphin subkutan injiziert. Die Narkose wurde durch intraperitoneale Injektion eines Gemischs aus Medetomidin (0.5 mg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (0.05 mg/kg KG) eingeleitet.

Nachdem die Tiefe der Narkose überprüft worden war, wurde die Haut mit einem 1.0 – 1.5 cm langen Querschnitt oberhalb des Brustbeins eröffnet und in stumpfer Präparation entlang der muskulären Strukturen die Trachea gesucht. Dadurch wurde die Arteria carotis communis dargestellt und die Aorta aufgesucht. Danach wurde der transversale Aortenbogen vorsichtig mobilisiert, ein chirurgischer Faden (6-0) unter der Aorta durchgeführt und diese mittels Knoten vorsichtig verengt. Mit Hilfe einer auf die Aorta gelegter 27 G-Injektionskanüle konnte der Stenosedurchmesser standardisiert werden. Anschließend wurde die Haut mit drei Einzelnähten geschlossen und die Narkose mit einer intraperitoneal injizierten Mischung aus Atipamezol (2.5 mg/kg KG) und Flumazenil (0.5 mg/kg KG) antagonisiert. Zusätzlich erhielten die Tiere nach der Operation Buprenorphin (0.1 mg/kg KG). Die Mäuse wurden getrennt von den wachen Tieren auf einer Wärmeplatte gewärmt, bis sie aus der Narkose erwachten.

Als Kontrollgruppe dienten sham-operierte Mäuse, bei denen die Narkose und Operation bis auf die Konstriktion der Aorta genauso wie oben beschrieben durchgeführt wurden. Die Operationen sowie die Echokardiographie wurden von Dr. Susanne Klatt durchgeführt.

3.4. Echokardiographie

Die zweidimensionale M (*motion*)-Mode Echokardiographie erfolgte mit Hilfe des Kleintierechokardiographs *Vevo 3100 Visualsonics Fujifilm MX400* (Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada). Bei der Echokardiographie werden die vom Schallkopf mit einer bestimmten Frequenz ausgesandten Schallwellen von einer Grenzfläche reflektiert und entsprechend der Tiefe der Grenzfläche in elektrische Signale umgewandelt. Beim M-Mode wird das eindimensionale Bild über die Zeit abgeleitet, sodass die Dimension des Herzens im Herzrhythmus (Systole und Diastole) aufgezeichnet werden kann [60].

Die Mäuse wurden mit einem Gasgemisch aus 1.5 – 2.5% Isofluran und 97.5 – 98.5% Sauerstoff über eine Nasenmaske narkotisiert und so eingestellt, dass die Herzfrequenz bei 450 ± 50 bpm lag. Nach Enthaarung des Brustkorbs mit handelsüblicher Enthaarungscreme wurde die Maus auf einer Wärmeplatte fixiert und zur Kontrolle der Temperatur ein rektales Thermometer eingeführt. Das Herz wurde in der parasternal langen Achse (PSLAX) dargestellt. Zudem wurde die Durchflussgeschwindigkeit an der stenosierten Stelle mit Hilfe des Farbdopplers gemessen. Die farbkodierte Dopplerechokardiographie ist eine Sonderform des *pulsed wave* (pw)-Dopplers. Dabei werden pulsatile Ultraschallstrahlen ausgesendet, die vom fließenden Blut reflektiert werden. Je nachdem, ob das Blut zum Schallkopf hin oder vom Schallkopf weg fließt, erfolgt die Farbkodierung in Rot oder Blau. Zudem wird die Geschwindigkeit des Blutflusses über die Helligkeit des Farbtönen wiedergegeben [61]. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms *Vevo LAB 3.0.0* (Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada).

3.5. Elektrokardiogramm (EKG)

Für die Messung des Elektrokardiogramms (EKG) wurden die Mäuse an d2 nach der TAC-OP mit einer intraperitonealen Injektion aus Medetomidin (0.5 mg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (0.05 mg/kg KG) narkotisiert und auf eine Wärmeplatte gelegt. Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe eines rektalen Thermometers kontrolliert. Ein 6-Kanal-EKG wurde aufgenommen, indem die Vorder- und Hinterpfoten der Maus mit Elektroden verbunden und das EKG über 1 min mit der Software *LabChart 8* (ADInstruments, Oxford, Großbritannien) und einem *MouseMonitor™* (Indus Instruments, Webster, TX, USA) aufgezeichnet wurde. Bei einem Teil der Mäuse wurde im Anschluss an das Ruhe-EKG eine akute Stresssituation simuliert, indem ihnen 1 mg/kg KG Isoprenalin (ISO) intraperitoneal injiziert und das EKG für weitere 5 min aufgezeichnet wurde. Diese Arbeiten wurden von Dr. Susanne Klatt durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Ableitung II nach Einthoven verwendet. Nach der EKG-Aufzeichnung wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet, das Herz entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.6. Histologie

Die histologischen Untersuchungen wurden an Paraffinschnitten durchgeführt. Dafür wurden die entnommenen Herzen in 4% Paraformaldehyd (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland) fixiert, anschließend entwässert und in Paraffin eingebettet. Diese Arbeit wurde freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg übernommen. Aus den Paraffinblöcken wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 5 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Anfertigung der Schnitte wurde von Gabriela Pietrzyk durchgeführt. Die Schnitte wurden 2x 10 min in Xylol entparaffiniert und je 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100%, 2x 96%, 2x 70%) rehydriert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in 1x PBS (5 min).

3.6.1. Wheat germ agglutinin (WGA)-Färbung

Für die Bestimmung der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten wurden die Schnitte mit *wheat germ agglutinin* (WGA) gefärbt, welches selektiv an die Zellmembran bindet. Dafür wurden die Schnitte zuerst mit *Antigen Unmasking Solution* (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) (1:100 in dH₂O) behandelt und für 30 min bei 95°C gekocht. Danach wurden die Schnitte 15 min mit Avidin (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), 15 min mit Biotin (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) und 30 min mit *SuperBlock® Blocking Buffer* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) blockiert. Dazwischen erfolgte jeweils ein Waschschrift mit 1x PBS (5 min). Der Primärantikörper WGA-Alexa Fluor™ 594 (Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA) wurde in einer Konzentration von 1:300 in 1x PBS eingesetzt und über Nacht (ü.N.) bei 4°C inkubiert. Die Negativ-Kontrolle erhielt 1x PBS anstelle des Primärantikörpers.

Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS (je 5 min) wurden die Zellkerne mit Hilfe des Farbstoffs Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) angefärbt (1:50000, 2 min). Nach einem weiteren Waschschrift (1x PBS, 5 min) wurden die Schnitte mit *Roti®-Mount FluorCare* (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt und lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte an dem Fluoreszenzmikroskop *Zeiss Observer.Z1* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit der Software *Axio Vision 4.9.1* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Pro Herz wurden 10 Aufnahmen des linken Ventrikels

in 40-facher Vergrößerung gemacht. Die Auswertung der Querschnittsflächen erfolgte mit dem Programm *Histo Quest 3.0.3.0158* (TissueGnostics GmbH, Wien, Österreich). Dabei wurden nur ganze Kardiomyozyten mit sichtbarem Zellkern und deutlich erkennbarer Zellmembran ausgemessen.

3.6.2. Isolectin B₄-Färbung

Für die Analyse der Kapillardichte in den einzelnen Herzen wurden die Schnitte mit Isolectin B₄ gefärbt, welches spezifisch an α -Galactosyl-Reste auf Endothelzellen bindet. Die Schnitte wurden zuerst für 30 s bei 121°C in *Antigen Unmasking Solution* (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) (1:100 in dH₂O) gekocht, um die Antigene zu demaskieren. Danach wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-System (je 15 min, dazwischen 5 min in 1x PBS waschen) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) und anschließend für 60 min mit *SuperBlock® Blocking Buffer* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) geblockt. Das biotinylierte *Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I* (Isolectin B₄, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) wurde in einer Konzentration von 1:200 in 1x PBS ü.N. bei 4°C auf die Schnitte gegeben. Für die Negativ-Kontrolle wurde 1x PBS eingesetzt.

Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS (je 5 min) wurden die Schnitte für 30 min mit dem *VECTASTAIN® ABC HRP Kit* (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (1x PBS, 5 min) wurden die Schnitte mit einem Diaminobenzidin-Gemisch (200 ml 1x PBS, 4 ml DAB, 300 μ l 1% H₂O₂) entwickelt (3 min, 37°C). Die Kernfärbung erfolgte für 30 s mit Hämalaun nach Meyer und anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser (10 min). Nach einer kurzen aufsteigenden Alkoholreihe (2x 70%, 2x 96%, 2x 100%) und 2x 5 min in Xylol wurden die Schnitte mit DePeX (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte am Mikroskop *Zeiss AxioStar plus* mit der Software *Axio Vision 4.9.1* (beides: Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Dabei wurden je Herz 10 Aufnahmen des linken Ventrikels in 40-facher Vergrößerung gemacht. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Dabei wurde die Anzahl der Kapillaren pro Bild (Gesamtfläche: 0.156164 mm²) ermittelt und die Kapillardichte pro mm² berechnet.

3.6.3. Masson-Trichrom-Färbung

Für die Quantifizierung fibrotischer Anteile im Herzen wurde die Färbung nach Masson-Trichrom verwendet. Dafür wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte für eine kontrastreichere Färbung ü.N. in *Bouin's Solution* (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Für die Zellkernfärbung wurden die Herzen für 6 min mit Weigert's Eisen-Hämatoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) inkubiert und wiederum 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen (bläuen). Die Muskelfärbung erfolgte mit Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (4 min) und anschließender Spülung in dH₂O. Nach einer 5 min Inkubation in Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdänsäure-Lösung (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) wurde das Kollagen mit Anilinblau (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (12 min) angefärbt. Für eine deutlichere Färbung wurden die Schnitte kurz in 1% Essigsäure (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) inkubiert und danach mit dH₂O gespült. Nach einer kurzen aufsteigenden Alkoholreihe (2x 70%, 2x 96%, 2x 100%) und 2x 5 min Inkubation in Xylol wurden die Schnitte mit DePeX (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte am Mikroskop *Zeiss Axiostar plus* mit der Software *Axio Vision 4.9.1* (beides: Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Dabei wurde in 20-facher Vergrößerung das gesamte Herz in einzelnen Bildausschnitten aufgenommen. Für die Auswertung wurde mit Hilfe des Programms *Histo Quest 3.0.3.0158* (TissueGnostics GmbH, Wien, Österreich) der Anteil der Fibrosefläche an der gesamten Herzfläche berechnet.

3.7. RNA-Isolation und quantitative Real-Time PCR

3.7.1. RNA-Isolation

Für die Isolation der RNA aus dem Herzgewebe wurden die Proben mit Hilfe des *FastPrep[®]-24* Homogenisator (MP Biologicals LCC, Irvine, CA, USA) und dem Extraktionsreagenz *peqGOLD TriFast[™]* (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), bestehend aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, zerkleinert (6000 rpm, 40 s). Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Durch die Zugabe von Chloroform (200 µl), einer weiteren Inkubation (10 min, RT) und anschließender Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, RT) trennte sich das Homogenat in

3 Phasen auf: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, die die Proteine und DNA enthält, eine Interphase, in der sich hauptsächlich die DNA befindet, und eine obere farblose wässrige Phase, in der die RNA angereichert ist. Die obere Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und für die Präzipitation der RNA mit 500 µl Isopropanol inkubiert (48 h, -20°C). Nach einem Zentrifugationsschritt (10000 rpm, 15 min, 4°C) wurde das Pellet, in dem sich die RNA befindet, 2x mit je 1 ml 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 10000 rpm, 5 min, 4°C) und anschließend getrocknet (45 min, unter dem Abzug). Die RNA wurde in 87.5 µl RNase-freiem H₂O gelöst.

3.7.2. DNA-Verdau

Für den Verdau noch vorhandener DNA wurde die Probe mit 2.5 µl DNase I und 10 µl RDD-Puffer aus dem *RNase-Free DNase Set* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Dafür wurde die Probe zusammen mit 350 µl RLT-Puffer + 1% β-Mercaptoethanol und 350 µl 70% Ethanol auf die *RNeasy Mini Spin* Säule gegeben und zentrifugiert (10000 rpm, 30 s, RT). Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zentrifugiert (10000 rpm, 30 s, RT). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10000 rpm, 2 min, RT), um die Reste des Puffers vollständig zu entfernen, wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem H₂O eluiert (10000 rpm, 30 s, RT) und die Konzentration am *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) bestimmt.

3.7.3. cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA wurden zuerst 1 µg RNA mit 1 µl Random Primer (Promega, Madison, WI, USA) und der entsprechenden Menge an RNase-freiem H₂O (Gesamtvolumen: 10 µl) für 3 min bei 70°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen aufzulösen und eine Anlagerung der Primer an die RNA zu ermöglichen. Anschließend wurden 1 µl dNTP (10 mM), 3 µl RNase-freies H₂O, 4 µl *M-MLV Reverse Transcriptase* 5x Puffer, 1 µl RNasin® und 1 µl *M-MLV Reverse Transcriptase* (alle: Promega, Madison, WI, USA) zu der Probe gegeben und die reverse Transkription für 60 min bei 37°C gestartet. Die Enzym-Inaktivierung erfolgte für 2 min bei 95°C.

3.7.4. quantitative Real-Time PCR

Für die Analyse der Genexpression in den Proben wurde eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) am *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* mit der *QuantStudio™ Software* (beides: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) durchgeführt. Dafür wurden die in Tabelle 1 dargestellten Primer-Sonden (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet, die für die Detektion der Amplifizierung in Echtzeit mit dem Farbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) gekoppelt sind.

Tabelle 1: Verwendete Primer-Sonden für die qRT-PCR

Gen	Primer-Sonde (ID)	Genfunktion
Myh6 (α -MHC)	Mm00440354_m1	Hypertrophie
Myh7 (β -MHC)	Mm00600555_m1	Hypertrophie
Nppb (BNP)	Mm01255770_g1	Hypertrophie
Col1a1	Mm00801666_g1	Fibrose
IL-1 β	Mm00434228_m1	Inflammation
IL-6	Mm00446190_m1	Inflammation
CCL2 (MCP-1)	Mm00441242_m1	Inflammation
GAPDH	Mm99999915_g1	Haushaltsgen

Für die qRT-PCR wurden folgende Komponenten gemischt: 4 μ l cDNA, 1 μ l Primer-Sondenpaar, 5 μ l *TaqMan Gene Expression Mastermix* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Die Analyse der Genexpression erfolgte jeweils in Duplikaten und mit folgendem Programm: Hold: 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, Cycle: 15 s bei 95°C, 1 min bei 60°C (40 Zyklen).

Die Auswertung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Dafür wurde die Differenz aus den CT-Werten des spezifischen Gens und des Haushaltgens GAPDH (ΔCT) sowie die Differenz aus den ΔCT -Werten der einzelnen Proben und dem Mittelwert der Kontrollgruppe gebildet ($\Delta\Delta CT$).

3.8. Western Blot

3.8.1. Homogenisierung

Das Herzgewebe wurde der Maus unter Isofluran-Narkose und nach zervikaler Dislokation entnommen und Ventrikel und Vorhof getrennt voneinander isoliert. Anschließend wurde das Ventrikelgewebe mit Hilfe eines Zellysepuffers (Tabelle 2) und durch mechanische Zerkleinerung homogenisiert. Die Proben wurden für 30 min auf Eis gestellt und zwischendurch gevortext, damit sich der Lysepuffer gleichmäßig im zerkleinerten Gewebe verteilt. Durch den Lysepuffer werden die Zellmembran zerstört und die im Zytosol befindlichen Proteine freigesetzt. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (6600 rpm, 10 min, 4°C) wurden die im Überstand gelösten Proteine von den übrigen Zellbestandteilen getrennt.

Tabelle 2: Zellysepuffer für den Western Blot

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
Zellysepuffer	Tris-HCl (pH 7.4)	20 mM
	NaCl	200 mM
	NaF	20 mM
	Triton X-100	0.01% (v/v)
	Na ₃ VO ₄	1 mM
	DTT	1 mM
	cComplete Tablets (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)	0.1% (v/v)
	PhosSTOP (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)	0.1% (v/v)

Die Proteinkonzentration in jeder Probe wurde mit Hilfe eines BCA (*Bicinchoninic Acid*) Assay Kits (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) anhand eines Protein-Standards (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) bestimmt. Sowohl von der Standardkurve als auch von den Proben (1:10 mit PBS verdünnt) wurden jeweils Triplikate verwendet. Die verdünnten Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit der BCA-Lösung, die im Verhältnis 1:50 aus den beiden Reagenzien Kupfer(II)sulfat und Bicinchoninsäure hergestellt wurde, für 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde am Photometer *infinite M200 Pro* (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) die Absorption bei 540 nm gemessen.

Um in jeder Probe die gleiche Ausgangskonzentration an Protein zu erhalten, wurden die Proben mit der entsprechenden Menge an PBS und Ladepuffer (Tabelle 3) verdünnt, sodass jeweils 1 µg/µl Protein in jeder Probe war. Dem Ladepuffer wurde zur Lösung der Disulfidbrücken im Protein 10% β-Mercaptoethanol zugegeben. Die Denaturierung erfolgte für 5 min bei 95°C für zytosolische Proteine und für 30 min bei 37°C für membranständige Proteine.

Tabelle 3: Ladepuffer für den Western Blot

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
Ladepuffer (pH 6.8, 37°C)	Tris Base	3.125 mM
	SDS	3.5 mM
	Glycerol (87%)	50% (v/v)
	Bromphenol Blau	0.75 µM
	β-Mercaptoethanol	10% (v/v)

3.8.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zuerst ein Gel bestehend aus einem Trenn- und Sammelgel (Tabelle 4) gegossen. Durch die Konzentration des Polyacrylamids im Trenngel konnte die Auftrennung der Proteine im Gel beeinflusst werden. Bei hochprozentigen Gelen wurden die kleinen Proteine, bei niedrigprozentigen Gelen die großen Proteine besser aufgetrennt. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um das Gel luftblasenfrei und sauber zu halten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, welches dazu dient, dass die Proben gleichmäßig von den Taschen in das Gel wandern. Vor der Polymerisation wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt, sodass sich Taschen für die Auftragung der Proben ausbildeten.

Das auspolymerisierte Gel wurde für die SDS-Gelelektrophorese mit Laufpuffer (Tabelle 5) befüllt und anschließend die mit Ladepuffer versetzten Proben und ein Größenmarker (10.0-250.0 kDa, 8-16% SDS-PAGE, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 60 mA (const.), 100 V, 50 W für ca. 2 h gestartet, bis die Proteine vollständig der Größe nach aufgetrennt waren.

Tabelle 4: SDS-Polyacrylamidgele für den Western Blot

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
Sammelgel (5%, pH 6.8, RT)	Polyacrylamid	5% (v/v)
	Tris Base	1.25 mM
	SDS	0.03 mM
	APS	0.1% (v/v)
	TEMED	0.1% (v/v)
Trenngel (8%, pH 8.8, RT)	Polyacrylamid	8% (v/v)
	Tris Base	23.5 mM
	SDS	0.22 mM
	APS	0.1% (v/v)
	TEMED	0.1% (v/v)

Tabelle 5: Gelelektrophorese-Laufpuffer für den Western Blot

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
Gelelektrophorese-Laufpuffer (pH 8.3, RT)	Tris Base	100 mM
	Glycin	767 mM
	SDS	13.8 mM

3.8.3. Transfer

Für den Transfer der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran (GE Health Care, Chalfont St Giles, Großbritannien) wurden zuerst die Membran, Filterpapier und Schwämme in Transferpuffer (Tabelle 6) eingeweicht und anschließend die Komponenten in folgender Reihenfolge in eine Kassette gelegt: Schwamm, 2x Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Gel, 2x Filterpapier, Schwamm. Der Transfer erfolgte für 2 h bei 400 mA (const.), 100 V, 50 W. Für optimale Transferbedingungen wurde die gesamte Apparatur mit Eis gekühlt.

Nach dem Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran wurde die Membran kurz mit Ponceau S (Tabelle 7) gefärbt, welches unspezifisch an die Proteine bindet. Anschließend wurde die Membran gründlich mit TBS-T (Tabelle 7) gespült, um das Ponceau S vollständig zu entfernen.

Tabelle 6: Transferpuffer für den Western Blot

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
Transferpuffer (pH 8.3, RT)	Tris Base	130 mM
	Glycin	767 mM
	Methanol	20% (v/v)
	SDS	0.01% (v/v)

Tabelle 7: Ponceau S und Waschpuffer für den Western Blot

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
Ponceau S	Ponceau S	0.5% (w/v)
	Essigsäure (CH ₃ COOH)	1% (v/v)
TBS-T (pH 7.5, RT)	Tris Base	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0.1% (v/v)

3.8.4. Antikörper und Entwicklung

Um zu viele unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Antikörperbindungsstellen zuerst für 1 h mit 5% Milchpulver in TBS-T (Tabelle 7) blockiert. Anschließend wurde je nach gewünschtem Protein der spezifische primäre Antikörper (Tabelle 8) auf die Membran gegeben, der durch die höhere Affinität des Antikörpers an die entsprechenden Stellen bindet und die unspezifische Bindung verdrängt. Der primäre Antikörper wurde bei 10 rpm und 4°C über Nacht inkubiert.

Nach einem dreimaligen Waschschrift mit TBS-T (je 10 min), um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (HRP-konjugierter *donkey anti-rabbit* oder *sheep anti-mouse* IgG Antikörper, GE Health Care, Chalfont St Giles, Großbritannien) inkubiert (1 h, 10 rpm). Anschließend wurde die Membran wiederum 3x 10 min mit TBS-T gewaschen.

Tabelle 8: Verwendete primäre Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
CaMKII γ	Mouse	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
CaMKII δ	Rabbit	1:15000	AG Bers, UC Davis, CA, USA
GAPDH	Mouse	1:30000	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
LTCC	Rabbit	1:500	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
NCX	Mouse	1:500	Abcam, Cambridge, Großbritannien
PLB	Mouse	1:10000	Badrilla Ltd. Leeds Innovation Centre, Leeds, Großbritannien
pSer2814-RyR2	Rabbit	1:3333	Badrilla Ltd. Leeds Innovation Centre, Leeds, Großbritannien
pThr17-PLB	Rabbit	1:6666	Badrilla Ltd. Leeds Innovation Centre, Leeds, Großbritannien
pThr287-CaMKII	Mouse	1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
RyR2	Rabbit	1:10000	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
SERCA2a	Mouse	1:20000	ABR Affinity BioReagents, Golden, CO, USA

Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe des *WesternBright™ ECL Chemilumineszenz Substrats* (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) und einem *Kodax*-Röntgengerät (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Für die Auswertung der Western Blots wurde das Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) verwendet.

3.9. CaMKII-Aktivitätsassay

Der CaMKII-Aktivitätsassay wurde wie von Backs et al. beschrieben [62] durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben (Homogenisierung, Bestimmung der Proteinkonzentration) erfolgte analog zu der Beschreibung in 3.8.1. Das GST-HDAC4 Protein (AG Backs, Universitätsklinikum Heidelberg, Deutschland) wurde an *Glutathion Sepharose Beads* (GE Health Care, Chalfont St Giles, Großbritannien) konjugiert, indem beide Komponenten im Verhältnis 1:2 in einem Überkopffroller inkubiert wurden (5 rpm, ü.N., 4°C). Die konjugierten HDAC4-Beads wurden mit 50 µg Protein in GST-Puffer, 750 mM NaCl (Tabelle 9) inkubiert (5 rpm, 2 h, 4°C), damit die aktivierte CaMKII im Proteinlysate an HDAC4 binden kann. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschschrift (2x mit GST-Puffer, 750 mM NaCl, 1x mit GST-Puffer, 150 mM NaCl) (Tabelle 9). Dabei wurden die Proben zuerst rotiert (5 rpm, 5 min, 4°C), dann zentrifugiert (1500 rpm, 2 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig abgenommen und die Proben in GST-Puffer, 150 mM NaCl zusammen mit Ladepuffer (Tabelle 6) und β-Mercaptoethanol denaturiert (500 rpm, 2 min, 95°C), um den CaMKII-HDAC4-Proteinkomplex von den Beads zu lösen. Nach einer weiteren Zentrifugation (13000 rpm, 30 s, 4°C) konnte der Überstand abgenommen und analog zu 3.8 geblottet werden.

Tabelle 9: Puffer für den CaMKII-Aktivitätsassay

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
GST-Puffer, 150 mM NaCl (pH 7.4, RT)	Tris (pH 7.4)	20 mM
	NaCl	150 mM
	cOmplete Tablets (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)	2% (v/v)
GST-Puffer, 750 mM NaCl (pH 7.4, RT)	Tris (pH 7.4)	20 mM
	NaCl	750 mM
	cOmplete Tablets (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)	2% (v/v)

Für den CaMKII-Aktivitätsassay wurden folgende primäre Antikörper (Tabelle 10) verwendet. Für die Auswertung wurde die CaMKII-Aktivität auf HDAC4 normalisiert.

Tabelle 10: Verwendete primäre Antikörper für den CaMKII-Aktivitätsassay

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
CaMKII	Mouse	1:1000	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
HDAC4	Rabbit	1:30000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA

3.10. Isolation der Herzmuskelzellen

Für die Einzelzellmessungen wurde der mit Isofluran narkotisierten und durch zervikale Dislokation getöteten Maus das Herz entnommen und mit Hilfe einer Langendorff-Perfusionsanlage verdaut. Dafür wurde das entnommene Herz retrograd über die Aorta mit einer Enzymlösung, die Liberase™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und Trypsin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) enthält (Tabelle 11), für 7 – 8 min verdaut. Danach wurde das Herz von der Perfusionsanlage genommen und mechanisch zuerst mit Hilfe einer Schere, dann durch Auf- und Abpipettieren in einer Stopplösung für die Enzyme mit 10% BCS (*bovine calf serum*, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) dissoziiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit Hilfe einer Nylongaze (Porendurchmesser: 200 µm) filtriert. Diese Arbeit wurde freundlicherweise von Thomas Sowa und Felicia Radtke übernommen.

Um die Einzelzellen von der Ca²⁺-freien Lösung wieder an die Normaltyrode mit 1 mM [Ca²⁺] zu gewöhnen, wurde der Ca²⁺-Gehalt schrittweise von 0.1 mM auf 0.8 mM erhöht. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils 7 min gewartet und dann der Überstand abgenommen, um gleichzeitig die intakten Zellen, die schneller absinken, von den kaputten und sterbenden Zellen zu trennen. Anschließend wurden die Zellen auf mit Laminin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) beschichteten Messkammern ausplattiert und 15 min gewartet, damit die Zellen an das Laminin anhaften können.

Tabelle 11: Enzymlösung für die Zellisolation

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
Enzymlösung (pH 7.4, 37°C)	NaCl	113 mM
	KCl	4.7 mM
	KH ₂ PO ₄	0.6 mM
	Na ₂ HPO ₄	0.6 mM
	MgSO ₄	1.2 mM
	Phenolrot	0.032 mM
	NaHCO ₃	12 mM
	KHCO ₃	10 mM
	HEPES	10 mM
	Taurine	30 mM
	BDM	10 mM
	Glukose	5.5 mM
	Liberase blendzyme 1	7.5 mg/ml
	Trypsin	0.6% (v/v)
CaCl ₂	0.125 mM	

3.11. Epifluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie und einem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff kann die Veränderung des Ca²⁺-Gehalts innerhalb einer Zelle während der elektromechanischen Kopplung detektiert werden. Zusätzlich kann auch die Kontraktion der Zelle durch die Messung der Sarkomerlängenverkürzung verfolgt werden.

3.11.1. Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops

Der Aufbau des Epifluoreszenzsetups (Ion Optix Corporation, Westwood, MA, USA) ist in Abbildung 5 dargestellt. Das kurzwellige Licht einer UV-Lampe (1) wird über einen Exzitationsfilter und dichroitischen Spiegel (3, D560±20 nm), der nur Wellenlängen zwischen 540 nm und 580 nm passieren lässt, zur Fluoreszenzanregung auf das Objekt gelenkt. Der Hyperswitch-Spiegel (2) wird nur für ratiometrische Farbstoffe benötigt, um schnell zwischen zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen alternieren zu können. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde der Hyperswitch mit Hilfe eines Hebels aus dem Strahlengang

geklappt. Ein weiterer dichroitischer Spiegel (4, D585 LPXR) reflektiert Licht mit einer Wellenlänge $\lambda < 585$ nm auf das Objekt und lässt gleichzeitig das längerwellige, rote Licht der Durchlichtquelle (6) für die Aufzeichnung der Sarkomerlängenverkürzung sowie das vom Objektträger emittierte Licht ($\lambda > 585$ nm) passieren. Ein weiterer dichroitischer Spiegel (7, D685 DMLP) leitet das Durchlicht der Myozytenkamera (8) und das emittierte Fluoreszenzlicht dem Photomultiplier (9), dem nochmals ein Filter (D630 \pm 35 nm) vorgeschaltet ist, zu. Das Fluoreszenz System Interface (12) konvertiert anschließend die Messdaten in computerlesbare Daten, sodass sowohl die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als Ca^{2+} -Transient als auch die Sarkomerlängenverkürzung mit Hilfe des Computerprogramms *Ion Wizard* (Ion Optix Corporation, Westwood, MA, USA) dargestellt werden kann. Mit Hilfe des Stimulationsgeräts (10) können die Myozyten mit unterschiedlich hohen Frequenzen stimuliert und eine Kraft-Frequenz-Beziehung aufgenommen werden.

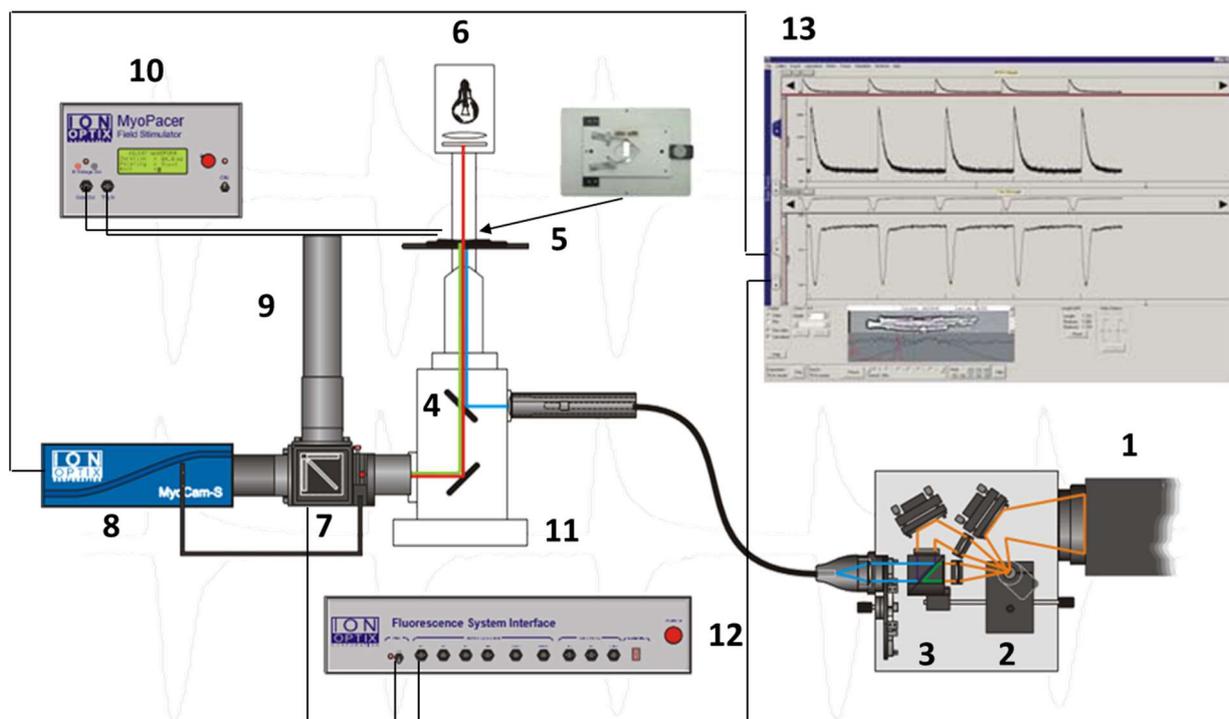


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops

1: UV-Lampe, 2: Hyperswitch-Spiegel, 3: Dichroitischer Exzitatorspiegel und Filter (D560 \pm 20 nm), 4: Dichroitischer Emissionsspiegel (D585 LPXR), 5: Objektträger mit Zellen, 6: Durchlichtquelle (rot), 7: Dichroitischer Spiegel (D685 DMLP), 8: Myozyten-Kamera, 9: Photomultiplier mit Filter (D630 \pm 35 nm), 10: Stimulationsgerät, 11: Mikroskop Nikon Eclipse TE 2000, 12: Fluoreszenz System Interface, 13: Computerprogramm *Ion Wizard*. Abbildung nach [63].

3.11.2. Der Ca^{2+} -Farbstoff X-Rhod1

Für die Messung der Ca^{2+} -Transienten wurde der nicht-ratiometrische Farbstoff X-Rhod1-AM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet. X-Rhod1 hat ein festes Exzitationsmaximum (580 nm) und Emissionsmaximum (602 nm). Bei nicht-ratiometrischen Farbstoffen verstärkt sich durch die Bindung an Ca^{2+} -Ionen die Fluoreszenzintensität, sodass mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration die Fluoreszenzamplitude steigt (Abbildung 6). Bei ratiometrischen Farbstoffen hingegen kommt es durch die Bindung an Ca^{2+} zu einer Verschiebung des Exzitations- oder Emissionsmaximums (Spektralshift).

Der Farbstoff X-Rhod1 wurde ausgewählt, da dessen Exzitations- und Emissionsmaximum im rotwelligen Bereich liegt und sich somit nicht mit dem in den AC3-I und AC3-C Tieren transgen exprimierten eGFP (Exzitationsmaximum: 480 nm, Emissionsmaximum: 510 nm) überschneidet.

Der Farbstoff X-Rhod1 ist an Acetoxymethylester (AM) gekoppelt. Durch die lipophilen Eigenschaften des Esters wird die Membranpermeabilität erhöht und der Farbstoff gelangt ins Zytosol. Zelleigene Esterasen spalten anschließend den Acetoxymethylester ab, sodass der Farbstoff hydrophil und membran-impermeabel wird.

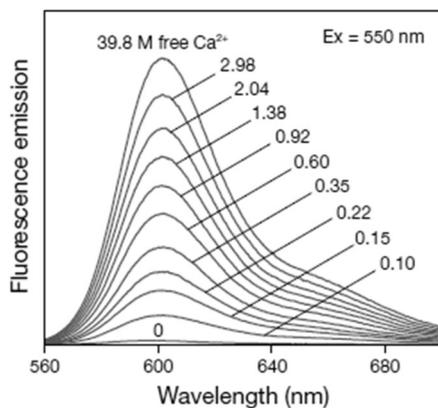


Abbildung 6: Fluoreszenzemissionsspektrum von X-Rhod1

Mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration steigt die Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum von X-Rhod1. Ex = Exzitationswellenlänge. Abbildung nach [64].

3.11.3. Versuchsdurchführung

Die Zellen wurden mit 2 μM X-Rhod1-AM in 1x Normaltyrode (Tabelle 12) für 15 min inkubiert. Anschließend wurde der Farbstoff abgekippt und die Perfusion mit 1x Normaltyrode bei 37°C gestartet. Nach einer Wartezeit von 15 min, in der die zelleigenen Esterasen den Acetoxymethylester abspalten, erfolgte die Messung der Ca^{2+} -Transienten sowie der Sarkomerlänge mit Hilfe des Programms *Ion Wizard* (Ion Optix Corporation, Westwood, MA, USA). Die Zellen wurden mit 1 Hz stimuliert, bis sie einen steady-state Zustand erreicht hatten. Der Ca^{2+} -Gehalt im SR wurde durch die rasche Applikation von 10 mM Caffein (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), welches die Ryanodinrezeptoren im geöffneten Zustand blockiert, gemessen. Um das arrhythmogene Potential der verschiedenen Versuchsgruppen zu vergleichen, wurde die Stimulation für 30 s gestoppt und die spontanen Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) in dieser Stimulationspause bestimmt.

Eine Gruppe der Kardiomyozyten wurde zusätzlich mit dem CaMKII-Inhibitor AiP (2 μM , 30 min) inkubiert und wie oben beschrieben gemessen. Zusätzlich wurden Zellen aus WT Tieren ohne OP mit rekombinantem eGFP (100 mM, 30 min) (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) inkubiert und anschließend gemessen, um eine mögliche Toxizität des in den AC3-I und AC3-C Mäusen exprimierten eGFP zu überprüfen. Die eingesetzte Konzentration entspricht der in den Mäusen exprimierten Konzentration [58]. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Programm *Ion Wizard* (Ion Optix Corporation, Westwood, MA, USA).

Tabelle 12: Messtyrode für Mauskardiomyozyten

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
Normaltyrode (pH 7.4, 37°C)	KCl	4 mM
	NaCl	140 mM
	MgCl ₂	1 mM
	HEPES	5 mM
	Glukose	10 mM
	CaCl ₂	1 mM

3.12. Calcium-Kalibrierung

Für die Kalibrierung der intrazellulären Calcium-Konzentration wurden zwei verschiedene Lösungen (EGTA und CaEGTA) verwendet. Die EGTA-Lösung (F_{\min} -Lösung) setzte sich wie in Tabelle 13 dargestellt zusammen. EGTA diente dabei als Ca^{2+} -Chelator. Durch das Ionophore A23187 wurde sichergestellt, dass sich die intra- und extrazellulären Lösungen equilibrieren können. Rotenon und 2-Deoxy-D-Glucose als metabolische Inhibitoren sowie CPA als SERCA2a-Inhibitor und SEA0400 als NCX-Inhibitor blockierten den aktiven Ca^{2+} -Transport in der Zelle. BDM sorgte außerdem dafür, dass die Zelle bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen nicht kontrahiert und somit die Calcium-Kalibrierung nicht beeinflusst wurde. Die CaEGTA-Lösung (F_{\max} -Lösung) unterschied sich von der EGTA-Lösung nur durch die Zugabe von 6 mM CaCl_2 (entspricht einer freien Ca^{2+} -Konzentration von 5 mM, berechnet mit dem MaxChelator Programm).

Die Zellen wurden zuerst mit der EGTA-Lösung umspült, bis eine minimale Fluoreszenzintensität (F_{\min}) erreicht wurde. Anschließend wurde zu der CaEGTA-Lösung gewechselt, bis eine maximale Fluoreszenzintensität (F_{\max}) detektiert wurde. Das Fluoreszenzsignal wurde dabei alle 2 min für 1 - 2 s gemessen. Die diastolische Calcium-Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{diast}}$ wurde anschließend mit Hilfe der Grynkiewicz-Gleichung [65] berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{diast}} = K_d \cdot (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

wobei $K_d = 700$ nM (Ca^{2+} -Dissoziationskonstante für X-Rhod1). F_{\min} und F_{\max} sind die minimale und maximale Fluoreszenzintensität bei null und gesättigter Ca^{2+} -Konzentration und F ist die jeweilige Fluoreszenzintensität in der Diastole für jede Zelle.

Tabelle 13: Messlösung für die Calcium-Kalibrierung

Lösung/Puffer	Substanz	Konzentration
EGTA-Lösung (F_{\min}) (pH 7.4, RT)	KCl	5.4 mM
	NaCl	130 mM
	MgCl ₂	0.5 mM
	EGTA	1 mM
	BDM	15 mM
	HEPES	25 mM
	A23187	0.01 mM
	2-Deoxy-D-Glucose	1.8 mM
	Rotenon	0.01 mM
	CPA	0.005 mM

3.13. Datenauswertung und Statistik

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Alle gezeigten Daten werden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) präsentiert, wobei der Standardfehler mit folgender Formel berechnet wird:

$$SEM = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

σ^2 = Varianz, σ = Standardabweichung, n = Stichprobengröße.

Für die statistische Auswertung wurde der ungepaarte Student t Test für den Vergleich zweier Gruppen und eine einseitige Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Tukey post Test für den Vergleich mehrerer Gruppen sowie der Exakte Test nach Fisher für 2x2 Kontingenztafeln verwendet. Das Überleben wurde mit dem Kaplan-Meier und Mantel-Cox Test analysiert. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert <0.05 angenommen.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden transgene Mäuse (AC3-I) verwendet, bei denen der CaMKII-Inhibitor *autocamtide-3 related inhibitory peptide* (AiP) herzspezifisch unter der Kontrolle des α -myosin heavy chain (α -MHC) Promotors und zusammen mit *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) exprimiert wird. Als Kontrollen dienten zum einen Wildtyp (WT) Geschwistertiere, zum anderen AC3-C Mäuse, bei denen eine inaktive Form des Inhibitors zusammen mit eGFP exprimiert wird. Im Gegensatz zu den AC3-I Tieren, bei denen beide im Herzen vorkommende CaMKII-Isoformen γ und δ inhibiert werden, fehlt den CaMKII δ -Knockout (CKO) Tieren nur die im Herzen am stärksten exprimierte δ -Isoform. Ziel der Arbeit ist es, die physiologische Funktion der beiden CaMKII-Isoformen im Herzen genauer zu definieren und die Folgen der Inhibition in einer akuten Stresssituation, simuliert durch eine operative Aortenkonstriktion (*transverse aortic constriction*, TAC), zu untersuchen.

4.1. AC3-I Mäuse

4.1.1. CaMKII-Expression & -Aktivität

Als Erstes wurde untersucht, ob die CaMKII in der akuten Nachlasterhöhung durch TAC eine Rolle spielt. Die akute Phase wurde dabei als Zeitraum Tag 2 bis Tag 5 nach der Operation definiert. Dafür wurden 2 Tage (d) nach der TAC-OP die Herzen entnommen und mittels Western Blot hinsichtlich der CaMKII-Expression sowie der Expression der phosphorylierten und somit aktivierten CaMKII untersucht. Zusätzlich wurde ein spezifischer CaMKII-Aktivitätsassay (nach Backs et al. [62]) durchgeführt, um die Aktivität der CaMKII auch direkt zu überprüfen.

Während die CaMKII δ -Expression an d2 nach TAC nur minimal gesteigert war (Abbildung 7 A+B), zeigte die pCaMKII als aktivierte Form der CaMKII zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Expressionserhöhung (Abbildung 7 A+C).

Dieses Ergebnis konnte durch den Aktivitätsassay bestätigt werden. So zeigte sich auch hier 2 d post-OP eine signifikante Steigerung der CaMKII-Aktivität in den WT TAC vs. sham Mäusen (Abbildung 7 D+E). Die Aktivierung der CaMKII stellt somit ein unmittelbares und wichtiges Signal in der akuten Phase der Nachlasterhöhung dar.

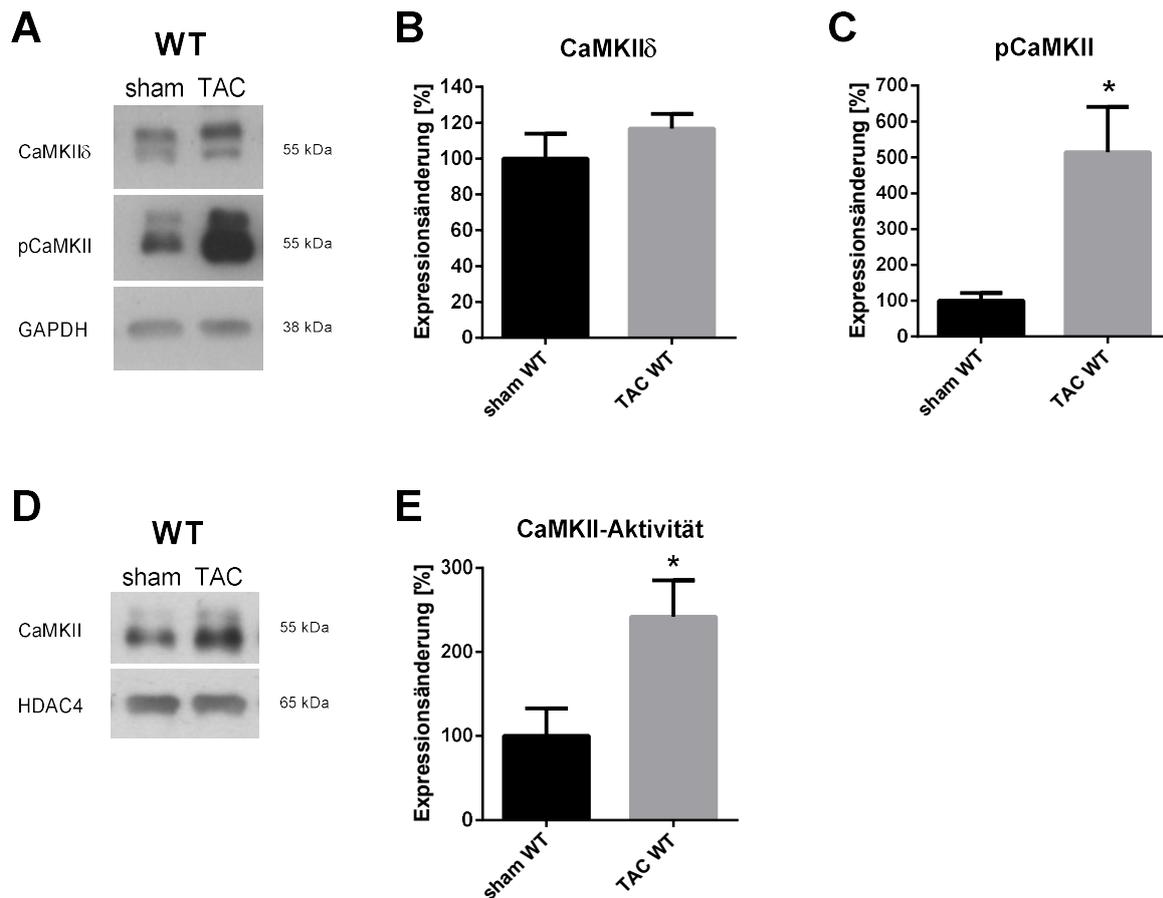


Abbildung 7: CaMKII-Expression und -Aktivität in WT Mäusen 2 d post-OP

A+D: Originalabbildung der CaMKII δ - und pCaMKII-Expression (A) sowie der CaMKII-Aktivität (D) in WT sham und TAC Mäusen. **B-E:** Expression der CaMKII δ (B), phosphorylierten CaMKII (C) und CaMKII-Aktivität (E) normalisiert auf die WT sham Gruppe (n=4 Mäuse/Gruppe, Student t Test). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe. (Abb. 7 A-C veröffentlicht in [66].)

4.1.2. Überleben

Das Überleben der Tiere wurde bis 5 Wochen nach der OP beobachtet. Todesfälle innerhalb der ersten 6 Stunden nach der TAC-OP wurden als OP-bedingte Todesfälle gewertet und nicht gezählt. Die AC3-I TAC Mäuse verstarben ausschließlich innerhalb der ersten 5 Tage nach der OP, während die WT TAC Mäuse hauptsächlich in der 2. Woche nach dem Eingriff verstarben. In den Kontrollgruppen der AC3-I und WT Mäuse überlebten sämtliche Tiere den Beobachtungszeitraum von 5 Wochen. Die Überlebensrate war somit in den AC3-I TAC Tieren im Vergleich zu den WT TAC und beiden sham Gruppen an d7 post-OP signifikant verringert (78% vs. 91% vs. 100%) (Abbildung 8 A).

Fünf Wochen nach der OP zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden TAC Gruppen hinsichtlich der Überlebensrate (Abbildung 8 B). Der Fokus der anschließenden Experimente lag somit auf der akuten Phase der Nachlasterrhöhung, definiert als d2 bis d5 post-OP, um die Todesursache der AC3-I Mäuse genauer zu erörtern.

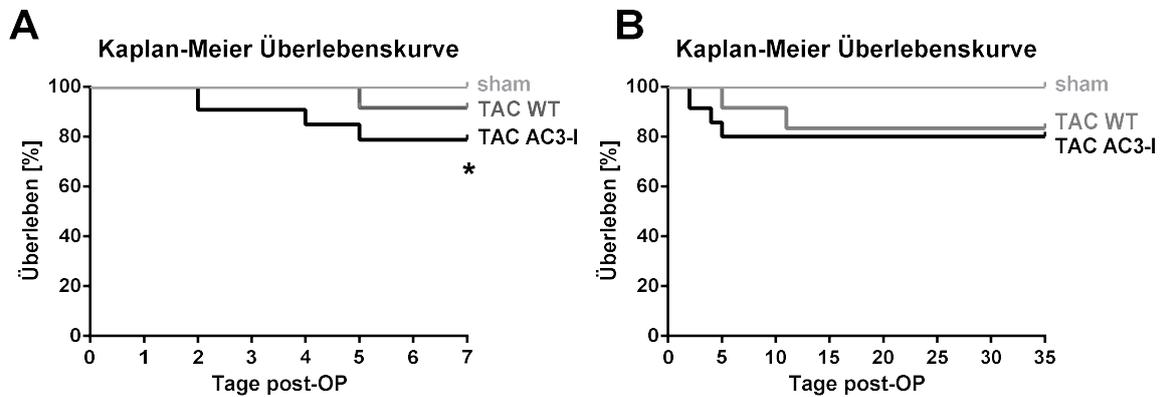


Abbildung 8: Überlebenskurve der WT und AC3-I Mäuse 7 d und 35 d post-OP

A+B: Kaplan-Meier Überlebenskurve der AC3-I und WT Mäuse 7 d (A) und 35 d (B) nach TAC ($n=12$ für WT, $n=33$ für AC3-I, Kaplan-Meier und Mantel-Cox Test). * $p<0.05$. (Abb. 8 veröffentlicht in [66].)

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Mortalität auf eine unterschiedlich starke Konstriktion der Aorta zurückzuführen sind, wurde die Durchflussgeschwindigkeit im Aortenbogen über der verengten Stelle mit Hilfe eines Farb-Dopplers gemessen (Abbildung 9 A). Während der Druckgradient in den beiden TAC Gruppen im Vergleich zu der jeweiligen sham Gruppe signifikant erhöht war, zeigte sich zwischen den WT TAC und AC3-I TAC Mäusen kein signifikanter Unterschied (Abbildung 9 B), was bedeutet, dass die erhöhte Sterblichkeit in den AC3-I TAC Tieren nicht auf eine stärkere Aortenkonstriktion zurückzuführen ist.

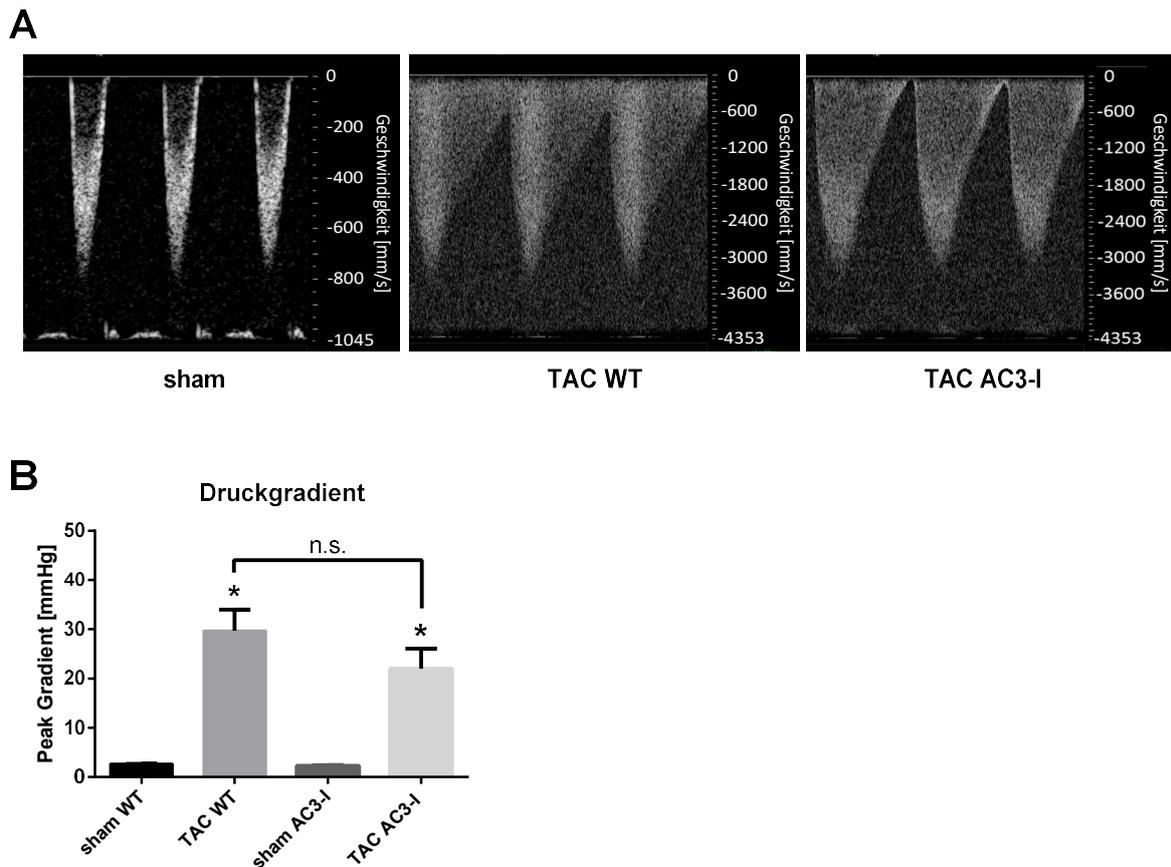


Abbildung 9: Druckgradient in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A: Beispiel für die Messung der Durchflussgeschwindigkeit über der verengten Stelle in sham (links), TAC WT (Mitte) und TAC AC3-I Tieren (rechts) 2 d nach der OP. **B:** Druckgradient in WT und AC3-I Mäusen 2 d nach der OP. Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=12-20$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). * $p<0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe. (Abb. 9 veröffentlicht in [66].)

Um eine verstärkte Inhibition der CaMKII-Aktivität infolge der akuten Nachlasterhöhung in den AC3-I TAC Mäusen und somit Unterschiede in der Mortalitätsrate aufgrund einer unterschiedlich starken transgenen Expression auszuschließen, wurde ein CaMKII-Aktivitätsassay durchgeführt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den AC3-I TAC vs. sham Mäusen (Abbildung 10 A+B), sodass die Unterschiede zwischen den AC3-I sham und TAC Tieren insbesondere auf die akute Nachlasterhöhung durch die TAC-OP zurückzuführen sind.

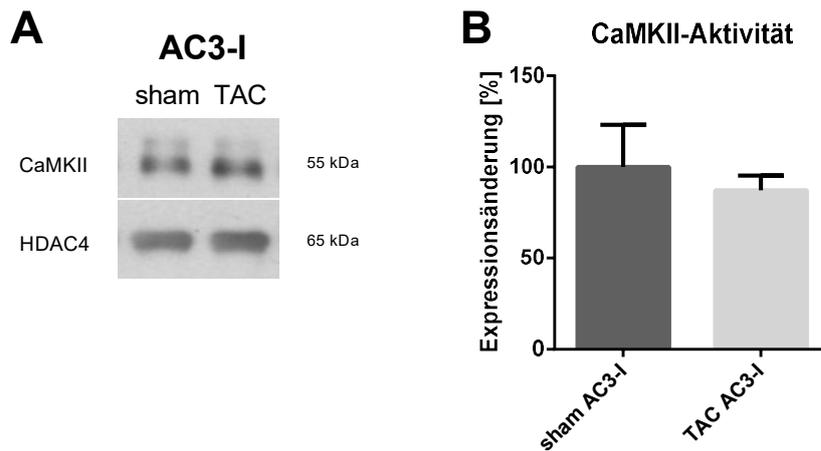


Abbildung 10: CaMKII-Aktivität in AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A: Originalabbildung der CaMKII-Aktivität in AC3-I TAC vs. sham Mäusen 2 d post-OP. **B:** CaMKII-Aktivität in AC3-I TAC vs. sham Mäusen 2 d nach der Operation ($n=4$ Mäuse/Gruppe, Student t Test). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. (Abb. 10 veröffentlicht in [66].)

4.1.3. Hypertrophie

Die Normalisierung des Herzgewichts auf das Körpergewicht der jeweiligen Maus (HW/BW Ratio) als ein *ex vivo* Marker für Herzhypertrophie ergab, dass in den WT TAC vs. sham Mäusen das HW/BW Ratio an d2 post-OP signifikant erhöht war, während sich in den AC3-I TAC Tieren im Vergleich zu den AC3-I sham Tieren kein signifikanter Unterschied ergab (Abbildung 11 A).

Die Entwicklung einer Herzhypertrophie geht in der Regel mit der Aktivierung des fötalen Hypertrophieprogramms einher, welches durch die gesteigerte Expression verschiedener Gene wie β -MHC (anstelle von α -MHC) oder BNP gekennzeichnet ist. Um zu überprüfen, ob das fötale Hypertrophieprogramm auch in der akuten Nachlasterhöhung, d.h. bereits 2 Tage nach der OP, eine Rolle spielt, wurde die Expression dieser Gene mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) untersucht. Während die Expression von α -MHC in allen Gruppen unverändert war, zeigte sich sowohl bei β -MHC als auch bei BNP in den WT TAC Tieren im Vergleich zu den WT sham Mäusen 2 d post-OP eine signifikante Steigerung (Abbildung 11 B-D). In den AC3-I Tieren war die Expression von β -MHC und BNP in der TAC vs. sham Gruppe ebenfalls erhöht, jedoch nicht signifikant (Abbildung 11 C+D). Die WT TAC Tiere wiesen also 2 Tage nach der Operation eine höhere Genexpression der Hypertrophiemarker als die AC3-I TAC Tiere auf.

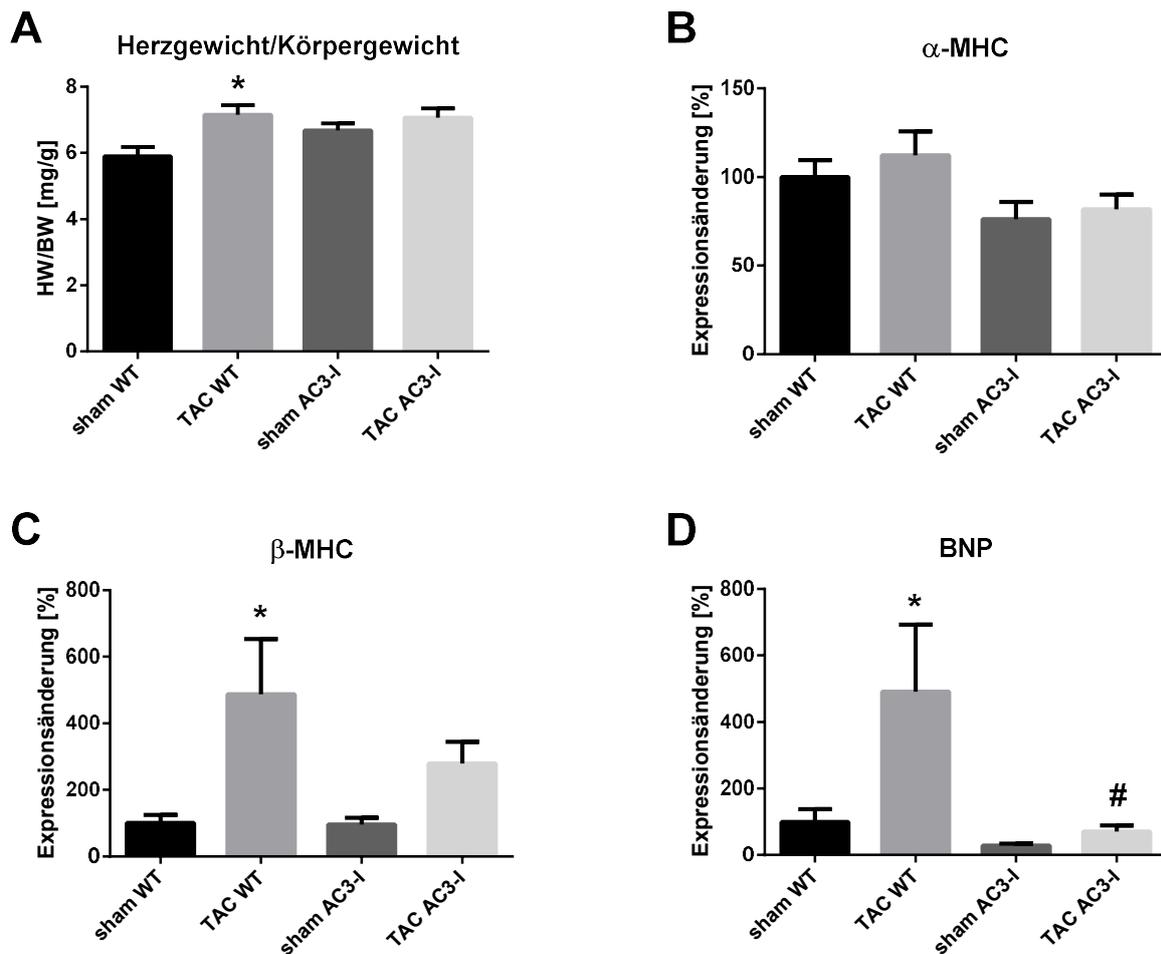


Abbildung 11: HW/BW Ratio und Genexpression von Hypertrophiemarkern in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A: Herzgewicht/Körpergewicht (HW/BW) Ratio 2 d post-OP ($n=12-20$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). **B-D:** Genexpression von α -MHC (B), β -MHC (C) und BNP (D) normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die WT sham Gruppe ($n=9-13$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA) und als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe. # $p < 0.05$ in AC3-I TAC vs. WT TAC. (Abb. 11 A veröffentlicht in [66].)

Auch die Bestimmung der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten mittels *wheat germ agglutinin* (WGA)-Färbung ergab, dass in der WT TAC Gruppe die Kardiomyozyten 2 d post-OP signifikant größer waren als in der WT sham Gruppe (Abbildung 12 A+C). Bei den AC3-I Mäusen zeigte sich, wie bereits beim HW/BW Ratio, kein signifikanter Unterschied zwischen der sham und TAC Gruppe (Abbildung 12 A+C).

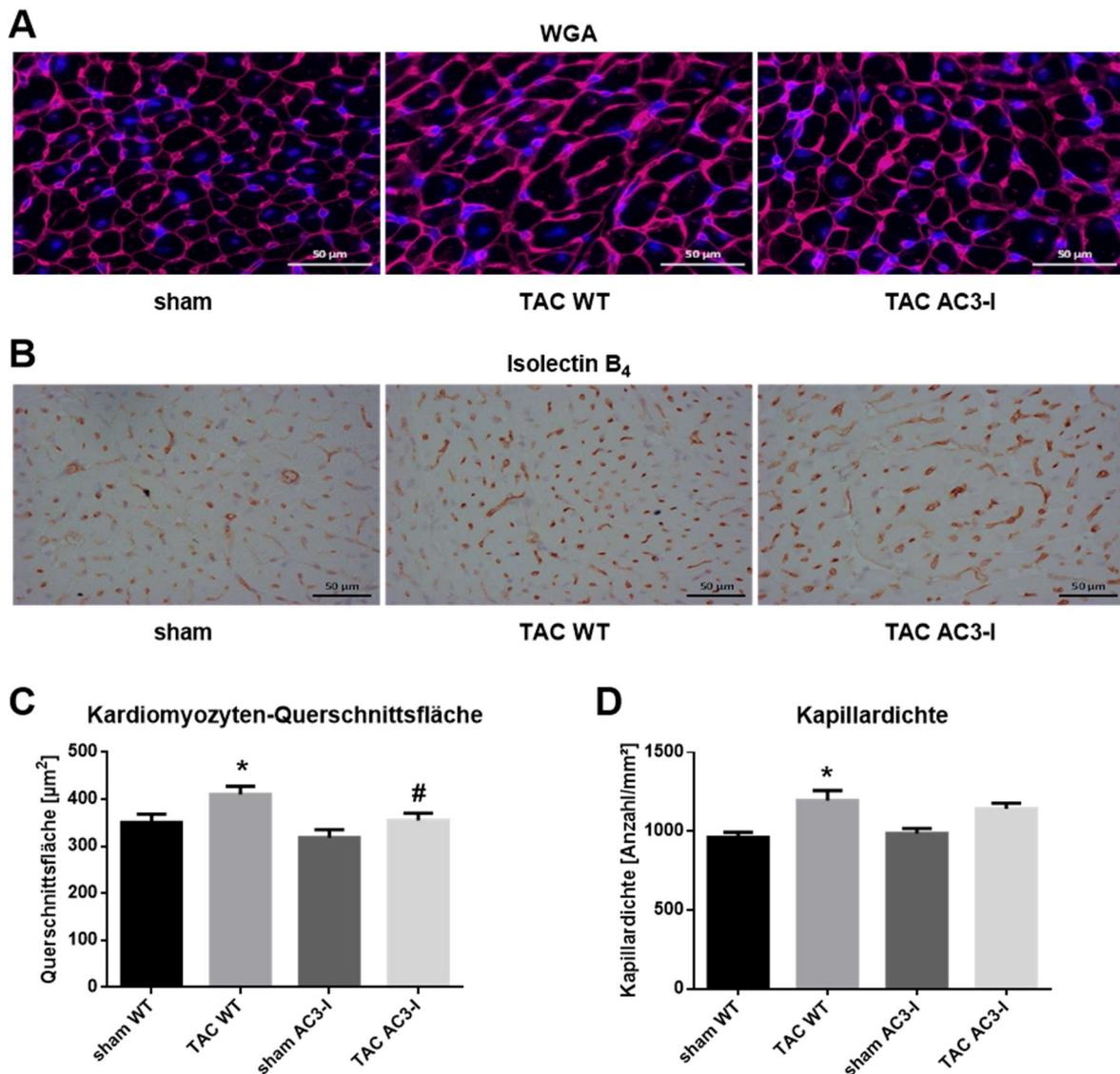


Abbildung 12: Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und Kapillardichte in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A+B: Beispiel für die wheat germ agglutinin (WGA)-Färbung (pink) und Zellkernfärbung (Hoechst, blau) (A) und Isolectin B₄-Färbung (B) in sham (links), TAC WT (Mitte) und TAC AC3-I Mäusen (rechts) 2 d nach der OP. **C+D:** Kardiomyozyten-Querschnittsfläche (C) und Kapillardichte (D) in WT sham und TAC Mäusen vs. AC3-I sham und TAC Tieren 2 d post-OP. Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n=4-8 Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). * p<0.05 vs. der entsprechenden sham Gruppe. # p<0.05 in AC3-I TAC vs. WT TAC.

Die Analyse der Kapillardichte mittels Isolectin B₄-Färbung gibt Aufschluss darüber, ob es möglicherweise infolge der Herzhypertrophie zu einer Unterversorgung des Gewebes aufgrund einer verringerten Kapillardichte kommt. Die Analyse ergab jedoch, dass in den WT

TAC Tieren die Kapillardichte im Vergleich zu den WT sham Mäusen 2 Tage nach der Operation signifikant gesteigert war (Abbildung 12 B+D). In den AC3-I TAC Mäusen nahm die Kapillardichte im Vergleich zu der AC3-I sham Gruppe infolge der OP ebenfalls zu, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (Abbildung 12 B+D).

4.1.4. Echokardiographie & Elektrokardiogramm

Um die Ursache für die erhöhte Sterblichkeit in den AC3-I Mäusen innerhalb der ersten Tage nach der TAC-OP zu erkunden, wurden die Herzen sowohl vor der OP als auch an d2 und d5 nach der OP sowie anschließend einmal wöchentlich echokardiographiert und somit die Leistung und die Dimensionen des Herzens dargestellt (Abbildung 13 A).

Die Ejektionsfraktion (EF) und das Herzzeitvolumen (Cardiac Output, CO) sind ein Maß für die Pumpleistung des Herzens. Beide Parameter waren in den AC3-I TAC Mäusen im Vergleich zu der entsprechenden sham Kontrollgruppe 2 d post-OP signifikant verringert (Abbildung 13 B+C). Im Gegensatz dazu waren die EF und CO in den WT TAC vs. sham Mäusen nur geringfügig erniedrigt (Abbildung 13 B+C).

Der linksventrikuläre innere Durchmesser (LVID) ist ein Maß für eine linksventrikuläre Dilatation. Zusätzlich zu der geringen EF zeigten die AC3-I TAC Mäuse im Vergleich zu den AC3-I sham Tieren auch eine signifikante Dilatation des linken Ventrikels (Abbildung 13 D). Die WT TAC vs. sham Tiere wiesen 2 d post-OP keinen signifikanten Unterschied bezüglich LVID auf (Abbildung 13 D).

Da die CaMKII unter anderem auch an der Regulation der Herzfrequenz beteiligt ist [67], wurde ein Elektrokardiogramm (EKG) bei den Mäusen sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter Stressbedingungen, simuliert durch eine Isoprenalin-Injektion (1 mg/kg KG), durchgeführt, um eine chronotrope Inkompetenz in den AC3-I TAC Mäusen als Ursache für die erhöhte Mortalität auszuschließen. Die EKGs zeigten weder basal noch nach ISO-Stimulation Auffälligkeiten bezüglich Arrhythmien oder Unterschiede in der Herzfrequenz in den WT TAC und AC3-I TAC Mäusen 2 d nach der OP (Abbildung 14 A-D).

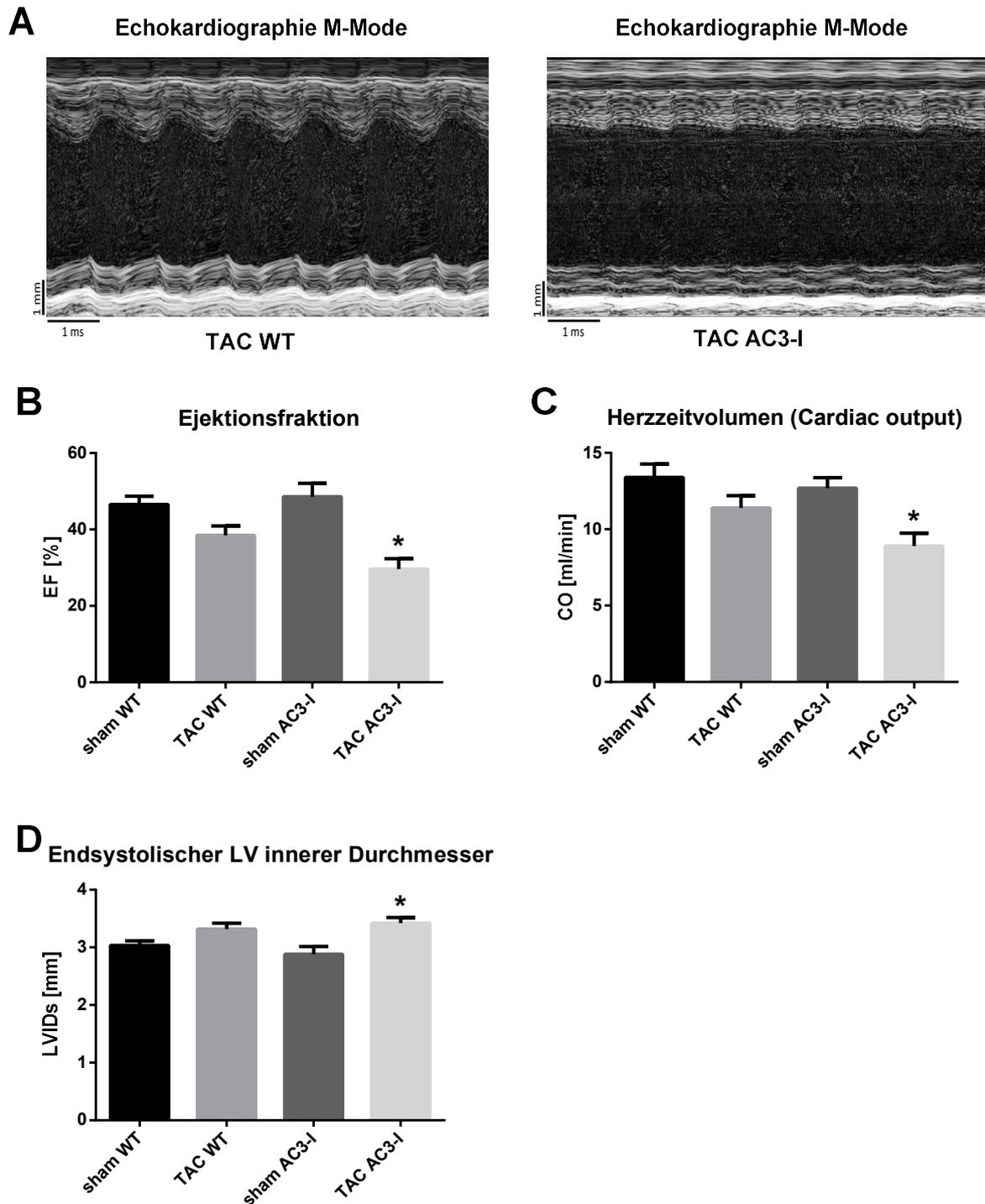


Abbildung 13: Echokardiographiedaten in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A: Beispiel einer echokardiographischen M-Mode Messung für TAC WT (links) und TAC AC3-I (rechts) 2 d post-OP. **B-D:** Ejektionsfraktion (B), Herzeitvolumen (Cardiac Output) (C) und endsystolischer linksventrikulärer (LV) innerer Durchmesser (D) 2 d nach sham- oder TAC-OP. Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=12-20$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). * $p<0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe. (Abb. 13 veröffentlicht in [66].)

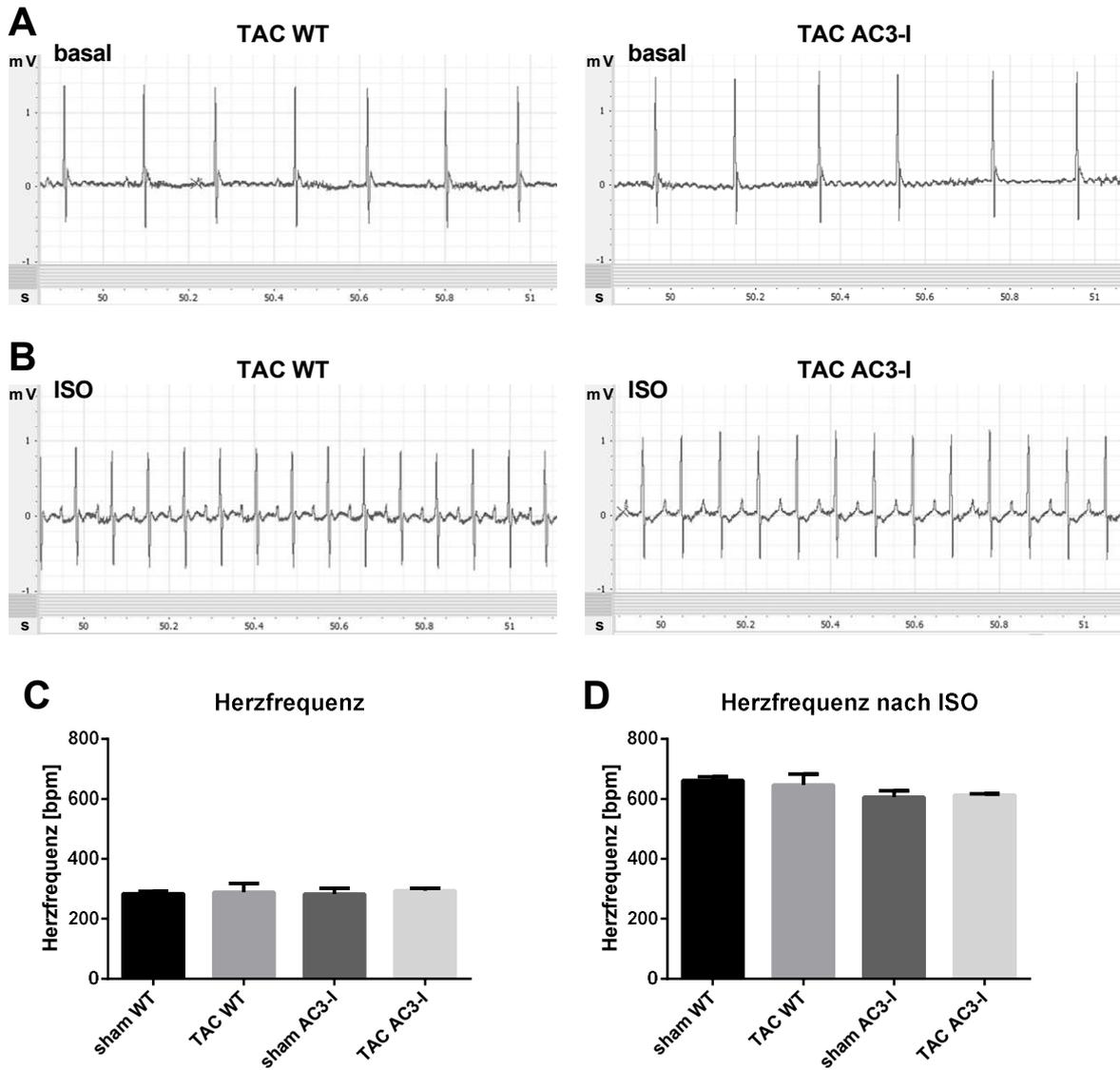


Abbildung 14: Elektrokardiogramm basal und nach ISO in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A+B: Beispiel einer Elektrokardiogramm-Messung in TAC WT (links) und TAC AC3-I Mäusen (rechts) 2 d post-OP in Ruhe (A) und nach Isoprenalin-Injektion (1 mg/kg KG) (B). **C+D:** Herzfrequenz, ermittelt im EKG nach erfolgter Narkotisierung, 2 d post-OP in Ruhe (C) und nach Isoprenalin-Injektion (D). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=4$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). (Abb. 14 veröffentlicht in [66].)

4.1.5. Fibrose & Inflammation

Um festzustellen, ob in der akuten Phase der Nachlastserhöhung auch andere Reaktionen wie eine zunehmende Fibrosierung des Gewebes oder Entzündungsprozesse die Pumpfunktion des Herzens beeinträchtigen, wurde einerseits eine Masson-Trichrom-Färbung an Paraffinschnitten der jeweiligen Gruppen durchgeführt, um den Anteil der Fibrosefläche bezogen auf die gesamte Herzfläche zu bestimmen. Andererseits wurde die Expression verschiedener Fibrose- und Inflammationsmarker mittels qRT-PCR ermittelt.

In den WT Tieren zeigte sich bei der Masson-Trichrom-Färbung 2 d post-OP kein signifikanter Unterschied zwischen der sham und TAC Gruppe (Abbildung 15 A+B). Der Anteil der fibrotischen Fläche war allerdings in der AC3-I TAC Gruppe doppelt so hoch wie in der WT TAC Gruppe (2.6% vs. 1.3%), während die beiden sham Gruppen ähnliche Werte aufwiesen (1.6% vs. 1.2%) (Abbildung 15 A+B).

Dieses Ergebnis konnte durch die Analyse der Genexpression von Col1a1, einem Fibrosemarker, bestätigt werden. So zeigte sich nur in der AC3-I TAC vs. sham Gruppe 2 d post-OP eine signifikante Erhöhung der Col1a1-Genexpression, während die Expression in den WT TAC vs. sham Tieren nur minimal gesteigert war (Abbildung 15 C).

Um mögliche Entzündungsprozesse im Herzen zu erkennen, wurde das mRNA-Expressionslevel der proinflammatorischen Interleukine IL-1 β und IL-6 sowie des Chemokinliganden CCL2 (MCP-1, *Monocyte chemoattractant protein-1*), welches die Migration und Infiltration von Monozyten reguliert, untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Genexpression der untersuchten Inflammationsmarker 2 d post-OP in den WT TAC vs. sham Mäusen signifikant gesteigert war (Abbildung 16 A-C). In den AC3-I TAC Tieren wurde hingegen im Vergleich zu den AC3-I sham Mäusen kein signifikanter Unterschied detektiert (Abbildung 16 A-C). Allerdings war die Expression von IL-1 β und CCL2 in den AC3-I TAC Mäusen im Vergleich zu den WT TAC Mäusen signifikant verringert (Abbildung 16 A+C), was zeigt, dass Entzündungsprozesse nicht ursächlich für die erhöhte Mortalität in den AC3-I Mäusen nach der TAC-Operation sind.

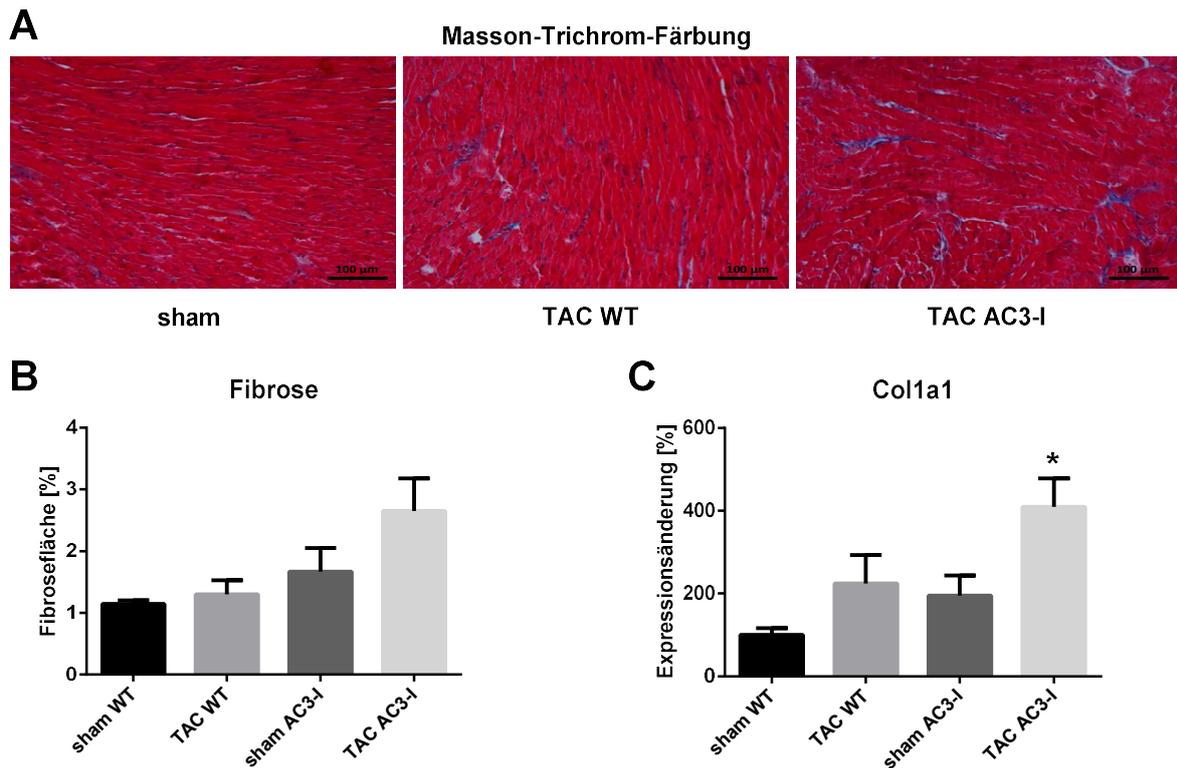


Abbildung 15: Fibrosierung und Genexpression eines Fibrosemarkers in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A: Beispiel für die Masson-Trichrom-Färbung (rot: Muskel, blau: Kollagen, schwarz: Zellkern) in sham (links), TAC WT (Mitte) und TAC AC3-I Mäusen (rechts) 2 d nach der OP. **B:** Anteil der Fibrosefläche in % am Gesamtgewebe in WT sham und TAC Mäusen vs. AC3-I sham und TAC Tieren 2 d post-OP (n=4-8 Mäuse/Gruppe). **C:** Genexpression von Col1a1 normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die WT sham Gruppe (n=9-13 Mäuse/Gruppe) und als Mittelwert \pm SEM dargestellt (one-way ANOVA). * $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe.

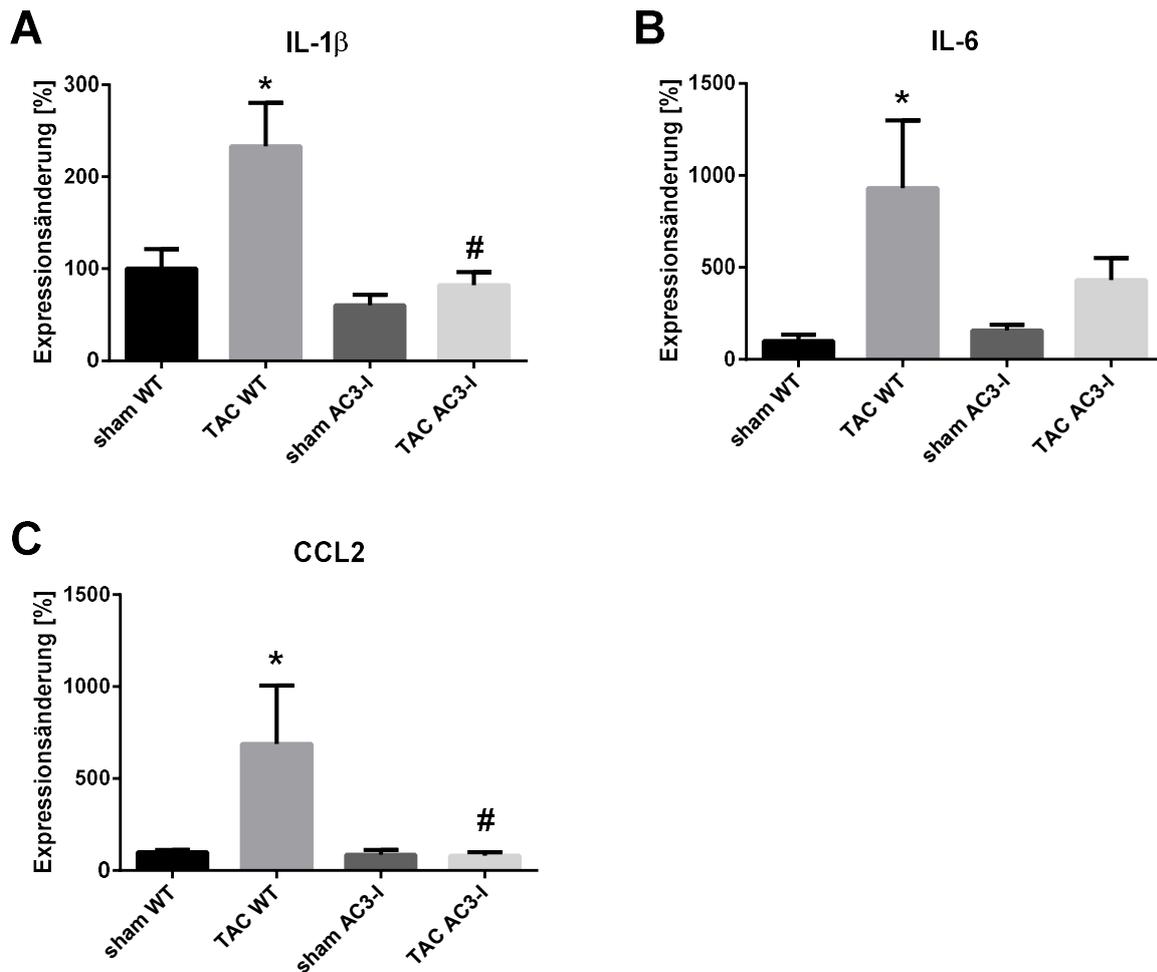


Abbildung 16: Genexpression von Inflammationsmarkern in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A-C: Genexpression von IL-1 β (A), IL-6 (B) und CCL2 (C) normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die WT sham Gruppe (n=9-13 Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA) und als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe. # $p < 0.05$ in AC3-I TAC vs. WT TAC.

4.1.6. Proteinexpression

Die CaMKII phosphoryliert und reguliert verschiedene, an der elektromechanischen Kopplung beteiligte Proteine, wie den Ryanodinrezeptor Typ 2 (RyR2) oder Phospholamban (PLB), ein inhibitorisches Protein, das im unphosphorylierten Zustand die SR-Calcium-ATPase (SERCA2a) hemmt. Deshalb wurde die Expression dieser Proteine sowie deren CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstellen mittels Western Blot analysiert (Abbildung 17 A+D).

Die Untersuchung der Proteinexpression und -phosphorylierung ergab in den WT TAC vs. sham Tieren 2 d post-OP eine signifikante Hyperphosphorylierung an den beiden CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstellen des RyR2 (pS2814) und PLB (pT17) (Abbildung 17 B+E). Die Expression der Gesamtproteine war dabei unverändert (Abbildung 17 C+F).

In den AC3-I TAC und sham Mäusen zeigte sich hingegen eine signifikante Hypophosphorylierung an pS2814 und pT17 entsprechend einer signifikant inhibierten CaMKII-Aktivität in diesen Mäusen (Abbildung 17 B+E), während die Gesamtproteinexpression wiederum keine Unterschiede aufwies (Abbildung 17 C+F).

Neben der Expression von RyR2 und PLB wurden auch die weiteren, an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteine SERCA2a, der L-Typ Ca^{2+} -Kanal (LTCC) und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) untersucht. Dabei zeigte sich, wie bereits bei RyR2 und PLB, kein Unterschied in der Proteinexpression zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 18 A-D).

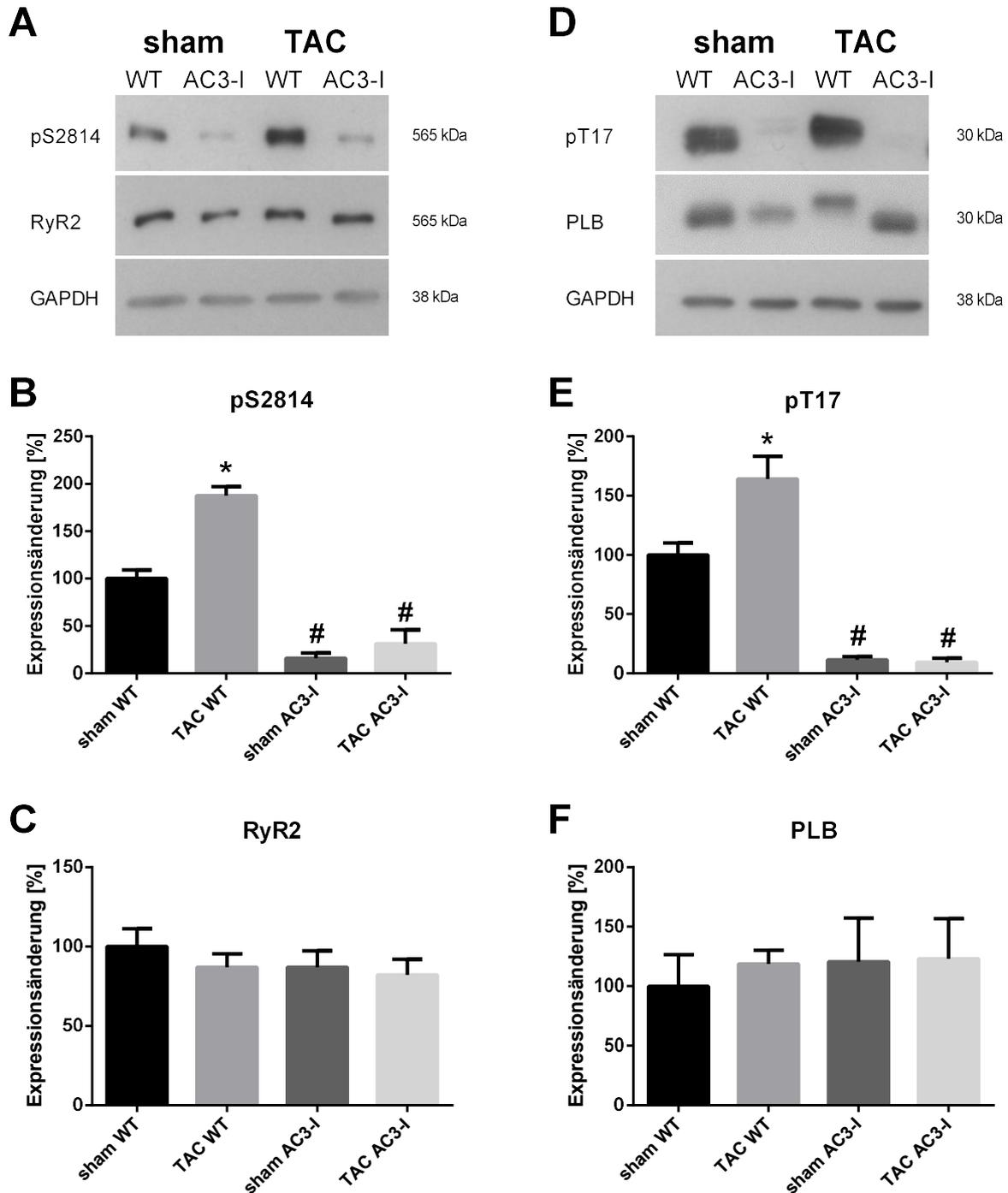


Abbildung 17: Phosphorylierung und Expression des RyR2 und PLB in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A+D: Originalabbildung der Proteinexpression in AC3-I und WT TAC Tieren verglichen mit sham Mäusen.
B-F: Expression von pS2814 (B), RyR2 (C), pT17 (E) und PLB (F) normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die WT sham Gruppe und als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=4$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). * $p<0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe. # $p<0.05$ in AC3-I sham vs. WT sham und AC3-I TAC vs. WT TAC. (Abb. 17 veröffentlicht in [66].)

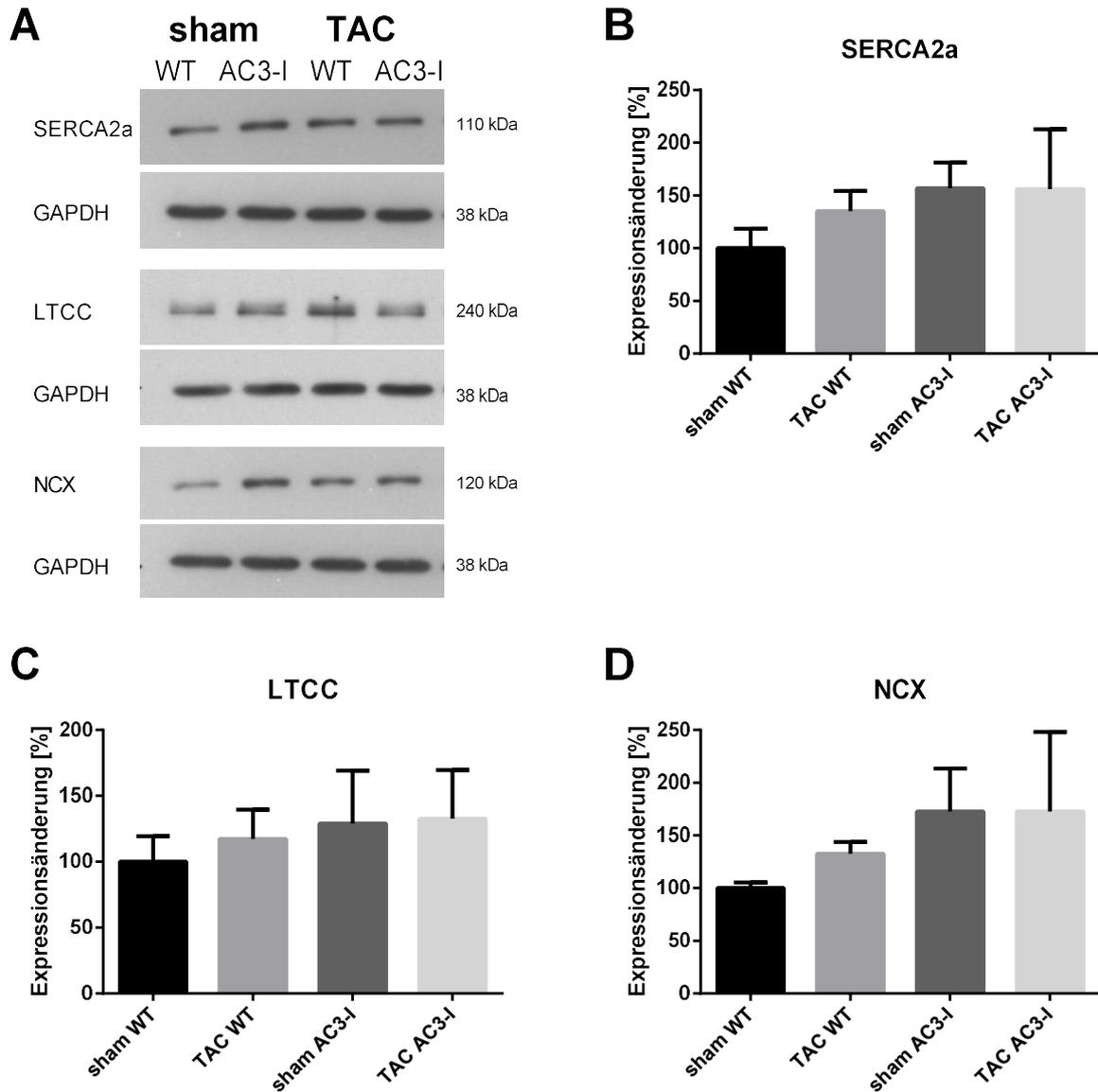


Abbildung 18: Proteinexpression in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A: Originalabbildung der Proteinexpression in AC3-I und WT TAC Tieren verglichen mit sham Mäusen.
B-D: Expression von SERCA2a (B), LTCC (C) und NCX (D) normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die WT sham Gruppe und als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=4$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). (Abb. 18 veröffentlicht in [66].)

4.1.7. Einzelzellmessungen am Epifluoreszenzmikroskop

Um zu überprüfen, ob die kardiale Dysfunktion in den AC3-I Mäusen auf eine gestörte elektromechanische Kopplung und Ca^{2+} -Haushalt auf Einzelzellebene zurückzuführen ist, wurden mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops sowohl Ca^{2+} -Transienten als auch die Kontraktilität in einzelnen Kardiomyozyten gemessen. Dabei wurde der Calcium-sensitive Farbstoff X-Rhod1 verwendet, dessen Absorptions- und Emissionsmaximum im rotwelligen Bereich liegt und sich somit nicht mit dem in den AC3-I Mäusen exprimierten eGFP überschneidet.

Sowohl die Ca^{2+} -Transienten als auch die Kontraktilität der Zellen waren in den WT TAC Tieren im Vergleich zu den WT sham Tieren 2 d post-OP signifikant gesteigert (Abbildung 19 A-D). In den AC3-I TAC Zellen waren hingegen beide Parameter im Vergleich zu den AC3-I sham Zellen signifikant verringert (Abbildung 19 A-D). Auch die Relaxationszeit der Zellen war in den WT TAC vs. sham Mäusen signifikant schneller, in den AC3-I TAC vs. sham Mäusen jedoch signifikant langsamer (Abbildung 19 E). Der SR Ca^{2+} -Gehalt, gemessen mit einer schnellen Caffein-Gabe, wodurch alle RyR2 im geöffneten Zustand blockiert wurden, war zwischen den einzelnen Gruppen und Genotypen nicht verändert (Abbildung 19 F).

Während einer 30 s-Stimulationspause wurden spontane Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) als Anzeichen für ein arrhythmogenes SR Ca^{2+} -Leck ausgewertet (Abbildung 20). Dabei zeigte sich, dass in 35% der WT TAC Zellen und 20% der WT sham Zellen SCRs auftraten, während dieser Prozentsatz bei den AC3-I TAC Zellen nur bei 6.9% lag ($p < 0.05$) (Abbildung 21 A).

Zusätzlich wurden die Fluoreszenzwerte kalibriert, sodass die absolute diastolische Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen bestimmt werden konnte. Dabei wiesen die AC3-I TAC Zellen im Vergleich zu den WT TAC Zellen 2 d post-OP eine signifikant erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration auf (Abbildung 21 B). Die WT TAC Zellen hatten außerdem eine im Trend geringere diastolische Ca^{2+} -Konzentration als die WT sham Zellen.

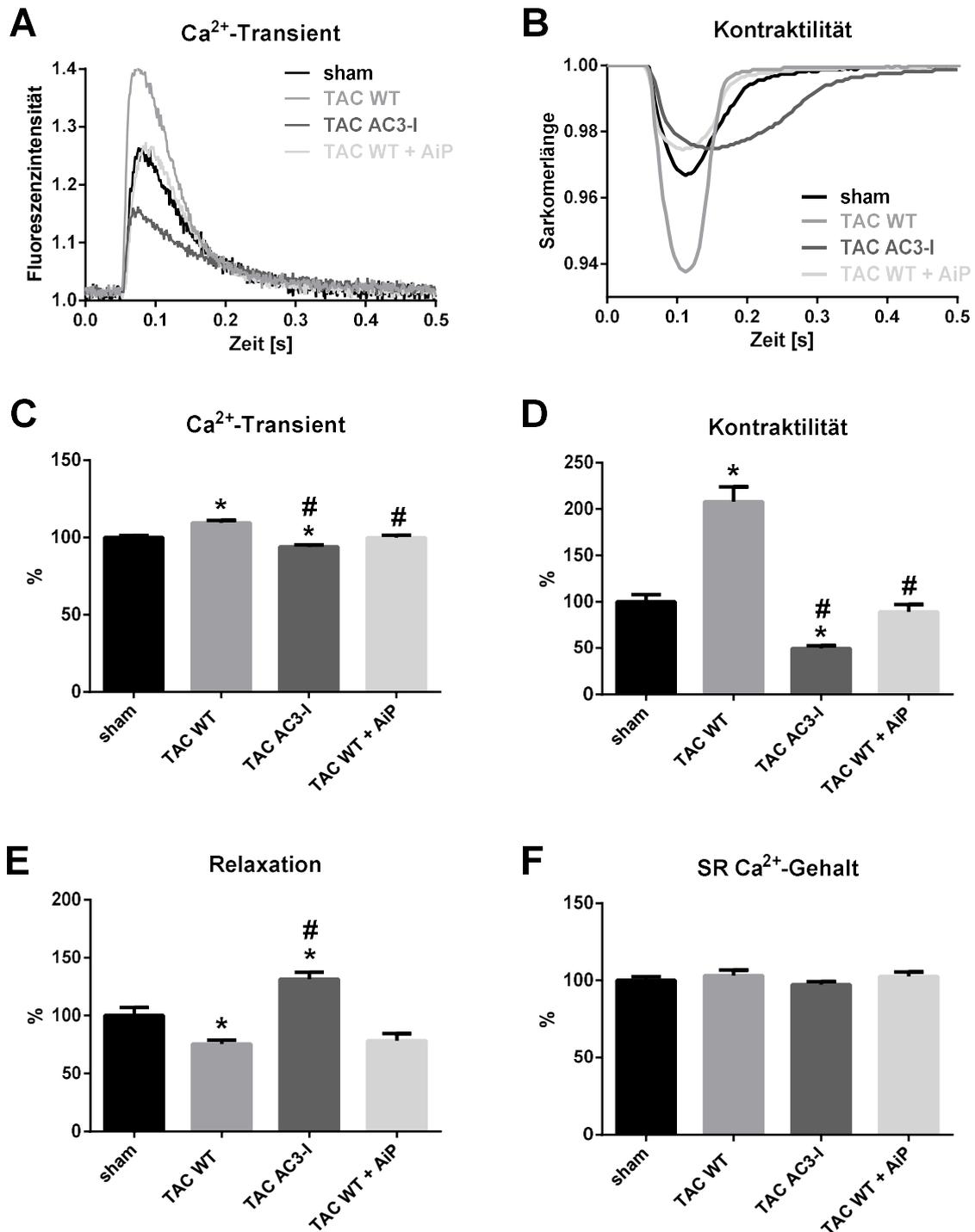


Abbildung 19: Epifluoreszenzmessung in WT und AC3-I Zellen 2 d post-OP

A+B: Originaldarstellung eines Ca²⁺-Transients (A) und einer Kontraktion (B) von AC3-I und WT TAC Zellen verglichen mit WT TAC + AiP und sham Zellen. **C-F:** Ca²⁺-Transient (C), Kontraktilität (D), Relaxation (E) und SR Ca²⁺-Gehalt (F) 2 Tage nach sham- oder TAC-Operation normalisiert auf die jeweilige sham Gruppe. Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n=40-72 Zellen in 5-6 Mäusen/Gruppe, one-way ANOVA). * p<0.05 vs. der entsprechenden sham Gruppe. # p<0.05 vs. WT TAC. (Abb. 19 veröffentlicht in [66].)

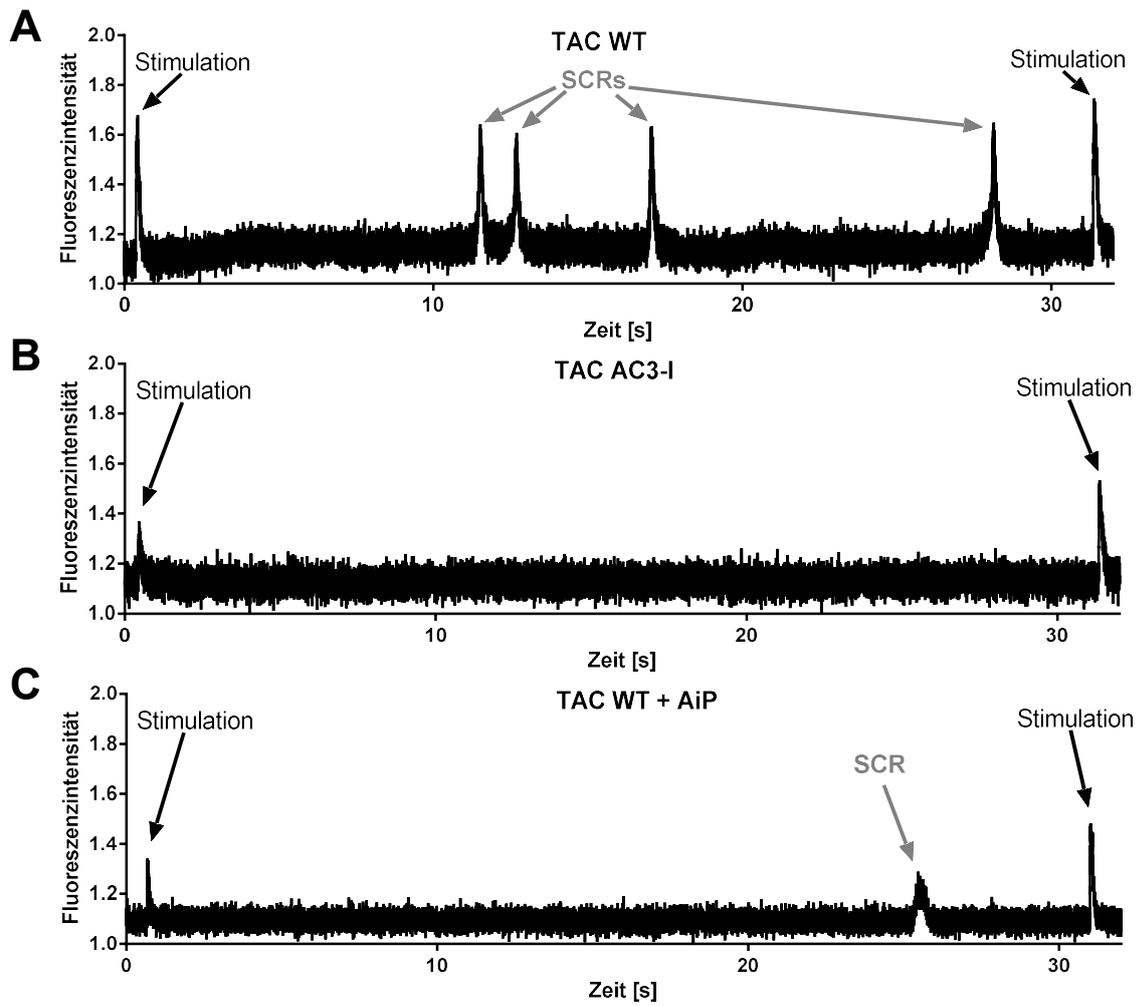


Abbildung 20: Spontane Ca^{2+} -Freisetzungsevents in WT und AC3-I Zellen 2 d post-OP

Beispiel für spontane Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) während einer 30 s-Stimulationspause in TAC WT (A), TAC AC3-I (B) und TAC WT + AiP Zellen (C). (Abb. 20 veröffentlicht in [66].)

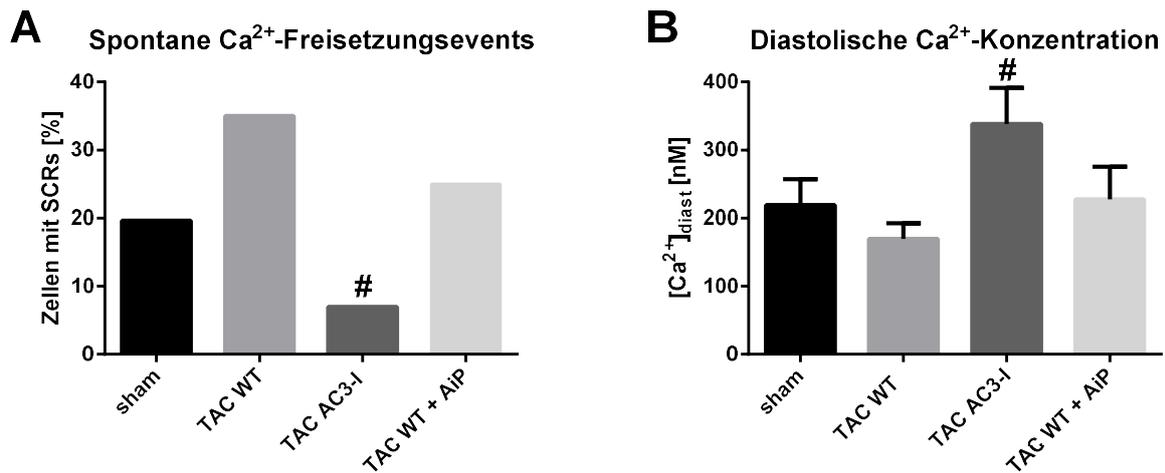


Abbildung 21: Spontane Ca²⁺-Freisetzungsevents und diastolische Ca²⁺-Konzentration in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP

A: Prozentsatz der Zellen mit spontanen Ca²⁺-Freisetzungsevents (SCRs) während einer 30 s-Stimulationspause in WT TAC und AC3-I TAC Zellen verglichen mit WT TAC + AiP und sham Zellen 2 d post-OP (n=40-72 Zellen in 5-6 Mäusen/Gruppe, Fisher's exact Test). **B:** Diastolische Ca²⁺-Konzentration in AC3-I und WT TAC Zellen verglichen mit WT TAC + AiP und sham Zellen 2 d nach der OP (n=16-40 Zellen in 5-6 Mäusen/Gruppe, one-way ANOVA). Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. # p<0.05 vs. WT TAC. (Abb. 21 veröffentlicht in [66].)

4.1.8. Akute CaMKII-Inhibition mit AiP

Um zu testen, ob sich der Phänotyp der AC3-I TAC Mäuse durch die akute Zugabe des CaMKII-Inhibitors AiP *in vitro* nachahmen lässt, wurden WT TAC Zellen 2 d post-OP isoliert und für 30 min mit 2 µM AiP inkubiert. Anschließend wurde die CaMKII-Aktivität gemessen und Epifluoreszenzmessungen durchgeführt.

Die CaMKII-Aktivität in den mit AiP inkubierten WT TAC Zellen war im Vergleich zu den mit einer Vehikel-Kontrolle inkubierten WT TAC Zellen signifikant verringert, während sich bei den sham Gruppen + AiP vs. – AiP kein Unterschied ergab (Abbildung 22 A+B).

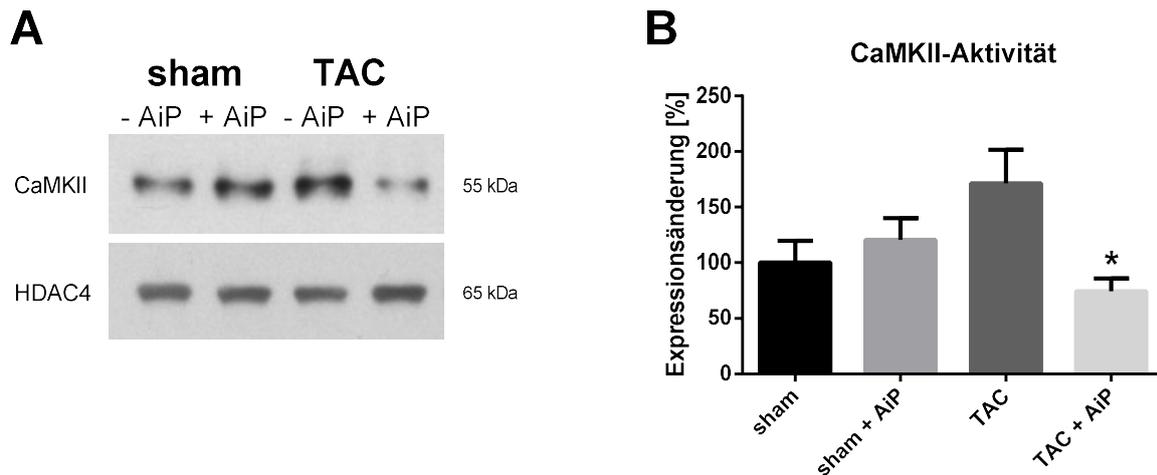


Abbildung 22: CaMKII-Aktivität in WT Zellen inkubiert mit AiP 2 d post-OP

A: Originalabbildung der CaMKII-Aktivität in WT Zellen inkubiert mit oder ohne AiP 2 d post-OP.

B: CaMKII-Aktivität von WT Kardiomyozyten, isoliert 2 d post-OP, nach Inkubation mit AiP verglichen mit Zellen ohne AiP. Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=5-7$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). * $p<0.05$ TAC + AiP vs. TAC. (Abb. 22 veröffentlicht in [66].)

Die Epifluoreszenzmessungen zeigten ebenfalls, dass sowohl die Ca^{2+} -Transienten als auch die Kontraktilität der WT TAC Zellen durch die Zugabe von AiP signifikant verringert wurden (Abbildung 19 A-D). Die AiP-Zugabe hatte jedoch keinen Effekt auf die Relaxationszeit (Abbildung 19 E), SR Ca^{2+} -Gehalt (Abbildung 19 F) oder diastolische Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung 21 B). Der Prozentsatz der Zellen mit SCRs verringerte sich durch die Zugabe von AiP von 35% in der WT TAC Gruppe auf 25% in der WT TAC + AiP Gruppe (Abbildung 21 A), was die anti-arrhythmogene Wirkung einer CaMKII-Inhibition bestätigte.

4.2. AC3-C Mäuse

Um mögliche Einflüsse des in den AC3-I Mäusen exprimierten eGFP auszuschließen [57,58], wurden neben den WT Geschwistertieren die AC3-C Tiere, die zwar eGFP, aber eine inaktive Form des Inhibitors exprimieren, als zusätzliche Kontrollgruppe verwendet.

4.2.1. Überleben & Hypertrophie

Das Überleben der AC3-C Tiere war in der ersten Woche nach der TAC-OP im Vergleich zu den WT Tieren nicht signifikant verändert (86% vs. 91%) (Abbildung 23 A). Die Überlebenskurve bis zu 5 Wochen nach der Operation zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen den AC3-C TAC und WT TAC Tieren (86% vs. 83%) (Abbildung 23 B).

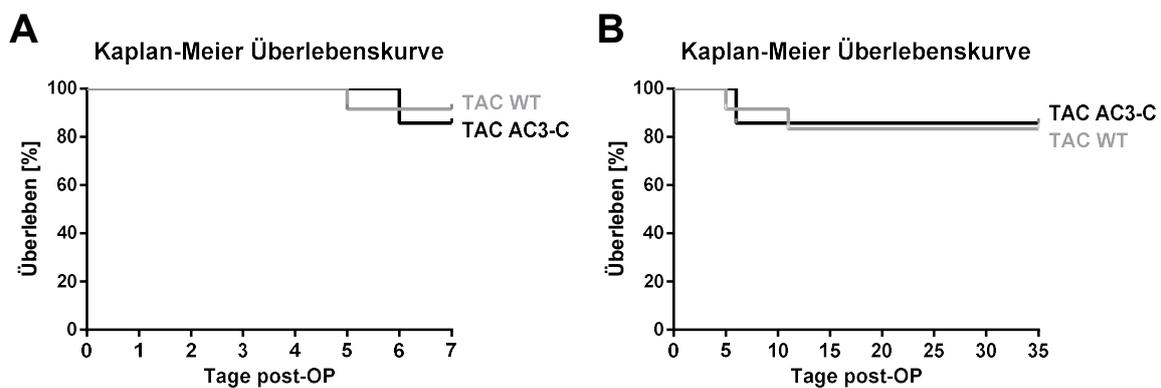


Abbildung 23: Überlebenskurve der AC3-C und WT Mäuse 7 d und 35 d post-OP

A+B: Kaplan-Meier Überlebenskurve der AC3-C und WT Mäuse 7 d (A) und 35 d (B) nach TAC ($n=7$ für AC3-C, $n=12$ für WT, Kaplan-Meier und Mantel-Cox Test).

Um auszuschließen, dass sich Unterschiede in der Stärke der Aortenkonstriktion auf die Mortalitätsrate auswirken, wurde 2 Tage nach der Operation die Durchflussgeschwindigkeit in der Aorta über der stenosierten Stelle gemessen. Dabei zeigte sich ein signifikant erhöhter Druckgradient in den AC3-C TAC vs. sham Tieren, jedoch kein Unterschied zwischen den AC3-C TAC, WT TAC und AC3-I TAC Mäusen (Abbildung 24 A), sodass ein Einfluss der Stärke der Aortenkonstriktion auf die Mortalitätsraten der einzelnen Genotypen ausgeschlossen werden konnte.

Die AC3-C TAC Mäuse zeigten zudem verglichen mit den AC3-C sham Mäusen 2 d post-OP ein signifikant gesteigertes HW/BW Ratio als Maß für eine Herzhypertrophie (Abbildung 24 B). Die Hypertrophie in den AC3-C TAC Tieren war vergleichbar mit der Hypertrophie in den WT TAC Tieren, während die AC3-I TAC Mäuse 2 d post-OP keine Herzhypertrophie entwickelten (Abbildung 11 A).

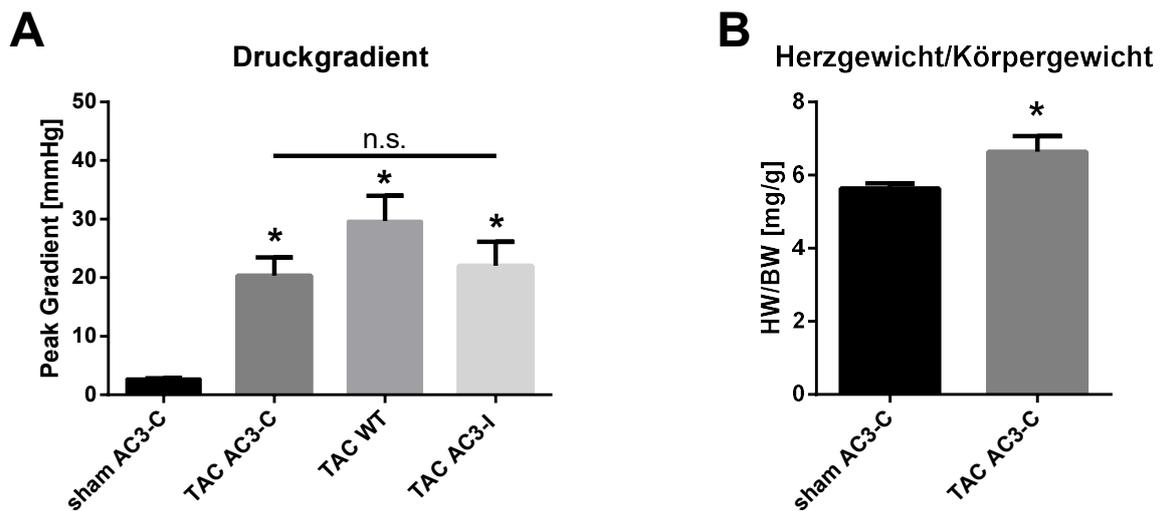


Abbildung 24: Druckgradient und HW/BW Ratio in AC3-C Mäusen 2 d post-OP

A: Druckgradient in AC3-C sham und TAC Mäusen verglichen mit WT TAC und AC3-I TAC Tieren 2 d nach der OP ($n=6-20$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). **B:** Herzgewicht/Körpergewicht (HW/BW) Ratio 2 d post-OP ($n=6-7$ Mäuse/Gruppe, Student t Test). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p<0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe.

4.2.2. Echokardiographie

Für die Analyse der Herzfunktion und -dimension wurden die Mäuse an d2 post-OP echokardiographiert. Die AC3-C TAC Mäuse waren ähnlich wie die WT TAC Tiere vor einem akuten Pumpversagen geschützt (Abbildung 25 A), welches durch einen signifikanten Abfall der Ejektionsfraktion (EF) und des Herzzeitvolumens (Cardiac Output, CO) gekennzeichnet ist. Obwohl die beiden TAC Gruppen vergleichbare Werte bei der EF zeigten (AC3-C TAC: 37.5%, WT TAC: 38.5%), unterschied sich die AC3-C sham Gruppe hinsichtlich der EF deutlich von der WT sham Gruppe (38.1% vs. 46.5%), sodass letztendlich kein Unterschied zwischen den AC3-C TAC und sham Mäusen zu sehen war (Abbildung 25 B).

Das Herzzeitvolumen war in beiden TAC Gruppen verglichen mit der jeweiligen sham Gruppe im Trend verringert (Abbildung 25 C). Bei diesem Parameter zeigten wiederum die AC3-C Mäuse in beiden Gruppen etwas geringere Werte als die WT Mäuse, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Der endsystolische linksventrikuläre innere Durchmesser (LVID) als ein Maß für die Dilatation des linken Ventrikels war in allen Gruppen unverändert (Abbildung 25 D). Insgesamt unterschieden sich die AC3-C TAC Mäuse hinsichtlich der Herzfunktion und -dimension nicht von den WT TAC Mäusen.

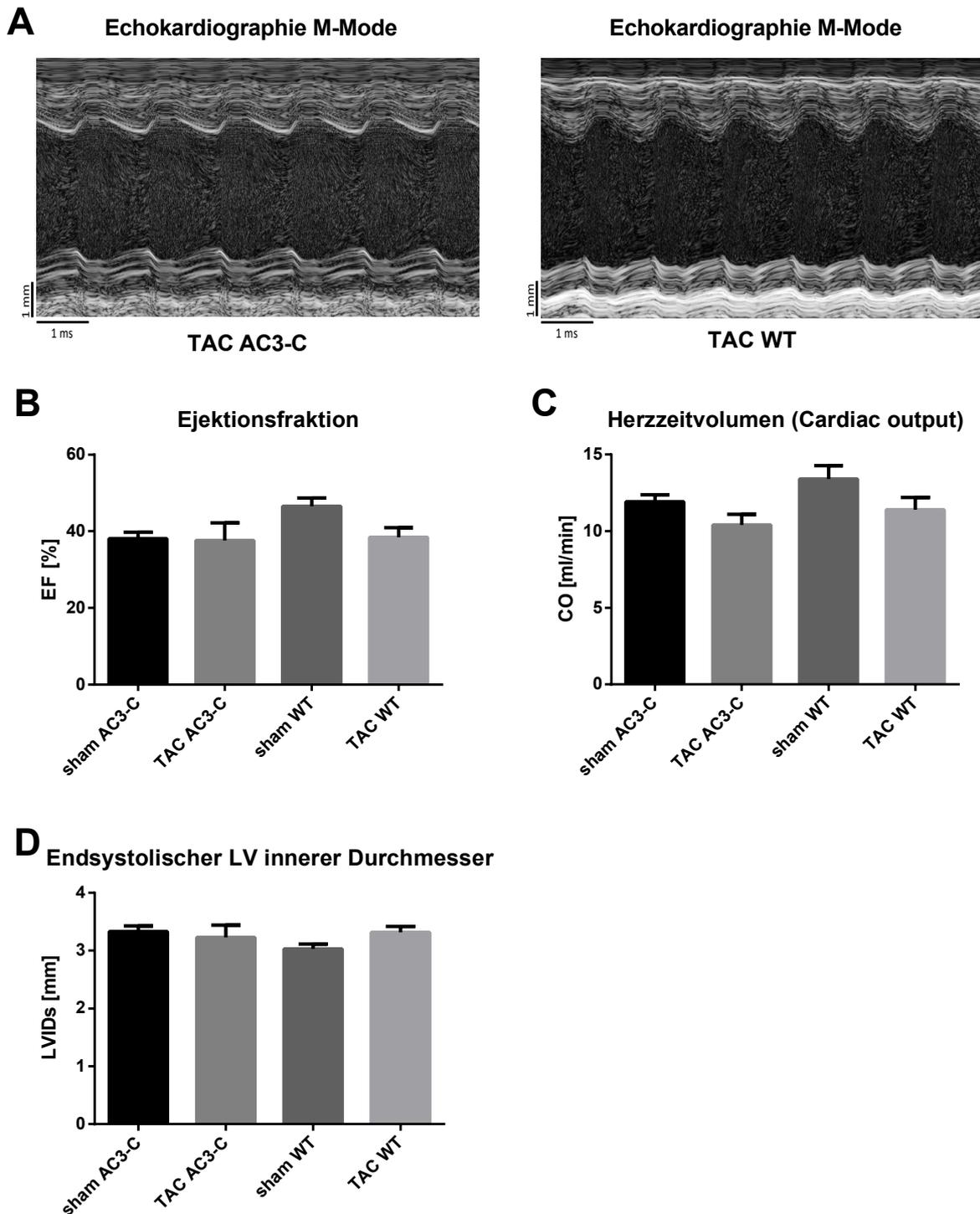


Abbildung 25: Echokardiographiedaten in AC3-C und WT Mäusen 2 d post-OP

A: Beispiel einer echokardiographischen M-Mode Messung für TAC AC3-C (links) und TAC WT (rechts) 2 d post-OP. **B-D:** Ejektionsfraktion (B), Herzzeitvolumen (Cardiac Output) (C) und endsystolischer linksventrikulärer (LV) innerer Durchmesser (D) 2 d nach sham- oder TAC-OP (n=8-20 Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4.2.3. Proteinexpression

Um mögliche Veränderungen im Ca^{2+} -Haushalt feststellen zu können, wurde die Expression der an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteine 2 d nach der Operation analysiert. Weil die CaMKII diese Proteine phosphorylieren und somit regulieren kann, wurde außerdem die Expression und Aktivität der CaMKII untersucht. Dabei zeigte sich weder bei der Gesamtexpression der CaMKII δ noch bei der phosphorylierten Form 2 d post-OP ein Unterschied zwischen der sham und TAC Gruppe (Abbildung 26 A-C). Obwohl die phosphorylierte CaMKII als ein Marker für die konstitutive Aktivität gilt, zeigte der CaMKII-Aktivitätsassay, anders als die pCaMKII-Expression, eine signifikante Erhöhung der CaMKII-Aktivität infolge der akuten Nachlasterhöhung (Abbildung 26 D+E). Dieses Ergebnis spiegelt auch das Ergebnis in den WT Mäusen wider, die ebenfalls eine signifikant erhöhte CaMKII-Aktivität 2 d nach der OP aufwiesen (Abbildung 7 E).

Die CaMKII-Phosphorylierungsstelle pS2814 des RyR2 war in den AC3-C TAC vs. sham Tieren 2 Tage nach der Operation hyperphosphoryliert (Abbildung 27 A+B), vergleichbar mit den WT TAC vs. sham Mäusen (Abbildung 17 B). Die Phosphorylierung an pT17 des PLB zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den AC3-C TAC und sham Mäusen, war aber im Trend ebenfalls in der TAC vs. sham Gruppe erhöht (Abbildung 27 D+E). Die WT Tiere wiesen bei pT17 ebenfalls eine signifikante Hyperphosphorylierung auf (Abbildung 17 E). Bei der Gesamtexpression des RyR2 und PLB war bei den AC3-C Mäusen wie auch bei den WT Tieren kein Unterschied zwischen der TAC und sham Gruppe zu erkennen (Abbildung 27 C+F).

Die ebenfalls an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteine SERCA2a, LTCC und NCX waren zwischen den AC3-C TAC und sham Mäusen 2 d nach der Operation in ihrer Expression unverändert (Abbildung 28 A-D). Dasselbe Ergebnis zeigte sich bereits in den WT und AC3-I Tieren (Abbildung 18).

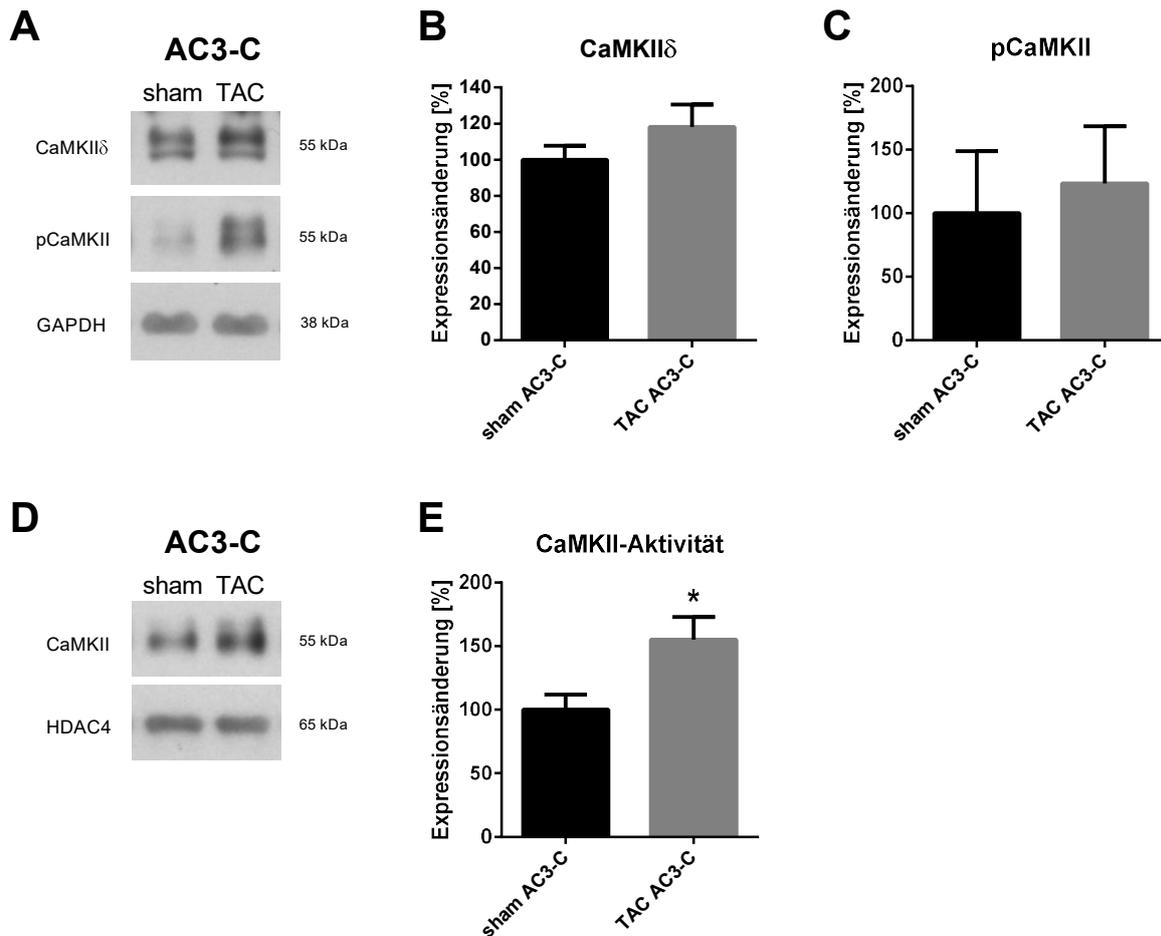


Abbildung 26: CaMKII-Expression und -Aktivität in AC3-C Mäusen 2 d post-OP

A+D: Originalabbildung der CaMKII δ - und pCaMKII-Expression (A) sowie der CaMKII-Aktivität (D) in AC3-C sham und TAC Mäusen. **B-E:** Expression der CaMKII δ (B), phosphorylierten CaMKII (C) und CaMKII-Aktivität (E) normalisiert auf die AC3-C sham Gruppe (n=5 Mäuse/Gruppe, Student t Test). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe.

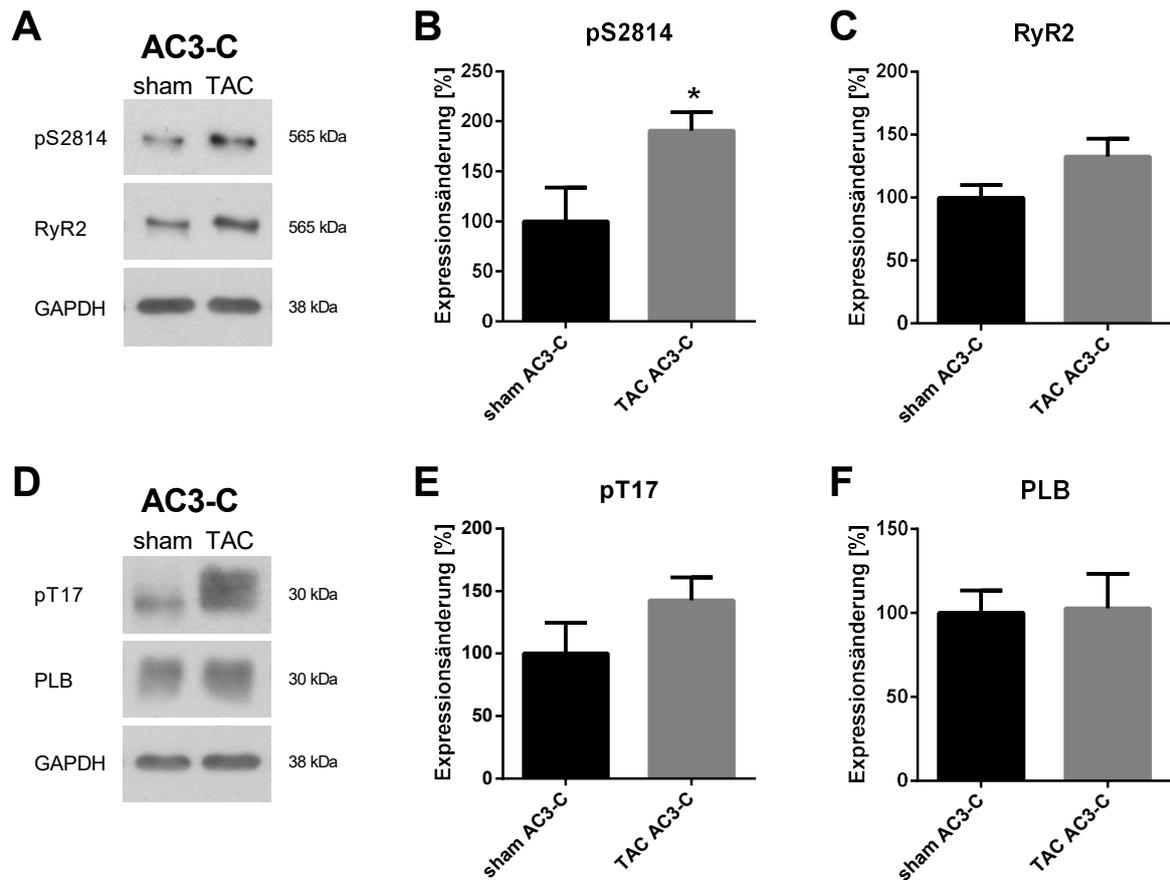


Abbildung 27: Phosphorylierung und Expression des RyR2 und PLB in AC3-C Mäusen 2 d post-OP

A+D: Originalabbildung der Proteinexpression in AC3-C TAC Tieren verglichen mit sham Mäusen. **B-F:** Expression von pS2814 (B), RyR2 (C), pT17 (E) und PLB (F) normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die AC3-C sham Gruppe und als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=5$ Mäuse/Gruppe, Student t Test). * $p<0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe.

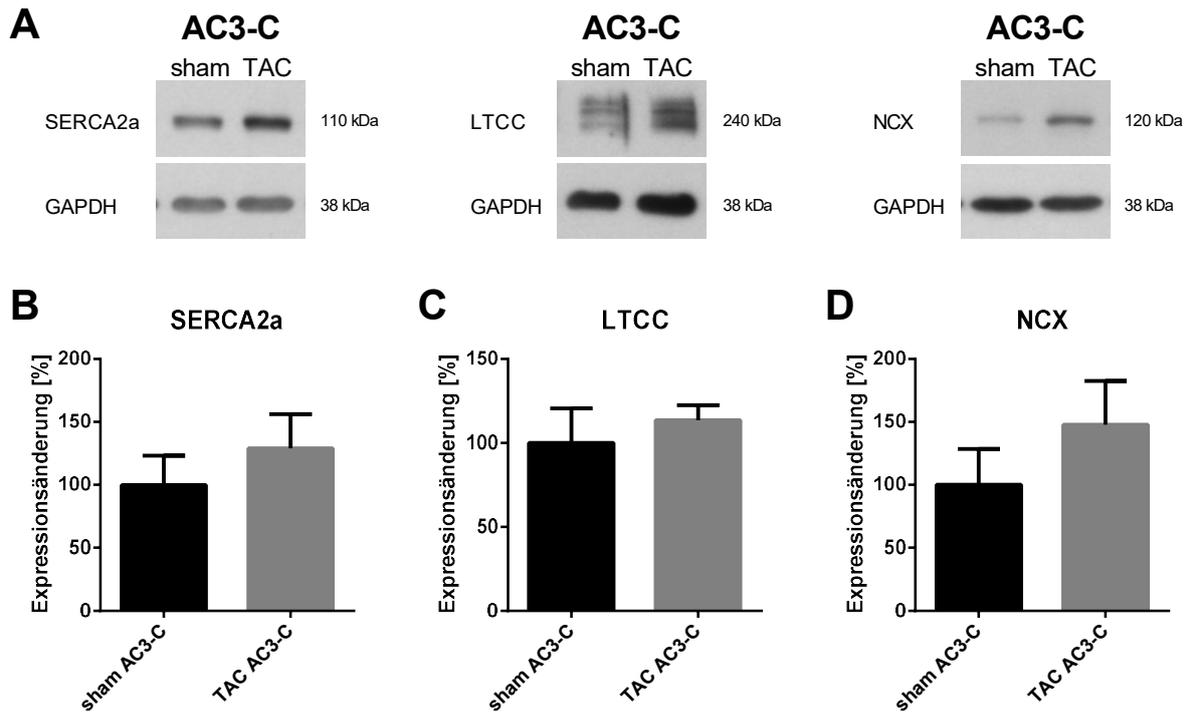


Abbildung 28: Proteinexpression in AC3-C Mäusen 2 d post-OP

A: Originalabbildung der Proteinexpression in AC3-C TAC Tieren verglichen mit sham Mäusen. **B-D:** Expression von SERCA2a (B), LTCC (C) und NCX (D) normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die AC3-C sham Gruppe und als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=5$ Mäuse/Gruppe, Student t Test).

4.2.4. Einzelzellmessungen am Epifluoreszenzmikroskop

Mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops und des Calcium-sensitiven Farbstoffs X-Rhod1 wurden in einzelnen Kardiomyozyten sowohl der Ca^{2+} -Transient als auch die Kontraktion während einer Stimulation von 1 Hz aufgezeichnet und ausgewertet. Dabei waren beide Parameter 2 d post-OP in den AC3-C TAC Mäusen im Vergleich zu den AC3-C sham Tieren signifikant gesteigert (Abbildung 29 A-D). Auch die Relaxation der Zellen war in den AC3-C TAC Mäusen signifikant schneller als in den AC3-C sham Mäusen (Abbildung 29 E). Beim SR Ca^{2+} -Gehalt zeigte sich wie bei den WT Tieren kein Unterschied zwischen der sham und TAC Gruppe der AC3-C Mäuse (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Einzelzellmessungen in den AC3-C Mäusen sind somit vergleichbar mit denen in den WT Mäusen (Abbildung 19).

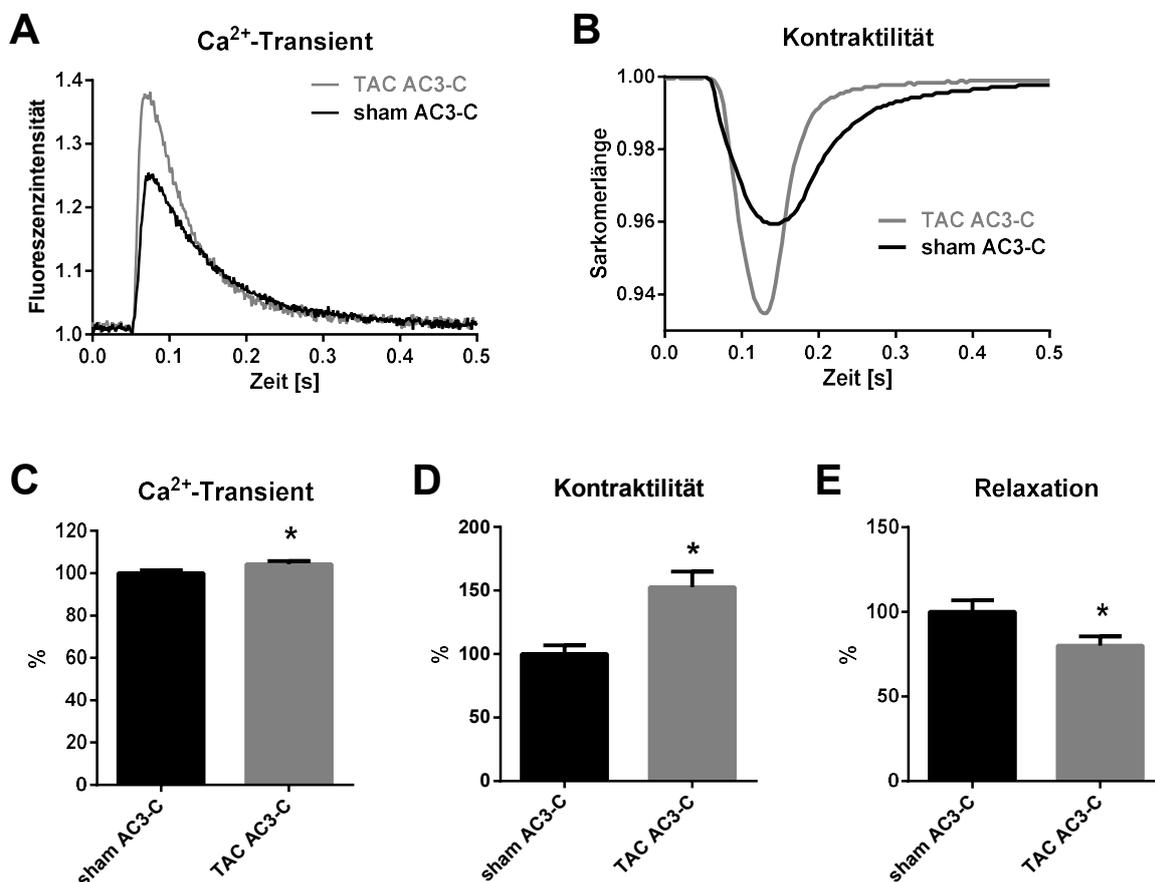


Abbildung 29: Epifluoreszenzmessung in AC3-C Zellen 2 d post-OP

A+B: Originaldarstellung eines Ca^{2+} -Transients (A) und einer Kontraktion (B) von AC3-C TAC und sham Zellen. **C-E:** Ca^{2+} -Transient (C), Kontraktilität (D) und Relaxation (E) 2 Tage nach sham- oder TAC-Operation normalisiert auf die AC3-C sham Gruppe. Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=48-69$ Zellen in 4-6 Mäusen/Gruppe, Student t Test). * $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe.

Um das arrhythmogene Potential der Zellen zu bestimmen, wurden während einer 30 s-Stimulationspause spontane Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) gemessen. In der AC3-C TAC Gruppe zeigten signifikant mehr Zellen SCRs als in der AC3-C sham Gruppe (36% vs. 10%) (Abbildung 30 A). In der WT TAC Gruppe hatten 35% der Zellen SCRs (Abbildung 21 A), sodass sich die AC3-C TAC und WT TAC Gruppen hinsichtlich ihres arrhythmogenen Potentials nicht unterscheiden.

Die diastolische Calcium-Konzentration zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der sham und TAC Gruppe in den AC3-C Mäusen (Abbildung 30 B).

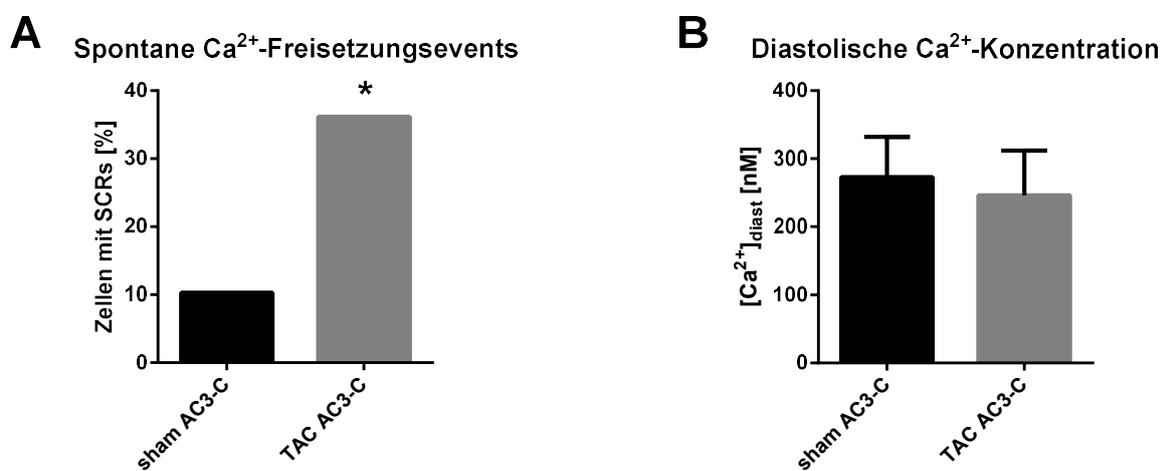


Abbildung 30: Spontane Ca^{2+} -Freisetzungsevents und diastolische Ca^{2+} -Konzentration in AC3-C Mäusen 2 d post-OP

A: Prozentsatz der Zellen mit spontanen Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) während einer 30 s-Stimulationspause in AC3-C TAC und sham Zellen 2 d post-OP ($n=48-69$ Zellen in 4-6 Mäusen/Gruppe, Fisher's exact Test). **B:** Diastolische Ca^{2+} -Konzentration in AC3-C TAC Zellen verglichen mit AC3-C sham Zellen 2 d nach der OP ($n=19-22$ Zellen in 4-6 Mäusen/Gruppe, Student t Test). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe.

4.2.5. Akute eGFP-Messungen am Epifluoreszenzmikroskop

Um eine mögliche Toxizität des eGFP zu überprüfen, wurden Kardiomyozyten aus nicht-operierten WT Mäusen isoliert und für 30 min mit 100 mM rekombinantem eGFP inkubiert. Anschließend wurden Epifluoreszenzmessungen durchgeführt, um die Auswirkungen des eGFP auf die Kontraktilität der Einzelzellen und den Ca^{2+} -Haushalt zu untersuchen. Dabei zeigte sich weder beim Ca^{2+} -Transienten noch bei der Kontraktilität ein signifikanter Unterschied zwischen den mit eGFP inkubierten Zellen und den mit 1x Normaltyrode (NT)

inkubierten Kontrollzellen (Abbildung 31 A+B). Auch die Relaxation war in den eGFP inkubierten Zellen vergleichbar mit den Kontrollzellen (Abbildung 31 C).

Beim SR Ca^{2+} -Gehalt gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 31 D). Auch die Bestimmung der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) während einer 30 s-Stimulationspause als ein Maß für das arrhythmogene Potential ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen mit eGFP vs. NT (27% vs. 23%) (Abbildung 31 E).

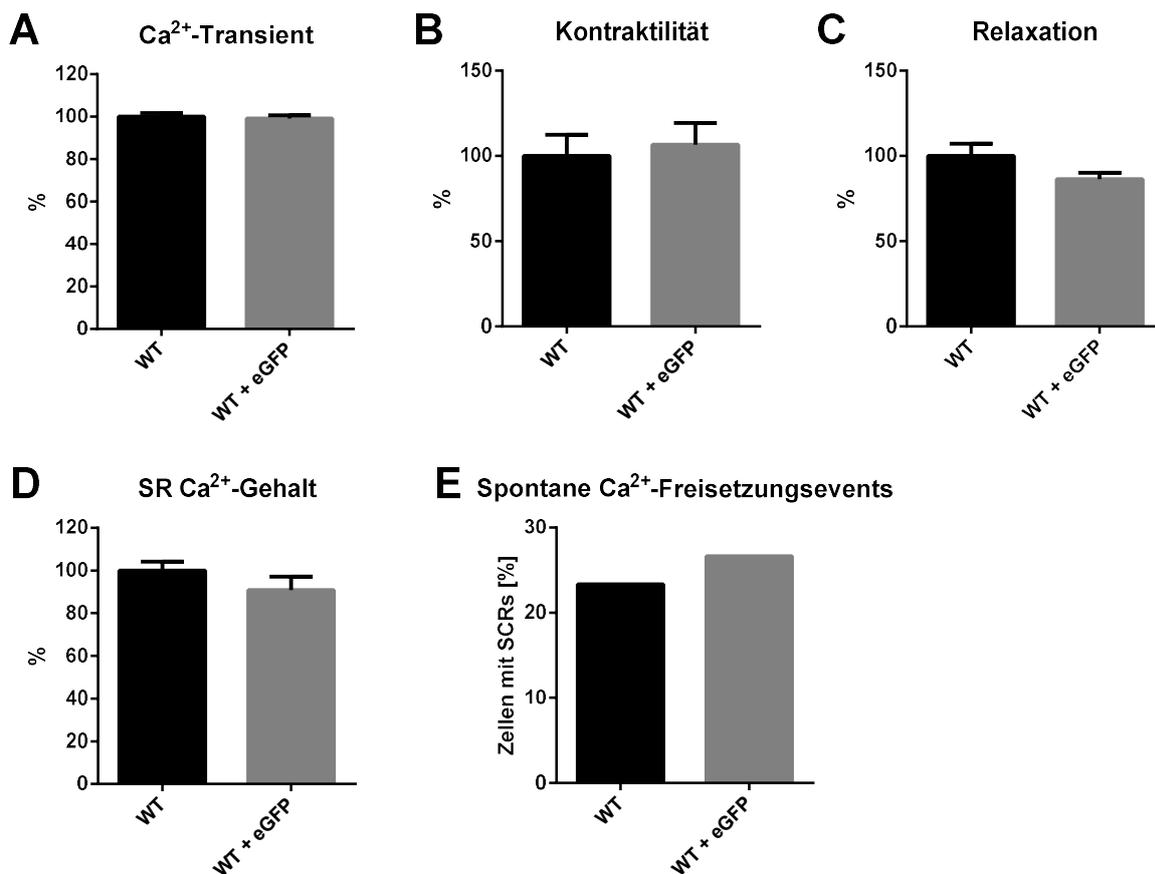


Abbildung 31: Epifluoreszenzmessung in WT Zellen inkubiert mit eGFP

A-D: Ca^{2+} -Transient (A), Kontraktilität (B), Relaxation (C) und SR Ca^{2+} -Gehalt (D) in WT Zellen inkubiert mit 100 mM eGFP im Vergleich zu WT Zellen inkubiert mit NT (Student t Test). **E:** Prozentsatz der Zellen mit spontanen Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) während einer 30 s-Stimulationspause in WT Zellen inkubiert mit eGFP vs. NT (Fisher's exact Test). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n=38 Zellen in 4 Mäusen/Gruppe).

4.3. CaMKII δ -Knockout Mäuse

In den CaMKII δ -Knockout (CKO) Mäusen fehlt, anders als in den AC3-I Mäusen, nur die im Herzen am stärksten exprimierte Isoform δ der CaMKII.

4.3.1. CaMKII-Expression & -Aktivität

Als Erstes wurden die spezifische CaMKII δ -Expression sowie die CaMKII-Aktivität in den CKO Mäusen gemessen. Dabei konnte in den CKO Mäusen eine residuale CaMKII δ -Expression von weniger als 10% verglichen mit den WT Mäusen detektiert werden (Abbildung 32 A+B). Während bei der CaMKII-Expression speziell die δ -Isoform gemessen wurde, wurde bei der Expression der phosphorylierten und somit aktivierten CaMKII beide CaMKII-Isoformen untersucht, sodass sich mit Hilfe der CKO Mäuse Rückschlüsse auf die noch vorhandene γ -Isoform ziehen lassen. So stieg die pCaMKII-Expression 2 d post-OP in den CKO TAC Mäusen im Vergleich zu den CKO sham Mäusen auf das Doppelte an (Abbildung 32 A+C), was auf eine gesteigerte Aktivität der γ -Isoform schließen lässt.

Die Analyse des CaMKII-Aktivitätsassays spiegelte mit einer 2-fach erhöhten Aktivität das Ergebnis der pCaMKII-Expression wider (Abbildung 33 A+B). Die Aktivierung der CaMKII ist allerdings in den WT TAC Mäusen signifikant höher als in den CKO TAC Mäusen (Abbildung 32 A+C), in denen die δ -Isoform der CaMKII fehlt.

Um zu überprüfen, ob die erhöhte CaMKII-Aktivität in den CKO TAC Mäusen sich in einer gesteigerten Expression der γ -Isoform der CaMKII widerspiegelt, wurde mittels Western Blot speziell die Expression der CaMKII γ untersucht. Dabei zeigte sich allerdings 2 d nach der Operation keine Steigerung der CaMKII γ -Expression in den CKO TAC vs. sham Mäusen (Abbildung 33 C+D).

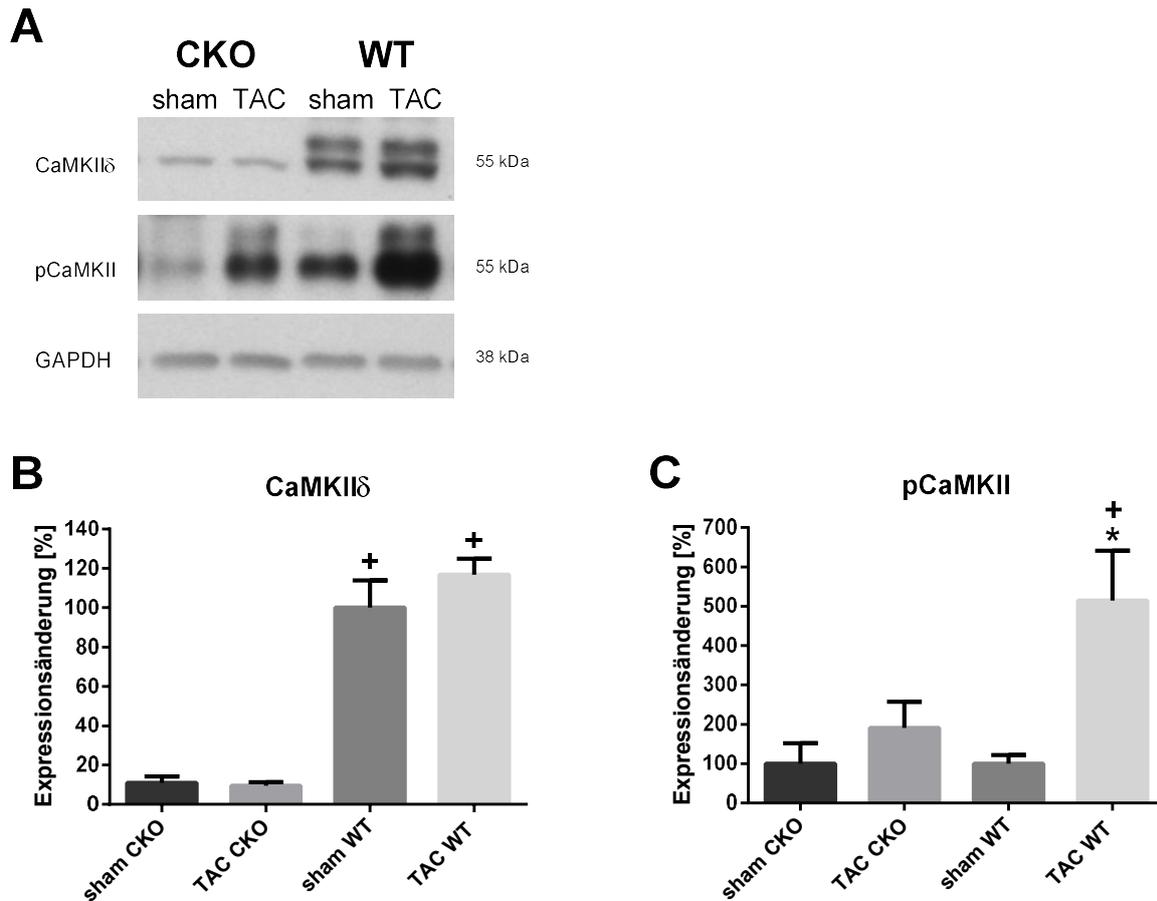


Abbildung 32: CaMKII-Expression und -Aktivität in CKO und WT Mäusen 2 d post-OP

A: Originalabbildung der CaMKII δ - und pCaMKII-Expression in CKO sham und TAC Tieren verglichen mit WT sham und TAC Mäusen. **B+C:** Expression der CaMKII δ (B), normalisiert auf die WT sham Gruppe, und phosphorylierten CaMKII (C), normalisiert auf die jeweilige sham Gruppe (n=3-5 Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe. + $p < 0.05$ in CKO sham vs. WT sham und CKO TAC vs. WT TAC.

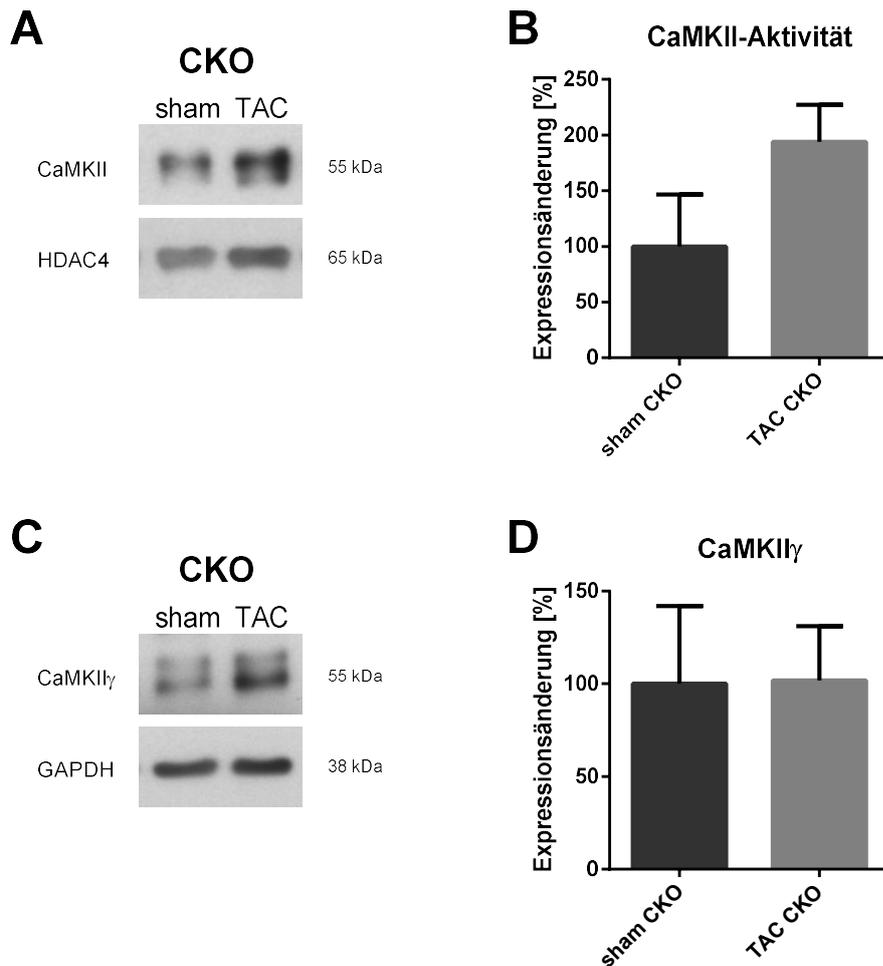


Abbildung 33: CaMKII-Aktivität und CaMKII γ -Expression in CKO Mäusen 2 d post-OP

A+C: Originalabbildung der CaMKII-Aktivität (A) und CaMKII γ -Expression (C) in CKO sham und TAC Tieren. **B+D:** CaMKII-Aktivität (B) und CaMKII γ -Expression (D) in CKO TAC Mäusen normalisiert auf die CKO sham Gruppe ($n=3-5$ Mäuse/Gruppe, Student t Test). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4.3.2. Überleben & Hypertrophie

Während die AC3-I TAC Mäuse ausschließlich in den ersten 5 Tagen nach der Operation verstarben (Überleben: 78%), zeigten die CKO TAC Mäuse mit 93% ein ähnlich hohes Überleben wie die WT TAC Tiere (91%) (Abbildung 34 A). Im Gesamtverlauf über 5 Wochen waren die Überlebensraten aller TAC Gruppen vergleichbar (CKO: 80%, WT: 83%, AC3-I: 80%) (Abbildung 34 B).

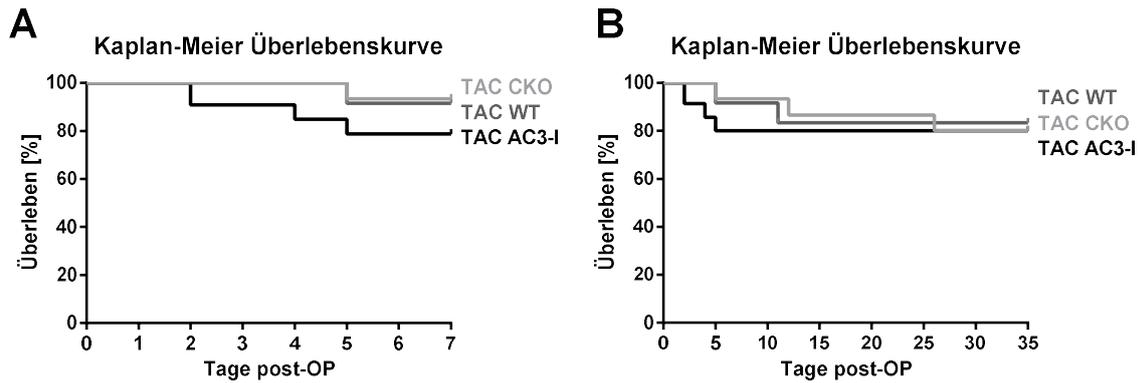


Abbildung 34: Überlebenskurve der CKO, WT und AC3-I Mäuse 7 d und 35 d post-OP

A+B: Kaplan-Meier Überlebenskurve der CKO TAC Mäuse verglichen mit den AC3-I und WT TAC Mäusen 7 d (A) und 35 d (B) nach TAC ($n=15$ für CKO, $n=12$ für WT, $n=33$ für AC3-I, Kaplan-Meier und Mantel-Cox Test).

Um auszuschließen, dass eine unterschiedlich starke Aortenkonstriktion die Ursache für die verschiedenen Mortalitätsraten war, wurde an d2 post-OP die Durchflussgeschwindigkeit über der stenosierten Stelle gemessen. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Stärke der Aortenkonstriktion zwischen den jeweiligen TAC Gruppen der verschiedenen Genotypen (Abbildung 35 A).

Durch die Messung des HW/BW Ratio lassen sich Rückschlüsse auf die Entwicklung einer möglichen Herzhypertrophie ziehen. Im Gegensatz zu den WT TAC Tieren (Abbildung 11 A) bildeten die CKO TAC Mäuse keine Herzhypertrophie, gemessen am HW/BW Ratio, in der akuten Phase der Nachlasterrhöhung aus (Abbildung 35 B).

Die Aktivierung des fötalen Hypertrophieprogramms ist durch eine gesteigerte Genexpression von Hypertrophiemarkern wie β -MHC (anstelle von α -MHC) oder BNP gekennzeichnet. Die Analyse der Expression dieser Gene mittels qRT-PCR zeigte 2 d nach der Operation, wie bereits beim HW/BW Ratio, keinen Unterschied zwischen den CKO TAC und sham Mäusen (Abbildung 35 C-E).

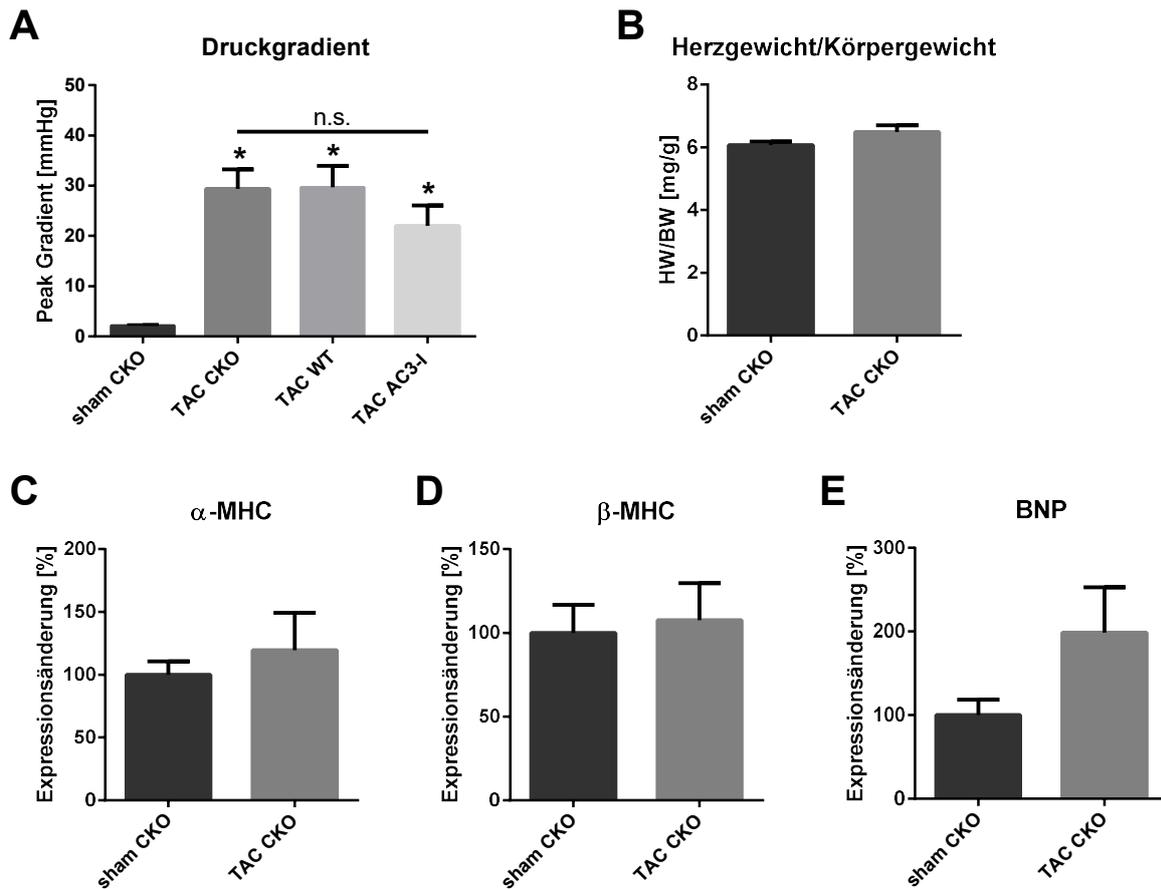


Abbildung 35: Druckgradient, HW/BW Ratio und Genexpression von Hypertrophiemarkern in CKO Mäusen 2 d post-OP

A: Druckgradient in CKO sham und TAC Mäusen verglichen mit WT TAC und AC3-I TAC Tieren 2 d nach der OP (n=8-20 Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). **B:** Herzgewicht/Körpergewicht (HW/BW) Ratio in CKO Mäusen 2 d post-OP (n=10-12 Mäuse/Gruppe). **C-E:** Genexpression von α-MHC (C), β-MHC (D) und BNP (E) normalisiert auf die GAPDH Expression und auf die CKO sham Gruppe (n=9-10 Mäuse/Gruppe). Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (Student t Test). * p<0.05 vs. der entsprechenden sham Gruppe.

Auch die Bestimmung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche mittels WGA-Färbung ergab 2 d post-OP keinen signifikanten Unterschied zwischen den CKO sham und TAC Mäusen (Abbildung 36 A+B). Mit Hilfe der Isolectin B₄-Färbung wurde außerdem die Kapillardichte in den einzelnen Gruppen 2 d nach der Operation bestimmt. Dabei zeigte sich jedoch keine Veränderung in den CKO TAC Mäusen gegenüber den CKO sham Tieren (Abbildung 36 C+D).

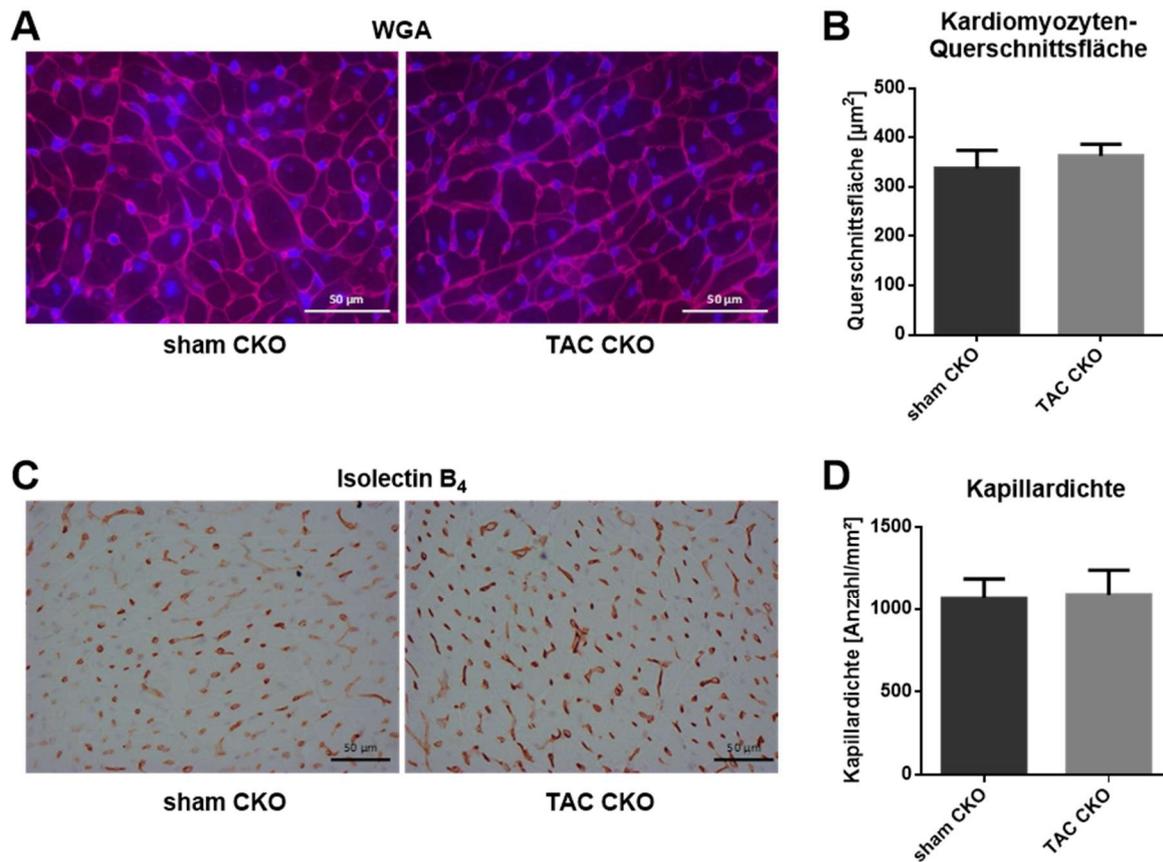


Abbildung 36: Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und Kapillardichte in CKO Mäusen 2 d post-OP

A+C: Beispiel für die wheat germ agglutinin (WGA)-Färbung (pink) und Zellkernfärbung (Hoechst, blau) (A) und Isolectin B₄-Färbung (C) in CKO sham (links) und TAC Mäusen (rechts) 2 d post-OP.

B+D: Kardiomyozyten-Querschnittsfläche (B) und Kapillardichte (D) in CKO sham und TAC Tieren 2 d post-OP. Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n=4-5 Mäuse/Gruppe, Student t Test).

4.3.3. Echokardiographie & Elektrokardiogramm

Für die genauere Untersuchung der Herzfunktion und -dimension wurde an d2 nach der Operation eine Echokardiographie bei den Mäusen durchgeführt (Abbildung 37 A). Die Echokardiographiedaten zeigten, dass die Ejektionsfraktion (EF) und das Herzzeitvolumen (Cardiac Output, CO) als ein Maß für die Pumpleistung des Herzens in den CKO TAC Mäusen im Vergleich zu den CKO sham Mäusen 2 d post-OP nur geringfügig verringert waren (Abbildung 37 B+C). Im Gegensatz dazu wiesen die AC3-I TAC Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikanten Abfall der EF und CO 2 Tage nach der Operation auf (Abbildung 37 B+C). Die CKO Mäuse waren also, anders als die AC3-I Mäuse, in den ersten Tagen post-TAC vor einem akuten Pumpversagen geschützt.

Auch der endsystolische innere Durchmesser des linken Ventrikels (LVIDs) war in der CKO TAC vs. sham Gruppe unverändert (Abbildung 37 D). In den AC3-I TAC Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den AC3-I sham Tieren hingegen eine signifikante Steigerung des linksventrikulären Durchmessers, was auf eine Dilatation des linken Ventrikels hinweist (Abbildung 37 D).

Zusätzlich zu der Echokardiographie wurde bei den Mäusen ein Elektrokardiogramm angefertigt, um mögliche Veränderungen in der Herzfrequenz oder Unregelmäßigkeiten im Herzrhythmus feststellen zu können. Dabei zeigten sich weder in der CKO sham Gruppe noch in den CKO TAC Tieren 2 d post-OP Auffälligkeiten (Abbildung 38 A). Die Ruheherzfrequenz (d.h. in diesem Fall nach erfolgter Narkotisierung) war in allen Gruppen unverändert (Abbildung 38 B).

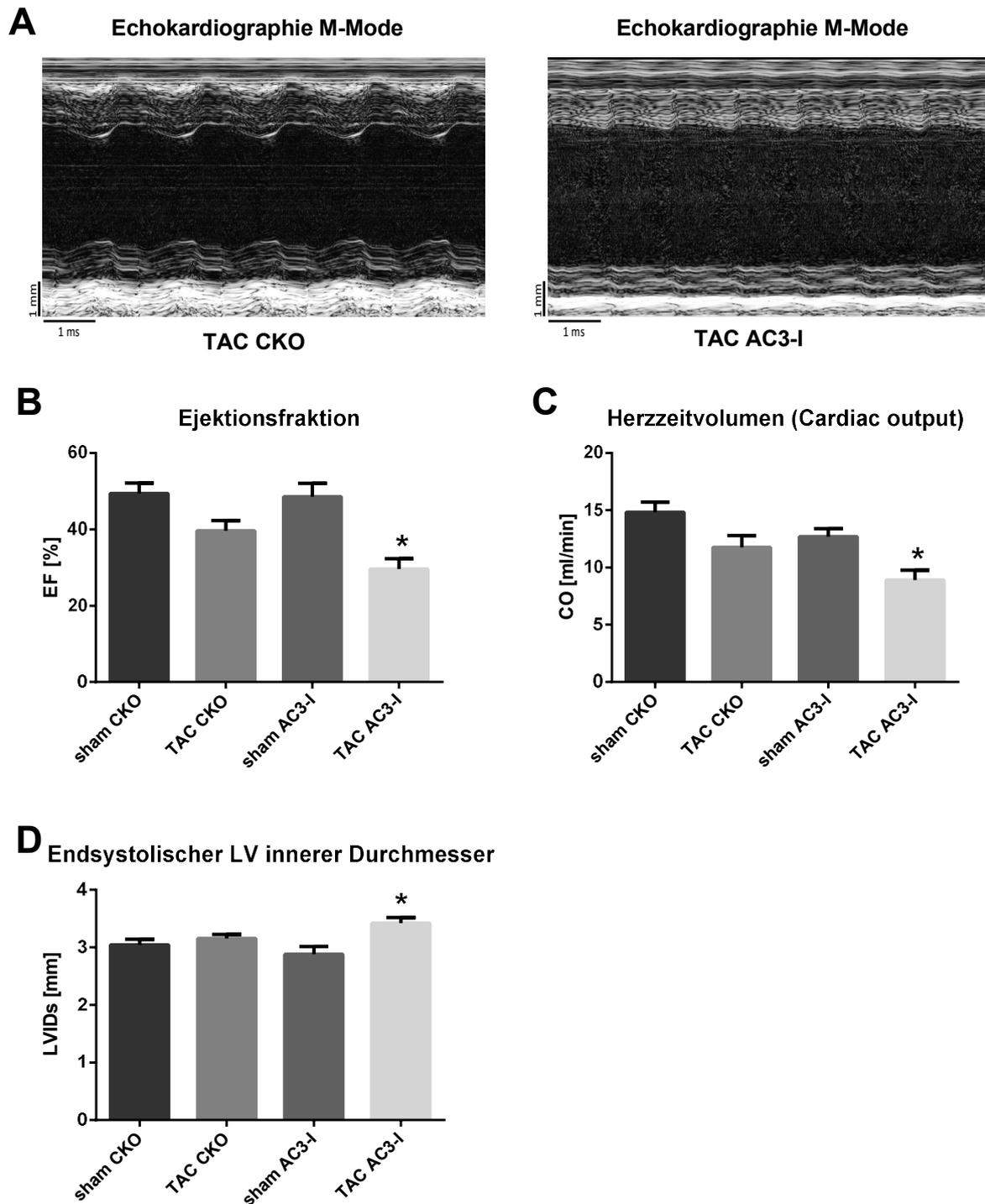


Abbildung 37: Echokardiographiedaten in CKO Mäusen 2 d post-OP

A: Beispiel einer echokardiographischen M-Mode Messung für TAC CKO (links) und TAC AC3-I (rechts) 2 d post-OP. **B-D:** Ejektionsfraktion (B), Herzeitvolumen (Cardiac Output) (C) und endsystolischer linksventrikulärer (LV) innerer Durchmesser (D) 2 d nach sham- oder TAC-OP (n=8-14 Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe.

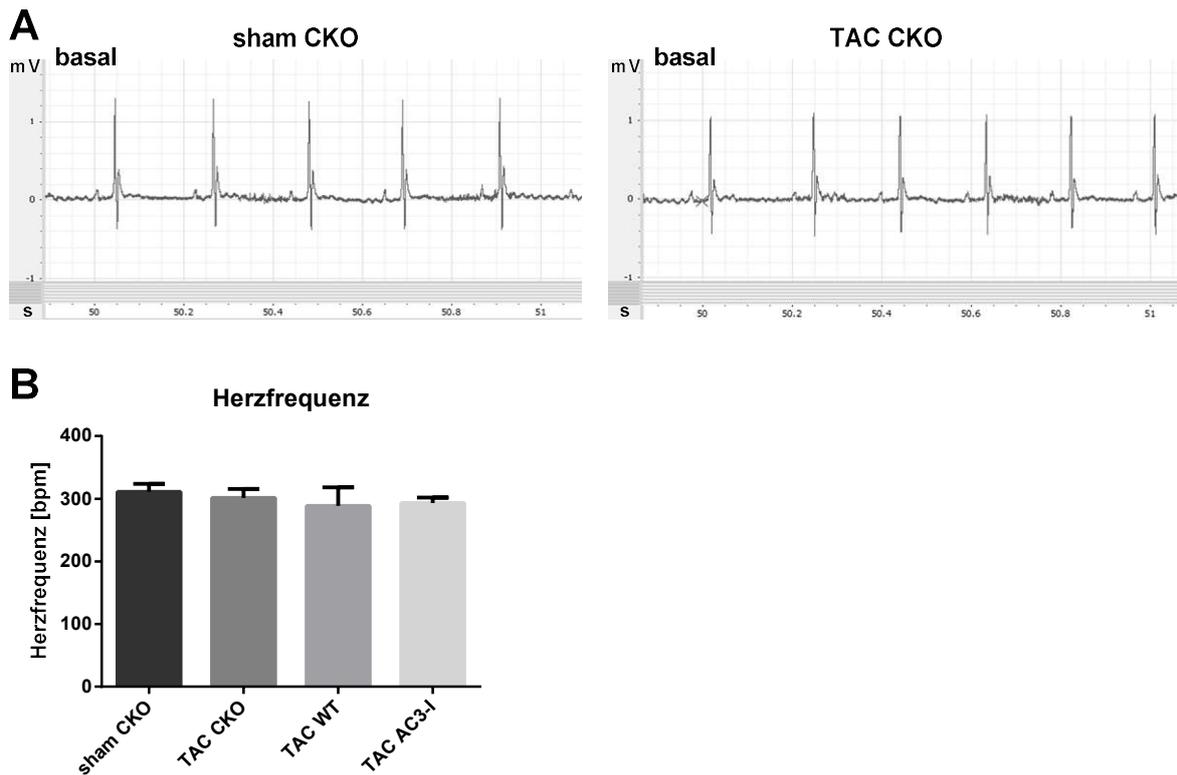


Abbildung 38: Elektrokardiogramm in CKO Mäusen 2 d post-OP

A: Beispiel einer Elektrokardiogramm-Messung in sham CKO (links) und TAC CKO Mäusen (rechts) 2 d post-OP in Ruhe. **B:** Ruheherzfrequenz, ermittelt im EKG nach erfolgter Narkotisierung, 2 d post-OP ($n=3-5$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4.3.4. Fibrose & Inflammation

Um eine Beeinträchtigung der Herzfunktion durch zunehmende Fibrosierung des Gewebes infolge der TAC-Operation auszuschließen, wurde mit Hilfe einer Masson-Trichrom-Färbung der Anteil der Fibrosefläche bezogen auf das gesamte Herzgewebe 2 Tage post-OP analysiert. Das Ergebnis zeigte, dass sich die CKO sham und TAC Mäuse 2 d nach der Operation hinsichtlich der Fibrosierung des Herzens nicht voneinander unterscheiden (Abbildung 39 A+B). Auch die Analyse der Genexpression des Fibrosemarkers Col1a1 mittels qRT-PCR ergab 2 d post-OP keinen Unterschied zwischen den CKO TAC und sham Mäusen (Abbildung 39 C).

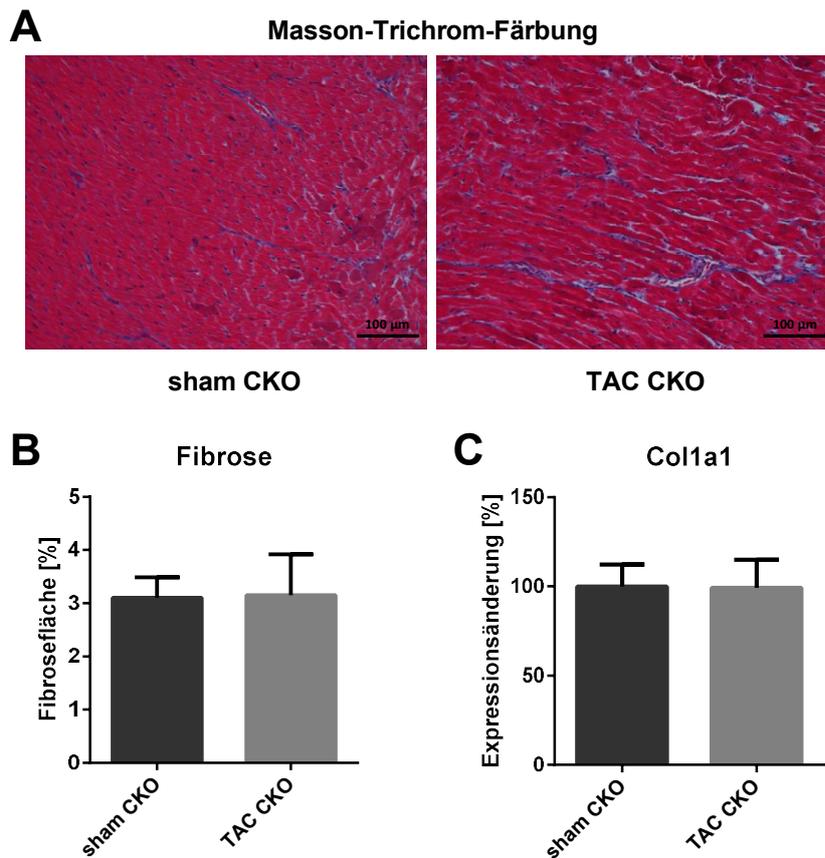


Abbildung 39: Fibrosierung und Genexpression eines Fibrosemarkers in CKO Mäusen 2 d post-OP

A: Beispiel für die Masson-Trichrom-Färbung (rot: Muskel, blau: Kollagen, schwarz: Zellkern) in CKO sham (links) und TAC Mäusen (rechts) 2 d nach der OP. **B:** Anteil der Fibrosefläche in % am Gesamtgewebe in CKO sham und TAC Mäusen 2 d post-OP (n=4-5 Mäuse/Gruppe). **C:** Genexpression von Col1a1 normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die CKO sham Gruppe (n=9-10 Mäuse/Gruppe) und als Mittelwert \pm SEM dargestellt (Student t Test).

Inflammatorische Prozesse können ebenfalls die Herzfunktion beeinträchtigen. Um eine solche Reaktion auszuschließen, wurde die Genexpression proinflammatorischer Interleukine und Chemokine mittels qRT-PCR untersucht. Dabei zeigte sich bei der Expression von IL-1 β , IL-6 und CCL2 2 d nach der OP kein signifikanter Unterschied zwischen den CKO sham und TAC Tieren (Abbildung 40 A-C).

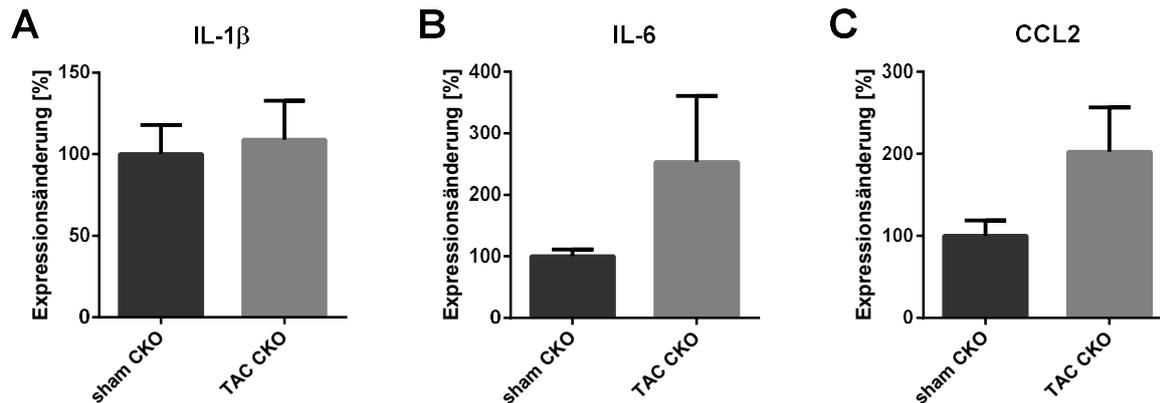


Abbildung 40: Genexpression von Inflammationsmarkern in CKO Mäusen 2 d post-OP

A-C: Genexpression von IL-1 β (A), IL-6 (B) und CCL2 (C) in CKO TAC vs. sham Mäusen (normalisiert auf die GAPDH Expression). Daten sind normalisiert auf die CKO sham Gruppe und als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=9-10$ Mäuse/Gruppe, Student t Test).

4.3.5. Proteinexpression

Mit Hilfe des Western Blots wurden die wichtigsten an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteine (RyR2, PLB, SERCA2a, LTCC und NCX) sowie deren spezifischen CaMKII-Phosphorylierungsstellen (pS2814 des RyR2, pT17 des PLB) untersucht.

Dabei zeigte sich in den CKO TAC Tieren, ähnlich wie in den AC3-I TAC Tieren, eine stark verminderte Phosphorylierung an pS2814 des RyR2 (Abbildung 41 A+B) und pT17 des PLB (Abbildung 41 D+E) im Vergleich zu den WT TAC Tieren. Die Phosphorylierung war allerdings in den CKO TAC Mäusen deutlich gesteigert sowohl verglichen mit der CKO sham Gruppe als auch mit der AC3-I TAC Gruppe (Abbildung 41 B+E), was wiederum auf die Aktivität der γ -Isoform schließen lässt.

Ähnlich zu den WT und AC3-I Tieren war die Gesamtexpression des RyR2 und PLB (Abbildung 41 C+F) sowie der ebenfalls an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteine SERCA2a, LTCC und NCX 2 d post-OP unverändert (Abbildung 42 A-D).

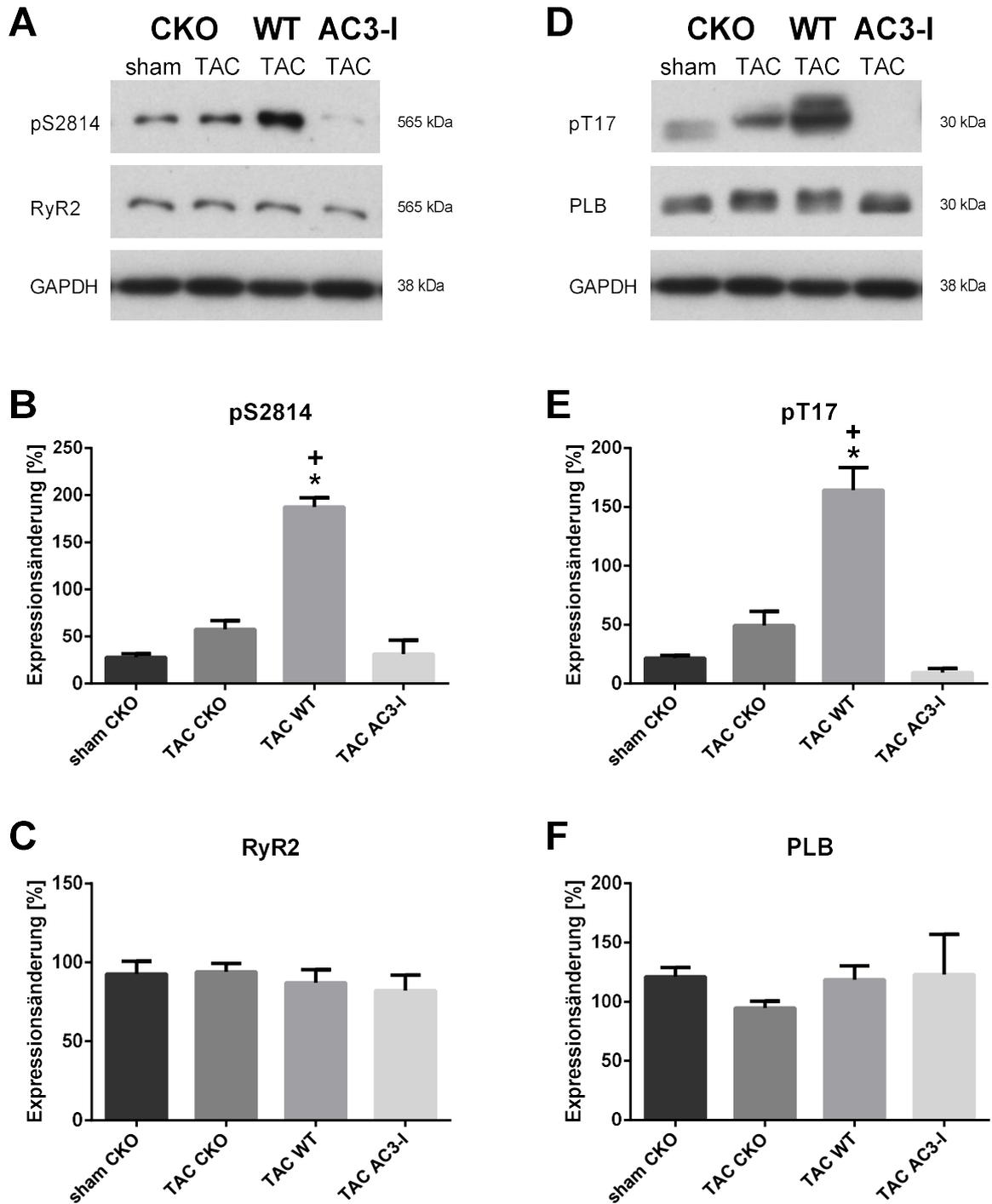


Abbildung 41: Phosphorylierung und Expression des RyR2 und PLB in CKO Mäusen 2 d post-OP

A+D: Originalabbildung der Proteinexpression in CKO sham und TAC Tieren verglichen mit WT und AC3-I TAC Mäusen. **B-F:** Expression von pS2814 (B), RyR2 (C), pT17 (E) und PLB (F) normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die WT sham Gruppe und als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=3-5$ Mäuse/Gruppe, one-way ANOVA). * $p<0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe. + $p<0.05$ vs. CKO TAC.

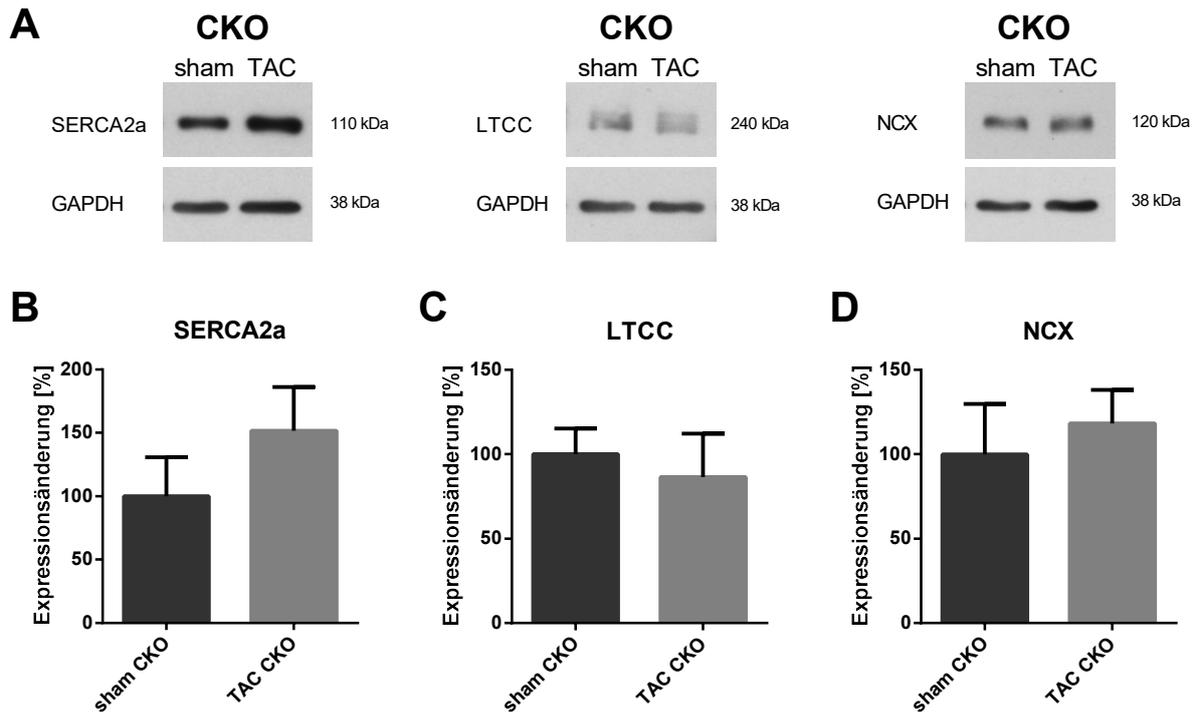


Abbildung 42: Proteinexpression in CKO Mäusen 2 d post-OP

A: Originalabbildung der Proteinexpression in CKO TAC Tieren verglichen mit sham Mäusen. **B-D:** Expression von SERCA2a (B), LTCC (C) und NCX (D) normalisiert auf die GAPDH Expression. Daten sind normalisiert auf die CKO sham Gruppe und als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=3-5$ Mäuse/Gruppe, Student t Test).

4.3.6. Einzelzellmessungen am Epifluoreszenzmikroskop

Für die Analyse möglicher Veränderungen des Ca^{2+} -Haushalts wurden 2 Tage nach der Operation Epifluoreszenzmessungen an einzelnen Kardiomyozyten durchgeführt. Dabei wurden mit Hilfe des Calcium-sensitiven Farbstoffs X-Rhod1 Ca^{2+} -Transienten sowie die Kontraktilität der Kardiomyozyten während einer 1 Hz-Stimulation gemessen. Die Ca^{2+} -Transienten und die Kontraktilität der CKO TAC Zellen waren im Vergleich zu den CKO sham Zellen 2 d post-OP signifikant gesteigert (Abbildung 43 A-D), jedoch nicht so stark wie in den WT TAC Zellen (Abbildung 19 C+D). Die Relaxationszeit hingegen war verglichen mit der sham Gruppe unverändert (Abbildung 43 E), wohingegen die Relaxation gegenüber der jeweiligen sham Gruppe in den AC3-I TAC Zellen verlangsamt, in den WT TAC Zellen jedoch beschleunigt war (Abbildung 19 E). Die CKO TAC Zellen nehmen somit eine intermediäre Position zwischen den AC3-I TAC und WT TAC Zellen ein. Beim SR Ca^{2+} -Gehalt zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 43 F).

Die Messung der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) während einer 30 s-Stimulationspause ergab, dass das arrhythmogene Potential in Folge der TAC-OP signifikant zunimmt, nämlich von 12% in den CKO sham Tieren auf 30% in den CKO TAC Tieren ($p < 0.05$) (Abbildung 44 A).

Die diastolische Ca^{2+} -Konzentration war tendenziell in den CKO TAC vs. sham Mäusen erniedrigt und zeigte einen ähnlichen Wert wie die WT TAC Mäuse (Abbildung 44 B).

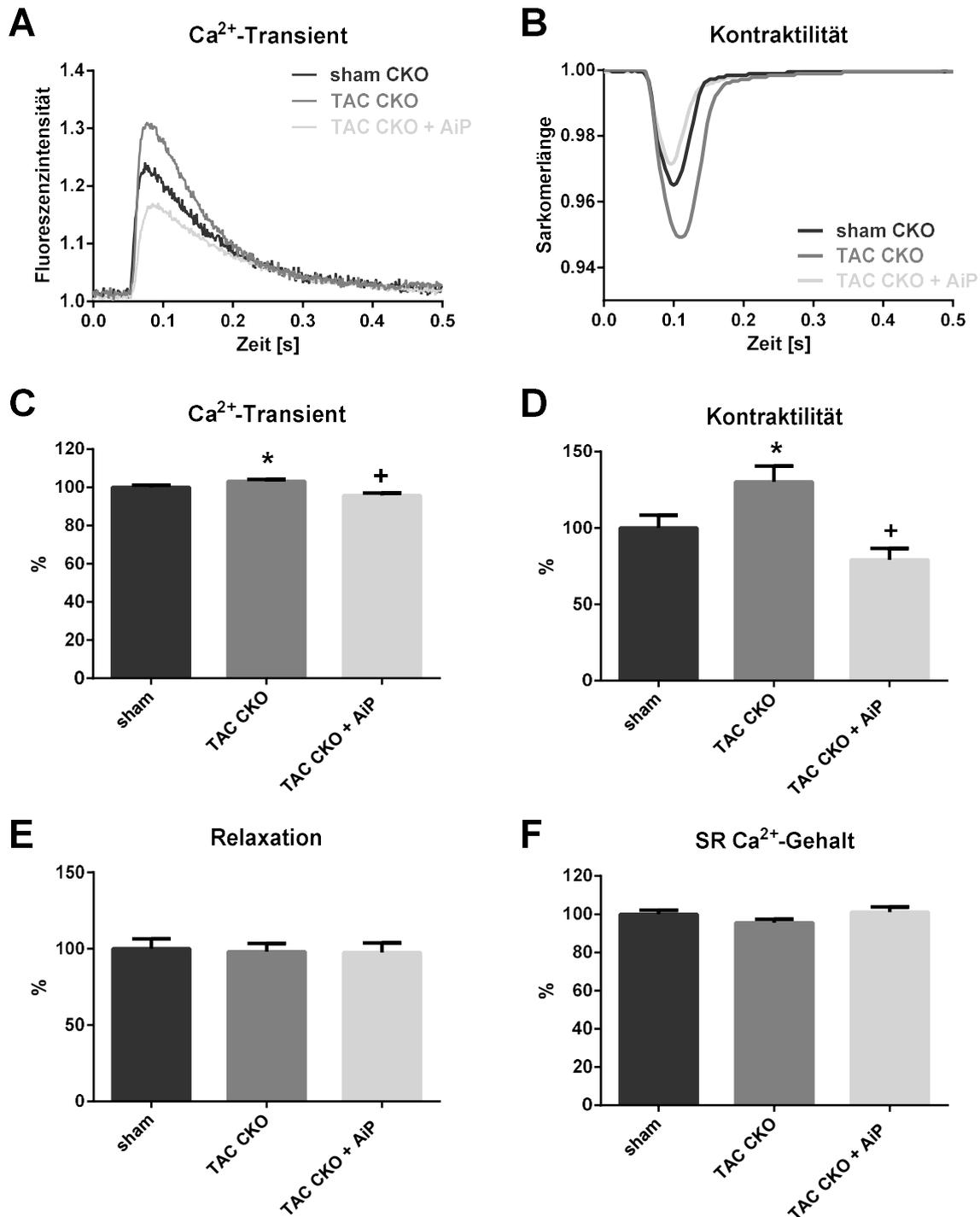


Abbildung 43: Epifluoreszenzmessung in CKO Zellen 2 d post-OP

A+B: Originaldarstellung eines Ca²⁺-Transienten (A) und einer Kontraktion (B) von CKO TAC und sham Zellen verglichen mit CKO TAC + AiP Zellen. **C-F:** Ca²⁺-Transient (C), Kontraktilität (D), Relaxation (E) und SR Ca²⁺-Gehalt (F) 2 Tage nach sham- oder TAC-Operation normalisiert auf die jeweilige sham Gruppe. Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n=60 Zellen in 5 Mäusen/Gruppe, one-way ANOVA).

* $p < 0.05$ vs. der entsprechenden sham Gruppe. + $p < 0.05$ vs. CKO TAC.

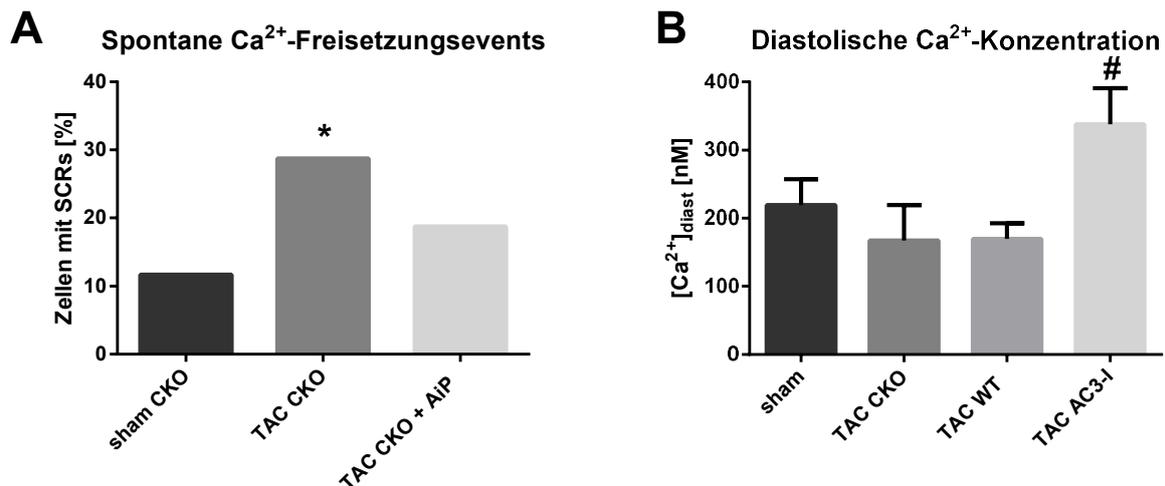


Abbildung 44: Spontane Ca²⁺-Freisetzungsevents und diastolische Ca²⁺-Konzentration in CKO Mäusen 2 d post-OP

A: Prozentsatz der Zellen mit spontanen Ca²⁺-Freisetzungsevents (SCRs) während einer 30 s-Stimulationspause in CKO TAC Zellen verglichen mit CKO TAC + AiP und sham Zellen 2 d post-OP (n=60 Zellen in 5 Mäusen/Gruppe, Fisher's exact Test). **B:** Diastolische Ca²⁺-Konzentration in CKO sham und TAC Zellen verglichen mit WT TAC und AC3-I TAC Zellen 2 d nach sham- oder TAC-OP (n=16-40 Zellen in 5-6 Mäusen/Gruppe, one-way ANOVA). Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. * p<0.05 vs. der entsprechenden sham Gruppe. # p<0.05 vs. WT TAC.

4.3.7. Akute CaMKII-Inhibition mit AiP

Um zu überprüfen, ob durch eine zusätzliche *in vitro* Inhibition der γ -Isoform die Ergebnisse der AC3-I Mäuse in den CKO Mäusen nachgeahmt werden können, wurden 2 d post-OP Einzelzellen aus CKO Mäusen isoliert, mit AiP inkubiert (2 μ M, 30 min) und Epifluoreszenzmessungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Ca²⁺-Transient und die Kontraktilität der Zellen in der CKO TAC + AiP Gruppe im Vergleich zur CKO TAC Gruppe signifikant verringert war (Abbildung 43 A-D). Die Inkubation mit AiP hatte keine Auswirkung auf die Relaxation (Abbildung 43 E) und den SR Ca²⁺-Gehalt (Abbildung 43 F).

Das arrhythmogene Potential, gemessen als spontane Ca²⁺-Freisetzungsevents (SCRs) in einer 30 s-Stimulationspause, wurde durch die Zugabe von AiP von 29% auf 19% verringert (Abbildung 44 A). Die akute CaMKII-Inhibition mit AiP in den CKO TAC Mäusen ist mit den Ergebnissen der WT TAC + AiP Zellen vergleichbar. Dementsprechend verringert die Inhibition beider CaMKII-Isoformen den Ca²⁺-Transienten und die Kontraktilität der Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro*.

5. Diskussion

Die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und ihre Rolle in der Pathophysiologie des Herzens wurde in den letzten zwei Jahrzehnten intensiv erforscht. Dabei zeigte sich, dass eine Überaktivierung der CaMKII an den häufigsten kardialen Erkrankungen, wie der Herzinsuffizienz [68], dem maladaptiven Umbau des Herzens und Herzhypertrophie [53,69,70], Arrhythmien [71–73] und plötzlicher Herztod [74,75], beteiligt ist. Die CaMKII ist somit ein sehr interessantes Zielprotein für die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung verschiedenster kardialer Erkrankungen.

Die physiologische Rolle der CaMKII ist hingegen weit weniger gut untersucht. Es gibt allerdings zunehmend Hinweise, dass die Aktivierung der CaMKII auch gute Seiten hat, insbesondere bei einer kurzzeitigen Aktivierung. So phosphoryliert und reguliert die CaMKII Untereinheiten des L-Typ Ca^{2+} -Kanals. Das führt zu einem Prozess (*facilitation*), bei dem durch eine wiederholte Stimulation mehr Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol gelangen und somit die Kontraktilität gesteigert wird [76,77]. Die CaMKII ist zudem positiv an der Erhöhung der Herzfrequenz nach adrenerger Stimulation [67] und an der Wiederherstellung der Herzfunktion im azidotischen Milieu [78] beteiligt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Aktivierung der CaMKII für die physiologische Adaptation des Herzens bei Ausdauersport wichtig ist [79] und dabei über einen IGF-1 und NO-vermittelten Signalweg aktiviert wird [80].

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die CaMKII eine wichtige physiologische Rolle bei akuter Nachlasterrhöhung einnimmt, um die Kontraktionskraft des Herzens aufrechtzuerhalten. Zudem legen die Ergebnisse dar, dass eine exzessive CaMKII-Inhibition in akuten Stresssituationen kontraproduktiv und sogar schädlich sein kann, was einen wichtigen Aspekt für die klinische Anwendbarkeit von CaMKII-Inhibitoren darstellt. Ferner wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine spezifische Inhibition der δ -Isoform ein idealer Kompromiss wäre, um die maladaptiven Folgen einer CaMKII-Überaktivierung bei kardialen Erkrankungen zu verhindern und gleichzeitig die Kontraktionskraft durch die noch vorhandene Restaktivität der CaMKII aufrechtzuerhalten.

5.1. CaMKII-Aktivität in der akuten Phase der Nachlasterhöhung

Als Erstes wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die CaMKII in dieser akuten Phase der Nachlasterhöhung (d.h. 2 Tage post-TAC) bereits aktiviert war. Dafür wurden WT Mäuse mit AC3-I Mäusen, in denen ein unspezifischer CaMKII-Inhibitor (AiP) herzspezifisch exprimiert wird [57], verglichen und gezeigt, dass die CaMKII-Aktivität in den WT TAC Mäusen massiv gesteigert war, was auf eine wichtige Funktion der CaMKII in der akuten Nachlasterhöhung hinweist. Die AC3-I TAC Tiere zeigten außerdem ein signifikant schlechteres Überleben in den ersten 5 Tagen nach der Operation im Vergleich zu den WT Geschwistertieren. Spezifische CaMKII δ -Knockout (CKO) Tiere waren hingegen, genauso wie die WT Tiere, in den ersten Tagen nach der TAC-Operation geschützt, sodass die Aktivität der weniger stark exprimierten γ -Isoform ausreicht, um die fehlende δ -Isoform zu kompensieren. So war auch die CaMKII-Aktivität in den CKO TAC Tieren 2 d nach der Operation doppelt so hoch wie in den CKO sham Mäusen, was auf die γ -Isoform zurückzuführen ist.

5.2. CaMKII-Inhibition in der akuten Phase der Nachlasterhöhung

5.2.1. Unspezifische CaMKII-Inhibition

Um die Todesursache der AC3-I TAC Mäuse genauer zu untersuchen, wurden die Mäuse an d2 post-OP echokardiographiert. Dabei zeigte sich, dass die AC3-I Mäuse eine signifikant schlechtere Ejektionsfraktion und Herzzeitvolumen (Cardiac Output) aufwiesen als die entsprechende Gruppe der WT Tiere und zudem eine linksventrikuläre Dilatation ausbildeten, was auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz hinweist.

Die Echokardiographiedaten zeigten in allen Genotypen basale EF-Werte von ca. 50%, was im Mittel 10% geringer ist als andere Arbeitsgruppen berichteten [81–83]. Jedoch gibt es in der Literatur auch Angaben, die ähnlich zu den Werten in dieser Arbeit sind [84–87]. Die Herzfrequenz wurde dabei über die Tiefe der Narkose kontrolliert und so eingestellt, dass die Mäuse eine Herzfrequenz von 450 ± 50 bpm hatten. Herzfrequenz und EF korrelieren positiv miteinander, weshalb sich eine veränderte Herzfrequenz auch auf die systolische Herzfunktion und die gemessenen Parametern auswirken kann [88]. Da die durch die Narkose eingestellte Herzfrequenz ebenfalls niedriger ist als bei anderen Arbeitsgruppen [69,89], ist das sehr wahrscheinlich der Grund für die niedrigere basale EF, die jedoch in allen Genotypen ähnliche Werte aufweist.

Die CaMKII reguliert in Stresssituationen die sogenannte *fight or flight*-Reaktion und somit auch die Herzfrequenz [67,90,91]. Da während der Echokardiographie die Herzfrequenz über die Narkosetiefe auf einen vorgegebenen Bereich eingestellt und somit mögliche Unterschiede zwischen den Genotypen nicht sichtbar wurden, wurde die Herzfrequenz zusätzlich mit Hilfe eines EKGs in Ruhe und in einer Stresssituation, simuliert durch eine Isoprenalin-Injektion (1 mg/kg KG), bestimmt. Dabei konnten allerdings keine Unterschiede zwischen den WT und AC3-I Tieren sowie TAC und sham Gruppen festgestellt werden, sodass eine chronotrope Inkompetenz als Todesursache der AC3-I TAC Mäuse ausgeschlossen werden konnte. Die erhöhte Sterblichkeitsrate der AC3-I TAC Tiere in den ersten Tagen nach der Operation ist somit auf eine kardiale Dysfunktion zurückzuführen.

5.2.2. Spezifische CaMKII δ -Inhibition

Im Gegensatz zu den AC3-I TAC Tieren zeigten die CKO TAC Mäuse in der akuten Phase der Nachlasterrhöhung gemessen an der Ejektionsfraktion und am Herzzeitvolumen keine Beeinträchtigung der Pumpfunktion. Sie wiesen ähnliche Werte wie die WT TAC Mäuse zu diesem Zeitpunkt auf, was darauf schließen lässt, dass die Aktivität der noch vorhandenen γ -Isoform ausreicht, um die Herzfunktion in akuten Stresssituationen aufrechtzuerhalten. Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen berichteten, dass sich eine Inhibition der CaMKII über einen längeren Zeitraum positiv auf das Überleben der Mäuse nach TAC auswirkte [69,92], zeigte sich am Ende des Beobachtungszeitraums von 5 Wochen kein Unterschied hinsichtlich der Überlebensrate zwischen den CKO, AC3-I und WT Mäusen. Mögliche Gründe für diese Diskrepanz liegen in der Länge des Beobachtungszeitraums, dem Geschlecht der verwendeten Tiere oder in der Stärke der Aortenkonstriktion.

5.3. Hypertrophie, Inflammation & Fibrose

5.3.1. Unspezifische CaMKII-Inhibition

Da neben dem akuten Pumpversagen auch andere Ursachen zu der erhöhten Sterblichkeit in den AC3-I TAC Mäusen beitragen könnten, wurden zusätzlich die Hypertrophie, die Kapillarisation, inflammatorische Prozesse sowie die Fibrosebildung der Herzen untersucht. Die AC3-I TAC Mäuse waren im Gegensatz zu den WT Mäusen 2 Tage nach der OP vor einer

Herzhypertrophie geschützt. Dass die CaMKII das genetische Hypertrophieprogramm aktiviert, wurde bereits mehrfach von anderen Arbeitsgruppen gezeigt [53,69,83,93,94], was meine Ergebnisse bezüglich der Hypertrophieentstehung in der akuten Nachlasterhöhung untermauert. Die Kapillardichte war ebenfalls nur in den WT TAC vs. sham Mäusen signifikant gesteigert, wobei Souders et al. 2 Tage post-TAC ein gegenläufiges Ergebnis beschrieben, dass aufgrund der Hypertrophie die Kapillardichte zunächst abnahm und sich bis d7 wieder normalisierte [94]. Die Diskrepanz zwischen Souders und meiner Arbeit könnte jedoch auch an den unterschiedlich verwendeten Methoden zur Bestimmung der Kapillardichte liegen.

Die Genexpressionsanalyse der proinflammatorischen Interleukine und Chemokine zeigte zudem, dass entzündliche Prozesse bei der erhöhten Mortalitätsrate der AC3-I TAC Mäuse in der akuten Phase der Nachlasterhöhung keine Rolle spielen. Die AC3-I TAC Mäuse waren nämlich im Gegensatz zu den WT TAC Tieren 2 d nach der Operation vor der Aktivierung inflammatorischer Signalwege geschützt.

Bei der Bestimmung des fibrotischen Anteils in den Herzen zeigte sich, dass der Fibroseanteil in den AC3-I TAC Tieren an d2 post-OP doppelt so hoch war wie in den WT TAC Mäusen (2.6% vs. 1.3%), obwohl das Ergebnis keine statistische Signifikanz erreichte. Da andere Arbeitsgruppen bereits einen signifikanten Anstieg der Fibrosierung an d7 post-TAC nachgewiesen haben, dieser jedoch nicht CaMKII-abhängig war [9,94] und außerdem die Genexpressionsanalyse des Fibrosemarkers Col1a1 eine signifikant gesteigerte Expression in den AC3-I TAC vs. sham Mäusen 2 d post-OP zeigte, ist davon auszugehen, dass der Anteil der Fibrose bei einem längeren Beobachtungszeitraum weiter zunehmen wird. In der akuten Phase der Nachlasterhöhung scheint die Fibrosierung des Gewebes allerdings noch keine wesentliche Rolle zu spielen.

5.3.2. Spezifische CaMKII δ -Inhibition

Ähnlich wie die AC3-I TAC Mäuse waren auch die CKO TAC Tiere vor einer Hypertrophie geschützt, wie es für diesen Genotyp in der Literatur beschrieben wurde [53,69]. Auch die Bestimmung der Kapillardichte und die Genexpressionsanalyse der Inflammationsmarker ergaben keinen Unterschied zwischen den CKO TAC und sham Mäusen. Die CKO Tiere waren also, ähnlich wie die AC3-I Tiere, in der akuten Phase der Nachlasterhöhung vor einer übermäßigen Aktivierung inflammatorischer Signalwege geschützt. Damit bestätigte sich das

Ergebnis von Suetomi et al., dass die CaMKII δ maßgeblich für die Aktivierung der Inflammation nach TAC verantwortlich war und CKO TAC Mäuse im Vergleich zu den sham Tieren keine erhöhte Expression der Inflammationsmarker aufwiesen [95].

Ähnlich zur Inflammation zeigte sich auch bei der Analyse der Fibrosebildung im Herzen kein Unterschied zwischen den CKO TAC und sham Tieren. Obwohl Toischer et al. 7 Tage post-TAC sowohl in WT als auch in CKO TAC vs. sham Mäusen einen signifikanten Anstieg der Fibrose zeigten [9], konnte dieses Ergebnis 2 d post-TAC noch nicht beobachtet werden. Allerdings untersuchten Toischer et al. speziell perivaskuläre Fibrose, während in dieser Arbeit hauptsächlich der Anteil der interstitiellen Fibrose analysiert wurde, was neben den untersuchten Zeitpunkten einen zusätzlichen Unterschied in der Methodik darstellt. Insgesamt tragen in der akuten Phase der Nachlasterrhöhung weder eine Veränderung in der Kapillardichte noch inflammatorische Prozesse oder eine verstärkte Fibrosierung des Gewebes zu Unterschieden zwischen den CKO TAC und sham Mäusen bei.

5.4. Auswirkungen der CaMKII-Inhibition auf die Proteinexpression

5.4.1. Unspezifische CaMKII-Inhibition

Die Analyse der Proteinexpression ergab, dass WT Mäuse 2 d nach der TAC-Operation eine signifikante Hyperphosphorylierung an den CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstellen des RyR2 und PLB aufwiesen. Das zeigt, dass die CaMKII in dieser akuten Phase der Nachlasterrhöhung die elektromechanische Kopplung respektive die Ca²⁺-Freisetzung und -Wiederaufnahme in das SR reguliert. Im Gegensatz dazu waren die CaMKII-Phosphorylierungsstellen des RyR2 und PLB in den AC3-I TAC Mäusen 2 d post-OP hypophosphoryliert, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde [57,96,97], wobei sich kein Unterschied zwischen den AC3-I TAC und sham Mäusen ergab. Die Hypophosphorylierung der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstellen in den AC3-I Mäusen zeigt zudem, dass das Modell der unspezifischen CaMKII-Inhibition funktioniert. Die Expression des Gesamtproteins von CaMKII, RyR2 und PLB war zwischen den einzelnen Gruppen unverändert, was beweist, dass die Regulation der an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteine in der akuten Phase der Nachlasterrhöhung auf posttranskriptioneller Ebene stattfindet, um möglichst schnell die Herzleistung an den plötzlich auftretenden mechanischen Stress anpassen zu können.

5.4.2. Spezifische CaMKII δ -Inhibition

In den CKO TAC Mäusen war die Phosphorylierung an den CaMKII-spezifischen Stellen des RyR2 und PLB im Vergleich zu den CKO sham Mäusen und auch verglichen mit den AC3-I TAC Mäusen 2 Tage nach der OP gesteigert, jedoch nicht so stark wie in den WT TAC Tieren. Das weist darauf hin, dass in der akuten Phase der Nachlasterhöhung die γ -Isoform der CaMKII anstelle der δ -Isoform aktiviert wird und ausreicht, um akute Stresssituationen zu kompensieren.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass sich unter basalen Bedingungen die CaMKII γ -Expression in den CKO Mäusen nicht von den WT Mäusen unterscheidet [53], sich jedoch 2 bzw. 3 Wochen nach der TAC-Operation sowohl in den WT TAC Mäusen als auch in den CKO TAC Mäusen signifikant erhöht hat [69,98]. Obwohl die Expression der CaMKII γ in den CKO TAC vs. sham Tieren 2 d nach der Operation nicht verändert war, zeigte sich infolge der TAC-OP eine gesteigerte CaMKII-Aktivität, die in den CKO Mäusen auf die CaMKII γ zurückzuführen ist. Denn auch in den WT Tieren war die Expression der CaMKII δ unverändert, die Aktivität der CaMKII, gemessen im Aktivitätsassay und an der pCaMKII-Expression, jedoch signifikant gesteigert, sodass die Anpassungsmechanismen in der akuten Phase der Nachlasterhöhung über die Phosphorylierung der Proteine und nicht deren Expression reguliert wird.

5.5. Auswirkungen der CaMKII-Inhibition auf den Ca²⁺-Haushalt

5.5.1. Unspezifische CaMKII-Inhibition

Die Ergebnisse der *in vivo* Experimente konnten auch *in vitro* auf Einzelzellebene bestätigt werden. So zeigten die AC3-I TAC Zellen im Vergleich zu den AC3-I sham Zellen sowohl einen signifikant verringerten Ca²⁺-Transienten und Kontraktilität als auch eine signifikant langsamere Relaxation, während bei den WT TAC Mäusen sämtliche Parameter im Vergleich zu der sham Kontrollgruppe gesteigert bzw. schneller waren. Die akute Inhibition der CaMKII durch die Inkubation der WT Zellen mit AiP bewies zudem, dass der Effekt der gesteigerten Kontraktilität und des Ca²⁺-Haushalts nach TAC CaMKII-abhängig ist.

Ebenso konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass es durch die TAC-induzierte Nachlasterhöhung zu einer CaMKII-abhängigen Steigerung der Zellkontraktilität in Mäusen

kommt [9,69,74,99]. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits zu einem früheren Zeitpunkt entschlüsselt, dass einerseits die Nachlasterrhöhung 7 Tage nach der Operation zu einem erhöhten L-Typ Ca^{2+} -Strom führt, der wiederum für eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und konsekutiv für eine gesteigerte Kontraktilität sorgt [9]. Andererseits entstanden durch die Nachlasterrhöhung auch vermehrt CaMKII-abhängige, spontane Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR (*Ca²⁺-Sparks*), welche einen proarrhythmischen Effekt zur Folge hatten [9]. Der Gesamteffekt dieser beiden Mechanismen blieb dabei ungeklärt.

Der SR Ca^{2+} -Gehalt war in allen Gruppen unverändert, d.h. die durch die CaMKII gesteigerte SR Ca^{2+} -Freisetzung und die ebenfalls durch die CaMKII beschleunigte Wiederaufnahme in das SR waren im Gleichgewicht, sodass der SR Ca^{2+} -Gehalt in den WT TAC Zellen konstant blieb.

Passend zu der verlangsamten Relaxation in den AC3-I TAC Zellen wurde eine erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration detektiert. Die durch die CaMKII-Inhibition verursachte verzögerte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR steigert die diastolische Ca^{2+} -Konzentration, wodurch die Herzfunktion aufgrund einer diastolischen Dysfunktion zusätzlich verschlechtert wird. Im Gegensatz zu den WT TAC Zellen hatte nur ein sehr geringer Prozentsatz der AC3-I TAC Zellen spontane Ca^{2+} -Freisetzungsevents, sodass ein arrhythmogenes SR Ca^{2+} -Leck nicht als Ursache für die erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration in Frage kommt. Andererseits bestätigt dieses Ergebnis auch den bereits in der Literatur beschriebenen Effekt, dass eine CaMKII-Inhibition die Entstehung von Arrhythmien unterbinden kann [71,100,101]. Interessanterweise hatten die WT TAC Mäuse trotz signifikant mehr SCRs und somit eines erhöhten arrhythmogenen Potentials eine bessere Überlebensrate als die AC3-I TAC Mäuse, die vor Arrhythmien geschützt waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass in der akuten Phase der Nachlasterrhöhung die Stimulation und Aufrechterhaltung der Kontraktilität lebensentscheidend und wichtiger ist als das Verhindern von Arrhythmien.

5.5.2. Spezifische CaMKII δ -Inhibition

In den CKO Mäusen waren der Ca^{2+} -Transient und die Kontraktilität der Zellen 2 d nach der TAC-Operation ebenfalls gesteigert, jedoch nicht so stark wie in den WT TAC Zellen. Die Relaxation und der SR Ca^{2+} -Gehalt waren hingegen zwischen der CKO sham und TAC Gruppe unverändert. Ähnlich wie in den WT TAC Zellen konnten durch die akute Inkubation der Zellen mit AiP, wodurch auch die noch vorhandene γ -Isoform inhibiert wurde, die Ergebnisse der

AC3-I TAC Zellen nachgeahmt werden. Dieser Effekt zeigt deutlich, dass die gesteigerte Kontraktilität und Ca^{2+} -Transienten infolge der akuten Nachlasterhöhung CaMKII-abhängig sind und dass die CaMKII γ die im Herzen stark exprimierte δ -Isoform kompensieren kann. Gleichzeitig wurden die spontanen SR Ca^{2+} -Freisetzungsevents (SCRs) in den CKO TAC Mäusen vs. WT TAC Mäusen verringert, sodass durch die spezifische CaMKII δ -Inhibition zum einen die negativen Effekte der CaMKII-Aktivierung unterbunden [9,69], zum anderen die positiven Seiten der akuten CaMKII-Aktivierung aufgrund der noch vorhandenen γ -Isoform aufrechterhalten werden konnten.

5.6. Auswirkungen der eGFP-Expression

Um eine möglicherweise kardiotoxische Wirkung des in den AC3-I Mäusen exprimierten eGFP auszuschließen [102,103], wurde neben den WT Geschwistertieren die AC3-C Mäuse als weitere Kontrollgruppe untersucht. Die AC3-C Tiere exprimieren wie die AC3-I Mäuse herzspezifisch eGFP, jedoch zusammen mit einer inaktiven Form des CaMKII-Inhibitors AiP. Unterschiede zwischen den AC3-C und WT Mäusen infolge der TAC-Operation sind somit auf das eGFP oder die transgene Proteinexpression im Allgemeinen zurückzuführen. Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit 2 d nach der OP kein wesentlicher Unterschied bezüglich Überleben, Herzfunktion oder Kontraktilität auf Einzelzellebene zwischen den WT TAC und AC3-C TAC Tieren. Nur die AC3-C sham Mäuse wiesen eine geringere EF und CO im Vergleich zu den WT sham Mäusen auf, was mit dem Bericht von Khoo et al. übereinstimmt, dass AC3-C Mäuse basal ein signifikant niedrigeres *Fractional Shortening* aufwiesen als AC3-I Mäuse [58]. Dies wurde aber weniger auf das eGFP zurückgeführt, als vielmehr auf die CaMKII-Aktivität, die in den AC3-I Mäusen, jedoch nicht in den AC3-C Mäusen inhibiert war.

Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den *in vivo* Experimenten *in vitro* Untersuchungen mit eGFP durchgeführt, indem WT Zellen ohne vorheriger Operation für 30 min mit 100 mM eGFP inkubiert wurden und hinsichtlich der Kontraktilität und der Ca^{2+} -Transienten mit WT Zellen ohne eGFP verglichen wurden. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen der Gruppe mit und ohne eGFP, sodass ein akuter toxischer Effekt des eGFP ausgeschlossen werden konnte. Da sich in der akuten Phase der Nachlasterhöhung die AC3-C TAC Tiere wie die WT TAC Tiere verhielten und somit keine konkreten Auswirkungen der transgenen eGFP-Expression

beobachtet werden konnten, wurden die Unterschiede zwischen den AC3-I TAC und WT TAC Tieren auf die CaMKII-Inhibition zurückgeführt.

5.7. Limitationen

In dieser Arbeit wurden AC3-I Mäuse mit einer transgenen Expression des CaMKII-Inhibitors AiP sowie spezifische CaMKII δ -Knockout Mäuse verwendet. Generell wird eine genetische herzspezifische CaMKII-Inhibition wie in diesen beiden Mausmodellen sehr wahrscheinlich drastischere Effekte erzielen als eine oral oder intraperitoneal verabreichte medikamentöse Therapie, was bei der Interpretation der Ergebnisse und der klinischen Übertragbarkeit berücksichtigt werden muss.

Trotz Ausschluss von negativen Effekten auf die Herzfunktion durch die transgene Expression des Kontrollpeptids und eGFP in AC3-C Mäusen im Rahmen dieser Arbeit, kann es durch die transgene Expression des AiP in AC3-I Mäusen zu kompensatorischen Effekten kommen, die beim Knockout-Modell der CKO Mäuse nicht auftreten. Darauf sollte beim Vergleich dieser beiden Mausmodelle, deren Inhibition auf unterschiedlichen genetischen Methoden basiert, geachtet werden. Im Allgemeinen ist die Übertragbarkeit eines Mausmodells auf den Menschen nicht immer gegeben und sollte für zukünftige Studien berücksichtigt werden.

5.8. Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend zeigen meine Daten, dass bei akuter Nachlasterhöhung die CaMKII aktiviert wird, was wiederum eine Hyperphosphorylierung und Aktivierung des RyR2 und PLB zur Folge hat. Das führt einerseits zu einem erhöhten Ca²⁺-Transienten und einer erhöhten Kontraktilität, andererseits aufgrund einer verringerten Inhibition durch PLB zu einer verstärkten SERCA2a-Funktion, sodass insgesamt die Herzfunktion aufrechterhalten und somit das Überleben verbessert wird. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die CaMKII eine wichtige Rolle als „akutes Stressprotein“ bei der physiologischen Adaptation in der akuten Phase der Nachlasterhöhung spielt, indem sie positiv inotrop und lusitrop wirkt.

Trotz dieser adaptiven Rolle der CaMKII zeigen meine Daten auch, dass die CaMKII-Aktivierung bereits in einem sehr frühen Stadium, d.h. 2 Tage nach der TAC-Operation Arrhythmien und

eine Herzhypertrophie initiiert. Ob bei der CaMKII-Aktivierung die positiven oder negativen Effekte überwiegen, ist somit eindeutig zeitabhängig. Während sich bei einer kurzzeitigen Aktivierung, wie in diesem Modell, die CaMKII-Aktivierung positiv auf das Überleben und die Herzfunktion der Mäuse auswirkt, ist eine chronische Aktivierung der CaMKII schädlich und gilt als Trigger für die Entstehung verschiedener kardialer Erkrankungen.

Die CaMKII ist somit ein sehr interessantes Zielprotein für die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung verschiedenster Herzerkrankungen. Meine Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine exzessive CaMKII-Inhibition wie in den AC3-I Mäusen in akuten Stresssituationen durchaus schädlich sein kann. Eine Isoform-spezifische Inhibition wie in den CKO Mäusen hingegen unterbindet die negativen Effekte weitestgehend, die positiven Effekte werden jedoch beibehalten. Dies sollte bei zukünftigen Studien zur Entwicklung und der klinischen Anwendbarkeit eines CaMKII-Inhibitors unbedingt berücksichtigt werden.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
AC3-C	autocamtide-3-related control peptide
AC3-I/AiP	autocamtide-3-related inhibitory peptide
ACE	Angiotensin-converting enzyme
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butanedione monoxime
BNP (Nppb)	Brain Natriuretic Peptide
bpm	beats per minute
BW	body weight
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Proteinkinase II
CCL2	CC-Chemokinligand 2
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CKO	CaMKIIδ-Knockout
cm	Zentimeter
CO	cardiac output/Herzeitvolumen
Col1a1	Kollagen Typ I, alpha 1
CPA	Cyclopiazonic acid
CT	Cycle Threshold
d	day
DAB	Diaminobenzidin
DAD	delayed afterdepolarization
dH ₂ O	destilliertes Wasser
diast.	diastolisch
DMLP	dicroic mirror longpass
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzung	Bedeutung
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAD	early afterdepolarization
EF	ejection fraction
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alii
FAM	6-Carboxyfluorescein
FKBP12.6	FK506 binding protein 12.6
g	Gramm
G	Gauge
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GST	glutathione S-transferase
h	hour
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDAC	histone deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
HW	heart weight
Hz	Hertz
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
ISO	Isoprenalin
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KO	knock out
l	Liter
LPXR	long pass dichroic beam splitter
LTCC	L-type calcium channel
LV	left ventricular

Abkürzung	Bedeutung
LVIDs	left ventricular internal diameter in systole
M	Molar
mA	Milliampere
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MCU	mitochondrial calcium uniporter
Met	Methionin
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV	moloney murine leukemia virus
mRNA	messenger ribonucleic acid
mV	Millivolt
n.s.	nicht signifikant
Na ⁺	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NT	Normaltyrode
OP	Operation
p	phosphoryliert
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species

Abkürzung	Bedeutung
rpm	round per minute
RT	Raumtemperatur
RyR2	Ryanodinrezeptor Typ 2
s	second
SCRs	spontane Ca ²⁺ -Freisetzungsevents
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
Ser/S	Serin
SERCA2a	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	transverse aortic constriction
TBS(-T)	tris-buffered saline (mit Tween 20)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr/T	Threonin
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
W	Watt
w/v	weight per volume
WGA	wheat germ agglutinin
WT	Wildtyp
α-MHC (Myh6)	α-myosin heavy chain (myosin heavy chain 6)
β-MHC (Myh7)	β-myosin heavy chain (myosin heavy chain 7)

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Sarkomers	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung	12
Abbildung 3: Aufbau und Aktivierungswege der CaMKII	16
Abbildung 4: Die Rolle der CaMKII im gesunden Herzen und in der Pathophysiologie.....	18
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops.....	38
Abbildung 6: Fluoreszenzemissionsspektrum von X-Rhod1	39
Abbildung 7: CaMKII-Expression und -Aktivität in WT Mäusen 2 d post-OP	44
Abbildung 8: Überlebenskurve der WT und AC3-I Mäuse 7 d und 35 d post-OP	45
Abbildung 9: Druckgradient in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP	46
Abbildung 10: CaMKII-Aktivität in AC3-I Mäusen 2 d post-OP.....	47
Abbildung 11: HW/BW Ratio und Genexpression von Hypertrophiemarkern in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP	48
Abbildung 12: Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und Kapillardichte in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP	49
Abbildung 13: Echokardiographiedaten in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP.....	51
Abbildung 14: Elektrokardiogramm basal und nach ISO in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP	52
Abbildung 15: Fibrosierung und Genexpression eines Fibrosemarkers in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP	54
Abbildung 16: Genexpression von Inflammationsmarkern in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP	55
Abbildung 17: Phosphorylierung und Expression des RyR2 und PLB in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP	57
Abbildung 18: Proteinexpression in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP	58
Abbildung 19: Epifluoreszenzmessung in WT und AC3-I Zellen 2 d post-OP.....	60
Abbildung 20: Spontane Ca ²⁺ -Freisetzungsevents in WT und AC3-I Zellen 2 d post-OP	61
Abbildung 21: Spontane Ca ²⁺ -Freisetzungsevents und diastolische Ca ²⁺ -Konzentration in WT und AC3-I Mäusen 2 d post-OP	62
Abbildung 22: CaMKII-Aktivität in WT Zellen inkubiert mit AiP 2 d post-OP.....	63
Abbildung 23: Überlebenskurve der AC3-C und WT Mäuse 7 d und 35 d post-OP.....	64
Abbildung 24: Druckgradient und HW/BW Ratio in AC3-C Mäusen 2 d post-OP	65

Abbildung 25: Echokardiographiedaten in AC3-C und WT Mäusen 2 d post-OP	67
Abbildung 26: CaMKII-Expression und -Aktivität in AC3-C Mäusen 2 d post-OP.....	69
Abbildung 27: Phosphorylierung und Expression des RyR2 und PLB in AC3-C Mäusen 2 d post-OP	70
Abbildung 28: Proteinexpression in AC3-C Mäusen 2 d post-OP	71
Abbildung 29: Epifluoreszenzmessung in AC3-C Zellen 2 d post-OP	72
Abbildung 30: Spontane Ca ²⁺ -Freisetzungsevents und diastolische Ca ²⁺ -Konzentration in AC3-C Mäusen 2 d post-OP	73
Abbildung 31: Epifluoreszenzmessung in WT Zellen inkubiert mit eGFP	74
Abbildung 32: CaMKII-Expression und -Aktivität in CKO und WT Mäusen 2 d post-OP	76
Abbildung 33: CaMKII-Aktivität und CaMKII γ -Expression in CKO Mäusen 2 d post-OP	77
Abbildung 34: Überlebenskurve der CKO, WT und AC3-I Mäuse 7 d und 35 d post-OP	78
Abbildung 35: Druckgradient, HW/BW Ratio und Genexpression von Hypertrophiemarkern in CKO Mäusen 2 d post-OP	79
Abbildung 36: Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und Kapillardichte in CKO Mäusen 2 d post-OP	80
Abbildung 37: Echokardiographiedaten in CKO Mäusen 2 d post-OP	82
Abbildung 38: Elektrokardiogramm in CKO Mäusen 2 d post-OP	83
Abbildung 39: Fibrosierung und Genexpression eines Fibrosemarkers in CKO Mäusen 2 d post-OP	84
Abbildung 40: Genexpression von Inflammationsmarkern in CKO Mäusen 2 d post-OP.....	85
Abbildung 41: Phosphorylierung und Expression des RyR2 und PLB in CKO Mäusen 2 d post-OP	86
Abbildung 42: Proteinexpression in CKO Mäusen 2 d post-OP	87
Abbildung 43: Epifluoreszenzmessung in CKO Zellen 2 d post-OP	89
Abbildung 44: Spontane Ca ²⁺ -Freisetzungsevents und diastolische Ca ²⁺ -Konzentration in CKO Mäusen 2 d post-OP	90

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer-Sonden für die qRT-PCR.....	29
Tabelle 2: Zelllysepuffer für den Western Blot	30
Tabelle 3: Ladepuffer für den Western Blot.....	31
Tabelle 4: SDS-Polyacrylamidgele für den Western Blot	32
Tabelle 5: Gelelektrophorese-Laufpuffer für den Western Blot.....	32
Tabelle 6: Transferpuffer für den Western Blot.....	33
Tabelle 7: Ponceau S und Waschpuffer für den Western Blot	33
Tabelle 8: Verwendete primäre Antikörper für den Western Blot.....	34
Tabelle 9: Puffer für den CaMKII-Aktivitätsassay.....	35
Tabelle 10: Verwendete primäre Antikörper für den CaMKII-Aktivitätsassay.....	36
Tabelle 11: Enzymlösung für die Zellisolation.....	37
Tabelle 12: Messtyrode für Mauskardiomyozyten	40
Tabelle 13: Messlösung für die Calcium-Kalibrierung.....	42

6.4. Literaturverzeichnis

- [1] E.J. Benjamin, M.J. Blaha, S.E. Chiuve, M. Cushman, S.R. Das, R. Deo, S.D. De Ferranti, J. Floyd, M. Fornage, C. Gillespie, C.R. Isasi, M.C. Jim'nez, L.C. Jordan, S.E. Judd, D. Lackland, J.H. Lichtman, L. Lisabeth, S. Liu, C.T. Longenecker, R.H. MacKey, K. Matsushita, D. Mozaffarian, M.E. Mussolino, K. Nasir, R.W. Neumar, L. Palaniappan, D.K. Pandey, R.R. Thiagarajan, M.J. Reeves, M. Ritchey, C.J. Rodriguez, G.A. Roth, W.D. Rosamond, C. Sasson, A. Towfghi, C.W. Tsao, M.B. Turner, S.S. Virani, J.H. Voeks, J.Z. Willey, J.T. Wilkins, J.H.Y. Wu, H.M. Alger, S.S. Wong, P. Muntner, Heart Disease and Stroke Statistics'2017 Update: A Report from the American Heart Association (2017). doi:10.1161/CIR.0000000000000485.
- [2] B. Ziaeiian, G.C. Fonarow, Epidemiology and aetiology of heart failure, *Nat. Rev. Cardiol.* 13 (2016) 368–78. doi:10.1038/nrcardio.2016.25.
- [3] B.L. Uta C. Hoppe, Michael Böhm, Helmut Drexler, Gerd Hasenfuß, M.P. Ady Osterspey, Pocket-Leitlinien: Therapie der chronischen und akuten Herzinsuffizienz, Vor. Der Dtsch. Gesellschaft Für Kardiol. – Herz- Und Kreislaufforsch. e.V. (2009).
- [4] A. Briasoulis, E. Androulakis, T. Christophides, D. Tousoulis, The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure, *Heart Fail. Rev.* 21 (2016) 169–176. doi:10.1007/s10741-016-9533-z.
- [5] M. Liu, Y. Li, R. Chen, CaMKII: Do not work too hard in the failing heart, *J. Pathol.* 235 (2015) 669–671. doi:10.1002/path.4507.
- [6] A.G. Rokita, C.-M. Sag, L.S. Maier, Herzinsuffizienz, *Herz.* 36 (2011) 94–101. doi:10.1007/s00059-010-3415-2.
- [7] A. der W.M.F. (AWMF) Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 3. Auflage (2019). doi:10.6101/AZQ/000465.
- [8] P. Ponikowski, A.A. Voors, S.D. Anker, H. Bueno, J.G.F. Cleland, A.J.S. Coats, V. Falk, J.R. González-Juanatey, V.-P. Harjola, E.A. Jankowska, M. Jessup, C. Linde, P. Nihoyannopoulos, J.T. Parisis, B. Pieske, J.P. Riley, G.M.C. Rosano, L.M. Ruilope, F. Ruschitzka, F.H. Rutten, P. van der Meer, Authors/Task Force Members, Document Reviewers, 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution, *Eur. J. Heart Fail.* 18 (2016) 891–975. doi:10.1002/ejhf.592.
- [9] K. Toischer, A.G. Rokita, B. Unsöld, W. Zhu, G. Kararigas, S. Sossalla, S.P. Reuter, A. Becker, N. Teucher, T. Seidler, C. Grebe, L. Preu, S.N. Gupta, K. Schmidt, S.E. Lehnart, M. Krüger, W.A. Linke, J. Backs, V. Regitz-Zagrosek, K. Schäfer, L.J. Field, L.S. Maier, G. Hasenfuss, Differential cardiac remodeling in preload versus afterload, *Circulation.* 122 (2010) 993–1003. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.943431.
- [10] M. Luo, M.E. Anderson, Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure, *Circ. Res.* 113 (2013) 690–708. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301651.
- [11] X.H.T. Wehrens, S.E. Lehnart, A.R. Marks, Intracellular calcium release and cardiac disease, *Annu. Rev. Physiol.* 67 (2005) 69–98. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.114521.

- [12] L.S. Maier, T. Zhang, L. Chen, J. DeSantiago, J.H. Brown, D.M. Bers, Transgenic CaMKII δ c overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: Reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release, *Circ. Res.* 92 (2003) 904–911. doi:10.1161/01.RES.0000069685.20258.F1.
- [13] D.M. Bers, E. Grandi, Calcium/Calmodulin-dependent Kinase II Regulation of Cardiac Ion Channels, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 54 (2009) 180–187. doi:10.1097/FJC.0b013e3181a25078.
- [14] Y. Wu, J. Temple, R. Zhang, I. Dzhura, W. Zhang, R. Trimble, D.M. Roden, R. Passier, E.N. Olson, R.J. Colbran, M.E. Anderson, Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy, *Circulation.* 106 (2002) 1288–93. doi:10.1161/01.cir.0000027583.73268.e7.
- [15] D. Dobrev, N. Voigt, X.H.T. Wehrens, The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: Pathophysiological and therapeutic implications, *Cardiovasc. Res.* 89 (2011) 734–743. doi:10.1093/cvr/cvq324.
- [16] D.M. Bers, *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*, 2nd Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2001).
- [17] H.E. Huxley, The mechanism of muscular contraction, *Science.* 164 (1969) 1356–65. doi:10.1126/science.164.3886.1356.
- [18] J.M. Squire, Muscle contraction: Sliding filament history, sarcomere dynamics and the two Huxleys, *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2016 Jun 30 (2016) e201611. doi:10.21542/gcsp.2016.11.
- [19] K. Mukund, S. Subramaniam, Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 12 (2020) e1462. doi:10.1002/wsbm.1462.
- [20] P. Scicchitano, S. Carbonara, G. Ricci, C. Mandurino, M. Locorotondo, G. Bulzis, M. Gesualdo, A. Zito, R. Carbonara, I. Dentamaro, G. Riccioni, M.M. Ciccone, HCN channels and heart rate, *Molecules.* 17 (2012) 4225–35. doi:10.3390/molecules17044225.
- [21] E.N. Marieb, K. Hoehn, *Human Anatomy & Physiology*, Pearson Benjamin Cummings (2007). <https://books.google.de/books?id=x1uEB68iitwC>. Stand: 25.04.2020
- [22] P.N. Unwin, G. Zampighi, Structure of the junction between communicating cells, *Nature.* 283 (1980) 545–9. doi:10.1038/283545a0.
- [23] E. Barth, G. Stämmeler, B. Speiser, J. Schaper, Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24 (1992) 669–81. doi:10.1016/0022-2828(92)93381-s.
- [24] H.A. Fozzard, S.S. Sheu, The resting potential in heart muscle, *Adv. Myocardiol.* 3 (1982) 125–33. doi:10.1007/978-1-4899-5561-6_14.
- [25] M. Vassalle, Contribution of the Na⁺/K⁺-pump to the membrane potential, *Experientia.* 43 (1987) 1135–40. doi:10.1007/bf01945511.
- [26] J.C. Haselgrove, H.E. Huxley, X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle, *J. Mol. Biol.* 77 (1973) 549–68. doi:10.1016/0022-2836(73)90222-2.

- [27] H.E. Huxley, Muscular contraction and cell motility, *Nature*. 243 (1973) 445–9. doi:10.1038/243445a0.
- [28] D.M. Bers, Cardiac excitation-contraction coupling, *Nature*. 415 (2002) 198–205. doi:10.1038/415198a.
- [29] M.E. Anderson, J.H. Brown, D.M. Bers, CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51 (2011) 468–473. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.01.012.
- [30] T.-S. Lee, R. Karl, S. Moosmang, P. Lenhardt, N. Klugbauer, F. Hofmann, T. Kleppisch, A. Welling, Calmodulin Kinase II Is Involved in Voltage-dependent Facilitation of the L-type CaV1.2 Calcium Channel, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 25560–25567. doi:10.1074/jbc.M508661200.
- [31] D. Dobrev, X.H.T. Wehrens, Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease, *Circ. Res.* 114 (2014) 1311–9; discussion 1319. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300568.
- [32] D.M. Bers, T. Guo, Calcium Signaling in Cardiac Ventricular Myocytes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1047 (2005) 86–98. doi:10.1196/annals.1341.008.
- [33] D. Dobrev, X.H.T. Wehrens, Calmodulin kinase II, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak, and atrial fibrillation, *Trends Cardiovasc. Med.* 20 (2010) 30–4. doi:10.1016/j.tcm.2010.03.004.
- [34] M.G. Chelu, X.H. Wehrens, Sarcoplasmic reticulum calcium leak and cardiac arrhythmias, *Biochem Soc Trans.* 35 (2007) 952–956. doi:10.1042/BST0350952.
- [35] E.A. Sobie, S. Guatimosim, L. Gómez-Viquez, L.-S. Song, H. Hartmann, M. Saleet Jafri, W.J. Lederer, The Ca²⁺ leak paradox and rogue ryanodine receptors: SR Ca²⁺ efflux theory and practice, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 90 (2008) 172–85. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2005.06.010.
- [36] R.J. van Oort, M.D. McCauley, S.S. Dixit, L. Pereira, Y. Yang, J.L. Respress, Q. Wang, A.C. De Almeida, D.G. Skapura, M.E. Anderson, D.M. Bers, X.H.T. Wehrens, Ryanodine Receptor Phosphorylation by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Promotes Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Mice With Heart Failure, *Circulation*. 122 (2010) 2669–2679. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982298.
- [37] W.F. Bluhm, E.G. Kranias, W.H. Dillmann, M. Meyer, Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 (2000) H249-55. doi:10.1152/ajpheart.2000.278.1.H249.
- [38] R. Wakili, Y.-H. Yeh, X. Yan Qi, M. Greiser, D. Chartier, K. Nishida, A. Maguy, L.-R. Villeneuve, P. Boknik, N. Voigt, J. Krysiak, S. Kääb, U. Ravens, W.A. Linke, G.J.M. Stienen, Y. Shi, J.-C. Tardif, U. Schotten, D. Dobrev, S. Nattel, Multiple Potential Molecular Contributors to Atrial Hypocontractility Caused by Atrial Tachycardia Remodeling in Dogs, *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* 3 (2010) 530–541. doi:10.1161/CIRCEP.109.933036.
- [39] B.D. Westenbrink, A.G. Edwards, A.D. McCulloch, J.H. Brown, The promise of CaMKII inhibition for heart disease: preventing heart failure and arrhythmias, *Expert Opin. Ther. Targets*. 17 (2013) 889–903. doi:10.1517/14728222.2013.809064.
- [40] A.G. Rokita, M.E. Anderson, New Therapeutic Targets in Cardiology: Arrhythmias and

- Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II (CaMKII), *Circulation*. 126 (2012) 2125–2139. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.124990.
- [41] J. Beckendorf, M.M.G. van den Hoogenhof, J. Backs, Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart, *Basic Res. Cardiol.* 113 (2018). doi:10.1007/s00395-018-0688-8.
- [42] R.J. Colbran, Inactivation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by basal autophosphorylation, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 7163–70.
- [43] J.R. Erickson, L. Pereira, L. Wang, G. Han, A. Ferguson, K. Dao, R.J. Copeland, F. Despa, G.W. Hart, C.M. Ripplinger, D.M. Bers, Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation, *Nature*. 502 (2013) 372–6. doi:10.1038/nature12537.
- [44] J.R. Erickson, C.B. Nichols, H. Uchinoumi, M.L. Stein, J. Bossuyt, D.M. Bers, S-Nitrosylation Induces Both Autonomous Activation and Inhibition of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II δ , *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 25646–56. doi:10.1074/jbc.M115.650234.
- [45] S. Wagner, A.G. Rokita, M.E. Anderson, L.S. Maier, Redox regulation of sodium and calcium handling, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 1063–77. doi:10.1089/ars.2012.4818.
- [46] E. Grandi, A.G. Edwards, A.W. Herren, D.M. Bers, CaMKII comes of age in cardiac health and disease, *Front. Pharmacol.* 5 (2014). doi:10.3389/fphar.2014.00154.
- [47] D.M. Bers, Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II regulation of cardiac excitation-transcription coupling, *Hear. Rhythm.* 8 (2011) 1101–1104. doi:10.1016/j.hrthm.2011.01.030.
- [48] L.F. Couchonnal, M.E. Anderson, The Role of Calmodulin Kinase II in Myocardial Physiology and Disease, *Physiology*. 23 (2008) 151–159. doi:10.1152/physiol.00043.2007.
- [49] X.H.T. Wehrens, S.E. Lehnart, S.R. Reiken, A.R. Marks, Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor, *Circ. Res.* 94 (2004). doi:10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2.
- [50] J.L. Respress, R.J. van Oort, N. Li, N. Rolim, S.S. Dixit, A. DeAlmeida, N. Voigt, W.S. Lawrence, D.G. Skapura, K. Skårdal, U. Wisløff, T. Wieland, X. Ai, S.M. Pogwizd, D. Dobrev, X.H.T. Wehrens, Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression, *Circ. Res.* 110 (2012) 1474–83. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.268094.
- [51] B. Hoch, R. Meyer, R. Hetzer, E.G. Krause, P. Karczewski, Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium, *Circ. Res.* 84 (1999) 713–21.
- [52] D.D. Duan, Calm down when the heart is stressed: Inhibiting calmodulin-dependent protein kinase II for antiarrhythmias, *Trends Cardiovasc. Med.* 25 (2015) 398–400. doi:10.1016/j.tcm.2015.01.016.
- [53] J. Backs, T. Backs, S. Neef, M.M. Kreusser, L.H. Lehmann, D.M. Patrick, C.E. Grueter, X. Qi, J.A. Richardson, J.A. Hill, H.A. Katus, R. Bassel-Duby, L.S. Maier, E.N. Olson, The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 2342–7.

- doi:10.1073/pnas.0813013106.
- [54] A. Mattiazzi, R.A. Bassani, A.L. Escobar, J. Palomeque, C.A. Valverde, M. Vila Petroff, D.M. Bers, Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 308 (2015) H1177–H1191. doi:10.1152/ajpheart.00007.2015.
- [55] J.N. Weiss, M. Nivala, A. Garfinkel, Z. Qu, Alternans and Arrhythmias, *Circ. Res.* 108 (2011) 98–112. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223586.
- [56] J. Backs, E.N. Olson, Control of Cardiac Growth by Histone Acetylation/Deacetylation, *Circ. Res.* 98 (2006) 15–24. doi:10.1161/01.RES.0000197782.21444.8f.
- [57] R. Zhang, M.S.C. Khoo, Y. Wu, Y. Yang, C.E. Grueter, G. Ni, E.E. Price, W. Thiel, S. Guatimosim, L.-S. Song, E.C. Madu, A.N. Shah, T.A. Vishnivetskaya, J.B. Atkinson, V. V Gurevich, G. Salama, W.J. Lederer, R.J. Colbran, M.E. Anderson, Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease, *Nat. Med.* 11 (2005) 409–417. doi:10.1038/nm1215.
- [58] M.S.C. Khoo, C.E. Grueter, M. Eren, J. Yang, R. Zhang, M.A. Bass, S.T. Lwin, L.A. Mendes, D.E. Vaughan, R.J. Colbran, M.E. Anderson, Calmodulin kinase II inhibition disrupts cardiomyopathic effects of enhanced green fluorescent protein, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44 (2008) 405–10. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.10.014.
- [59] L. Sciences, C. Isbn, T. Pdf, N.A. Press, N.A. Press, N. Academy, N. Academy, N.A. Press, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (1996). doi:10.17226/11385.
- [60] M. Gutberlet, ed., *Bildgebende Diagnostik angeborener Herzfehler*, in: Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2017) pp. 65–66. doi:10.1055/b-003-125839.
- [61] C. Mewis, R. Riessen, I. Spyridopoulos, eds., 4.1 Echokardiographische Methoden, in: *Kardiol. Compact*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2006) pp. 50–51. doi:10.1055/b-0034-24170.
- [62] J. Backs, K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang, E.N. Olson, CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1853–1864. doi:10.1172/JCI27438.
- [63] IonOptix, *Myocyte Calcium & Contractility Recording System (HyperSwitch Configuration)* (2011). <http://www.ionoptix.com/product/myocyte-calcium-and-contractility-recording-system/>. Stand: 25.04.2020
- [64] Invitrogen, *Indicators for Ca, Mg, Zn and Other Metal Ions*, in: *Mol. Probes Handb. - a Guid. to Fluoresc. Probes Labeling Technol.*, 11th ed. (2010) p. 845.
- [65] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties., *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–50.
- [66] M.J. Baier, S. Klatt, K.P. Hammer, L.S. Maier, A.G. Rokita, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is essential in hyperacute pressure overload, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 138 (2020) 212–221. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.12.002.
- [67] Y. Wu, Z. Gao, B. Chen, O.M. Koval, M. V Singh, X. Guan, T.J. Hund, W. Kutschke, S. Sarma, I.M. Grumbach, X.H.T. Wehrens, P.J. Mohler, L.-S. Song, M.E. Anderson, Calmodulin kinase II is required for fight or flight sinoatrial node physiology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 5972–7. doi:10.1073/pnas.0806422106.

- [68] S. Sossalla, N. Fluschnik, H. Schotola, K.R. Ort, S. Neef, T. Schulte, K. Wittköpper, A. Renner, J.D. Schmitto, J. Gummert, A. El-Armouche, G. Hasenfuss, L.S. Maier, Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium, *Circ. Res.* 107 (2010) 1150–61. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.220418.
- [69] H. Ling, T. Zhang, L. Pereira, C.K. Means, H. Cheng, Y. Gu, N.D. Dalton, K.L. Peterson, J. Chen, D. Bers, J.H. Brown, J. Heller Brown, Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1230–40. doi:10.1172/JCI38022.
- [70] M. Vila-Petroff, M.A. Salas, M. Said, C.A. Valverde, L. Sapia, E. Portiansky, R.J. Hajjar, E.G. Kranias, C. Mundiña-Weilenmann, A. Mattiazzi, CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.* 73 (2007) 689–98. doi:10.1016/j.cardiores.2006.12.003.
- [71] A. Purohit, A.G. Rokita, X. Guan, B. Chen, O.M. Koval, N. Voigt, S. Neef, T. Sowa, Z. Gao, E.D. Luczak, H. Stefansdottir, A.C. Behunin, N. Li, R.N. El-Accaoui, B. Yang, P.D. Swaminathan, R.M. Weiss, X.H.T. Wehrens, L.S. Song, D. Dobrev, L.S. Maier, M.E. Anderson, Oxidized Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Triggers Atrial Fibrillation, *Circulation.* 128 (2013) 1748–1757. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003313.
- [72] S. Sedej, F.R. Heinzel, S. Walther, N. Dybkova, P. Wakula, J. Groborz, P. Gronau, L.S. Maier, M.A. Vos, F.A. Lai, C. Napolitano, S.G. Priori, J. Kockskämper, B. Pieske, Na⁺-dependent SR Ca²⁺ overload induces arrhythmogenic events in mouse cardiomyocytes with a human CPVT mutation, *Cardiovasc. Res.* 87 (2010) 50–9. doi:10.1093/cvr/cvq007.
- [73] P.D. Swaminathan, A. Purohit, S. Soni, N. Voigt, M. V Singh, A. V Glukhov, Z. Gao, B.J. He, E.D. Luczak, M.A. Joiner, W. Kutschke, J. Yang, J.K. Donahue, R.M. Weiss, I.M. Grumbach, M. Ogawa, P.-S. Chen, I. Efimov, D. Dobrev, P.J. Mohler, T.J. Hund, M.E. Anderson, Oxidized CaMKII causes cardiac sinus node dysfunction in mice, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 3277–88. doi:10.1172/JCI57833.
- [74] N. Dybkova, S. Sedej, C. Napolitano, S. Neef, A.G. Rokita, M. Hünlich, J.H. Brown, J. Kockskämper, S.G. Priori, B. Pieske, L.S. Maier, Overexpression of CaMKII δ c in RyR2R4496C^{+/-} knock-in mice leads to altered intracellular Ca²⁺ handling and increased mortality, *J. Am. Coll. Cardiol.* 57 (2011) 469–79. doi:10.1016/j.jacc.2010.08.639.
- [75] M. Luo, X. Guan, E.D. Luczak, D. Lang, W. Kutschke, Z. Gao, J. Yang, P. Glynn, S. Sossalla, P.D. Swaminathan, R.M. Weiss, B. Yang, A.G. Rokita, L.S. Maier, I.R. Efimov, T.J. Hund, M.E. Anderson, Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 1262–1274. doi:10.1172/JCI65268.
- [76] A. Hudmon, H. Schulman, J. Kim, J.M. Maltez, R.W. Tsien, G.S. Pitt, CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 537–47. doi:10.1083/jcb.200505155.
- [77] O.M. Koval, X. Guan, Y. Wu, M.-L. Joiner, Z. Gao, B. Chen, I.M. Grumbach, E.D. Luczak, R.J. Colbran, L.-S. Song, T.J. Hund, P.J. Mohler, M.E. Anderson, CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 4996–5000. doi:10.1073/pnas.0913760107.
- [78] A. Mattiazzi, C. Mundiña-Weilenmann, L. Vittone, M. Said, E.G. Kranias, The importance of the Thr17 residue of phospholamban as a phosphorylation site under physiological and pathological conditions, *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Medicas e Biol.* 39 (2006) 563–72. doi:10.1590/s0100-879x2006000500001.
- [79] O.J. Kemi, O. Ellingsen, M. Ceci, S. Grimaldi, G.L. Smith, G. Condorelli, U. Wisløff, Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43 (2007) 354–61. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.06.013.
- [80] J.I. Burgos, A.M. Yeves, J.P. Barrena, E.L. Portiansky, M.G. Vila-Petroff, I.L. Ennis, Nitric oxide and CaMKII: Critical steps in the cardiac contractile response To IGF-1 and swim training, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 112 (2017) 16–26. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.08.014.
- [81] A.O. Melleby, A. Romaine, J.M. Aronsen, I. Veras, L. Zhang, I. Sjaastad, I.G. Lunde, G. Christensen, A novel method for high precision aortic constriction that allows for generation of specific cardiac phenotypes in mice, *Cardiovasc. Res.* 114 (2018) 1680–1690. doi:10.1093/cvr/cvy141.
- [82] C.J. Weinheimer, A. Kovacs, S. Evans, S.J. Matkovich, P.M. Barger, D.L. Mann, Load-Dependent Changes in Left Ventricular Structure and Function in a Pathophysiologically Relevant Murine Model of Reversible Heart Failure, *Circ. Heart Fail.* 11 (2018) e004351. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004351.
- [83] A. Nakamura, D.G. Rokosh, M. Paccanaro, R.R. Yee, P.C. Simpson, W. Grossman, E. Foster, LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice, *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* 281 (2001) H1104–12.
- [84] J. Mustroph, O. Wagemann, C.M. Lucht, M. Trum, K.P. Hammer, C.M. Sag, S. Lebek, D. Tarnowski, J. Reinders, F. Perbellini, C. Terracciano, C. Schmid, S. Schopka, M. Hilker, Y. Zausig, S. Pabel, S.T. Sossalla, F. Schweda, L.S. Maier, S. Wagner, Empagliflozin reduces Ca/calmodulin-dependent kinase II activity in isolated ventricular cardiomyocytes, *ESC Hear. Fail.* 5 (2018) 642–648. doi:10.1002/ehf2.12336.
- [85] B.A. Mohamed, M. Elkenani, J. Jakubiczka-Smorag, E. Buchholz, S. Koszewa, D. Lbik, M. Schnelle, G. Hasenfuss, K. Toischer, Genetic deletion of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta does not mitigate adverse myocardial remodeling in volume-overloaded hearts, *Sci. Rep.* 9 (2019) 9889. doi:10.1038/s41598-019-46332-3.
- [86] N.J. Byrne, J. Levasseur, M.M. Sung, G. Masson, J. Boisvenue, M.E. Young, J.R.B. Dyck, Normalization of cardiac substrate utilization and left ventricular hypertrophy precede functional recovery in heart failure regression, *Cardiovasc. Res.* 110 (2016) 249–257. doi:10.1093/cvr/cvw051.
- [87] K.M. O’Shea, D.J. Chess, R.J. Khairallah, S. Rastogi, P.A. Hecker, H.N. Sabbah, K. Walsh, W.C. Stanley, Effects of adiponectin deficiency on structural and metabolic remodeling in mice subjected to pressure overload, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298 (2010) H1639–45. doi:10.1152/ajpheart.00957.2009.
- [88] J. Wu, L. Bu, H. Gong, G. Jiang, L. Li, H. Ma, N. Zhou, L. Lin, Z. Chen, Y. Ye, Y. Niu, A. Sun, J. Ge, Y. Zou, Effects of heart rate and anesthetic timing on high-resolution echocardiographic assessment under isoflurane anesthesia in mice, *J. Ultrasound Med.*

- 29 (2010) 1771–8. doi:10.7863/jum.2010.29.12.1771.
- [89] H. Takanari, V.J.A. Bourgonje, M.S.C. Fontes, A.J.A. Raaijmakers, H. Driessen, J.A. Jansen, R. Van Der Nagel, B. Kok, L. Van Stuijvenberg, M. Boulaksil, Y. Takemoto, M. Yamazaki, Y. Tsuji, H. Honjo, K. Kamiya, I. Kodama, M.E. Anderson, M.A.G. Van Der Heyden, H.V.M. Van Rijen, T.A.B. Van Veen, M.A. Vos, Calmodulin/CaMKII inhibition improves intercellular communication and impulse propagation in the heart and is antiarrhythmic under conditions when fibrosis is absent, *Cardiovasc. Res.* 111 (2016) 410–421. doi:10.1093/cvr/cvw173.
- [90] Y. Wu, M.E. Anderson, CaMKII in sinoatrial node physiology and dysfunction, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 48. doi:10.3389/fphar.2014.00048.
- [91] Z. Gao, M. V Singh, D.D. Hall, O.M. Koval, E.D. Luczak, M.A. Joiner, B. Chen, Y. Wu, A.K. Chaudhary, J.B. Martins, T.J. Hund, P.J. Mohler, L.-S. Song, M.E. Anderson, Catecholamine-independent heart rate increases require Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 4 (2011) 379–87. doi:10.1161/CIRCEP.110.961771.
- [92] M. Grimm, H. Ling, A. Willeford, L. Pereira, C.B.B. Gray, J.R. Erickson, S. Sarma, J.L. Respress, X.H.T. Wehrens, D.M. Bers, J.H. Brown, CaMKII δ mediates β -adrenergic effects on RyR2 phosphorylation and SR Ca(2+) leak and the pathophysiological response to chronic β -adrenergic stimulation, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 85 (2015) 282–91. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.06.007.
- [93] Y. Imai, T. Kariya, M. Iwakiri, Y. Yamada, E. Takimoto, Sildenafil ameliorates right ventricular early molecular derangement during left ventricular pressure overload, *PLoS One.* 13 (2018) e0195528. doi:10.1371/journal.pone.0195528.
- [94] C.A. Souders, T.K. Borg, I. Banerjee, T.A. Baudino, Pressure overload induces early morphological changes in the heart, *Am. J. Pathol.* 181 (2012) 1226–1235. doi:10.1016/j.ajpath.2012.06.015.
- [95] T. Suetomi, A. Willeford, C.S. Brand, Y. Cho, R.S. Ross, S. Miyamoto, J.H. Brown, Inflammation and NLRP3 Inflammasome Activation Initiated in Response to Pressure Overload by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II δ Signaling in Cardiomyocytes Are Essential for Adverse Cardiac Remodeling, *Circulation.* 138 (2018) 2530–2544. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034621.
- [96] M. Grimm, A. El-Armouche, R. Zhang, M.E. Anderson, T. Eschenhagen, Reduced contractile response to α 1-adrenergic stimulation in atria from mice with chronic cardiac calmodulin kinase II inhibition, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42 (2007) 643–652. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.12.010.
- [97] A.A. Werdich, E.A. Lima, I. Dzhura, M. V Singh, J. Li, M.E. Anderson, F.J. Baudenbacher, Differential effects of phospholamban and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II on [Ca²⁺]_i transients in cardiac myocytes at physiological stimulation frequencies, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 294 (2008) H2352–H2362. doi:10.1152/ajpheart.01398.2006.
- [98] M.M. Kreusser, L.H. Lehmann, S. Keranov, M.-O. Hoting, U. Oehl, M. Kohlhaas, J.-C. Reil, K. Neumann, M.D. Schneider, J.A. Hill, D. Dobrev, C. Maack, L.S. Maier, H.-J. Gröne, H.A. Katus, E.N. Olson, J. Backs, Cardiac CaM Kinase II genes δ and γ contribute to adverse remodeling but redundantly inhibit calcineurin-induced myocardial hypertrophy, *Circulation.* 130 (2014) 1262–73. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.006185.

- [99] T. Zhang, L.S. Maier, N.D. Dalton, S. Miyamoto, J. Ross, D.M. Bers, J.H. Brown, The δ isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure, *Circ. Res.* 92 (2003) 912–919. doi:10.1161/01.RES.0000069686.31472.C5.
- [100] C.M. Sag, D.P. Wadsack, S. Khabbazzadeh, M. Abesser, C. Grefe, K. Neumann, M.K. Opiela, J. Backs, E.N. Olson, J.H. Brown, S. Neef, S.K.G. Maier, L.S. Maier, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure, *Circ. Hear. Fail.* 2 (2009) 664–675. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.865279.
- [101] S. Neef, A. Steffens, P. Pellicena, J. Muströph, S. Lebek, K.R. Ort, H. Schulman, L.S. Maier, Improvement of cardiomyocyte function by a novel pyrimidine-based CaMKII-inhibitor, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 115 (2018) 73–81. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.12.015.
- [102] O. Agbulut, A. Huet, N. Niederländer, M. Puceat, P. Menasché, C. Coirault, Green fluorescent protein impairs actin-myosin interactions by binding to the actin-binding site of myosin, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 10465–71. doi:10.1074/jbc.M610418200.
- [103] B. Badrian, M.A. Bogoyevitch, Changes in the transcriptional profile of cardiac myocytes following green fluorescent protein expression, *DNA Cell Biol.* 26 (2007) 727–36. doi:10.1089/dna.2007.0604.

6.5. Publikationen

Diese Arbeit wurde auf nationalen und internationalen Kongressen der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) und der American Heart Association (AHA) im Rahmen von Postervorträgen und freien Vorträgen präsentiert und diskutiert.

Die Ergebnisse der AC3-I und WT Mäuse (Abbildungen gekennzeichnet) sowie die entsprechenden Passagen der Diskussion sind bereits in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

M.J. Baier*, S. Klatt*, K.P. Hammer, L.S. Maier, A.G. Rokita, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is essential in hyperacute pressure overload, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 138 (2020) 212–221. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.12.002.

* geteilte Erstautorenschaft

Die Verwendung der eigenen bereits in dem *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* publizierten Daten und Abbildungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

6.6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

den Mentoren meiner Promotionsarbeit, Prof. Dr. Hayo Castrop, Prof. Dr. Lars S. Maier und Prof. Dr. Ali El-Armouche, dass sie dieses Amt übernommen haben sowie für die hilfreichen Ratschläge und konstruktive Kritik, die meine Arbeit vorangebracht und verbessert haben. Zusätzlich möchte ich Prof. Dr. Lars S. Maier dafür danken, dass ich diese Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II durchführen und meine Arbeit bei nationalen und internationalen Kongressen vorstellen durfte.

Dr. Adam Rokita für die Bereitstellung dieses interessanten Dissertationsthemas sowie die gute Zusammenarbeit, die vielen Ratschläge und Diskussionen, durch die ich thematisch und persönlich sehr viel dazugelernt habe.

Dr. Susanne Klatt für die tolle Zusammenarbeit im Labor und dass sie mir jederzeit bei Fragen und sonstigen Anliegen geholfen hat.

allen Kollegen im Labor, besonders Dr. Karin Hammer, Teresa Stauber, Thomas Sowa, Felicia Radtke und Gabriela Pietrzyk, die mir mit vielen guten Ratschlägen geholfen und den Laboralltag lustiger und schöner gemacht haben.

und vor allem meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und mir geholfen haben.