

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Einfluss von CASK auf die CaMKII- abhängige Regulation des L-Typ Kalziumkanals im Herzen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anna-Lena Lentzen (geb. Schmidtman)

Aus Waldbröl

2021

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Einfluss von CASK auf die CaMKII- abhängige Regulation des L-Typ Kalziumkanals im Herzen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anna-Lena Lentzen (geb. Schmidtman)

Aus Waldbröl

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jonathan Jantsch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2022

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 17.01.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
Einheitenverzeichnis	10
1 Einleitung	11
1.1 Die Herzinsuffizienz und dilatative Kardiomyopathie	11
1.2 Die Herzmuskelzelle	16
1.2.1 Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle	16
1.2.2 Die elektromechanische Kopplung	18
1.3 Der L-Typ Kalziumkanal	21
1.4 Die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)	28
1.4.1 Die Struktur der CaMKII	28
1.4.2 Die Aktivierung der CaMKII	29
1.4.3 Die Inaktivierung und Hemmung der CaMKII	30
1.4.4 Die Funktion der CaMKII	30
1.5 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Serin-Proteinkinase (CASK)	31
1.6 Kardiale Arrhythmien	35
1.7 Zielsetzung und Fragestellung	38
2 Material und Methoden	41
2.1 Verwendete Zelllinien	41
2.2 Knock-out Mäuse	41
2.3 Isolation ventrikulärer Mäusekardiomyozyten	42
2.4 Patch-Clamp-Technik	45
2.4.1 Versuchsaufbau der Patch-Clamp Anlage	47
2.4.2 Lösungen für die Patch-Clamp-Messungen	49
2.4.3 Pipetten und Elektroden	51
2.4.4 Versuchsdurchführung	52
2.4.5 Protokolle	53

2.5	Datenerfassung und Statistik	54
2.5.1	Datenauswertung zum Aktivierungsverhalten des LTCCs	55
2.5.2	Datenauswertung zur Inaktivierungskinetik des LTCCs Tau (τ)	57
2.6	Pharmakologische Intervention	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Die Auswertung biometrischer Daten	59
3.1.1	Herz- und Körpergewichtsverhältnis von Wildtyp (WT), der Knock-out Maus (CASK KO) und der Kontrollgruppen CASK CTRL und CASK flox	59
3.1.2	Größe der gemessenen Zellen bestimmt über die Membrankapazität	60
3.2	Die Effekte des CASK KO auf den LTCC	61
3.2.1	Veränderung des I_{Ca} bei CASK KO-, CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter basalen Messbedingungen	61
3.2.2	Öffnungsverhalten des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter basalen Messbedingungen	63
3.2.3	Leitfähigkeit des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter basalen Messbedingungen	65
3.3	Die Bedeutung von CASK bei der β-adrenerge Regulation des LTCCs	66
3.3.1	Veränderung des I_{Ca} bei CASK KO-, CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter basalen Messbedingungen unter Isoprenalin und Kalzium (100nM)	66
3.3.2	Öffnungsverhalten des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Isoprenalin	68
3.3.3	Leitfähigkeit des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Isoprenalin	71

3.4	Die Bedeutung von CASK für die kalziumabhängige Regulation des LTCCs	72
3.4.1	Veränderung des I_{Ca} bei CASK KO-, CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Kalzium (500nM)	72
3.4.2	Öffnungsverhalten des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Kalzium (500nM)	74
3.4.3	Leitfähigkeit des LTCCs in CASK KO-, CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Isoprenalin und in Gegenwart von Kalzium (100 nM)	77
4	Diskussion	79
4.1	Die verwendeten Modelle	80
4.2	Der I_{Ca} unter basalen Messbedingungen	81
4.3	Die Veränderung von I_{Ca} nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin	81
4.4	Der Effekt einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration auf I_{Ca}	86
4.5	Die Veränderung des Inaktivierungsverhaltens des LTCCs	86
4.6	Der Knock-out von CASK wirkt proarrhythmogen	88
5	Zusammenfassung	92
	Literaturverzeichnis	95
	Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Seite 13
Abbildung 2	Seite 15
Abbildung 3	Seite 18
Abbildung 4	Seite 20
Abbildung 5	Seite 21
Abbildung 6	Seite 22
Abbildung 7	Seite 23
Abbildung 8	Seite 26
Abbildung 9	Seite 29
Abbildung 10	Seite 31
Abbildung 11	Seite 32
Abbildung 12	Seite 33
Abbildung 13	Seite 34
Abbildung 14	Seite 38
Abbildung 15	Seite 42
Abbildung 16	Seite 44
Abbildung 17	Seite 47
Abbildung 18	Seite 48
Abbildung 19	Seite 52
Abbildung 20	Seite 54
Abbildung 21	Seite 62
Abbildung 22	Seite 63
Abbildung 23	Seite 64
Abbildung 24	Seite 64
Abbildung 25	Seite 65
Abbildung 26	Seite 66
Abbildung 27	Seite 67
Abbildung 28	Seite 68
Abbildung 29	Seite 69
Abbildung 30	Seite 70
Abbildung 31	Seite 71
Abbildung 32	Seite 72

Abbildung 33	Seite 73
Abbildung 34	Seite 74
Abbildung 35	Seite 75
Abbildung 36	Seite 76
Abbildung 37	Seite 77
Abbildung 38	Seite 78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Seite 45
Tabelle 2	Seite 51
Tabelle 3	Seite 60
Tabelle 4	Seite 61

Abkürzungsverzeichnis

A-Bande	anisotrope Bande
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	<i>American Heart Association</i>
AIP	<i>Autocamtide-2-related-inhibitory-protein</i>
AP	Aktionspotenzial
APD	Aktionspotenzialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	Synthetische Aminopolycarbonsäure als Kalzium-Komplexbildner
BW	<i>body weight</i>
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase(n)
CaMKII	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKII δ c	Splicevariante c der δ -Isoform der Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASK	Calcium/Calmodulin-dependent serine protein Kinase
Cmg	Camguk (= CASK in der Drosophila)
Cre	<i>causes recombination</i>
CTRL	Control (Kontrollgruppe)
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
DAD	<i>Delayed afterdepolarization (späte Nachdepolarisationen)</i>
DCRD	distale carboxyterminale regulatorische Domäne
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
EAD	<i>early afterdepolarization</i>
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FFR	fraktionelle Flussreserve
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Het	heterozygot
Homo	homozygot
HVA	<i>high-voltage activated</i>

HW	<i>heart weight</i>
HZV	Herzzeitvolumen
H ₂ O	Wasser
I _{ca}	sarkolemmaler Kalziumeinstrom
I-Bande	isotrope Bande
IQ	Isoleucin-Glutamin
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	Knock-out
LoxP	<i>locus of crossing over</i>
L-Tubuli	Longitudinal-Tubuli
LTCC	<i>long lasting type calcium channel</i>
LV	linker Ventrikel
LVA	<i>low-voltage activated</i>
MAD	mittlerer arterieller Druck
MAGUK	<i>membrane-associated guanylate kinase</i>
Met	Methionin
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NO	Stickstoff
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
OP	Operation
P _i	anorganisches Phosphat
PCRD	proximale carboxyterminale regulatorische Domäne
PDZ	<i>PSD95/SAP90 Discs large Zonula occludens-1</i>
PKA	Proteinkinase A
PP1	Phosphatase 1

P-Region	Poren-Region
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RyR	Ryanodin-Rezeptor
Ser	Serin
SERCA	<i>sarcoendoplasmatic reticulum calcium ATPase</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSA	<i>steady state activation</i>
SSI	<i>steady state inactivation</i>
Thr	Threonin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TierSchG	Tierschutzgesetz
T-Tubuli	Transversal-Tubuli
T-Typ	transienter Typ
WT	Wildtyp

Einheitenverzeichnis

g	Gramm
kHZ	Kiloherz
l	Liter
mA	Milliampere
min	Minuten
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
nmol	Nanomol
Ω	Ohm
pA	Picoampere
°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Die Herzinsuffizienz und dilatative Kardiomyopathie

Die Herzinsuffizienz beschreibt ein Syndrom, bei dem das Herz das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen nicht fördern (Herold, 2016) und somit den Körper nicht mit ausreichend Blut und Sauerstoff versorgen kann. Es gibt zwei Einteilungen für die Herzinsuffizienz. Nach der New York Heart Association (NYHA) unterteilt man die Patienten in vier klinische Stadien. Stadium I gilt für Patienten mit Herzinsuffizienz, aber ohne Symptome und Einschränkungen im täglichen Leben. NYHA II ist definiert für Patienten mit Herzinsuffizienz und leichter Einschränkung bei schwerer Belastung, aber Beschwerdefreiheit bei leichter Belastung und in Ruhe. NYHA III ist definiert für Patienten mit starker Einschränkung bei leichter Belastung, aber bei Beschwerdefreiheit in Ruhe. NYHA IV ist definiert für Patienten mit dauerhaften Beschwerden auch in Ruhe (New York Heart Association, 1994). Weiterhin wird die Herzinsuffizienz von der American Heart Association (AHA) in vier Stadien von A bis D eingeteilt. Stadium A ist definiert als ein hohes Risiko für eine Herzinsuffizienz, aber es liegen weder Symptome, noch eine strukturelle Herzerkrankung vor. Stadium B ist definiert als Vorliegen einer strukturellen Herzerkrankung, die mit einer Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht werden kann, wobei noch keine mit der Herzinsuffizienz assoziierten Symptome aufgetreten sind. Stadium C ist definiert durch momentan bestehende oder früher mal bestandene Symptome einer Herzinsuffizienz bei einer aktuell bestehenden strukturellen Herzerkrankung. Stadium D ist definiert durch schwere Herzinsuffizienzsymptomatik, welche behandlungsbedürftig ist, und durch das Vorliegen einer schweren strukturellen Herzerkrankung. Weitere Kardinalsymptome der Herzinsuffizienz sind, neben der oben genannten Atemnot, auch periphere Ödeme, Nykturie, Leistungsminderung im Alltag, Tachykardie, Kardiomegalie und Müdigkeit neben weiteren Symptomen wie gestaute Jugularvenen, Hepatomegalie, Pleuraergüsse und einem dritten Herzton. Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Krankheiten weltweit und einer der häufigsten Gründe für die Hospitalisierung von älteren Menschen (Jensen et al., 2016). Die Prävalenz in Europa wird auf ungefähr 10 Millionen geschätzt (Hoppe et al., 2005), wobei die Herzinsuffizienz eher eine Erkrankung des höheren Alters ist. Im Alter von 45 bis 55 Jahren leiden weniger als 1% an der Erkrankung. Im Alter von 65 bis 75 Jahren leiden ca. 2 –

5% an der Krankheit und bei den über 80-jährigen fast 10% (Hoppe et al., 2005). In Anbetracht des demografischen Wandels in Deutschland und Europa wird die Prävalenz der Herzinsuffizienz in den nächsten Jahrzehnten stetig zunehmen. Man geht davon aus, dass die Prävalenz für Herzinsuffizienz bis 2030 um 25% steigt (Jensen et al., 2016). Nicht nur das ist Besorgnis erregend, sondern auch die Tatsache, dass trotz des Einsatzes vieler hochwertiger Medikamente in den letzten Jahrzehnten, die Mortalität durch Herzinsuffizienz immer noch hoch ist (Braunwald und Bristow, 2000). Die Prognose der Herzinsuffizienz ist relativ schlecht. Die 5-Jahres Mortalität liegt bei ca. 50% (Roger VL et al., 2004). Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes sind im Jahr 2014 44.551 Menschen an der Herzinsuffizienz gestorben (Gesundheitsberichterstattung, 2014). Damit ist die Herzinsuffizienz im Jahr 2014 für Frauen die dritthäufigste und für Männer die vierthäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2015). Ursächlich für die Herzinsuffizienz ist zum größten Teil die linksventrikuläre Funktionsstörung (Inamdar und Inamdar, 2016), bedingt durch die koronare Herzkrankheit, Kardiomyopathie oder Myokarditis (Herold, 2016). Die Herzinsuffizienz kann durch die oben genannten Begleiterkrankungen selbst ausgelöst werden, aber auch selbst der auslösende Faktor für weitere Erkrankungen sein. Begleiterkrankungen sind deshalb, neben dem Alter, wichtige Parameter für die Prognose der Herzinsuffizienz (McMurray und Pfeffer, 2005). Das Auftreten von Begleiterkrankungen spiegelt sich wider im Circulus vitiosus, welcher zeigt, dass auch zahlreiche andere Organsysteme wie zum Beispiel Blutgefäße, Lunge, Muskulatur, Leber und Nieren beteiligt sind (Abb. 1).

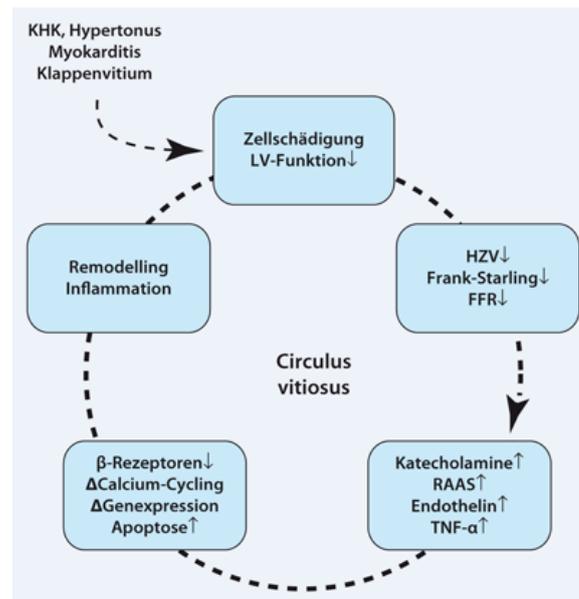


Abbildung 1

Der Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz entsteht, wenn die Pumpleistung der Herzen nicht mehr ausreicht, um die extrakardialen Organstromgebiete ausreichend mit Blut und Sauerstoff zu versorgen. Um das erforderliche Herzzeitvolumen aufrechtzuerhalten, werden Adaptionsmechanismen gestartet, welche jedoch zu Zellschäden und damit zur Progression der Herzinsuffizienz führen (Fischer et al. 2011).

Das mit der Zeit in seiner Kontraktilität immer mehr eingeschränkte Myokard erfährt einen strukturellen, funktionellen und molekularen Umbau. Dies führt zur Veränderung von systemischen Prozessen und vor allem zu Elektrolytverschiebungen, welche final zur mechanischen und elektrischen Fehlfunktion des Herzens führen (Armoundas et al., 2001; Grodin, 2016). Neben der kontraktiven Dysfunktion kommt es bei der Herzinsuffizienz auch zur Entstehung von Herzrhythmusstörungen, die molekularen Grundlagen i.e. die Störung der Elektromechanischen Kopplung, sind ähnlich (siehe unten). Diese Herzrhythmusstörungen sind Grundlage des plötzlichen Herztodes und damit häufige Todesursachen bei der Herzinsuffizienz. Die Mortalität der Erkrankung ist im Vergleich zur Normalbevölkerung um das 6- bis 9-fache erhöht (Thom et al., 2006). Heilbar ist die Herzinsuffizienz bis heute nur durch Herztransplantation. Deshalb ist es wichtig, weiter nach neuen und besseren Therapieansätzen für die Behandlung der Krankheit zu suchen.

Im Rahmen der Herzinsuffizienzentwicklung zeigen sich strukturelle Veränderungen im Myokard häufig zunächst als Entwicklung einer kardialen Hypertrophie. Hypertrophie bedeutet eine Zunahme der Muskelmasse, deren Genese in der

chronischen Druck- oder Volumenerhöhung des Ventrikels liegt. Sie ist ein Anpassungsmechanismus des Herzens, um die erhöhte Belastung zu kompensieren und die Hämodynamik aufrecht zu erhalten. Man unterscheidet zwischen einer konzentrischen und exzentrischen Hypertrophie. Bei der konzentrischen Hypertrophie, welche durch eine erhöhte Druckbelastung entsteht, kommt es zu einer Zunahme der Dicke der Ventrikelwand und zu einer konsensuellen Verkleinerung der Kammer. Diese Wandverdickung entsteht durch die Ausbildung neuer Myofibrillen, welche sich im Rahmen der systolischen Druckbelastung und der damit einhergehenden Wandbelastung bilden. Die exzentrische Hypertrophie entsteht bei einer erhöhten Volumenbelastung. Dies hat zur Folge, dass der diastolische Druck in der Kammer und damit auch die diastolische Wandspannung steigt. Es kommt zur Ausbildung von neuen Sarkomeren und zu einer Zunahme der Kammergröße. Beide Hypertrophieformen können final zu einer Herzinsuffizienz führen.

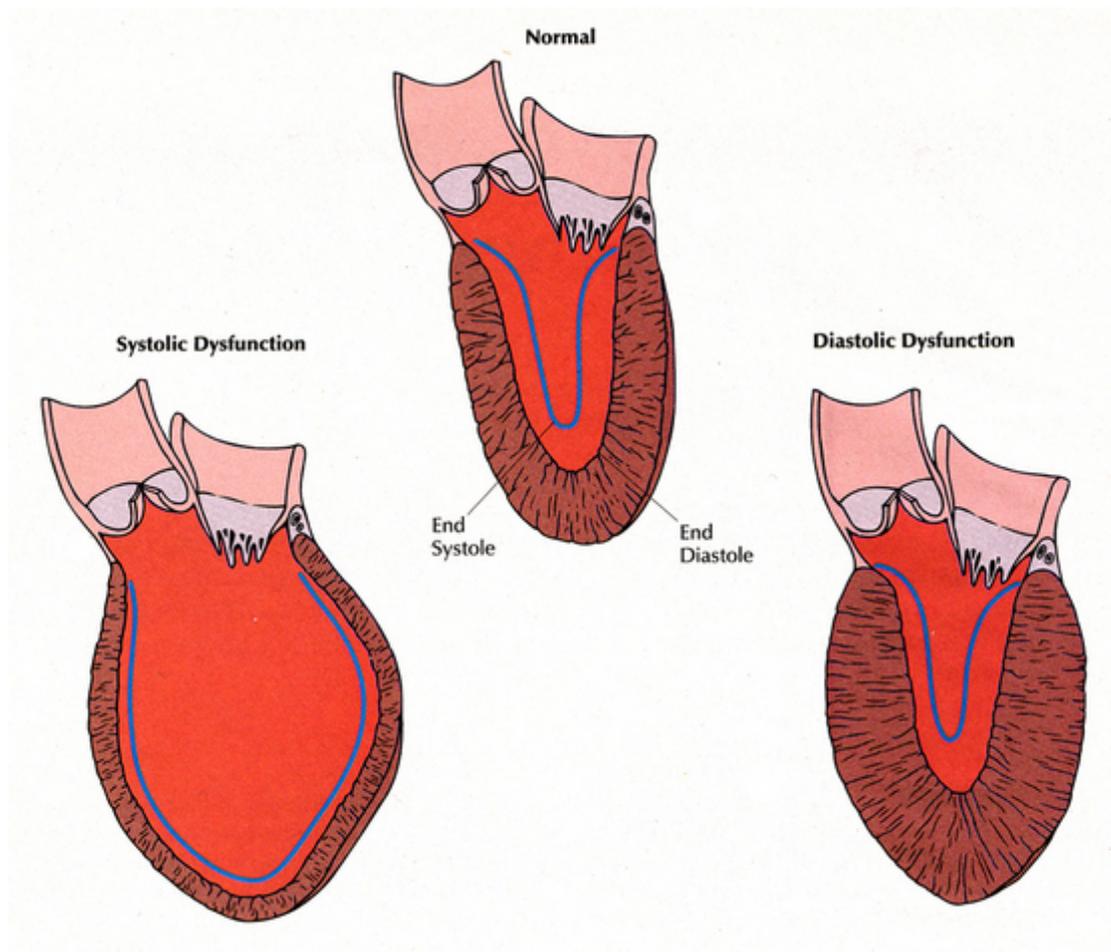


Abbildung 2

Systolische Dysfunktion: Es kommt zur reduzierten Kontraktilität (inotroper Defekt) aufgrund der Überdehnung. Es besteht weiterhin eine gute Füllung, aber eine schlechte Leerung → exzentrische Hypertrophie. Diastolische Dysfunktion: Es kommt zur reduzierten Dehnbarkeit (lusitroper Defekt), wegen der konzentrischen Hypertrophie. Der Ventrikel hat eine schlechte Füllung, aber eine gute Leerung. (<http://teleteach.patho.unibas.ch/teachinggroup/object/10809>)

Im Rahmen der elektromechanischen Koppelung haben die Homöostase von Kalzium und das Öffnungsverhalten des L-Typ Kalziumkanals (LTCC) einen signifikanten Anteil an der elektrischen Stabilität des Herzens und somit auch an dessen mechanischen Funktion und Schlagkraft. Im folgenden Abschnitt soll deshalb auf die Vernetzung zwischen Kalzium, dem LTCC und der Herzinsuffizienz eingegangen werden. Dabei sollen auch die Zusammenhänge zwischen der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) und der Calcium/Calmodulin-abhängigen Serin-Proteinkinase (CASK) erklärt werden, sowie die generellen Vorgänge in der Herzmuskelzelle, welche diese Zusammenhänge mit beeinflussen.

1.2 Die Herzmuskelzelle

Der Herzmuskel, das Myokard, besteht aus quergestreiften, zu einander parallel verlaufenden Muskelzellen. Sie besitzen einen einzelnen Zellkern, welcher meist zentral lokalisiert ist. Die Gesamtheit der Zellen bildet ein funktionelles Synzytium, da sie untereinander durch *disci intercalares* (sog. Glanzstreifen) miteinander verbunden sind (Stenger und Spiro, 1961). Des Weiteren sind die Kardiomyozyten durch *gap junctions*, welche im Bereich der Glanzstreifen liegen, miteinander verbunden. Dadurch sind Ionenströme von einer Zelle zur anderen möglich und somit eine schnelle elektrische Erregungsausbreitung (Maeda und Tsukihara, 2011). Der Herzmuskel bildet so eine zusammenhängende Einheit, die eine synchrone Kontraktion ermöglicht.

1.2.1 Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle

Die Herzmuskelzellen sind von einer sarkolemmalen Membran, dem Sarkolemm, umgeben. Das Sarkolemm ist eine Biomembran, die aus einer Phospholipid-Doppelschicht besteht. In diese Lipiddoppelschicht sind verschiedene Proteine eingelagert, welche für die elektro-mechanische Kopplung und für die Zellkommunikation zuständig sind. Die Lipiddoppelschicht trennt den Intra- vom Extrazellulärraum und ist für lipophile Substanzen direkt passierbar, aber für hydrophile nur via Kanäle oder Transporter. Das Sarkolemm bildet transversale Einstülpungen zum Zellinneren aus (T-Tubuli), welche in der Nähe des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) lokalisiert sind. Die Einheit aus T-Tubuli, SR und Zytosol wird Diade genannt (Scriven et al., 2000). Der Zwischenraum im Zytosol ist der diadische Spalt. Das SR ist eine Unterform des glatten endoplasmatischen Retikulums in den Muskelzellen und ist spezialisiert, Kalzium zu speichern und freizusetzen. Es besitzt somit eine entscheidende Rolle bei der Herzmuskelkontraktion. Oft wird das SR aufgrund seiner länglichen Form auch als Longitudinal (L)-Tubuli bezeichnet. Sie laufen am Ende in sogenannte Terminalzisternen aus und enden gegenüber den T-Tubuli. Die L- und T-Tubuli stehen im engen räumlichen Kontakt und bilden eine funktionelle Einheit. Die meisten LTCCs finden sich in den T-Tubuli. Dort stehen ca. 25 LTCCs ungefähr 100 Ryanodin-Rezeptoren des SR gegenüber (Maier und Bers, 2007). Der Ryanodin-Rezeptor (RyR)

ist ein Kalziumkanal, durch welchen Kalzium in das Zytosol austreten kann. Die Einheit zwischen LTCC und RyR nennt man „couplon“ (Maier und Bers, 2007). An den Terminalzisternen des SR sind hauptsächlich die RyR vom Typ 2 zu finden (Paolini et al., 2004). Ein weiteres Protein, das sich in der Membran des SR befindet, ist die SERCA (sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase), welche die Kalziumionen vom Zytosol zurück in das SR pumpt und somit die Relaxation der Herzmuskelzelle ermöglicht. Die SERCA wird reguliert durch Phospholamban (PLN), welches im unphosphorylierten Zustand die SERCA inhibiert. Wird PLN durch die CaMKII phosphoryliert, dissoziiert PLN von der SERCA und die Hemmung ist aufgehoben (Brittsan und Kranias, 2000).

Weitere Organelle, welche sich im Zytoplasma befinden, sind u.a. der Golgi-Apparat, die Mitochondrien, Lysosomen, Lipofuszin-Granula, Peroxisomen. Außerdem befindet sich im Zytosol das Zytoskelett, welches für die Kontraktion der Zelle, für den Transport von Stoffen in der Zelle und die Zellstabilität verantwortlich ist. Die kleinste kontraktile Einheit der Zelle ist das Sarkomer, welches aus den kontraktile Proteinen Aktin und Myosin besteht, sowie diversen Verankerungs- und Regulatorproteinen wie unter anderem auch Troponin und Tropomyosin. Die dünnen Aktin- und die dicken Myosinfilamente sind sich regelmäßig abwechselnd und ineinander verzahnt angeordnet. Der Bereich, der nur Myosinfilamente umfasst, wird A-Bande, der Bereich, der nur die Aktinfilamente umfasst, I-Bande genannt. Die Nomenklatur leitet sich aus dem Lichtbrechungsverhalten der Filamente ab. Dabei steht A für anisotrop, was bedeutet, dass das polarisierte Licht stark doppelt gebrochen wird. I steht für isotrop, was bedeutet, dass die Filamente wenig doppelbrechend sind. Die Myosinfilamente sind über Titinfilament und die Aktinfilamente direkt mit der Z-Scheibe verbunden. Die Z-Scheibe unterteilt die einzelnen Sarkomere in ihre morphologische Einheit und liegt in der Mitte der I-Bande. Die M-Linie ist in der Mitte des Sarkomers in der H-Zone, welche in der Mitte der A-Bande ist. Dort sind nur die Myosinfilamente vorhanden und verankert. Die M-Linie unterteilt das Sarkomer in der Mitte somit in zwei funktionelle Einheiten. Die charakteristische Querstreifung der Herzmuskelzellen entsteht durch die Z-Scheiben aller Myofibrillen, weil sie sich dort auf einer Höhe befinden und alle Sarkomere etwa gleich lang sind. Bei der Kontraktion gleiten die verzahnten Myosin- und Aktinfilamente aneinander vorbei und verkürzen somit das Sarkomer, wobei ihre Länge selbst unverändert bleibt. Dies entspricht der heute anerkannten Gleitfilamenttheorie (Huxley, 1969; Huxley, 2004). Das Verankerungsprotein Titin,

welches die Myosinfilamente an der Z-Bande fixiert, fungiert dabei als eine elastische Feder, welche das Auseinanderfallen des Sarkomers bei der Dehnung verhindert.

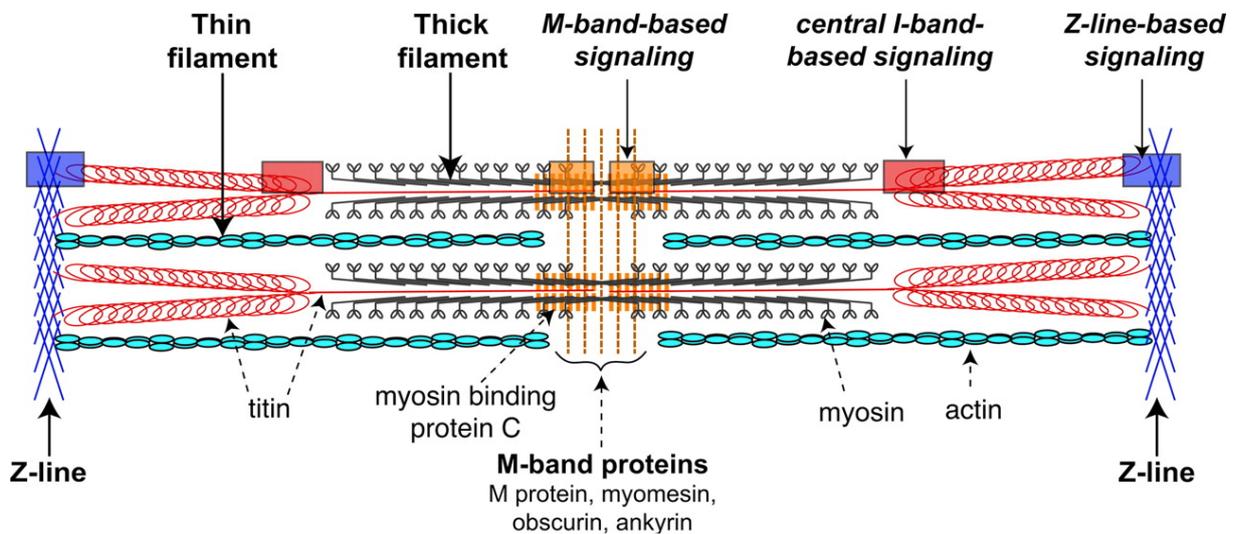


Abbildung 3

Aufbau eines Sarkomers: Die dünnen Filamente, die Aktinfilamente, sind mit der Z-Linie über das Verankerungsprotein Aktin verbunden. Sie bestehen aus Tropomyosin, Troponin und Nebulin und verzahnen sich mit den zwischen ihnen liegenden dicken Filamenten, den Myosinfilamenten. Sie werden zu Bündeln zusammengefasst und durch das C-Protein stabilisiert. Die Verbindung zur Z-Linie gelingt über das Verankerungsprotein Titin (Katz und Zile, 2006).

1.2.2 Die elektromechanische Kopplung

Unter elektromechanischer Kopplung (engl.: excitation-contraction coupling) versteht man die Prozesse, welche zwischen der Depolarisation der Membran und der Kontraktion des Sarkomers geschehen. Es kommt dabei zu einer Umwandlung von elektrischer in mechanische Energie. Eine Schlüsselrolle hält dabei Kalzium. Durch die Entstehung eines Aktionspotenzials kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen Natriumkanälen in der Zellmembran und zum Einstrom von Natrium in die Zelle. Dies hat eine Depolarisation des Sarkolemms auf ca. +30 mV zur Folge. Durch die Depolarisation kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen LTCCs, auch als Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) bezeichnet, und zum Einstrom von extrazellulärem Kalzium in den diadischen Spalt (Langer und Peskoff, 1996). Dadurch entsteht die Plateauphase des Aktionspotenzials. Während der Plateauphase des Aktionspotenzials, die ca. 200-300 ms dauert, schließen sich die Natriumkanäle, aber die Kalziumkanäle bleiben offen, und das Membranpotenzial bleibt stabil bei ca. 0 mV.

Auch über den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) gelangt ein geringer Anteil von Kalzium in die Zelle. Durch den Kalziumeinstrom kommt es zu einer Kalzium getriggerten Kalzium Freisetzung aus dem SR (calcium induced calcium release) (Bers, 2002). Dazu öffnet sich der RyR2 Rezeptor am SR und entlässt Kalzium ins Zytosol, welches die Menge an Kalzium, das durch den LTCC einströmt, um einiges übersteigt (Lanner et al., 2010). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) erhöht sich dabei von ungefähr 100 nmol/l auf 700 nmol/l. Das Kalzium bindet via Calmodulin an die Ca^{2+} -Bindungsstelle des Troponin C, welches eine Untereinheit des Troponinkomplexes am Aktinfilament ist. Dadurch widerfährt diesem eine Konformationsänderung und die Kontaktstelle zwischen Aktin und Myosin wird freigegeben (Huxley, 1973). Ein an das Myosinköpfchen gebundenes ATP wird in ADP und anorganisches Phosphat (P_i) hydrolysiert, sodass nun der Myosinkopf an das Aktin binden kann. Es kommt zu einer Abkipfung des Myosinköpfchens von 90° auf 45° im Verhältnis zum Aktinfilament. Das Aktinfilament wird dabei in Bewegung gebracht und gleitet ca. 10 nm weiter zwischen die beiden benachbarten Myosinfilamente. So kommt es zur Verkürzung des Sarkomers. Dabei wird das ADP vom Myosinkopf abgegeben. Dieser Vorgang der Querbrückenbildung wiederholt sich so oft, bis das intrazelluläre Kalzium erschöpft ist und die Myosin- und Aktinfilamente maximal überlappt sind. Dadurch kommt es letztendlich zur Verkürzung der gesamten Myofibrille und zur Kontraktion des gesamten Muskels. Durch erneute Anlagerung von ATP und der Spaltung in ADP und P_i kommt es zur Lösung des Myosinköpfchens vom Aktinstrang und zum Zurückgleiten in die Ausgangsposition. Das freigewordene Kalzium wird nun zu einem geringen Teil mittels des NCX aus dem Zellinneren abtransportiert. Der Großteil des Kalziums wird allerdings durch die SERCA wieder in das SR aufgenommen und dort für die nächste Kontraktion gespeichert. Das freie Kalzium bindet unter anderem auch an das Calmodulin, welches dadurch aktiviert wird. Calmodulin wiederum bindet als Ca^{2+}/CaM nun an das Carboxyende des LTCCs und induziert somit seine Schließung. Es besteht ein sogenannter „negativer feed-back“ Mechanismus (Peterson et al., 1999). Weitere Mechanismen sind die sarkolemmale Kalzium-Pumpe und der einwärts gerichtete mitochondriale Kalziumkanal (Bers, 2002). Wichtig ist dabei, dass die Menge des die Zelle verlassenden Kalziums der des vorher in die Zelle eingeströmten entspricht. Dies ist wichtig, weil Veränderungen in der Kalziumhomöostase zu Störungen in der elektrischen Signalkaskade führen können, was sich schließlich durch Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz

äußert (Bers, 2002).

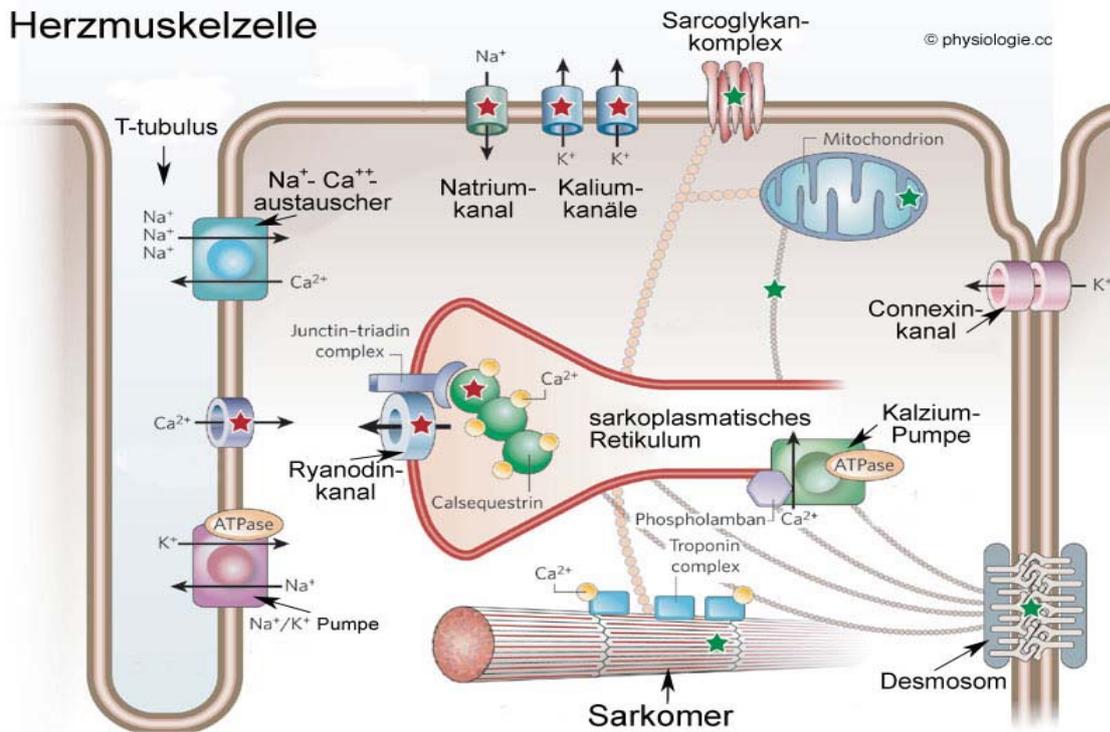


Abbildung 4

Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung im Kardiomyozyten (Knollmann und Roden, 2008). Die Einziehungen im Sarkolemm sind die T-Tubuli, in denen unter anderem die L-Typ Kalziumkanäle liegen. Der LTCC, der RyR und das Zytosol bilden eine funktionelle Einheit, welche für die Kalzium-abhängige Kalziumfreisetzung zuständig ist. Die Elimination des Kalziums erfolgt zum einen über die Aufnahme in das SR über eine Kalzium Pumpe, zum anderen über die Aufnahme in die Mitochondrien. In den extrazellulären Raum wird Kalzium mittels Nutzung des Natriumgradienten über den NCX gepumpt, im geringeren Umfang auch über primär aktive Pumpen. Die Aufrechterhaltung des Natriumgradienten erfolgt über die Na⁺/K⁺-ATPase.

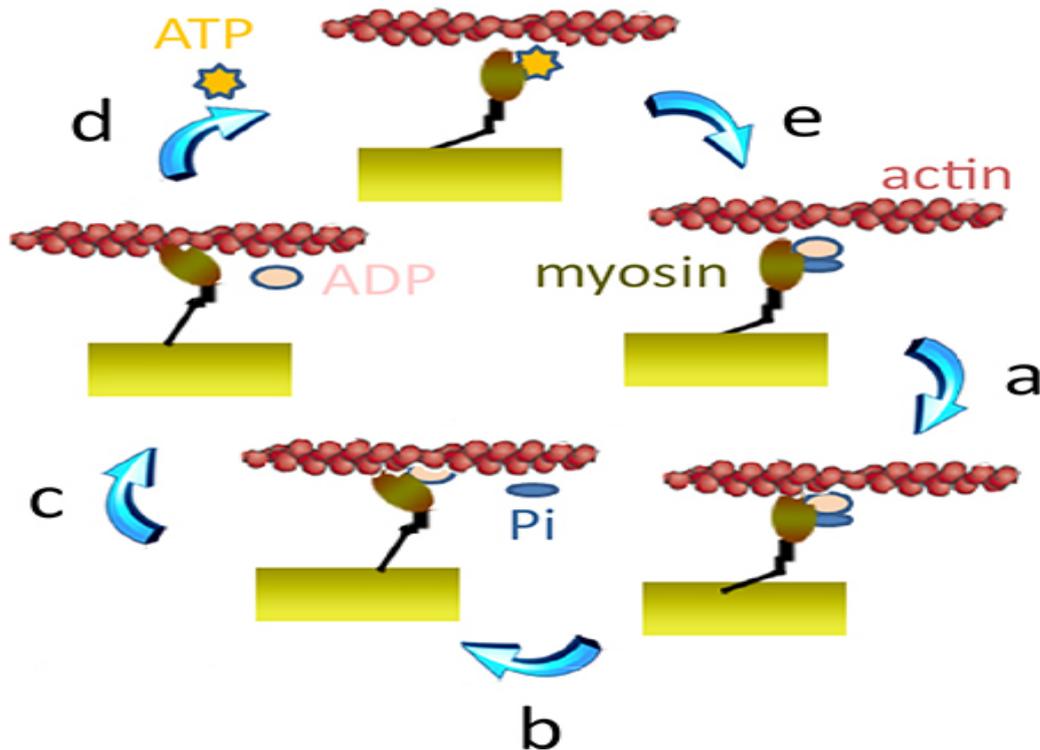


Abbildung 5

Die Muskelkontraktion: Schritt a: Bindung von Myosin an Aktin. Dieser Schritt beginnt mit der "schwachen Bindung" von Aktin (in Magenta) an den Myosinkopf (in Braun). Eine stereospezifische Interaktion zwischen Aktin und Myosin führt zu einer starken Bindung von Aktin an Myosin. Schritt b: Power-Stroke: Ruderschlag – Gleiten der Filamente. Es wird angenommen, dass der Verlust von anorganischem Phosphat (Pi) den Beginn des Ruderschlags und eine Umkehrung der vorherigen Konformationsbiegung auslöst. Schritt c: ADP-Freigabeschritt. Öffnen der Nukleotidbindetasche und die Freisetzung von ADP. Schritt d: ATP-Bindung. ATP kann an Myosin binden, welches von Aktin dissoziiert. Schritt e: ATP-Hydrolyse. ATP wird zu ADP und Pi hydrolysiert (Guellich et al. 2014).

1.3 Der L-Typ Kalziumkanal (LTCC)

Der LTCC gehört zu den Kanälen, die durch starke Depolarisation und positive Membranpotentiale aktiviert werden (high voltage activated, HVA) (Shaw und Colecraft, 2013). Des Weiteren gibt es noch HVA Kanäle vom P/Q-Typ, N-Typ und R-Typ, welche in Neuronen, endokrinen Zellen und im Herzen vorkommen. Sie lassen sich nicht durch Kalziumantagonisten hemmen (Nowycky et al., 1985). Davon abzugrenzen sind die „low-voltage activated“ (LVA) Kanäle, welche durch negative Spannungen aktiviert werden, d.h. schon in der Nähe des Ruhemembranpotenzials geöffnet sind. Dazu gehören die T-Typ Kalziumkanäle, die schnell inaktivieren, langsam deaktivieren und ebenfalls nicht sensitiv gegenüber Kalziumkanalblockern sind (Carbone und Lux, 1984). T-Typ steht für das transiente Kinetikverhalten der Kanäle.

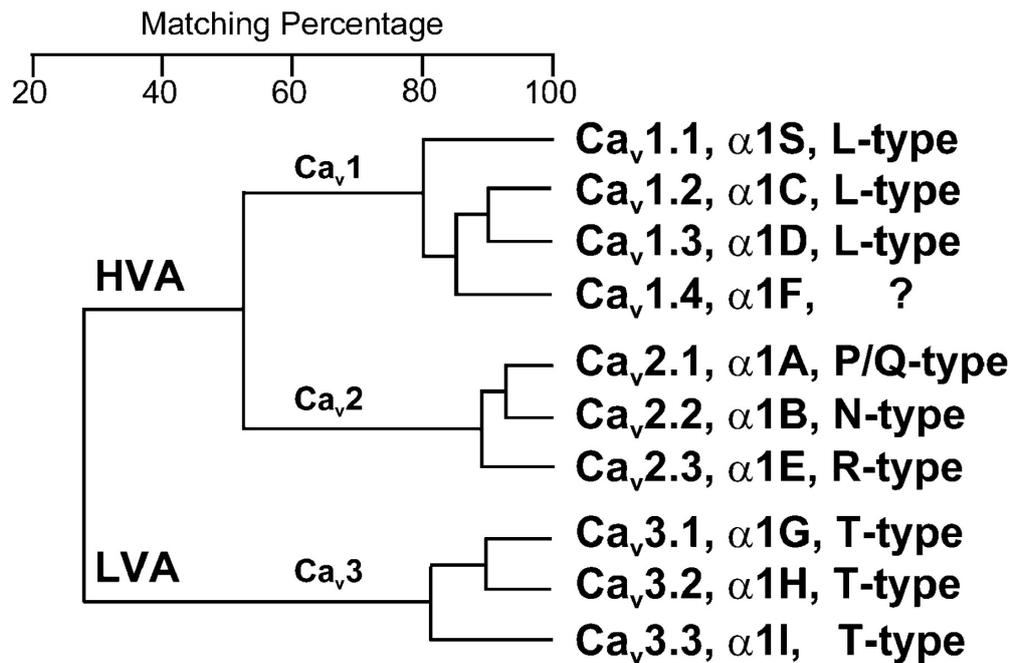


Abbildung 6

Systematik spannungsabhängiger Kalziumkanäle. Eingeteilt werden die Subtypen durch ihre porenbildende Untereinheit α_1 . HVA= High-voltage activated, LVA= low-voltage activated (Perez-Reyes, 2003).

Es gibt sieben unterschiedliche HVA-Kanäle (s.o.), von denen unter normalen Bedingungen nur der Typ Ca_v1.2 α_1C von menschlichen Kardiomyozyten des Ventrikels exprimiert wird (Shaw und Colecraft, 2013). Gehemmt werden können die Ca_v1 Kanäle durch die klassischen Kalziumantagonisten vom 1,4-Dihydropyridin- (auch Nifedipin-), Verapamil- und Diltiazem-Typ. Sie binden an die α_1 -Untereinheit des Kanals. Die Nomenklatur L-Typ bezieht sich auf die lange Öffnungszeit des Kanals, wenn dieser Barium als Leitungsträger hat (Nowycky et al., 1985; Perez-Reyes, 2003). L-Typ steht dabei für „long lasting“ (lange Öffnungszeit).

Die Untereinheit α_1 , welche für die Porenbildung zuständig ist, besteht aus vier Domänen (I-IV). Außerdem sind die α_2 , die intrazelluläre β -Untereinheit und die transmembranösen δ und γ - Untereinheiten vorhanden. Sie fungieren als Hilfsuntereinheiten und sind für die Kinetik und Amplitude des Kalziumstroms zuständig (Kobayashi et al., 2007).

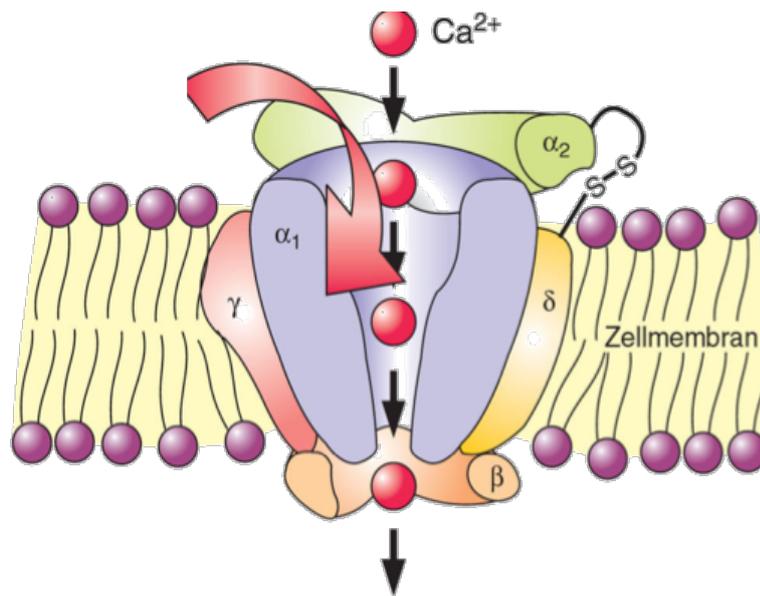


Abbildung 7

Der L-Typ- Kalziumkanal ist ein heterooligomeres Komplex aus vier oder fünf Untereinheiten. Die porenbildende Untereinheit α_1 ist auch die größte Untereinheit mit ca. 240kDa. Hinzu kommen die α_2 , die β und die δ -Untereinheit. Die γ -Untereinheit findet sich nicht im LTCC, wohl aber in den Kanälen der Skelettmuskulatur (verändert nach: Aktories, Klaus et al., 2009).

Jede Domäne selbst besteht aus sechs transmembranösen α -Helices (S1-S6). Der Amino (+H₃N)- und der Carboxy (COOH)-Terminus ragen dabei beide ins Zytosol. Die Helices S5 und S6 von jeder der vier Domänen haben jeweils eine P-Region, welche die Pore des Kanals und den Selektivitätsfilter bilden (Shaw und Colecraft, 2013). S1 bis S4 sind die Spannungssensoren des Kanals. Wichtig für die Autoregulation des LTCCs ist zum einen das EF-Hand-Motiv, welches ungefähr in einer Länge von 100 Aminosäuren proximal zum Carboxyterminus lokalisiert ist. Man geht davon aus, dass das EF-Motiv einen Kalziumsensor enthält, der durch negative Rückkoppelung den Kanal deaktiviert (Peterson et al., 1999). Das EF-Motiv wird flankiert von den beiden Aminosäuren Serin (Ser) 1512 und Ser1570. Studien, in denen diese Aminosäuren mutiert waren, haben gezeigt, dass es zu einer verminderten Fazilitierung und zu einer verstärkten Hemmung kommt. Deshalb geht man davon aus, dass das EF-Hand-Motiv und dessen Phosphorylierung wichtig für die Fazilitierung des Kanals sind (Lee et al., 2006). Fazilitierung ist ein positiver Feedback-Mechanismus, bei dem es zu einer längeren Öffnungszeit und einer höheren Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals kommt. Dies führt zu einem vermehrten sarkolemalem Kalziumeinstrom (I_{Ca}) (Kleppisch et al., 1994). Eine weitere wichtige Aminosäuresequenz, die einerseits die Hemmung (calcium-dependent inactivation (CDI)), andererseits auch die Aktivierung (calcium-dependent facilitation (CDF)) des LTCC moduliert, ist die IQ-Domäne. IQ

steht dabei für das Isoleucin-Glutamin-Motiv. Durch die Bindung von Kalzium an Calmodulin verändert dies seine Form, sodass es als $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ an das IQ-Motiv binden kann (Peterson et al., 1999). Studien mit mutierten Aminosäuresequenzen haben auch hier die Wichtigkeit der Interaktion gezeigt. Bei den mutierten Sequenzen war keine Interaktion zwischen $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und dem Kanal möglich (Zühlke et al., 2000). Die CDF wird durch die Aktivierung von CaMKII durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ möglich, wodurch sich das Öffnungsverhalten des Kanals verändert. Mehr dazu unter Punkt 1.4.4.

Der transmembranöse Kalziumgradient ($[\text{Ca}^{2+}_e] \sim 1,2 \text{ mM}$ vs. $[\text{Ca}^{2+}_i] \sim 100 \text{ nM}$) generiert die Antriebskraft für I_{Ca} in die Zelle bei Depolarisation. Die Aktivierung des LTCCs während des Aktionspotentials erlaubt den Einstrom von Kalzium aus dem Sarkolemm in die Zelle (I_{Ca}). Die Aktivierung von I_{Ca} des LTCCs ist schnell (2-3 ms) und der maximale Einwärtsstrom wird nach ca. 4-5 ms erreicht (bei einem Membranpotential 0 bis +10 mV) (Bers 2001). Die Inaktivierung des LTCC ist langsamer und wird durch Inaktivierungszeitkonstanten $\tau_{\text{schnell/fast}}$ ($T_{\text{schnell/fast}}$) und $\tau_{\text{langsam/slow}}$ ($T_{\text{langsam/slow}}$) angegeben. Diese liegen (bei einem Membranpotential 0 bis +10 mV) bei ungefähr 4 bis 10 ms (T_{schnell}) und 40 bis 60 ms (T_{langsam}) (Bers 2001). Es wird im Allgemeinen angenommen, dass der anfänglich schnelle Abfall die kalziumabhängige Inaktivierung (calcium dependent inactivation - CDI) darstellt und die langsamere Phase, die spannungsabhängige Inaktivierung (voltage dependent inactivation – VDI) reflektiert (Grandi et al. 2010).

Die CDI des LTCC hängt zum einen von dem I_{Ca} über den LTCC und zum anderen von dem Kalzium, das aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird, ab. Dieses Kalzium bindet an das CaM und verursacht somit die CDI. CaM assoziiert dabei mit dem C-Terminus der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit. Wenn das intrazelluläre Kalzium ansteigt, bindet Kalzium am Carboxyende von CaM, welches eine hohe Affinität für Kalzium besitzt. Dadurch bindet der $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex an einem kritischen IQ-Motiv nahe der ApoCaM-Bindungsstelle an das $\alpha 1\text{C}$ des LTCC, wodurch die Inaktivierung beschleunigt wird (Bers 2008).

In den Kardiomyozyten dominiert CDI normalerweise über VDI (Bers und Morotti 2014). Angesichts der Rolle von I_{Ca} zur Aufrechterhaltung des AP-Plateaus sind CDI und VDI wichtige Determinanten für die Regulation der Dauer des Aktionspotenzials. Die Inaktivierung des LTCC führt zur Repolarisation. Durch den Ausstrom von Kalium

aus der Zelle wird das Ruhemembranpotential erreicht. Während der Depolarisation und der Dauer des AP-Plateaus ist der Kardiozyt refraktär. Dies bedeutet, dass kein neues Aktionspotential ausgelöst werden kann. Die Inaktivierungskurve hat einen sigmoidalen Verlauf in Abhängigkeit vom Membranpotential. Das Potential bei dem die Hälfte aller Kanäle geschlossen inaktiviert sind (half-inactivation potential; $V_{0.5, inactivation}$) liegt bei ca. -35mV.

Eine weitere Regulation des LTCCs geschieht über die Proteinkinase A (PKA). Die PKA ist ein Schlüsselenzym bei der elektromechanischen Koppelung im Kardiomyozyten. Dabei binden Katecholamine an die β -adrenergen Rezeptoren der Zelloberfläche. Dies wiederum führt zu Aktivierung der Adenylatcyclase, damit zu einer Erhöhung von cAMP und schließlich zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), die eine Phosphorylierung des $Ca_v1.2$ -Kanals durchführt. Dabei konnten multiple Phosphorylierungsstellen an den α_1 und β -Untereinheiten *in vitro* identifiziert werden (Bünemann et al. 1999). Die funktionelle Bedeutung dieser Phosphorylierungsstellen ist bisher jedoch nicht vollständig charakterisiert. Die Selektivität der PKA-Signaltransduktion wird dabei durch räumliche Kopplung an die Zielproteine verstärkt. Hierfür sind sogenannte A-kinase-anchoring proteins (AKAPs) verantwortlich. AKAPs sind Gerüstproteine, welche PKA über den cAMP Signalweg regulieren. Im Herzen bindet PKA über die membranverankerten AKAP79 und AKAP15/18 an die α_1 -Untereinheit der distalen C-terminalen Domäne des $Ca_v1.2$ -Kanals und erhöht damit die Kanalaktivität (Hulme et al. 2006; Fuller et al. 2014).

Als Reaktion auf eine gesteigerte β -adrenerge Stimulation konnte *in vivo* eine Phosphorylierung von Serin 1700 (Ser1700) nachgewiesen werden (Lundby et al. 2013). Ser1700 befindet sich im proximalen C-Terminus der $\alpha_1 1.2$ -Untereinheit, wo es mit dem distalen C-Terminus-Peptid interagieren kann (Harvey und Hell 2013). Catterall konnte 2015 zeigen, dass die Mutation von Ser1700 die PKA-abhängige $Ca_v1.2$ -Aktivität hemmt (Catterall 2015). Die singuläre Mutation von Ser-1700-Ala im $Ca_v1.2$ -Kanal führt zu einer Verhinderung der Phosphorylierung an dieser Stelle (Fu et al. 2013). Fu et al generierten eine mutierte Mauslinie, in der Ser1700 als auch Threonin 1704 (Thr1704) durch Ala substituiert sind (STAA-Mäuse) (Fu et al. 2013). Die dadurch verringerte β -adrenerge Stimulation des L-Typ $Ca_v1.2$ führt zu einem verminderten basalen I_{Ca} , einer verminderten zellulären Kontraktilität, verminderten

kardialen Belastbarkeit und gestörten kardialen Homöostase (Yang et al. 2016). Damit konnte bewiesen werden, dass die Phosphorylierung an Ser1700 und Thr1704 essentiell für die Aufrechterhaltung der basalen $Ca_v1.2$ -Kanalaktivität und für die normale β -adrenerge Regulation ist (Fu et al. 2013).

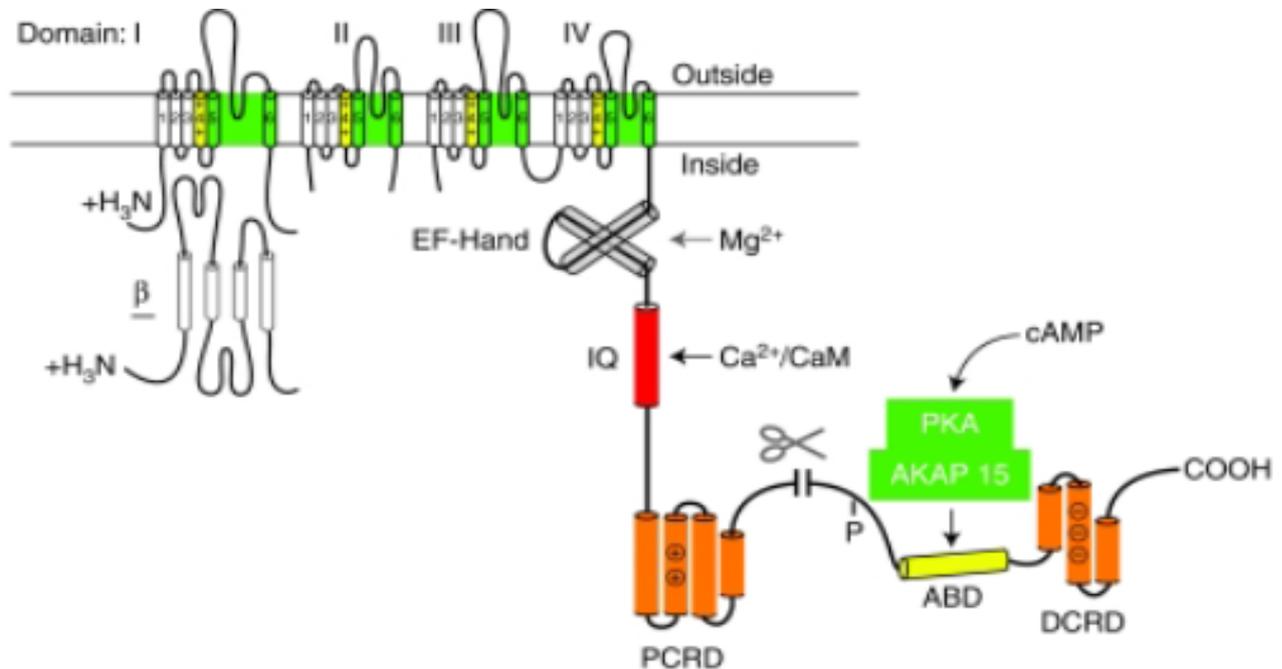


Abbildung 8

Eine Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals. DCRD= distale carboxyterminale regulatorische Domäne; PCRD= proximale carboxyterminale regulatorische Domäne, IQ= Bindungsstelle des Ca^{2+}/CaM -Komplex, EF-Hand= Kalziumsensor, $+H_3N$ = Aminoterminus, $COOH$ = Carboxyterminus (Catterall, 2011)

Eine weitere Phosphorylierungsstelle an der α -Untereinheit vom LTCC ist Serin 1928 (Ser1928). Hulme et al. konnten zeigen, dass Ser1928 am Carboxyterminus der $Ca_v1.2$ -Untereinheit ebenfalls durch den PKA-Weg, zur Regulation des sarkolemmalen Kalziumstrom (I_{Ca}), phosphoryliert wird. In der Folge einer gesteigerten Phosphorylierung kommt es zu einer funktionellen β_1 -adrenergen Hochregulierung von kardialen Kalziumkanälen (Hulme et al. 2006). Hulme et al. korrelierten die β -adrenerge Stimulation mit der Phosphorylierung von Ser1928 und der funktionellen Hochregulation von I_{Ca} in intakten ventrikulären Myozyten im Sinne von einer Steigerung des I_{Ca} um das $3,34 \pm 0,2$ -fache (Hulme et al. 2006).

Allerdings zeigen die Ergebnisse von Ganesan et al., dass die Phosphorylierung von Ser1928 für eine wesentliche Stimulation durch den β -adrenergen Rezeptorweg nicht

notwendig ist (Ganesan et al. 2006). Durch eine Punktmutation von Ser1928 wurde die β -adrenerge Antwort nicht signifikant abgeschwächt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der distale Carboxyl-Terminus von α_1C eine wichtige Rolle bei der β -adrenergen Hochregulierung von kardialen $Ca_v1.2$ spielt, aber dass die Phosphorylierung von Ser1928 für diesen Effekt nicht zwingend erforderlich ist (Ganesan et al. 2006).

Die Regulation des LTCC durch die Proteinkinase C ist umstritten. Es wird vermutet, dass sich die Phosphorylierungsstellen der PKC möglicherweise am N-Terminus (Thr27 und Thr31) befinden. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung dieser Stellen durch PKC eine Hemmung der Funktion des LTCC verursachen (McHugh et al. 2000). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass durch die PKC auch eine Phosphorylierung an Ser1928 der α_1c -Untereinheit stattfindet, was mit einer Steigerung des I_{Ca} einhergeht (Yang et al. 2016). Diese Phosphorylierungsstelle ist somit durch die PKA als auch die PKC beeinflussbar.

Die PKC hat verschiedene Subtypen. Es wird auch eine Inhibition des LTCC und damit gegensätzliche Wirkung bezüglich des I_{Ca} beschrieben (Harvey und Hell 2013).

Neben der α -Untereinheit kann auch die β -Untereinheit durch die Proteinkinase A phosphoryliert werden. Dabei konnten Ser478 und Ser479 als Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, welche Einfluss auf den I_{Ca} beim LTCC haben (Bünemann et al. 1999).

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

Die CaMK ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und gehört zu einer Gruppe von Kinasen, die durch die Bindung von Ca^{2+} /CaM aktiviert werden. In ihrem aktivierten Zustand phosphorylieren sie dann unterschiedlichste Ionenkanäle, Rezeptoren und Proteine.

Die CaMKII ist aber nicht nur im Herzen nachweisbar, sondern wurde primär im Nervengewebe entdeckt (Braun und Schulman, 1995). Die Isoformen I, II und IV befinden sich sowohl im Herzen (Jett et al., 1987; Uemura et al., 1995), als auch im Nervengewebe.

Dabei ist die vorherrschende Form im Herzen die CaMKII. Von ihr sind vier weitere Isoformen bekannt: α , β , γ und δ . Die Isoform CaMKII δ kommt dabei am häufigsten im Herzen vor (Maier und Bers, 2002). Von dieser Isoform bestehen zwei weitere Splicevarianten, von der sich eine im Zellkern (CaMKII δ_b) und die andere im Zytosol (CaMKII δ_c) befindet (Edman und Schulman, 1994).

1.4.1 Die Struktur der CaMKII

Die CaMKII besteht aus drei Domänen: eine katalytische am aminoterminalen Ende, eine autoinhibitorische (regulatorische) und eine assoziative Domäne am Carboxyterminus. Letztere ist für die Oligomerisation des Enzyms verantwortlich. 6-12 dieser Monomere setzen sich radspeichenartig zusammen, wobei die assoziative Domäne nach innen und die katalytische Domäne nach außen zeigt. Die Gesamtheit bildet das CaMKII-Enzym.

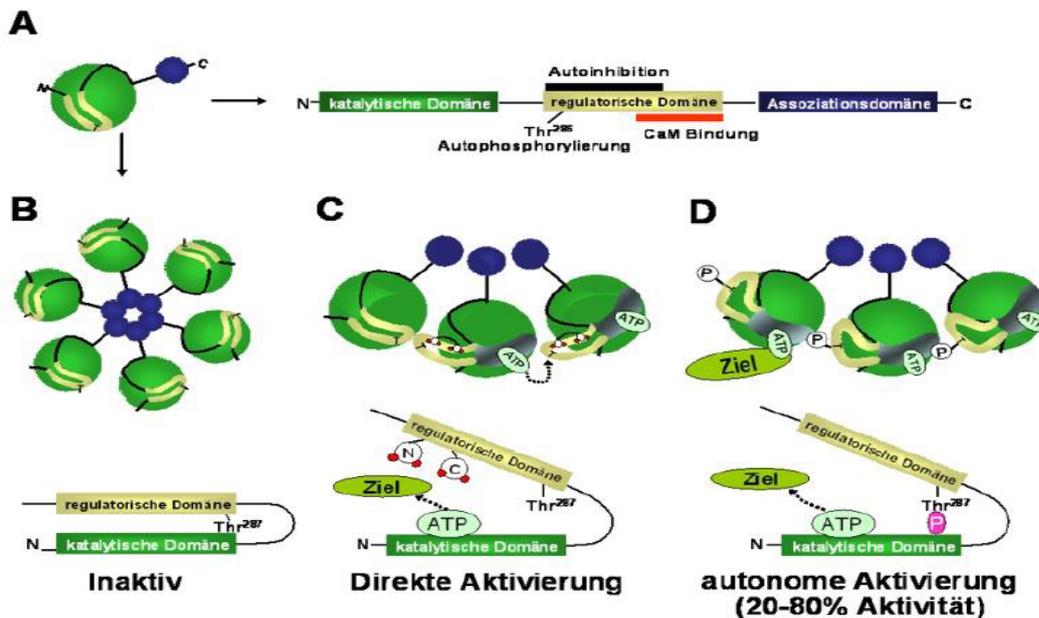


Abbildung 9

Ultrastruktur der CaMKII A: Das CaMKII Monomer mit seinen drei Domänen, B: Radspeichenartige Anordnung der Monomere, C: CaMKII wird durch an sie bindende Ca^{2+} -CaM aktiviert, D: Durch Autophosphorylierung benachbarter CaMKII-Monomere an Thr287 kann die CaMKII selbst nach Abdiffusion von Ca/CaM zu 20-80% aktiv bleiben (Maier und Bers 2002).

1.4.2 Die Aktivierung der CaMKII

Damit die CaMKII aktiviert wird, muss der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex (Ca^{2+} /CaM), der aus Apocalmodulin und vier Kalzium-Ionen besteht, an die regulatorische Domäne binden. Damit ist die Autoinhibition aufgehoben, so dass nun die katalytische Domäne frei ist um an Zielproteine zu binden. Die CaMKII kann sich auch autophosphorylieren, indem die Untereinheit Thr286/287 das Enzym selbst als Zielprotein nutzt. Durch die Autophosphorylierung steigt die Affinität des Enzyms gegenüber dem Ca^{2+} /CaM-Komplex um das 700-fache, sodass auch beim Abfall der intrazellulären Kalzium-Konzentration noch Ca^{2+} /CaM an die CaMKII bindet (Meyer et al., 1992). Des Weiteren behält die CaMKII durch die Autophosphorylierung etwa 20-80% ihrer Aktivität, wenn der Ca^{2+} /CaM-Komplex bereits dissoziiert ist (Maier und Bers, 2002).

Ein weiterer Aktivierungsweg für die CaMKII ist Kalzium unabhängig und geschieht durch die reaktiven Sauerstoffspezies ROS. Dabei wird die CaMKII an Methionin (Met) 281 und Met282 oxidiert und gilt somit auch als Sensor für oxidativen Stress der Zelle (Erickson et al., 2008). Durch die Oxidierung, welche reversibel ist, kommt es ebenfalls zu einer erhöhten Affinität vom CaMKII gegenüber dem Ca^{2+} /CaM-Komplex. Ein

weiterer Weg, die CaMKII zu aktivieren, ohne dass Kalzium involviert ist, geschieht mittels NO-vermittelter β -adrenerger Stimulation der Kardiomyozyten (Gutierrez et al., 2013).

1.4.3 Die Inaktivierung und Hemmung der CaMKII

Die Inaktivierung der CaMKII erfolgt über die Dephosphorylierung mittels Proteinphosphatasen, wie zum Beispiel die Phosphatase 1 (PP1) (Huke und Bers, 2007). Es können auch synthetisch hergestellte Peptide, wie z.B. das Peptid 273-302 als Pseudosubstrat an der aktiven katalytischen Domäne der CaMKII binden und diese dadurch kompetitiv hemmen (Anderson et al., 1994). Darüberhinaus gibt es das Peptid 296-311, welches eine ähnliche Konformität wie CaM besitzt und an die regulatorische Einheit der CaMKII bindet und diese dann hemmt.

Es gibt auch synthetische Hemmstoffe der CaMKII wie das Phenylpiperazin-Derivat KN-62 und das Methoxybenzen-Sulfonyl-Derivat KN-93 (Bassani et al., 1995). Beide hemmen kompetitiv und selektiv die Bindung von Ca^{2+} /CaM an die CaMKII (Sumi, 1991).

Zusätzlich gibt es noch den Peptid-Inhibitor Autocamtide-2-related-inhibitory-protein (AIP), der potent und hoch selektiv an die für die Autophosphorylierung verantwortliche katalytische Domäne bindet und somit zu einer Hemmung der Autophosphorylierung führt. Dabei ist die Hemmung durch AIP ca. 50-500 mal stärker als die durch KN-93 (Ishida et al., 1995).

1.4.4 Die Funktion der CaMKII

Die CaMKII ist eine Proteinkinase, die multiple Proteine phosphorylieren kann und somit Einfluss auf die Homöostase des Kalziumstoffwechsels der Zelle hat. Als Regulator fungiert dabei das Protein Calmodulin. Ausschlaggebend ist dabei die erhöhte Kalziumkonzentration im Kardiomyozyten, wobei das Kalzium an Calmodulin und der Ca^{2+} /CaM-Komplex an die Kinase bindet. Wie bereits oben beschrieben, ist die CaMKII verantwortlich für die Phosphorylierung von Phospholamban, aber auch für die des Ryanodinrezeptors und damit für die Ausschüttung von Kalzium aus dem SR (Maier, 2003). Des Weiteren ist sie zuständig für die Phosphorylierung des LTCCs und eventuell der SERCA (Maier und Bers, 2002). Der LTCC $\text{Ca}_v1.2$ wird von der CaMKII phosphoryliert, indem sie an die α_1 -Untereinheit des Carboxyterminus in der

Nähe des sogenannten IQ-Motivs bindet (Hudmon et al., 2005). Es wird beschrieben, dass die CaMKII, sobald sie einmal an die Untereinheit gebunden ist, sich nicht mehr löst, auch wenn sie dephosphoryliert wird oder die Kalziumkonzentration sinkt. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Ser1512 und Ser1570, welche das EF-Hand-Motiv am Carboxyterminus des Ca_v1.2 flankieren, von der CaMKII phosphoryliert werden (Lee et al., 2006).

Darüber hinaus kann die CaMKII die Relaxationszeit verkürzen, indem sie die Elimination des Kalziums beschleunigt, wenn es zu hohen Stimulationsfrequenzen kommt (Maier und Bers, 2002).

Die CaMKII kann so auf verschiedene Arten Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration nehmen und auf molekularer Ebene die elektromechanische Koppelung im Myokard beeinflussen.

1.5 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Serin-Proteinkinase (CASK)

Die CASK gehört zu der Familie der MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) und ist ein membranständiges Gerüstprotein. Erstmals wurde CASK 1996 von Hata et al durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System entdeckt. Es ist bekannt, dass CASK in hoher Konzentration im Gehirn vorliegt und in einer verminderten Konzentration in vielen anderen Organen, wie auch im Herzen (Dimitratos et al., 1997; Atasoy et al., 2007). CASK hat mehrere Domänen, unter anderem eine N-terminale CaMKII homologe Domäne, ebenso wie eine CaM bindende Domäne. Der C-Terminus besteht aus mehreren Domänen, welche typische MAGUK Proteine sind.

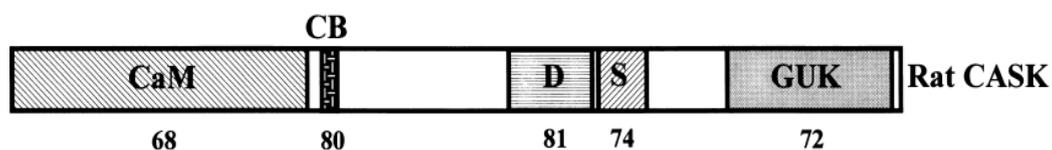


Abbildung 10

Struktur der CASK. CaM = CaMKII homologe Domäne, CB = CaM-bindende Domäne, D = DHR/PDZ Domäne, S = SH3 Domäne, GUK = Guanylatkinase Domäne (Dimitratos et al. 1997).

Als weitere Domänen liegen die DHR/PDZ- und die SH3-Domäne vor. Von der DHR/PDZ Domäne können ein oder drei Kopien vorhanden sein, welche die MAGUK Familie in zwei Subfamilien unterteilt. Wenn eine einfache Kopie der Domäne vorliegt, spricht man von einer „p55-like“ Subfamilie, wenn drei Kopien vorliegen spricht man

von einer „dlg-like“ Subfamilie. Die Domänen sind beteiligt an der Protein-Protein Interaktion. Die SH3-Domäne erlaubt der Kinase mit anderen für die Signaltransduktion zuständigen Proteinen zu interagieren (Dimitratos et al., 1997).

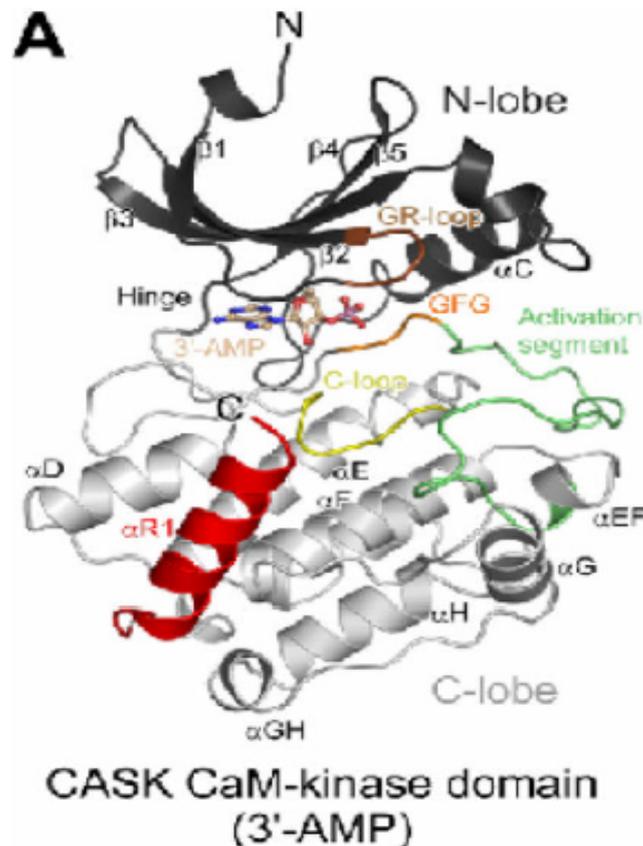


Abbildung 11

Die Ultrastruktur der CASK CaMKII-Domäne im Komplex mit 3'-AMP. N-Terminus (dunkel grau), C-Terminus (hell grau), CaM-bindendes Segment (rot) (Mukherjee et al. 2008b)

Wie bereits beschrieben ist CASK in hoher Konzentration im Gehirn vorhanden und dort vor allem in den Prä- aber auch in geringer Konzentration in den Postsynapsen. Es ist dort beteiligt an der Regulation der Bildung von Synapsen (Wang und Yuan, 2015). CASK bindet im Gehirn an verschiedene Proteine wie Neurexin, Syndecan und Veli/LIN-7 sowie Mint/LIN-10 (Hsueh et al., 2000; Schuh et al., 2003). Mit seiner Guanylatkinase-Domäne kann CASK im Zellkern an Tbr-1, einem T-Box Transkriptionsfaktor, binden und agiert somit als Co-Aktivator für die Ablesung der Gene dieser Sequenz. Die Proteine dieser Sequenz sind wichtig für die cerebrocorticale Entwicklung des Gehirns (Hsueh et al., 2000).

CASK entspricht in der Drosophila dem Protein Camguk (Cmg) (Hata et al. 1996). Es wurde gezeigt, dass unter ATP-Hydrolyse und in Gegenwart von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ es zur Autophosphorylierung an der Untereinheit Thr287 von CaMKII durch CASK kommen kann und dies somit zu einer aktiven Kinase führt (Lu et al. 2003). Außerdem hat CASK die Fähigkeit, die Autophosphorylierung von Thr306 (T306) in Drosophila und Thr305 (T305) in Säugetier- αCaMKII in der CaM-Bindungsdomäne der Kinase zu induzieren. Die Phosphorylierung von Thr306 blockiert die $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Bindung, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierung von Thr287 verringert wird, da sowohl eine CaM-Bindung an das Substrat als auch an die katalytischen Untereinheiten dafür erforderlich ist (Hodge James J. L. et al. 2006).

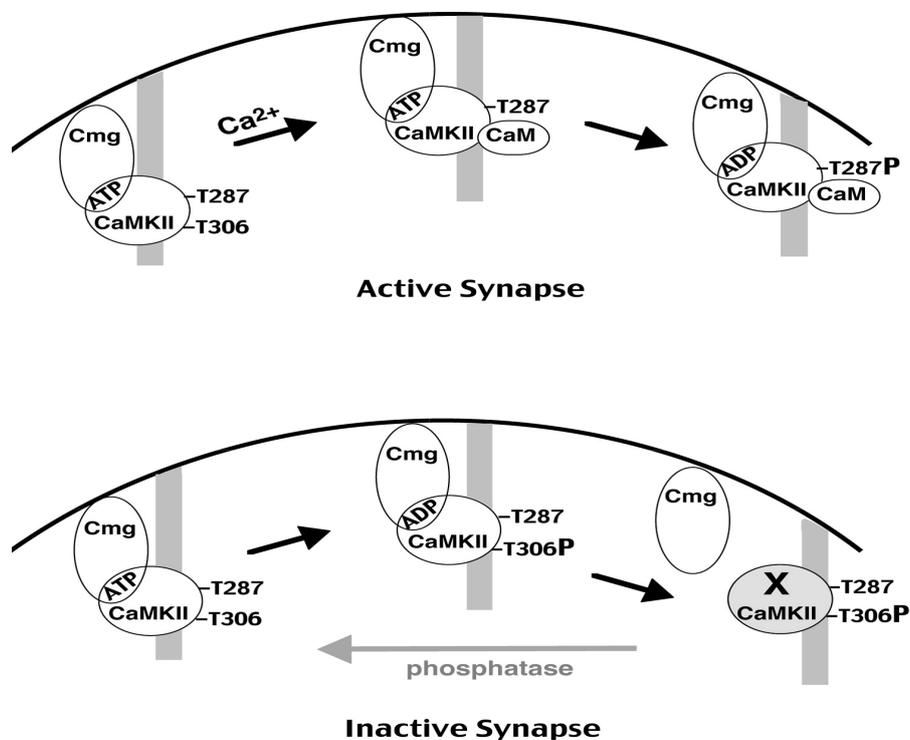


Abbildung 12

Aktive Synapse: In der Anwesenheit von Ca^{2+} bindet Cmg (= CASK in der Drosophila) an die CaMKII, welche wiederum CaM bindet. Unter der Spaltung von ATP in ADP kommt es zur Phosphorylierung von T287 und somit zu einer Aktivierung der CaMKII. Inaktive Synapse: in Abwesenheit von Ca^{2+} bindet Cmg an die CaMKII. Unter Spaltung von ATP in ADP kommt es zu einer Phosphorylierung von T306 und somit zu einer inaktiven Kinase, welche unfähig ist $\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$ zu binden, bevor sie nicht dephosphoryliert wird (Lu et al. 2003).

Man vermutet, dass dieser Effekt ein Mechanismus zur Herabregulierung des aktiven Kinase Pools ist (Hodge James J. L. et al. 2006). Hodge et al. 2006 beschreiben, dass die Reduktion von CASK zu einer erhöhten CaMKII-Thr287-Autophosphorylierung führen kann.

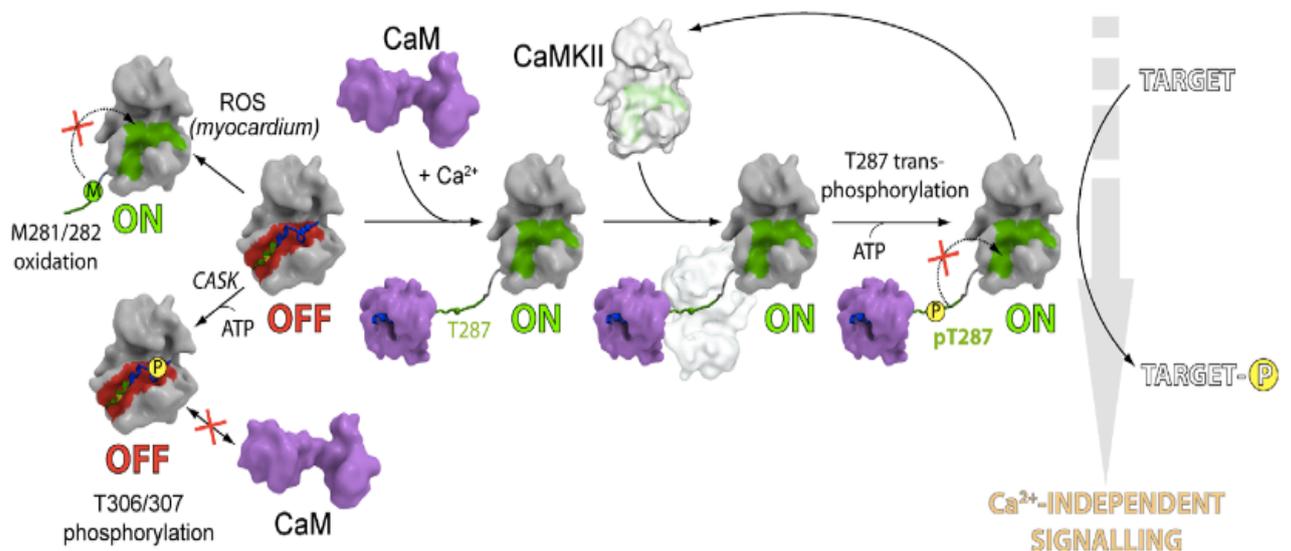


Abbildung 13

Bei der autoinhibierten CaMKII (zweite von links) ist die inaktivierende C-terminale Helix an die Substratbindungsstelle gebunden (dargestellt als rote Oberfläche). Ca²⁺/CaM-unabhängige Mechanismen führen durch Methionoxidation zu einem aktiven Zustand ("ON" -Zustand; oben links) oder zu einem inaktiven Zustand ("OFF" -Zustand; unten links) mittels CASK-vermittelter T306 / T307-Phosphorylierung. Ca²⁺/CaM-abhängige Aktivierung (rechts) wird durch strukturelle Umordnung der inhibitorischen Helix durch Ca²⁺/CaM-Bindung und anschließende Autophosphorylierung von T287 erreicht. Auch wenn Calmodulin nach einem Abfall des Ca²⁺-Gehalts aus dem Komplex freigesetzt wird, wird die retinale Bindung der inhibitorischen Helix durch pT287 blockiert (markiert als rotes Kreuz). Selbst wenn Calmodulin nach einem Abfall des Ca²⁺-Niveaus aus dem Komplex freigesetzt wird, wird die erneute Bindung der inhibitorischen Helix blockiert (als rotes Kreuz markiert), einerseits durch pT287 und durch einer strukturellen Änderung im unteren Kinaselappen, die die Bindungsstelle für die Helix schließt, die Substratbindungsstelle blockiert (strukturiert als grüne Oberfläche) und richtet E97 in der aktiven Stelle für die ATP-Bindung aus. Folglich ist der aktive Zustand der Kinase langlebig und Signalwege, die zu Änderungen der Gentranskription führen, werden aktiviert. (Rellos et al. 2010).

Im Herzen wurde CASK in Verbindung mit Dystrophin (Dystrophin-Glykoprotein-Komplex) speziell in den Costameren der lateralen Membran von Kardiomyozyten entdeckt (Eichel et al., 2016). Costamere sind Proteinkomplexe, die für die Übertragung der Kontraktion des Myokards, ausgelöst durch die Verkürzung der Sarkomere, von der Myofibrille auf die extrazelluläre Matrix zuständig sind (Anastasi et al., 2008). CASK befindet sich nicht in den Glanzstreifen, sondern nur an der lateralen Membran. Kürzlich wurde entdeckt, dass CASK im Herzen mit Na_v1.5 interagiert und den I_{Na} runter regulieren kann (Eichel et al., 2016).

Des Weiteren ist bekannt, dass Ca_v1.2 eine PDZ-Domäne bindendes carboxyterminales Motiv besitzt.

In der Arbeit von Eichel et al. wurde gezeigt, dass das CASK-Silencing zu einer erhöhten Expression von $\text{Na}_v1.5$ an der Zelloberfläche führt. Dabei kam es allerdings nicht zu einem Anstieg des I_{Na} , da dies durch den Proteintransportinhibitor Brefeldin-A vollständig verhindert wurde.

Obwohl das Vorhandensein des CASK im Myokard bereits in mehreren Arbeiten bestätigt wurde (Cohen et al. 1998; Leonoudakis et al. 2004), ist seine Funktion bezogen auf den LTCC bisher wenig bis gar nicht erforscht.

1.6 Kardiale Arrhythmien

Bei der Herzinsuffizienz ist die Kalziumhomöostase im Herzmuskel stark gestört. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer verminderten Kontraktilität der Herzmuskelzelle und einer verminderten Relaxation in der Diastole. Studien haben gezeigt, dass zwar die Kalziumsensitivität der Myofilamente erhalten bleibt, es jedoch zu verminderter Kontraktion proportional zum verminderten Kalziumtransienten kommt (Bers, 2001). Man geht deshalb davon aus, dass die verminderte Kontraktilität auf den verminderten Kalziumtransienten zurückzuführen ist (Bers, 2001). Es gibt drei Ursachen für die verminderte Kalziumkonzentration. Erstens haben Studien gezeigt, dass es zu einem vermehrten Kalziumverlust des SR in der Diastole kommt. Dies geschieht durch einen undichten RyR. Der Kanal ist zwar im insuffizienten Myokard herunterreguliert, aber seine Öffnungswahrscheinlichkeit ist stark verlängert. Warum die RyRs undicht werden, ist bislang nur unzureichend geklärt. Man vermutet die Entstehung dieses Effektes in der Phosphorylierung entweder durch Proteinkinase A (PKA) oder durch CaMKII (Shan et al., 2010; Respress et al., 2012).

Zweitens kommt es im terminal insuffizienten Myokard zu einer verminderten Pumpkapazität der SERCA sowie zu einer verminderten Leistung von Phospholamban. Dies hat zur Folge, dass während der Diastole das SR nicht ausreichend mit Kalzium gefüllt werden kann und deshalb die SR-Kalziumkonzentration abnimmt. Somit kommt es zu einer verminderten Kalziumfreisetzung, welche für die Kontraktion ausschlaggebend ist (Bassani et al., 1995). Dies kann zu systolischen Dysfunktionen und ventrikulären Tachyarrhythmien führen (Chen et al., 2004).

Zum dritten kommt es zu einer erhöhten Aktivität der NCX. Man vermutet, dass er kompensatorisch das vermehrt im Zytosol anfallende Kalzium transsarkolemmal eliminiert (Studer et al., 1994). Somit verschiebt sich das Gewicht der

kalziumeliminierenden Systeme. Andererseits kann der NCX bidirektional arbeiten. Das heißt, dass es bei einer sehr hohen intrazellulären Natriumkonzentration, einem langen Aktionspotenzial und einem positiven Membranpotenzial zu einem Kalziuminflux kommen kann (Bers, 2001; Bers, 2002).

Während der Diastole kommt es aufgrund der Depletion der intrazellulären Kalziumspeicher zu einer Kalziumüberladung der Zelle. Die Myofilamente sind durch das erhöhte Kalziumangebot länger aktiviert. Dies hat zur Folge, dass die Relaxation des Herzmuskels verlangsamt und nicht vollständig abläuft. Dies wiederum führt dazu, dass das Herz keinen Zustand erreicht, in dem es so relaxiert ist, dass es ausreichend mit Blut gefüllt werden kann (Mercadier et al., 1990).

Zu den weiteren Mechanismen, die im insuffizienten Myokard ablaufen, gehört die Desensibilisierung der β -Rezeptoren, sodass adrenerge Agonisten nur noch einen verminderten Effekt auf die Zellen haben (Eschenhagen, 2008). Der positiv inotrope Effekt der Katecholamine ist somit stark abgeschwächt (Böhm et al., 1988). Auch die Konzentration des second-messenger cAMP ist vermindert. Dies deutet darauf hin, dass der stimulierende Effekt der Katecholamine auf die Kontraktilität des Herzens vermindert ausfällt und die Dynamik des Herzens signifikant beeinträchtigt (El-Armouche und Eschenhagen, 2008).

Der LTCC ist essentiell für die Regulation der elektromechanischen Kopplung. Es wurde gezeigt, dass die Dichte und Expressionsmenge der LTCC in Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz unverändert im Vergleich zu gesunden Herzen ist (Mukherjee und Spinale 1998). Allerdings zeigte sich, dass die einzelne Aktivität der Kanäle modifiziert ist. Insbesondere bei Herzinsuffizienz kommt es zu einer erhöhten Aktivität der einzelnen Kanäle. Schröder et al. zeigten, dass die LTCC bei Herzinsuffizienz eine erhöhte Verfügbarkeit und eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit haben (Schröder Frank et al. 1998). Dies ist laut den Autoren bedingt durch eine kürzere erste Latenz bis zur Öffnung, eine längere durchschnittliche Öffnungszeit der Kanäle und kürzere geschlossene Zeit. Sie vermuten daher, dass ein Phosphorylierungsmechanismus für die erhöhte Aktivität von LTCC bei Herzinsuffizienz verantwortlich ist.

Die CaMKII ist ein wichtiges Enzym, das die Genexpression in den Herzzellen reguliert und diverse Proteine phosphoryliert. Hoch et al. konnten 1999 zeigen, dass im insuffizienten Myokard die CaMKII auf mRNA- und Proteinebene deutlich hochreguliert war. Die Überexpression der CaMKII kann selbst zu einer kardialen

Hypertrophie, ventrikulärer Dilatation, Arrhythmien und zur Herzinsuffizienz führen, da sich das Verhältniss zwischen Herzgewicht und Körpergewicht mehr als verdoppelt (Maier, 2003). Maier et al. weisen auch darauf hin, dass die Überexpression von der CaMKII für die verlängerte Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR und für die kontraktile Dysfunktion bei der Herzinsuffizienz verantwortlich ist. Wie bereits erläutert, ist die CaMKII ein Regulatorprotein für den LTCC. Es wurde eine Überexpression von CaMKII via Phosphorylierung des Carboxyterminus der α -Untereinheit und der β_{2a} Untereinheit des Thr498 beschrieben, die zu einer verlängerten Öffnungszeit des LTCCs führt (Anderson et al., 1994; Hudmon et al., 2005). Es wird vermutet, dass die Veränderungen am LTCC durch die überexprimierte CaMKII das Entstehen von Arrhythmien triggert. Besonders hervorzuheben sind die Arrhythmien, die durch frühe Nachdepolarisationen (early afterdepolarizations (EAD)) verursacht werden (siehe Abbildung 14). Diese entstehen, wenn während der Repolarisationsphase eines Aktionspotenzials eine neue Depolarisation auftritt. Ausgelöst wird dies durch spontane Oszillationen der transmembranären Spannung, welche durch das Membranpotenzial des vorausgehenden Aktionspotenzials ausgelöst werden. Wird das Schwellenpotenzial erreicht, so entsteht ein neues Aktionspotenzial. Dies führt zu einer unangemessenen Öffnungszeit und zur verfrühten Reaktivierung des LTCCs (Wu et al., 2002; Anderson et al., 2011). Für den LTCC gibt es ein bestimmtes Spannungsfenster, in welchem er reaktiviert werden kann (window current, siehe Abbildung 14). Dieses befindet sich in der Nähe der Plateauphase des Aktionspotenzials und liegt bei -30 mV bis 0 mV. Dort überlappen sich die steady state activation (SSA) und steady state inactivation (SSI) (Weiss et al., 2010). Fällt die neue Depolarisation in dieses Fenster, kann der LTCC erneut aktiviert werden und eine EAD wird generiert.

Davon unterscheidet man die delayed afterdepolarizations (DAD), welche nach Erreichen des Ruhepotenzials auftreten können und meist durch eine Kalziumüberladung in der Zelle sowie einer spontanen Kalziumentladung aus dem SR bedingt sind (Pogwizd und Bers, 2006). Zusammen mit einem Natriumeinstrom über den NCX kann eine Depolarisation bewirkt werden.

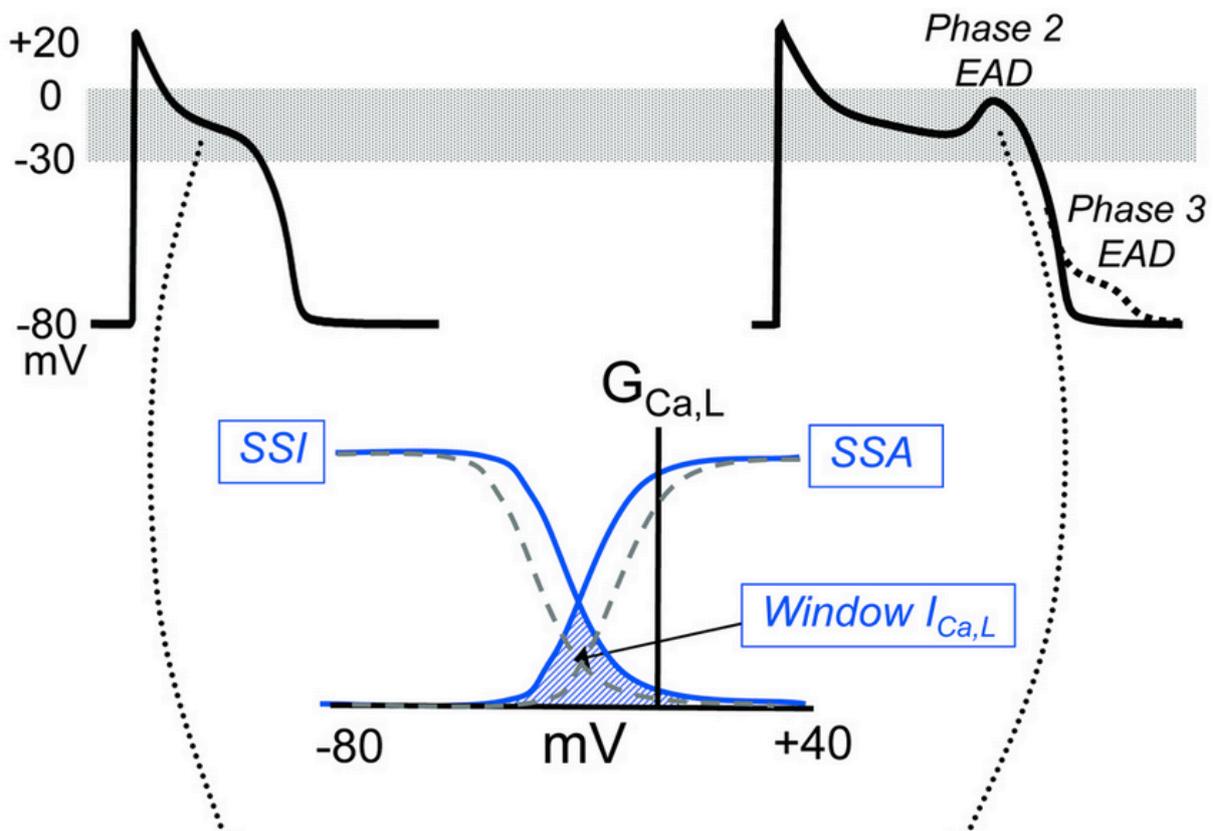


Abbildung 14

Ein normales Aktionspotential im Vergleich zu einem Aktionspotential mit EAD. Die untere Abbildung zeigt einen Graphen bei dem auf der X-Achse die Membranspannung (mV) und auf der Y-Achse die Leitfähigkeit des LTCC aufgetragen ist. Es zeigt das Fenster (window $I_{Ca,L}$) in welchem sich die Kurven der Inaktivierung (SSI) und Aktivierung (SSA) des Kanals überschneiden. Der markierte Teil beschreibt den Zeitpunkt, bei dem sich ein noch in Repolarisation befindlicher LTCC wieder reaktivieren kann (Weiss et al. 2010).

Durch eine Inhibition der CaMKII konnte gezeigt werden, dass sich die Kontraktilität des Myokards, ebenso wie die myokardiale Hypertrophie verbesserten (Sossalla et al., 2010; Anderson et al., 2011). Durch die Inhibition kommt es zu einer nachweislichen Senkung der Arrhythmien.

1.7 Zielsetzung und Fragestellung

Trotz früherer Daten über die Expression von CASK in den Kardiomyozyten wurde bisher weder seine Rolle in der Regulierung der CaMKII Aktivität, noch die Folgen für Herzinsuffizienz und ventrikuläre Arrhythmien untersucht. Diese Arbeit soll zeigen, ob das myokardiale CASK mit CaMKII assoziiert ist. Das Fehlen von CASK führt zu einer erhöhten CaMKII-Aktivität, Arrhythmien und zur kontraktile Dysfunktion in einer

herzinsuffizienten Mäusen. Somit dürfte CASK und seine Interaktion mit CaMKII ein potenzielles Target für künftige Arzneimittelentwicklung darstellen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, welche Effekte das Fehlen von CASK auf den Kalziumstrom, das Öffnungsverhalten und die Leitfähigkeit des LTCCs hat.

Des Weiteren wird verglichen, ob es bei einem erhöhten intrazellulären Kalzium oder beim Hinzufügen von Isoprenalin in das extrazelluläre Medium zu einer Veränderung der oben beschriebenen Punkte kommt. Die zugrunde liegende Hypothese lautet, dass CASK im Mäuseherz mit der CaMKII assoziiert ist und dass eine Veränderung der CASK-Expression in Mäusen die CaMKII-abhängige Regulation des LTCCs i.S. von Änderung des Kalziumstrom, des Öffnungsverhaltens sowie der Leitfähigkeit bewirkt.

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Welche Bedeutung hat das Fehlen von CASK auf die basale Funktion des LTCCs?
 - 1.1. Nimmt der Kalziumstrom in Kardiomyozyten isoliert aus CASK Knock-out Mäusen zu?
 - 1.2. Wie verändert sich das Öffnungsverhalten des LTCCs in Kardiomyozyten isoliert aus CASK Knock-out Mäusen?
 - 1.3. Wie verändert sich die Leitfähigkeit des LTCCs in Kardiomyozyten isoliert aus CASK Knock-out Mäusen?

- 2.) Welche Bedeutung hat CASK bei der β -adrenergen Regulation des LTCCs?
 - 2.1. Wie verändert sich die Strom-Spannungskurve des LTCCs unter Isoprenalin in Kardiomyozyten isoliert aus CASK Knock-out Mäusen?
 - 2.2. Wie verändert sich das Öffnungsverhalten unter Isoprenalin in Kardiomyozyten isoliert aus CASK Knock-out Mäusen?
 - 2.3. Wie verändert sich Leitfähigkeit des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Isoprenalin?

- 3.) Welche Bedeutung hat CASK für die kalziumabhängige Regulation des LTCCs)?
 - 3.1. Wie verändert sich die Strom-Spannungskurve des LTCCs bei direkter Stimulation der Kardiomyozyten isoliert aus CASK Knock-out Mäusen?
 - 3.2. Wie verändert sich das Öffnungsverhalten bei direkter Stimulation der Kardiomyozyten isoliert aus CASK Knock-out Mäusen?
 - 3.3. Wie verändert sich die Leitfähigkeit des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten bei direkter Stimulation?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Zelllinien

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse aus zwei Mauslinien untersucht. Dabei wurden Wildtyp- und Knock-out-Geschwister miteinander verglichen. Bei den Knock-out Mäusen wurde das für CASK kodierende Gen ausgeschaltet.

2.2 Knock-out Mäuse

Durch genetische Manipulation, dem sogenannten Gene targeting, werden bei Knock-out-Mäusen ein oder auch mehrere Gene deaktiviert. Die grundlegende Idee dabei ist, das zu untersuchende Gen komplett zu zerstören, wobei alle anderen Gene intakt bleiben. Die Ergebnisse der Messungen im Wildtyp und im Knock-out-Typ werden dann miteinander verglichen. Der Vorteil beim Gene targeting ist, dass man am lebenden Objekt (in-vivo) messen kann.

Das Entfernen von gezielten DNA Abschnitten ließ sich durch das Cre/loxP-System erreichen. Cre (causes recombination) ist eine Rekombinase, die eine spezifische Sequenz erkennt, diese exzidiert und die Fragmente transloziert. Dazu benötigt sie keinen weiteren Ko-Faktor. Die Cre-Rekombinase entstammt dem Bakteriophagen P1. Die loxP Sequenz (locus of crossing over) ist der Basenabschnitt, welcher von der Rekombinase erkannt wird und besteht aus 34 Basenpaaren. Um den zu herauschneidenden DNA-Abschnitt zu markieren, setzt man vor und hinter ihn die loxP Sequenz. Dieser Vorgang wird ‚floxed‘ genannt. Damit ist der Bereich dann für die Rekombinase auffindbar. Es gibt verschiedene loxP Sequenzen, mit denen der betroffene DNA-Abschnitt markiert werden kann.

Mittels eines Transgen-Prozesses, wurde das Cre-Gen mit einem zugehörigen Promoter in das Mausgenom eingebracht. Dabei wurde ein Promoter für die Kodierung von Proteinen gewählt, die spezifisch im Herzen vorkommen. So wurde sichergestellt, dass die Rekombinase nur in Kardiomyozyten exprimiert wird. Diese Maus wurde nun gepaart mit einer weiteren Maus, in der das herauszuschneidende Gen bereits mit loxP markiert wurde. Die Nachkommen dieser Paarung hatten die Mutation beider Elternteile mit einer Rekombinase in Kardiomyozyten, die den betroffenen geflochten

Genabschnitt dort herauschneidet. Somit wurde CASK nur im Herzen nicht mehr exprimiert, jedoch noch in anderen Körperzellen wie zum Beispiel im Gehirn.

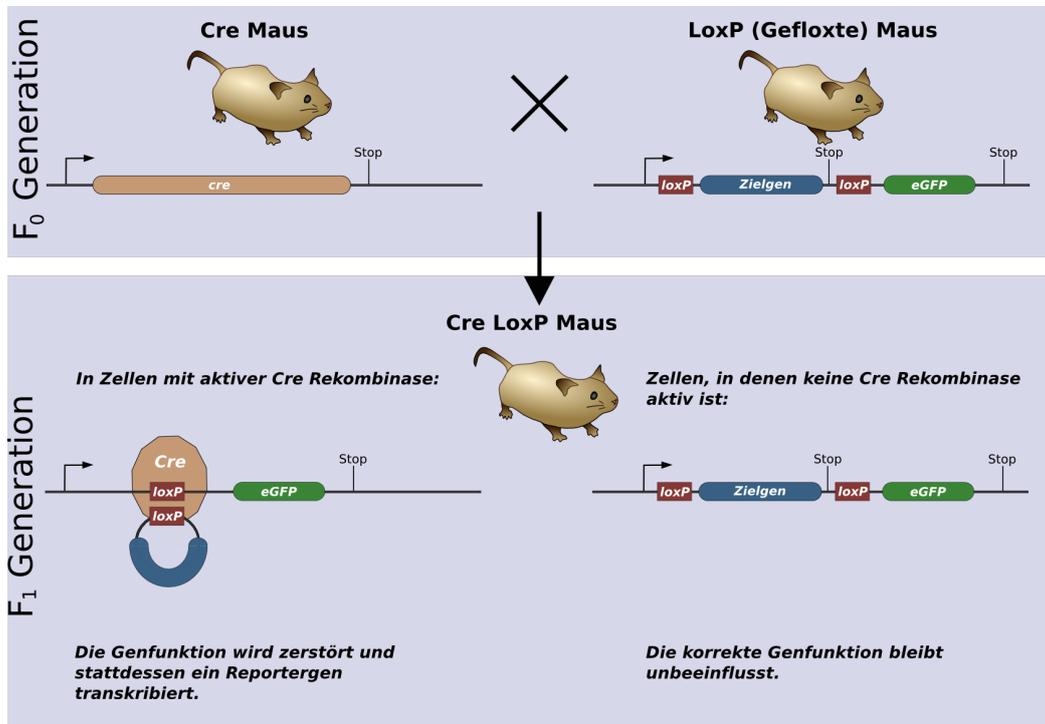


Abbildung 15

Cre/loxP Mechanismus für Knock-out Mäuse: Die in floxierten Mäusen vorhandene vorzeitige Stopsequenz wird nur aus Zellen entfernt, die Cre-Rekombinase exprimieren, wenn die Mäuse zusammen gezüchtet werden (https://en.wikipedia.org/wiki/Cre-Lox_recombination).

Da die Expression von Cre-Rekombinase auch Off-Target-Effekte haben kann, wurden in dieser Doktorarbeit zwei Kontrollgruppen verwendet: Mäuse mit Wildtyp-CASK-Allelen und Kardiomyozyten-spezifischer Expression der Cre-Rekombinase (CASK CTRL) sowie homozygote gefloxt Mäuse ohne Expression der Cre-Rekombinase (CASK Flox).

2.3 Isolation ventrikulärer Mäusekardiomyozyten

Alle durchgeführten Tierexperimente wurden der zuständigen Tierschutzbehörde in Braunschweig mitgeteilt (Tierversuchsanzeige für die „Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß § 4 TierSchG, Aktenzeichen T2.08 und T14.06, Bezirksregierung Braunschweig, Anzeigender Dr. Harald Kögler) und in

Übereinstimmung mit dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996) durchgeführt.

Als erstes wurde die Maus im Exsikkator mit ca. 500 ml Isofluran narkotisiert. Wenn die Maus eine verminderte Atemfrequenz und –tiefe aufzeigte, konnte von einer ausreichenden Sedierung ausgegangen werden. Daraufhin wurde der Maus eine Schere in den Nacken gedrückt, und durch das ruckartige Ziehen am Schwanz konnte ein zügiger Genickbruch erreicht werden. Dann wurde die Maus gewogen und ihr Körpergewicht festgehalten. Um das Herz zu erreichen, wurde die Bauchdecke mit der chirurgischen Pinzette gefasst. Mittels einer OP-Schere wurden durch Schnitte schräg zu den Vorderpfoten der Thorax- bzw. Bauchraum eröffnet. Das Sternum wurde mittels einer Kornzange fixiert und das Diaphragma inzidiert. Von dort aus konnte man weiter zum Herzen vorpräparieren. Nach Freilegung des Herzens und nach Abtrennung der Aorta und der anderen großen zuführenden Gefäße wurde das Herz aus dem Thorax gehoben und umgehend in den Tyrodepuffer überführt. Dort wurde es dann durch manuelle Kompression ausgedrückt und gespült, um so das restliche Blut aus den Kammern zu entfernen. Dies sollte eine Thrombenbildung vorbeugen. Danach wurde das Gewicht des Herzens festgehalten. Die Aorta wurde dann unter dem Mikroskop kanüliert und mittels Naht an der Kanüle fixiert. Daraufhin wurde das Herz über diesen Zugang erneut gespült, dann in eine modifizierte Langendorff-Apparatur eingespannt und von retrograd für 5-6 min mit einer Enzymlösung gespült. Dies entsprach dem sogenannten ‚Verdau‘. Dabei wurden intrazelluläre Verbindungen gelöst und das Herauslösen der Zellen aus dem Zellverband gewährleistet, um dadurch eine gute Suspendierung der Zellen zu erreichen. Nach dem abgeschlossenen Verdau wurde das Herz aus dem Apparat herausgenommen und mittels Skalpells wurden Vorhof- und Kammermyokard voneinander getrennt. Das Kammermyokard wurde in einem nächsten Schritt in viele kleine Teile zerschnitten und in kalziumhaltige Tyrode gegeben. Diese Suspension wurde dann durch eine Nylongaze (Porentiefe 200 µm) gefiltert und mit der gefilterten Suspension dann ein Kalziumaufbau vorgenommen. Dazu wurden die Zellen in vier Schritten immer größeren Kalziumkonzentrationen ausgesetzt. Nach jedem Schritt wurde 7,5 min gewartet, dann der Überstand der Perfusion verworfen und nur der zelluläre Rest am Boden des Falconröhrchens behalten.

Im letzten Schritt wurden die Versuchskammern mit Laminin beschichtet und von der

finalen Suspension ca. 500 µl hinzugegeben. Danach wurde 15 min gewartet, um den Zellen die Möglichkeit zur Adhäsion an das Laminin zu geben.

Laminin ist ein kollagenhaltiges Glykoprotein, das über Rezeptoren an Zelloberflächen bindet und somit die Zellen fixiert.

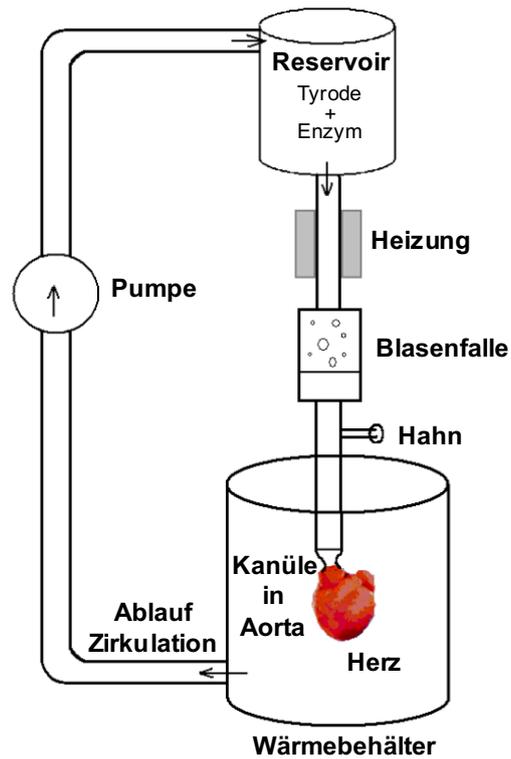


Abbildung 16

Schematische Darstellung der zur Isolation von Mäusekardiomyozyten verwendeten Perfluationsanlage nach Langendorff (Wagner 2005).

Tabelle 1 - Lösungen zur Isolation von ventrikulären Maus- Kardiomyozyten.

Lösung	Ion/Substanz	Konzentration		
Tyrode Perfu-sions-pufferlösung	NaCl	113	mmol/L	Gelöst in ddH ₂ O; pH 7,42 bei 36,5 °C
	KCl	4,7	mmol/L	
	KH ₂ PO ₄	0,6	mmol/L	
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,6	mmol/L	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2	mmol/L	
	Phenolrot	0,032	mmol/L	
	NaHCO ₃	12	mmol/L	
	KHCO ₃	10	mmol/L	
	HEPES	10	mmol/L	
	Taurin	30	mmol/L	
	Glucose	5,5	mmol/L	
	BDM (2,3-Butadionemonoxime)	10	mmol/L	
Enzymlösung	Liberase	1,5	mg	Gelöst in 20ml Tyrode; pH 7,42 bei 36,5 °C
	Trypsin	111,2	µl	
	CaCl ₂	0,0125	mmol/L	
Stopplösung	BCS (Bovine calf serum)	ca. 10	Vol%	Gelöst in 2,25ml Tyrode; pH 7,42 bei 36,5 °C
	CaCl ₂	0,0125	mmol/L	

2.4 Patch-Clamp-Technik

1976 wurde die Patch-Clamp-Technik zur Messung des Stroms, der durch einzelne Kanäle der Zellmembran fließt, durch den Biophysiker Erwin Neher und den Mediziner Bert Sakmann entwickelt. Im Jahr 1991 gewannen sie für diese Arbeiten den „Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.“

Mit der Patch-Clamp-Technik ist es möglich, sehr kleine Ströme im pA Bereich über einer kleinen Fläche zu messen. Dabei hat man eine hohe zeitliche Auflösung von ca. 100-300 kHz.

Um einen einzelnen Ionenkanal auf der Zellmembranoberfläche zu isolieren und spezifisch den Strom über diesen Kanal zu messen, benutzt man eine feine Glaspipette mit einem sehr kleinen Spitzendurchmesser. Die Spitze der Glaspipette

wird unter Anlegen eines leichten Überdrucks (um ein Verstopfen der Pipette zu verhindern) an die Zellmembran herangeführt, bis eine dichte Verbindung zwischen der Spitze der Glaspipette und der Membran entsteht (Gigaseal). Dabei wird der betroffene Membranbereich („patch“) von seiner Umgebung elektrisch isoliert.

Beim Gigaseal entwickelt sich ein Abdichtwiderstand zwischen Membran und Pipette in der Größenordnung von ca. 100 G Ω . Dabei kann praktisch kaum noch Strom fließen, und die Stromantwort auf den Kommandospannungspuls wird dabei zu einer geraden Linie (Cell-attached-Konfiguration). Durch vorsichtiges Anlegen eines leichten Unterdrucks kann dann die Zellmembran rupturiert und somit ein Zugang zum Zellinneren erreicht werden (Whole-Cell-Konfiguration). Die Flüssigkeit in der Pipette vermischt sich dabei mit dem Intrazellularraum.

Für das Durchbrechen der Zellmembran gibt es zwei Methoden: Zum einen die in der vorliegenden Doktorarbeit benutzte und bereits oben erklärte Technik mittels Unterdruck, die sogenannte „ruptured-patch-Methode“, zum anderen die sogenannte „perforated-patch-Methode“, bei der die Zellmembran chemisch durchlässig gemacht wird (z.B. mit dem Ionophor Nystatin) (Horn und Marty, 1988).

Abgesehen von den beiden oben genannten Konfigurationen gibt es noch zwei weitere für die Messungen. Durch das Zurückziehen der Pipette lässt sich das vorher durch die Pipette isolierte Membranstück aus der Zellmembran herauslösen, und der Kanal kann so zellfrei gemessen werden.

Dadurch erreicht man entweder eine „inside-out-Konfiguration“, bei der die zytoplasmatische Seite, also die ursprünglich zellinnere Seite des Kanals, zur Badlösung gerichtet ist, oder die „outside-out-Konfiguration“, bei der die extrazelluläre Seite, also die ursprünglich zelläußere Seite des Kanals, zur Badlösung zeigt (Hamill et al., 1981).

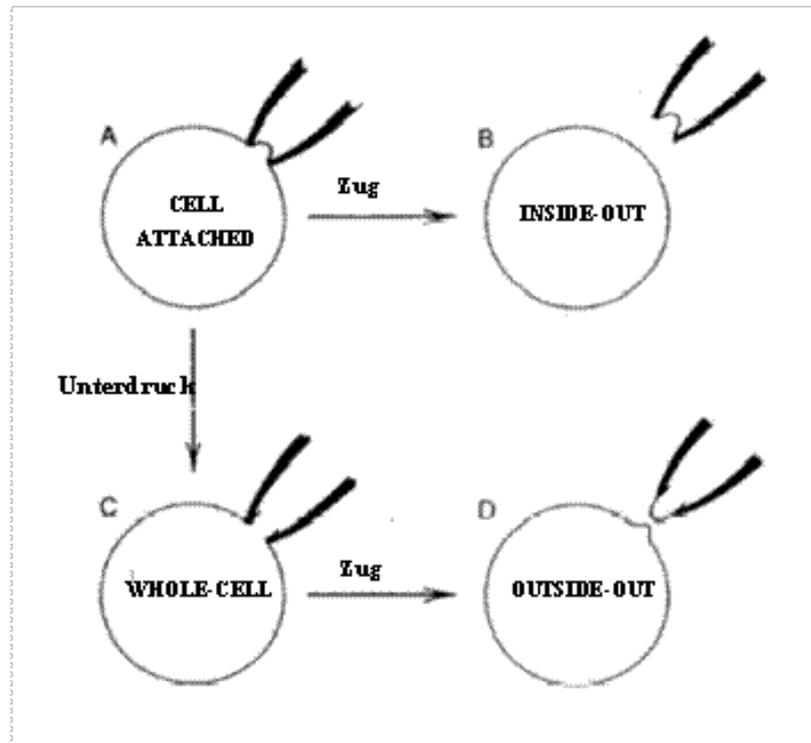


Abbildung 17

Patch-Clamp Konfigurationen. Durch das Anlegen eines leichten Unterdrucks kann dann die Zellmembran rupturiert werden und somit ein Zugang zum Zellinneren erreicht werden (Whole-Cell-Konfiguration) (Fidzinski, 2006).

An der Messanlage lässt sich darüber hinaus mit der „Current-clamp-“ oder der „Voltage-clamp-Technik“ arbeiten.

Die „Current-clamp-Technik“ bedeutet, dass während die Zelle mit bestimmten Stromstärken stimuliert wird, gleichzeitig das Membranpotenzial im Sinne einer Spannung gemessen werden kann.

Bei der in dieser Doktorarbeit benutzten „Voltage-clamp-Technik“ wird hingegen das Membranpotenzial bei einem bestimmten Wert gehalten, während man den fließenden Strom (I_{Ca}) dabei misst.

2.4.1 Versuchsaufbau der Patch-Clamp-Anlage

Für die Versuche wurde ein inverses Mikroskop (Nikon Eclipse TE 200) mit 200-facher Gesamtvergrößerung (20 x Objektiv und 10 x Okular) benutzt. Die zu untersuchenden Zellen sind auf den Böden von Zellkammern fixiert, welche in einer Vertiefung auf dem Objektisch des Mikroskops platziert werden. Der Objektisch ist ein schwingungsgedämpfter Tisch. Dadurch dass die Tischplatte gefedert und

hochgelagert ist und somit ein träges Gewicht darstellt, werden Schwingungen aller Art abgefedert. Am Objektisch sind des Weiteren ein Pipettenhalter mit Pipettenelektrode, ein Anschluss für Über- und Unterdruck sowie der Mikromanipulator fixiert. Der Mikromanipulator wird mittels eines Joysticks dreidimensional im Raum bewegt und ermöglicht somit eine exakte Annäherung an die Zelle mittels der Pipette. Die Pipettenelektrode besteht aus chloriertem Silberdraht und muss die Pipette stabil fixieren sowie gleichzeitig abdichten, damit die Drücke angelegt werden können. Die Pipetten- und die Referenzelektrode (welche in der Badlösung liegt) werden über einen Vorverstärker mit einem Patch-Clamp-Verstärker (EPC 10 von HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) mit integriertem AD/DA-Wandler verbunden. Durch die Verstärker können die empfangenen Signale gefiltert, umgewandelt und verstärkt werden. Im Computer erfolgt die Datenaufnahme durch das Programm Patchmaster 2.0 (HEKA). Umgeben ist das Mikroskop von einem Faraday'schen Käfig. Dieses Metallkonstrukt schirmt den Messplatz gegenüber elektromagnetischen Schwingungen ab, da diese andernfalls die Messergebnisse stören könnten. Alle anderen Netzgeräte sind außerhalb des Käfigs platziert.

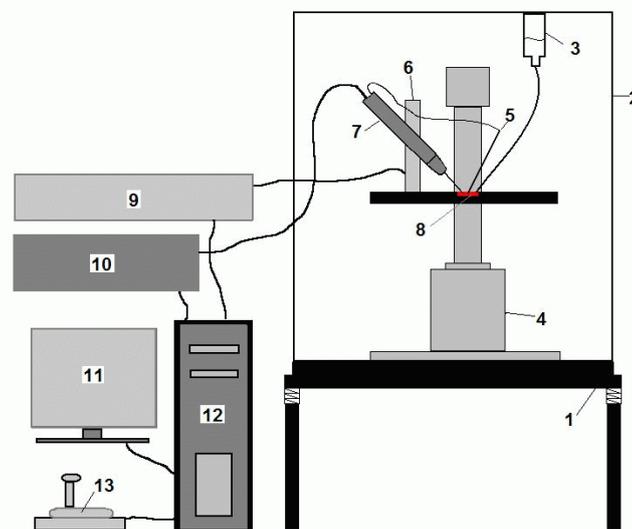


Abbildung 18

Schematischer Aufbau des Patch-Clamp-Setups: **1** Schwingungsgedämpfter Tisch, **2** Faraday Käfig, **3** Zulauf für Badlösung, **4** inverses Mikroskop, **5** Referenzelektrode in Badlösung, **6** Motoreinheit des Mikromanipulators, **7** Vorverstärker (Probe) mit Pipettenhalter und Pipette, **8** Versuchskammer mit Kardiomyozyten, **9** Steuereinheit des Mikromanipulator, **10** Patch-Clamp-Verstärker (Amplifier) mit integriertem AD/DA-Wandler, **11** Bildschirm, **12** Computer, **13** Joystick (Kohlhaas 2006).

2.4.2 Lösungen für die Patch-Clamp-Messungen

Die Zusammensetzungen der in den Versuchsreihen verwendeten Bad- und Pipettenlösungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Badlösung: Die in Zellsuspension befindlichen Zellen wurden in die Versuchskammern eingefüllt und den Zellen ein Zeitraum von ca. 15 Minuten gewährt, um sich auf dem Boden der mit Laminin beschichteten Zellkammer abzusetzen. Nach diesem Zeitraum wurde die überschüssige Zellsuspension verworfen, sodass nur der fixierte Rest in der Kammer verblieb. Die Kammer wurde dann mit einer isotonen Badlösung, einer modifizierten Tyrode, welche der physiologischen Zusammensetzung des Extrazellulärraumes entspricht, aufgefüllt.

Da die Zellmembran nicht für große monovalente Ionen wie Cäsium permeabel ist, wurde Kalium durch dieses ersetzt. Dadurch wurden Leckströme von Kaliumionen durch Kaliumkanäle verhindert.

Der pH-Wert wurde bei Raumtemperatur mit CsOH auf 7,4 eingestellt. Die zweite Badlösung enthielt zusätzlich Isoprenalin (10^{-4} M).

Pipettenlösung: Die Lösung in den Pipetten wurde von der Ionenzusammensetzung so gewählt, dass sie den physiologischen intrazellulären Ionenkonzentrationen ähnelte. Dadurch wurde die Häufigkeit der ausgebildeten Gigaseals gesteigert. Dabei wurde Kalium auch in dieser Lösung durch Caesium ersetzt.

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde auf eine physiologische diastolische Kalziumkonzentration von 100 nmol/l eingestellt. Dabei wurde das Tetra-Cäsiumsalz von BAPTA als langsamer und das Tetra-Kaliumsalz von Br₂-BAPTA als schneller Kalziumpuffer verwendet. Der pH-Wert wurde mit CsOH bei Raumtemperatur auf 7,2 eingestellt.

Außerdem wurde eine Lösung mit einer Kalziumkonzentration von 500 nmol/l verwendet. Damit sollte die Zelle stimuliert werden, bevor das Protokoll durchgeführt wurde.

Nach der Rupturierung der Zellmembran trat die Pipettenlösung mit der Intrazellulärflüssigkeit in Kontakt und beide Flüssigkeiten bildeten eine Einheit. Dabei kam es zu einer partiellen Diffusion der Kalziumionen von der höher konzentrierten Pipettenlösung in die niedriger konzentrierte Badlösung. Durch die Diffusion entstand eine Potenzialdifferenz, da durch die Wanderung der Kalziumionen die Pipettenlösung

negativ und die Badlösung positiv geladen wurde. An dem Punkt, wo beide Lösungen aufeinandertrafen, entstand das "liquid junction potential", eine Potenzialdifferenz. Ziel war es, dass "liquid junction potential" und auch die Leak-Ströme niedrig zu halten. Dies wurde durch den Gigaseal erreicht, weil die Ionen aus Pipetten- und Badlösung dann nur schlecht diffundieren konnten. Gewünscht war dabei ein hoher Serienwiderstand (Series resistance). Nach der Rupturierung der Zellmembran kam es in der "Whole-Cell-Konfiguration" oft zu Leak-Strömen, welche durch undichte Stellen zwischen Zellmembran und Pipettenwand entstanden. Dies spiegelte sich in der Erhöhung des "liquid junction potentials" wider. Der Serienwiderstand fiel dabei ab. Somit konnte durch die drei Parameter "liquid junction arhythm", Leak-Strom und Serienwiderstand, eine Aussage über die Qualität der Verbindung zwischen Zelle und Pipette getroffen werden. Nach der Rupturierung der Zellmembran und dem Erreichen eines Zugangs zum Zellinneren wurde 5 min gewartet, um der Pipettenflüssigkeit und der Intrazellulärflüssigkeit Zeit zur Vermischung zu geben und ein Äquilibrium zu bilden.

Tabelle 2 – Bad- und Pipettenlösungen für die Messung von Kalziumströmen mit der Patch-Clamp-Technik.

Lösung	Ion/Substanz	Konzentration		
Badlösung	NaCl	140	mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; auf pH 7,4 mit CsOH bei RT eingestellt
	CsCl	4	mmol/l	
	MgCl ₂	1	mmol/l	
	Glucose	10	mmol/l	
	HEPES	10	mmol/l	
Badlösung mit Isoprenalin	NaCl	140	mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; auf pH 7,4 mit CsOH bei RT eingestellt
	CsCl	4	mmol/l	
	MgCl ₂	1	mmol/l	
	Glucose	10	mmol/l	
	HEPES	10	mmol/l	
	Isoprenalin	10 ⁻⁴	mmol/l	
Pipettenlösung 100 nmol/l Kalzium	CsCl	86	mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; auf pH 7,2 mit CsOH bei RT eingestellt
	CS-Glutamat	40	mmol/l	
	MgCl ₂	0,92	mmol/l	
	BAPTA x 4 Cs	5	mmol/l	
	Br ₂ -BAPTA x 4 K	1	mmol/l	
	Mg-ATP	5	mmol/l	
	HEPES	10	mmol/l	
	CaCl ₂	1,65	mmol/l	
Pipettenlösung 500 nmol/l Kalzium	CsCl	86	mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; auf pH 7,2 mit CsOH bei RT eingestellt
	CS-Glutamat	40	mmol/l	
	MgCl ₂	0,92	mmol/l	
	BAPTA x 4 Cs	5	mmol/l	
	Br ₂ -BAPTA x 4 K	1	mmol/l	
	Mg-ATP	5	mmol/l	
	HEPES	10	mmol/l	
	CaCl ₂	3,75	mmol/l	

2.4.3 Pipetten und Elektroden

Für die Herstellung der Pipetten wurden Glaspipetten (World Precision Inc.) genutzt, welche einen Außendurchmesser von 1,5 mm, einen Innendurchmesser von 1,12 mm und eine Länge von 76 mm hatten. Als Material wurde Borsilikatglas gewählt, welches das elektrische Hintergrundrauschen bedingt durch Kanäle in der Zellmembran minimierte. Die Pipetten wurden durch ein Pipettenziehgerät der Firma Zeitz-Instruments (DMZ Universal Puller) in einem zweistufigen Prozess in der Horizontalen durch Hitze geformt. Dabei entstanden aus einer Glaskapillare zwei Pipetten, deren Spitzen konisch zuliefen. Durch Veränderung der verschiedenen Parameter am Pipettenziehgerät konnten die Hitze, das Zugintervall sowie die Zugkraft so eingestellt

werden, dass die Form und die Eigenschaften der Pipetten optimal gewählt werden konnten.

Nach dem Befüllen der Pipetten und Eintauchen der Spitze in die Badlösung sollte der initiale Pipettenwiderstand bei ca. 2-3 M Ω liegen. Dabei musste ein Mittelweg zwischen Pipettenspitzen Durchmesser und dem initialen Widerstand gefunden werden. Je größer der Pipettendurchmesser desto niedriger war der initiale Pipettenwiderstand und desto schwieriger war die Erzeugung eines Gigaseals.

Jede Pipette wurde frisch vor der Messung gezogen und nur einmal benutzt, da die Pipetten für das Erreichen eines Gigaseals frei von jeglicher Verschmutzung sein mussten. Als Elektrode für die Pipette wurde ein chlorierter Silberdraht verwendet, welcher die Pipettenlösung mit dem Verstärker verband. Für die Badelektrode wurde ebenfalls ein chlorierter Silberdraht benutzt, der den Erdleiter mit der Badlösung verband. Beim Eintauchen beider Elektroden in die Badlösung sollte die Potenzialdifferenz Null betragen. Eventuelle Schwankungen konnten durch den Verstärker kompensiert werden.

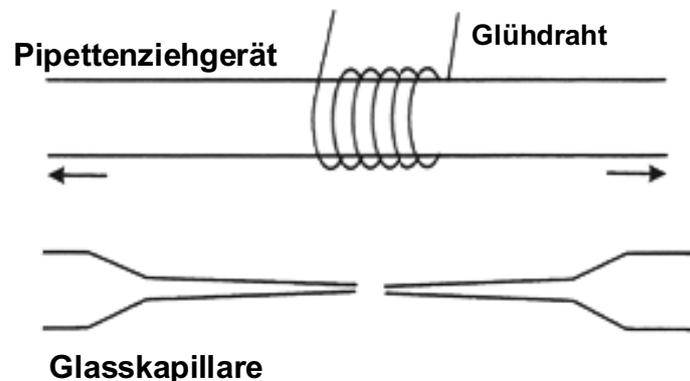


Abbildung 19

Das Prinzip des Pipettenziehgeräts (Rasenack 2006).

2.4.4 Versuchsdurchführung

Die Versuchskammer, mit den durch Laminin fixierten und sich in Badlösung befindlichen Zellen, wurde in der Mitte des Objektisches platziert. In die untere Ecke der Kammer wurde die Badelektrode in die Badlösung getaucht. Unter dem inversen Mikroskop wurde nach einer stabilen Zelle gesucht, die sich nicht unregelmäßig kontrahierte und eine regelmäßige Kontur und Querstreifung hatte. Wenn man eine

solche Zelle gesichtet hatte, wurde eine frisch gezogene Pipette mit der Pipettenlösung gefüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Dabei wurde die Spitze der Pipettenelektrode in die Flüssigkeit eingetaucht. Danach wurde ein leichter Überdruck angelegt, um einerseits ein Verschmutzen der Pipettenspitze zu verhindern, zum anderen half das so erzeugte Druckpolster sich der Zellmembran anzunähern. Die Pipette wurde dann mittels des Mikromanipulators zur Oberfläche dirigiert und langsam unter Sichtkontrolle in die Badlösung eingetaucht. Beim Eintauchen der Pipette in die Badlösung floss kein Strom zwischen offener Elektrode und der Badlösung. Am Computerbildschirm wurde deshalb der Nullwert des Potentials festgelegt. Auf dem Bildschirm war dann ein rechteckiger, biphasischer Kommandostromtestpuls zu sehen. Unter Sicht wurde nun die Pipettenspitze sehr langsam mittels des Mikromanipulators der Zelle angenähert. Dabei wurde der Computerbildschirm weiter beobachtet. Wenn die Pipettenspitze sich sehr nah vor der Zellmembran befand, kam es zu einer Erhöhung des Widerstandes auf das Doppelte, was mit einer Abnahme der Stromamplitude einherging.

Um den finalen Kontakt herzustellen, wurde der Unterdruck weggenommen und gegebenenfalls ein leichter Überdruck angelegt, bis es zu einem Gigaseal kam. Gigaseal bedeutet, dass der Kontakt zwischen Pipette und Zelle so eng ist, dass fast kein Strom mehr fließen kann, der Widerstand maximal groß ist und er sich im GΩ-Bereich befindet. Auf dem Computerbildschirm konnte beobachtet werden, dass der Kommandostrompuls zu einer geraden, nicht wandernden Linie wurde. Es wurde dann in den on-cell Modus geschaltet. Dann wurde die Zellmembran in der Pipettenspitze durch das ruckartige Anlegen eines Unterdrucks rupturiert. Somit wurde die „Whole-Cell-Konfiguration“ erreicht. Wichtig war dabei, den Serienwiderstand zu beobachten, welcher sich bei unter 20 MΩ befinden sollte. In dieser Konfiguration konnten nun Ströme und Spannungen an der Zellmembran gemessen werden. Nach einer kurzen Wartezeit von fünf Minuten, um der Pipettenlösung Zeit für deren Vermischung mit der Intrazellulärflüssigkeit zu geben, begannen die eigentlichen Messungen.

2.4.5 Protokolle

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels „Whole-Cell-Konfiguration“ an ventrikulären Kardiomyozyten der Maus der Kalziumstrom (I_{Ca}) des LTCCs gemessen. Zur Messung der Strom-Spannungs-Beziehung wurde das IV-Protokoll benutzt. Man ging dabei von

einem Membranpotenzial von -90 mV aus. Zuerst wurde, um die Natriumkanäle zu aktivieren und zu deaktivieren, die Zelle für 50 ms auf -45 mV depolarisiert. Danach begann die Messung im Rahmen des eigentlichen Protokolls. Es fand erneut eine Depolarisation statt, um den LTCC zu aktivieren und den I_{Ca} zu messen. Dabei wurde in 20 Durchläufen das Membranpotenzial in 5 mV-Schritten von -40 mV auf +60 mV angehoben. Zwischen den einzelnen Durchläufen wurde jeweils eine Ruhepause von 1 ms bei -90 mV eingelegt, um den Kalziumkanälen Zeit zu deren Erholung zu geben und inaktivierte Kalziumkanäle wieder aktivierbar zu machen. Der gemessene Strom (I_{Ca}) kann aber nicht als absolute Zahl genommen werden, sondern muss an die Membrankapazität der einzelnen Zelle normalisiert werden ($A/F = \text{Stromamplitude/Zellkapazität}$). Das Ergebnis wurde dann gemäß der Strom-Spannungs-Kurve im Verhältnis zur Membranspannung aufgetragen.

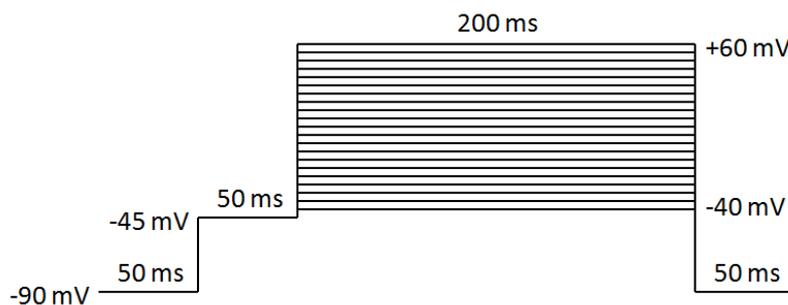


Abbildung 20

Das IV- Protokoll.

2.5 Datenerfassung und Statistik

Für die Datenerfassung wurden verschiedene Computerprogramme genutzt. Die erfassten Ströme der Patch-Clamp-Messungen wurden mit dem Computerprogramm Patchmaster 2.0 (HEKA) erfasst und als ITX-Dateien gespeichert. Es wurden die verwertbaren Daten herausselektiert und mit dem Programm Clampfit (Axon Instruments) weiterbearbeitet, indem sie in ein ABF-Format umgewandelt wurden (ABF File Utility v2.1.76 by Justin Lee). In Exceldateien wurden die Daten gesammelt und miteinander verglichen. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die statistischen Analysen erfolgten mittels t-Test, Einweg- bzw. Zweiweg-

ANOVA (one-way or two-way analysis of variance), da immer eine Normalverteilung vorlag. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (zweiseitig) wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle Abbildungen zeigen die Mittelwerte der gesammelten Daten. Dabei wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) als Fehlerbalken dargestellt.

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

σ = Standardabweichung; σ^2 = Varianz; n = Anzahl der Beobachtungen

2.5.1 Datenauswertung zum Aktivierungsverhalten des LTCCs

Die erfolgten Messungen wurden unter Voltage-clamp-Bedingungen durchgeführt. Dabei wird verhindert, dass sich das Membranpotenzial ändert. Somit wird nur der Strom, der über die Membran fließt, gemessen. Um den fließenden Strom zu messen, wird ihm ein genauso grosser Kompensationsstrom entgegengesetzt. Der Kompensationsstrom wird vom Verstärker erzeugt. Erzeugt wird er dadurch, dass dem Membranpotenzial ein Kommando- oder Sollpotenzial entgegengesetzt wird. Wenn eine Differenz zwischen Kommando- und Membranpotenzial auftritt, erzeugt der Verstärker eine Spannung die proportional zur Differenz ist. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird, der Differenz entsprechend, ein entgegengesetzter Strom erzeugt. Dieser wird als Kompensationsstrom bezeichnet. Der ermittelte Messstrom lässt Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Kanäle zu. Grundlage für die Messungen ist das Ohmsche Gesetz, wobei die Zellmembran die Eigenschaft des Widerstands (Ω) besitzt:

$$U = R \times I$$

Für die Messung eines Ionenkanalstroms bei vorgegebener Spannung wird die Gleichung umgestellt:

$$U = R \times I \Leftrightarrow I = U / R = U \times g$$

wobei g der Kehrwert von R ist ($g = 1/R$) und damit ein Maß für die Leitfähigkeit darstellt (Siemens Einheit (S)).

In den durchgeführten Experimenten ist I (Stromstärke) eine registrierte Messgröße; U (Spannung) ist die Differenz zwischen dem Kommandostrom ($U_{\text{Kommandostrom}}$) und dem Gleichgewichtspotenzial der Zellmembran (E_{Membran}) für die Ionen, welche den Strom führen, der gemessen werden sollen.

Daraus ergibt sich:

$$g = I / (U_{\text{Kommandostrom}} - E_{\text{Membran}})$$

E_{Membran} entspricht dabei dem Gleichgewichtspotenzial des gemessenen Ions.

Dies lässt sich durch die Nernst Gleichung herleiten.

$$\text{Nernst-Gleichung: Gleichgewichtspotenzial}_{\text{Calcium}} = \frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{[Ca^{++}]_o}{[Ca^{++}]_i},$$

$$R \left[\frac{J}{K \cdot mol} \right] = \text{allgemeine Gaskonstante}$$

$$F \left[\frac{A \cdot s}{mol} \right] = \text{Farraday Konstante}$$

$$T [K] = \text{absolute Temperatur}$$

$$[Ca^{++}]_o \left[\frac{mol}{l} \right] = \text{extrazelluläre Kalziumkonzentration}$$

$$[Ca^{++}]_i \left[\frac{mol}{l} \right] = \text{intrazelluläre Kalziumkonzentration}$$

Die Nernst-Gleichung kombiniert das elektrische und das chemische Potenzial.

Für das Gleichgewichtspotenzial gilt wie bereits oben erwähnt, dass es sich aus dem elektrochemischen Potenzial errechnet, also aus der Differenz zwischen Membranpotenzial und Gleichgewichtspotenzial. Dabei ist die elektrochemische Potenzialdifferenz, in diesem Falle für Kalzium, gleich Null. Das bedeutet, dass die elektrische und chemische Triebkraft sich zwar entgegengesetzt verhalten, aber gleich groß sind. Die Ionen sind dann im Äquilibrium und können berechnet werden.

Mit diesen Werten ist es dann möglich, bei einer gegebenen $U_{\text{Kommandostrom}}$ die Leitfähigkeit g zu berechnen. Das ermittelte Ergebnis spiegelt die Zahl aller geöffneten Ionenkanäle wider.

Um die relative Leitfähigkeit des LTCCs darzustellen, wurde aus den IV-Graphen das Umkehrpotenzial abgelesen. Dabei ist das Umkehrpotenzial definiert als das Potenzial, bei dem sich die Fließrichtung eines Ions über die Zellmembran umkehrt. Dabei ändert sich beim Ablesen der Daten von den IV-Graphen das Vorzeichen. Anschließend wird die Leitfähigkeit nach der oben beschriebenen Formel bestimmt.

$$g = I / (U_{\text{Kommandostrom}} - E_{\text{Membran}})$$

Die Abbildungen der Strom-Spannungskurven des LTCCs im Ergebnisteil beziehen sich auf das Membranpotenzial zwischen -60 mV bis +20 mV, da die maximale Leitfähigkeit bereits bei -5 mV erreicht wird.

Die Werte der Leitfähigkeit wurden durch nonlinear curve fitting unter Verwendung der Boltzmann-Gleichung berechnet:

$$G = G_{\text{max}} / (1 + \exp (V_{0.5,\text{act}} - V_m) / k_{\text{act}})$$

Dabei ist G_{max} die maximale Leitfähigkeit, V_m das Membranpotential und k_{act} die Steigung der Aktivierungskurve (slope) (Kudrnac et al. 2009).

2.5.2 Datenauswertung zur Inaktivierungskinetik des LTCCs Tau (τ)

Um das Inaktivierungsverhalten des LTCCs zu bestimmen, wurden die Inaktivierungszeitkonstanten $\tau_{\text{schnell/fast}}$ ($T_{\text{schnell/fast}}$) und $\tau_{\text{langsam/slow}}$ ($T_{\text{langsam/slow}}$) ermittelt.

Mittels des Computerprogramm ClampFit (Axon Instruments) wurde bei jeder aufgezeichneten Messung eine Kurvenapproximation („Curve Fitting“) durchgeführt und mittels einer bi-exponentiellen Funktion der Parameter Tau berechnet. Dabei wird die Funktion, die Tau approximiert, zweimal integriert und dann sowohl für τ_{schnell} als auch für τ_{langsam} aufgelöst.

$$f(t_i) = a_0 + a_1 e^{-t_i/\tau_{\text{schnell}}} + a_2 e^{-t_i/\tau_2}$$

Dabei ist t die Zeit, a_1 und a_2 die Amplituden der inaktivierenden Stromkomponente in pA zum Zeitpunkt $t=0$, a_0 ist eine Konstante, $f(t_i)$ ist das gemessene Signal, d.h. in diesem Fall die Stromamplitude in pA.

2.6 Pharmakologische Intervention

Das synthetische Isoprenalin (Isoproterenol) aktiviert als adrenalinähnliche Substanz β -Adrenorezeptoren und gehört aufgrund dieser Eigenschaft zur Wirkstoffklasse der Sympathomimetika. Am Herzen bewirkt die Substanz vor allem über eine Aktivierung der β_1 -Adrenorezeptoren eine Zunahme der Chronotropie und der Inotropie. Der systolische Blutdruck steigt, wobei der diastolische abfällt, und es somit insgesamt zu einer Senkung des MAD (mittlerer arterieller Druck) kommt. Nach Andocken an die Rezeptoren wird eine Kaskade in Gang gesetzt. Primär wird das Enzym Adenylatcyclase aktiviert, welches für die Bildung von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) katalytisch verantwortlich ist. Der Konzentrationsanstieg von cAMP führt zur Aktivierung von Proteinkinase A (PKA), welche die spannungsabhängigen Kalziumkanäle phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung der Kanäle kommt es während der Depolarisation zu einem vermehrten Kalziumeinstrom in die Zelle, was zu einer erhöhten Herzkontraktilität führt. Des Weiteren führt Isoprenalin am AV-Knoten zu einer erhöhten Dromotropie.

Mit einer Konzentration von 10^{-4} mmol/l Isoprenalin in der Badlösung wurden die Zellen vor Beginn der Messungen stimuliert. Auffällig war dabei unter dem Mikroskop die sofortige Zunahme der Kontraktion und die Instabilität der Zellen. Die Messung gestaltete sich somit schwieriger.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des LTCCs in isolierten Kardiomyozyten von genetisch veränderten Mäusen, wobei nur männliche Mäuse verwendet wurden, miteinander verglichen.

Bei diesen handelte es sich um die folgenden Genotypen: homo/het, homo/wt, wt/het und wt/wt. Dabei bezieht sich der jeweils erste Terminus auf das CASK-Gen flox und ist entweder beim Wildtyp (WT) nicht genetisch modifiziert oder beim homozygoten Typ (homo) auf beiden Allelen gefloxed (Erklärung siehe 2.2). Der zweite Terminus bezieht sich auf die Cre-Rekombinase, welche in den Wildtyp (wt) nicht eingebracht wurde. Im Gegensatz dazu wurde sie in spezifische Zellen des heterozygoten Typus (het), in diesem Fall Herzzellen, eingebracht. Cre-Rekombinase ist zuständig für das Herausschneiden des mit flox markierten Gens (weitere Erklärung siehe 2.2). Ein homozygoter-Typ für cre sollte nicht gezüchtet werden, da eine so massive Überexpression der Cre-Rekombinase nachteilige Auswirkungen auf wichtige Zellfunktionen hat.

3.1 Auswertung biometrischer Daten

3.1.1 Herz- und Körpergewichtsverhältnisse der Wildtyp- (WT), der Knock-out- (CASK KO), und der Kontrollgruppen-Mäuse (CASK CTRL und CASK Flox)

Um zu testen, ob es zwischen den einzelnen Genotypen der untersuchten Mäuse Unterschiede bezüglich ihres Herzgewichts (HG), Körpergewichts (KG) und des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht (HG/KG) gibt, wurde der jeweilige Mittelwert mit SEM bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Herzgewichte der WT- und CASK Flox-Mäuse im Vergleich zu CASK CTRL-Mäusen signifikant vermindert waren. Die Körpergewichte zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch im Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht zeigte sich zwischen den Gruppen keine signifikante Abweichung (Tab. 3).

Tabelle 3 - Herz- und Körpergewichte der untersuchten Mäuse.

Genotyp (N)	Herzgewicht (HG) [mg]	Körpergewicht (KG) [g]	Verhältnis (mg HG/g KG)
WT/WT (16)	193,31±7,57*	26,49±0,88	7,29±0,16
CASK Flox (19)	190,50±7,41*	25,98±1,16	7,4±0,26
CASK KO (19)	219,05±11,12	28,22±1,15	7,83±0,3
CASK CTRL (8)	239,22±14,26	30,43±1,56	7,87±0,26

N: Anzahl der Mäuse; angegeben sind jeweils Mittelwerte ± SEM; (* p<0.05 vs. CASK CTRL)

3.1.2 Grösse der gemessenen Zellen bestimmt über die Membrankapazität

Um auszuschließen, dass innerhalb einer Gruppe nur kleine oder große Zellen gemessen wurden, wurde für jede untersuchte Zelle in der whole-cell-Patch-Clamp Messung die Membrankapazität (C_m) bestimmt. Die Membrankapazität ist ein Parameter für die Grösse einer Zelle, da sie sich proportional zur Fläche der Zellmembran verhält ($1 \text{ pF} \approx 1 \text{ } \mu\text{m}^2$) (Penner und Neher 1989). Je größer die Membrankapazität, desto größer ist die Zelle.

Die Membrankapazität der verschiedenen aus den unterschiedlichen Maus-Genotypen isolierten Kardiomyozyten ist in Tab. 4 aufgeführt. Die Messungen erfolgten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

Tabelle 4 – Membrankapazitäten für die I_{Ca} -Messungen.

Genotyp (N)	Membrankapazität [pF]
WT/WT (8)	267,76±30,95
WT/WT (11) mit erhöhtem Ca^{2+}	235,90±12,5
WT/WT (6) mit Isoprenalin	267,3±28,65
CASK KO (11)	251,63±15,42
CASK KO (8) mit erhöhtem Ca^{2+}	221,02±18,45
CASK KO (8) mit Isoprenalin	227,54±17,35
CASK CTRL (11)	270,46±30,37
CASK CTRL (7) mit erhöhtem Ca^{2+}	287,87±25,77
CASK CTRL (9) mit Isoprenalin	234,81±24,25
CASK Flox (9)	245,14±15,37
CASK Flox (5) mit erhöhtem Ca^{2+}	222,32±27,15
CASK Flox (5) mit Isoprenalin	252,97±27,22

N: Anzahl der Messungen; angegeben sind jeweils Mittelwerte \pm SEM

Mit der Einweg-ANOVA wurde gezeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Membrankapazitäten bei den einzelnen Kardiomyozytentypen gab. Das bedeutet, dass alle nachfolgenden präsentierten Veränderungen und Ergebnisse bezüglich der LTCCs nicht auf unterschiedlichen Zellgrößen innerhalb der einzelnen Gruppen beruhen.

3.2 Die Effekte des CASK KO auf den LTCC

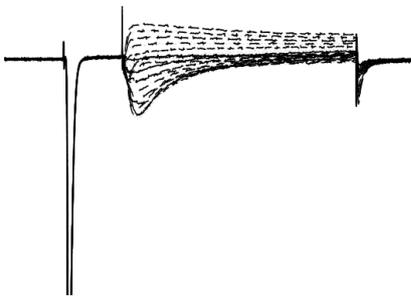
3.2.1 Veränderung des I_{Ca} bei CASK KO-, CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter basalen Messbedingungen

Um das veränderte Verhalten des LTCCs zu untersuchen, wurde die CASK KO-Gruppe der CASK CTRL- und der CASK Flox-Gruppe gegenübergestellt. Dabei wurde eine intrazelluläre physiologische diastolische Kalziumkonzentration von 100 nmol/l in dem Messprotokoll verglichen.

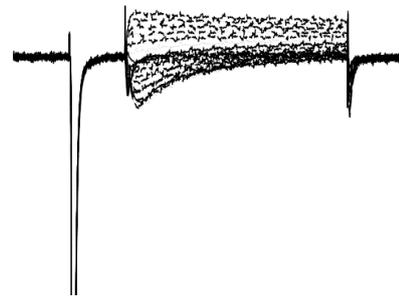
Bei verschiedenen Testspannungen wurden die Stromamplituden gemessen. Dies ergibt die Strom-Spannungs-Beziehung. Die Strom-Spannungskurve beschreibt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von I_{Ca} . Dabei ist die Amplitude von I_{Ca} ein Maß für die Dichte der Kalziumkanäle, da diese im Bezug zur Zellkapazität steht. Die Einheit der Stromdichte ist A/F.

Die Originalregistrierungen sind in Abb. 21 dargestellt.

CASK CTRL



CASK KO



CASK Flox

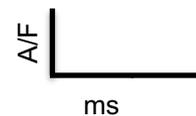
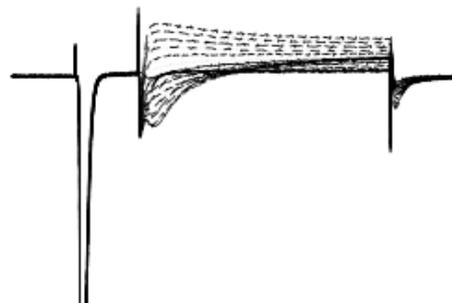


Abbildung 21

Originalregistrierungen von I_{Ca} in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten in Gegenwart von Kalzium. Kalzium in der Pipettenlösung 100 nmol/l, die x-Achse zeigt den Zeitverlauf in Millisekunden, die y-Achse die Stromstärke in Ampere auf die Membrankapazität in Farad genormt.

In der Strom-Spannungsbeziehung zeigten sich keine signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 22).

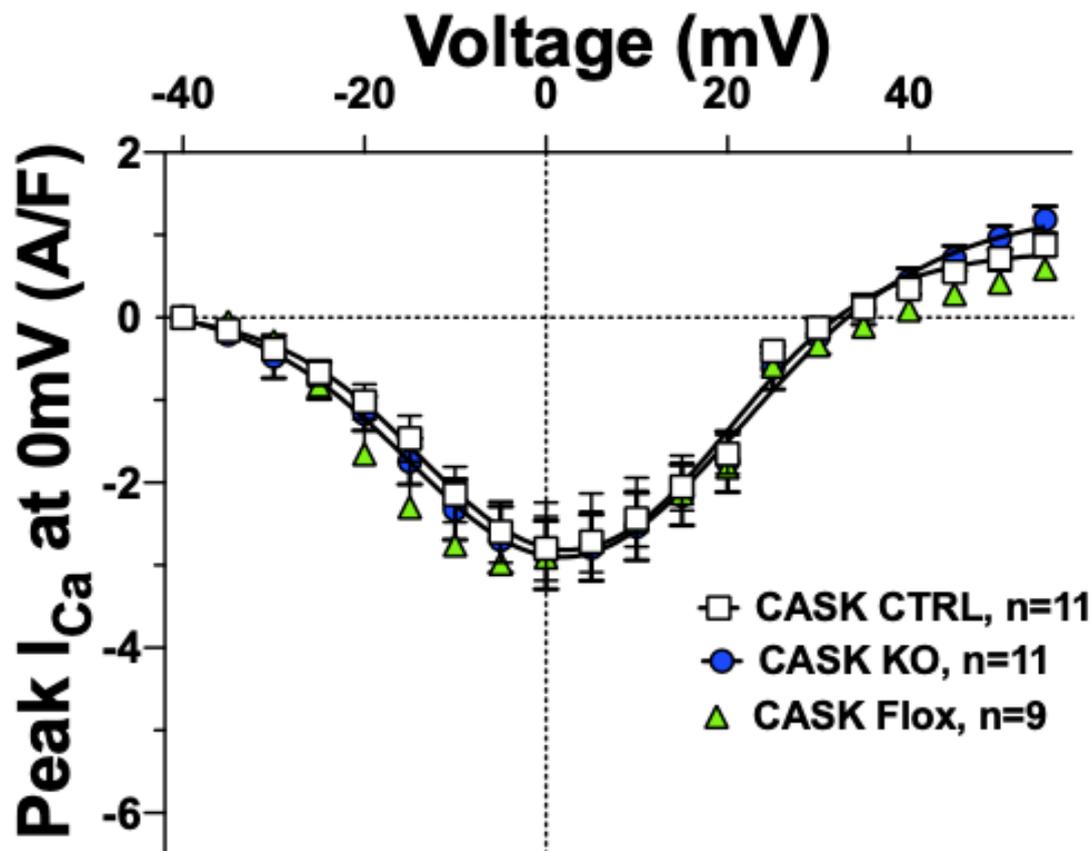


Abbildung 22

Stromspannungsbeziehung des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter basalen Messbedingungen. Kalzium in der Pipettenlösung 100 nmol/l, die x-Achse zeigt die Spannung in mV, die y-Achse beschreibt den Peak I_{Ca} bei 0 mV (A/F), d.h. die Stromstärke in Ampere auf die Membrankapazität in Farad genormt.

3.2.2 Öffnungsverhalten des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter basalen Messbedingungen

Wie unter 2.5.2 beschrieben wird das Inaktivierungsverhalten des LTCCs über die Inaktivierungszeitkonstanten τ_{schnell} ($T_{\text{schnell/fast}}$) und τ_{langsam} ($T_{\text{langsam/slow}}$) bestimmt. Dabei beschreibt τ die Zeit (s), nach der der LTCC sich schließt. Es wird dabei zwischen den sich schnell (fast) und langsam (slow) schließenden Kanälen unterschieden. τ ist eine Zeitkonstante der Inaktivierung von I_{Ca} .

Beim Vergleich von CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten zeigten sich bei den basalen Messungen keine signifikanten Unterschiede sowohl für die schneller schließenden (T_{fast}) als auch für die langsamer schließenden (T_{slow}) Kanäle (Abb. 23, 24).

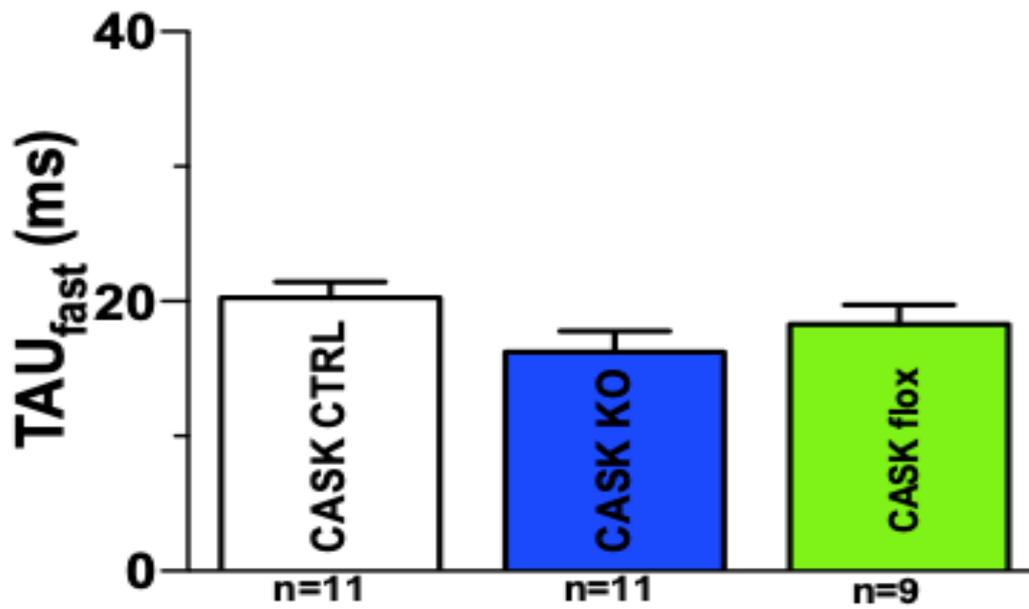


Abbildung 23

Schnelle Inaktivierung (T_{fast}) unter basalen Messbedingungen. Mittelwerte \pm SEM. Die y-Achse beschreibt die Dauer in ms.

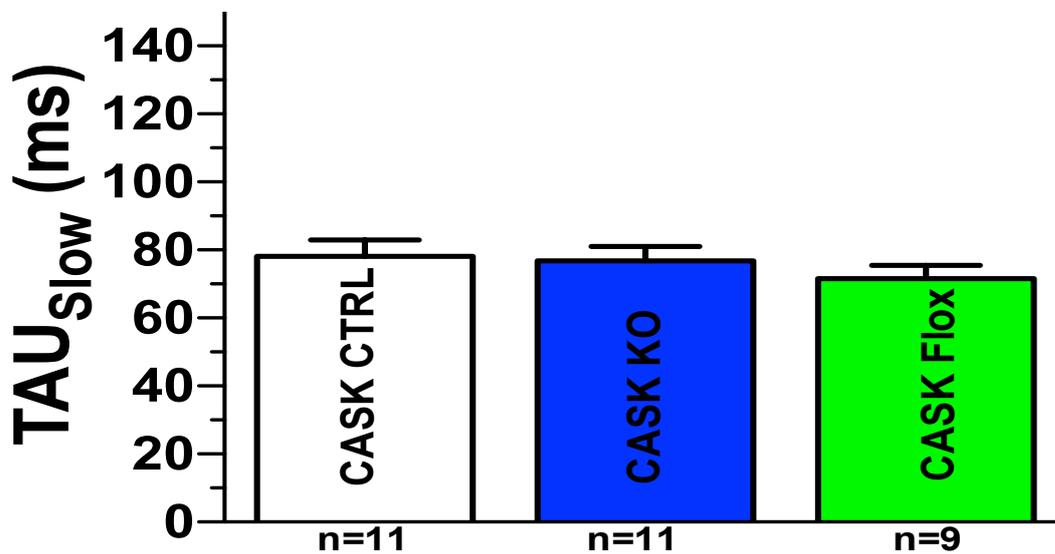


Abbildung 24

Langsame Inaktivierung (T_{slow}) unter basalen Messbedingungen. Mittelwerte \pm SEM. Die y-Achse beschreibt die Dauer in ms.

3.2.3 Leitfähigkeit des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter basalen Messbedingungen

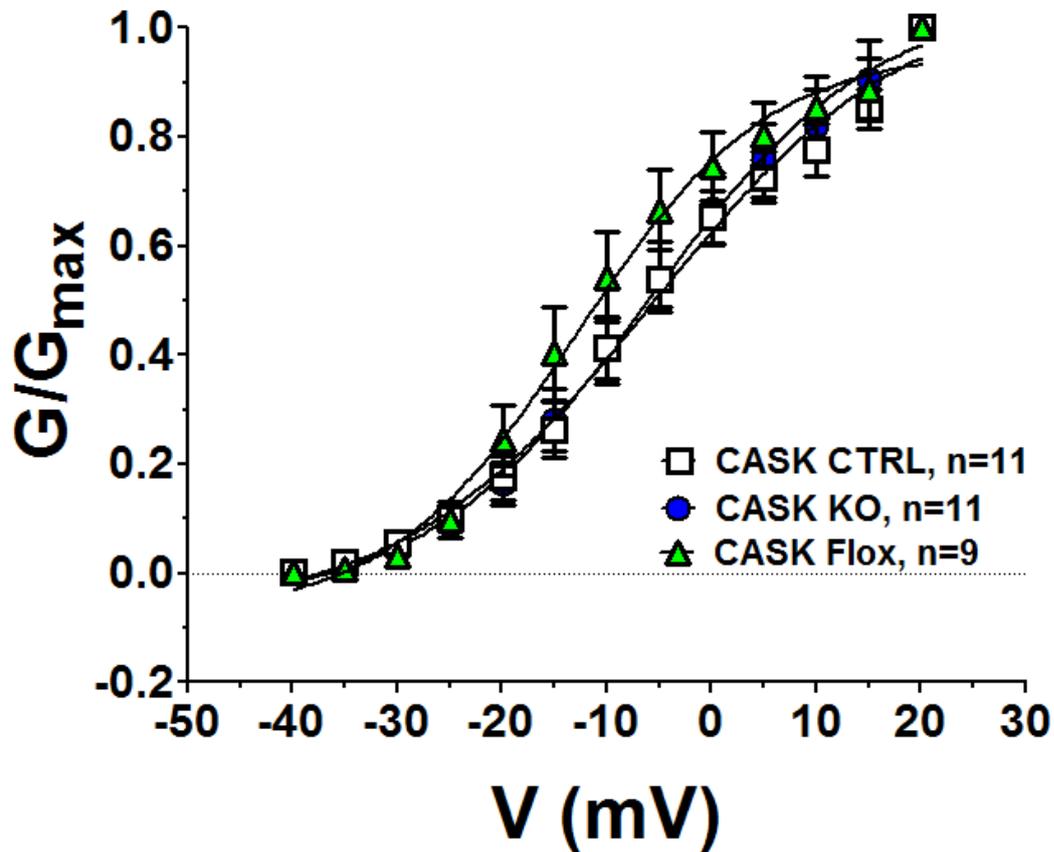


Abbildung 25

Leitfähigkeit des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter basalen Messbedingungen. Kalzium in der Pipettenlösung 100 nmol/l, die x-Achse zeigt die Spannung in mV, die y-Achse beschreibt G/G_{max} . G/G_{max} ist das Verhältnis der Leitfähigkeit (G) zur maximalen Leitfähigkeit (G_{max}) aufgetragen gegen die ausgelöste Membranspannung (mV).

In den basalen Messungen erkennt man eine Linksverschiebung bei CASK Flox gegenüber CASK CTRL und CASK KO. Das heißt, dass das Potential bei dem bereits die Hälfte des maximalen Stroms ($V_{1/2}$) fließt, schon bei negativeren Membranpotentialen erreicht wird. Bei CASK CTRL lag der $V_{1/2}$ -Wert -5.71 ± 1.98 mV (n=11), bei CASK KO lag der Wert bei -6.14 ± 2.03 mV und bei CASK Flox lag der Wert bei -12.83 ± 1.77 . Es zeigt sich eine signifikante Änderung des halbmaximalen Aktivierungspotentials bei CASK Flox im Vergleich zu CASK CTRL und CASK KO.

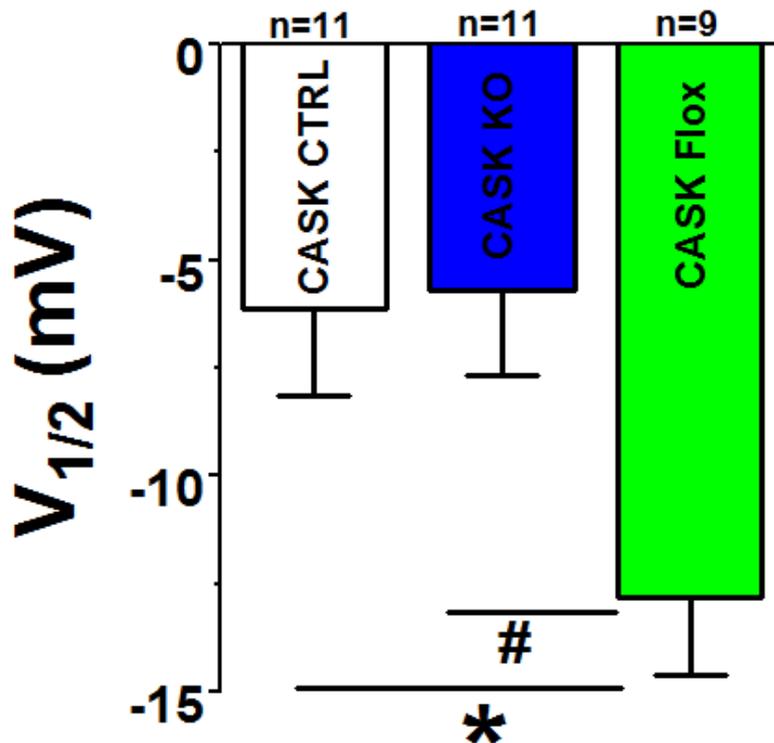


Abbildung 26

Aufgetragen sind die gemittelten Werte des $V_{1/2}$ unter basalen Messbedingungen. Es zeigt sich die Verfügbarkeit der Kanäle $V_{1/2}$ bei CASK Flox signifikant bei negativerem Potential im Vergleich CASK CTRL und CASK KO. (* Einweg-ANOVA $p < 0.05$ CASK Flox vs. CASK CTRL; # Einweg-ANOVA $p < 0.05$ CASK Flox vs. CASK KO)

3.3 Die Bedeutung von CASK bei der β -adrenergen Regulation des LTCCs

3.3.1 Veränderung des I_{Ca} bei CASK KO-, CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Isoprenalin und in Gegenwart von Kalzium (100 nM)

Im Vergleich zu CASK CTRL gab es unter basalen Messbedingungen keinen Unterschied in der Peak- I_{Ca} der CASK KO-Myozyten (siehe Abbildung 22). Interessanterweise war die Aktivierung von I_{Ca} bei Exposition von Isoprenalin erhöht und die Inaktivierung in CASK KO-Myozyten verlangsamt oder verzögert.

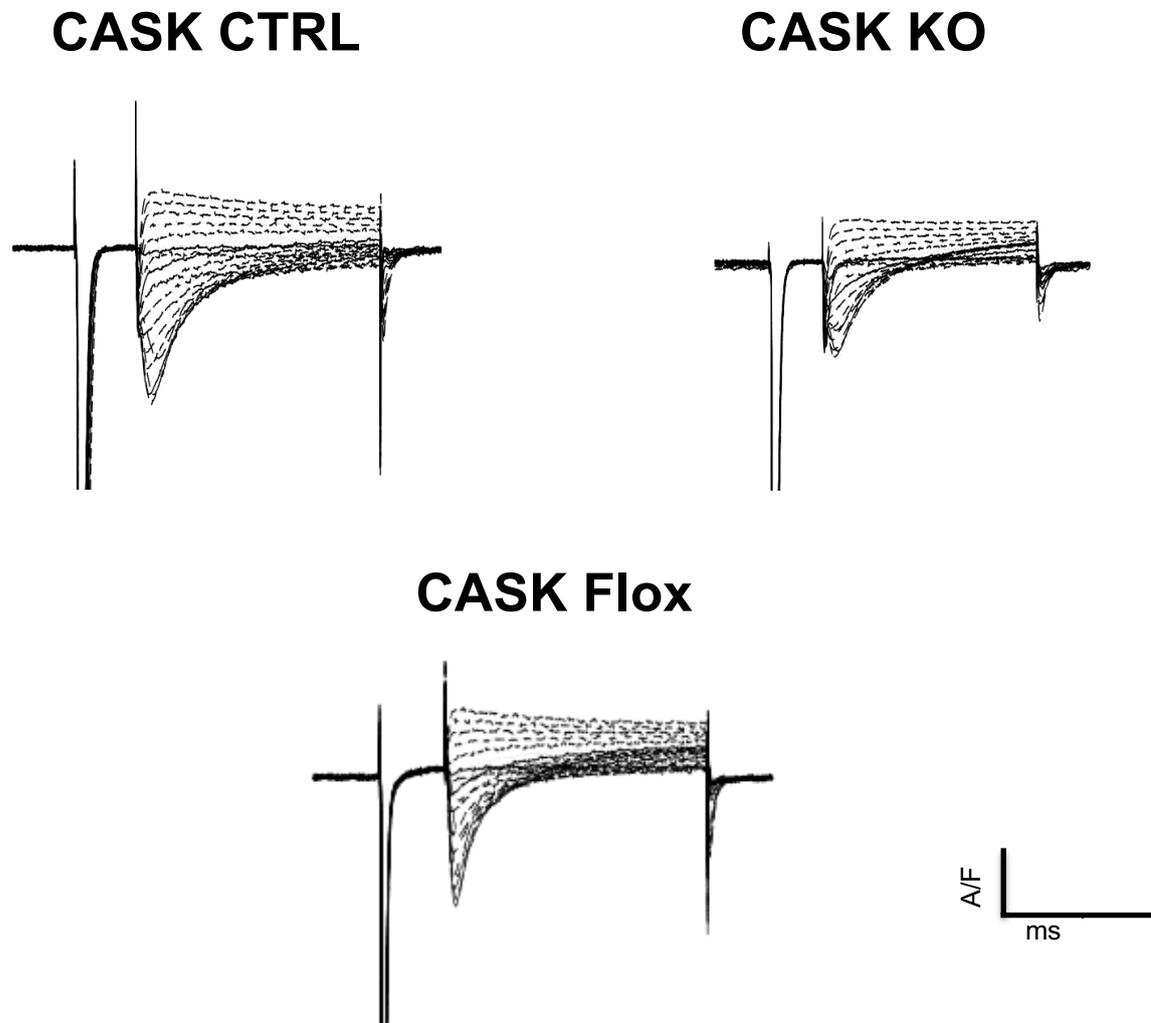


Abbildung 27

Originalregistrierungen von I_{Ca} in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Stimulation mit Isoprenalin. Badlösung mit Isoprenalin 10^{-4} mmol/l, Kalzium in der Pipettenlösung 100 nmol/l, die x-Achse zeigt den Zeitverlauf in Millisekunden, die y-Achse die Stromstärke in Ampere auf die Membrankapazität in Farad genormt.

Isoprenalin konnte in den CASK KO-Kardiomyozyten die Stromstärke am LTCC im Vergleich zu den CASK CTRL-Kardiomyozyten signifikant beeinflussen (Abb. 26).

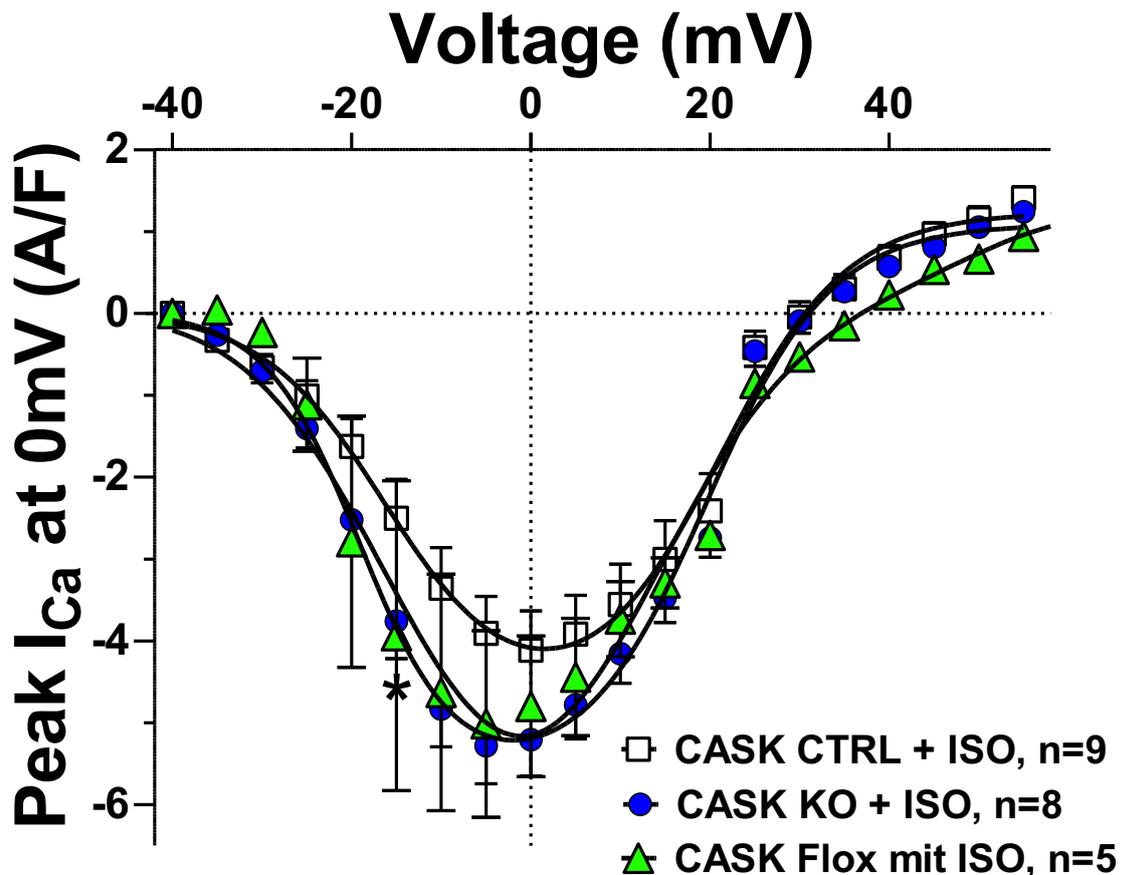


Abbildung 28

Stromspannungsbeziehung des LTCC in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Stimulation mit Isoprenalin. Badlösung mit Isoprenalin 10^{-4} mmol/l, Kalzium in der Pipettenlösung 100 nmol/l, die x-Achse zeigt die Spannung in mV, die y-Achse beschreibt den Peak I_{Ca} bei 0 mV (A/F), d.h. die Stromstärke in Ampere auf die Membrankapazität in Farad genormt. (* Zweiweg-ANOVA $p < 0.05$)

3.3.2 Öffnungsverhalten des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Isoprenalin

Isoprenalin (10^{-4} mmol/l) führt bei den CASK CTRL-Kardiomyozyten zu einer leichten Verlangsamung, bei den CASK-KO-Kardiomyozyten im Vergleich zu den Basalmessungen ohne Isoprenalin (Abb. 23) zu einer deutlicheren Verlangsamung der schnellen Inaktivierung.

Vergleicht man nur die mit Isoprenalin behandelten Gruppen, ist die schnelle Inaktivierung bei Kardiomyozyten ohne CASK (CASK KO) signifikant verlangsamt im Vergleich zu CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten (Abb. 29).

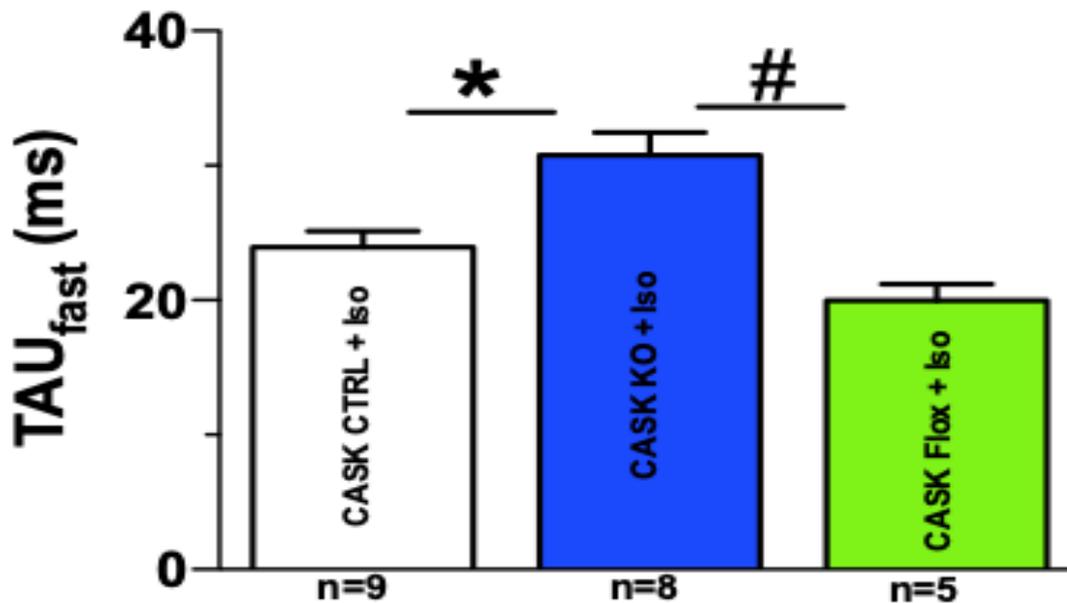


Abbildung 29

Schnelle Inaktivierung (T_{fast}) unter Stimulation mit Isoprenalin. Mittelwerte \pm SEM, Badlösung mit Isoprenalin 10^{-4} mmol/l, Kalzium in der Pipettenlösung 100 nmol/l. Die y-Achse beschreibt die Dauer in ms. (* Einweg-ANOVA $p < 0.05$, mehrfaktoriell, # Einweg-ANOVA $p < 0.05$, mehrfaktoriell)

Isoprenalin führt bei allen untersuchten Kardiomyozyten im Vergleich zu den Basalmessungen ohne Isoprenalin (Abb. 24) erwartungsgemäß zu einer verlangsamt langsamen Inaktivierung.

Vergleicht man nur die mit Isoprenalin inkubierten Gruppen, zeigt sich eine signifikante Isoprenalin -bedingte Verlangsamung der langsamen Inaktivierung bei CASK KO-Kardiomyozyten im Vergleich zu CASK CTRL-Kardiomyozyten (Abb. 30).

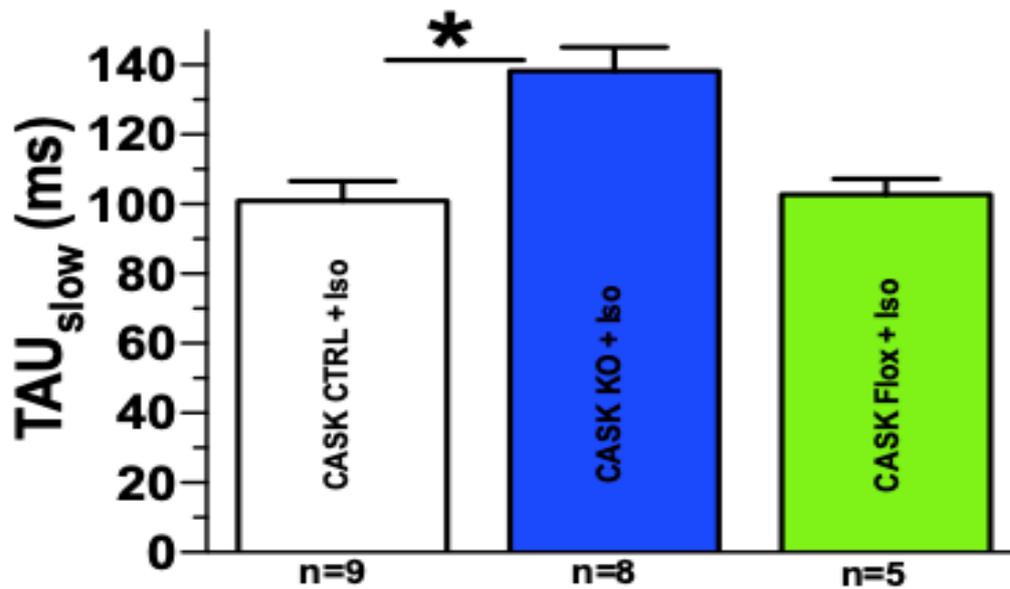


Abbildung 30

Langsam Inaktivierung (T_{slow}) unter Stimulation mit Isoprenalin. Mittelwerte \pm SEM, Badlösung mit Isoprenalin 10^{-4} mmol/l, Kalzium in der Pipettenlösung 100 nmol/l. Die y-Achse beschreibt die Dauer in ms. (* Einweg-ANOVA $p < 0.05$, mehrfaktoriell)

3.3.3 Leitfähigkeitsanalyse des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Isoprenalin

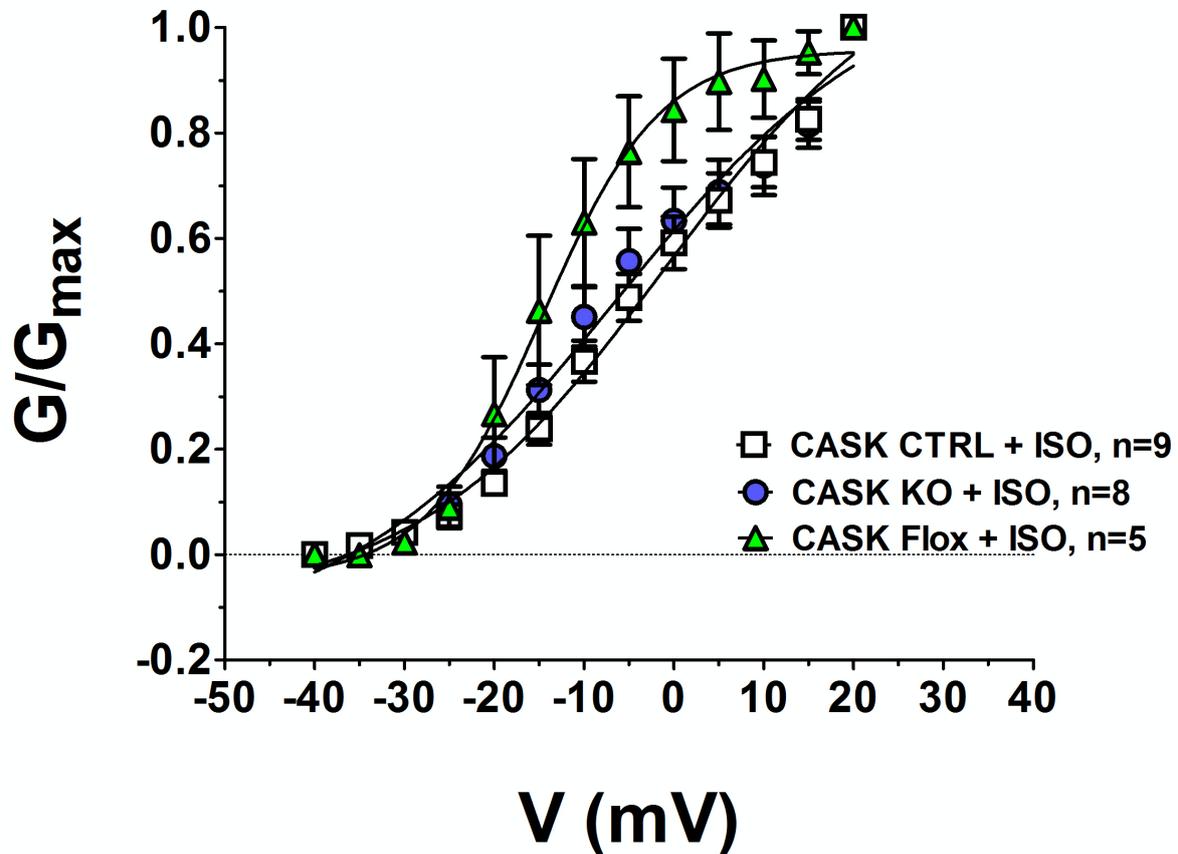


Abbildung 31

Leitfähigkeit des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Stimulation mit Isoprenalin. Kalzium in der Pipettenlösung 100 nmol/l, die x-Achse zeigt die Spannung in mV, die y-Achse beschreibt G/G_{max} . G/G_{max} ist das Verhältnis der Leitfähigkeit (G) zur maximalen Leitfähigkeit (G_{max}) aufgetragen gegen die ausgelöste Membranspannung (mV).

In den basalen Messungen erkennt man eine Linksverschiebung bei CASK Flox gegenüber CASK CTRL und CASK KO. Das heißt, dass das Potential bei dem bereits die Hälfte des maximalen Stroms ($V_{1/2}$) fließt, ist schon bei negativeren Membranpotentialen erreicht. Bei CASK CTRL lag der $V_{1/2}$ -Wert -1.0 ± 2.9 mV (n=12), bei CASK KO lag der Wert bei -6.69 ± 3.18 mV (n=15) und bei CASK Flox lag der Wert bei -14.58 ± 1.65 (n=9). Es zeigt sich eine signifikante Änderung des halbmaximalen Aktivierungspotentials bei CASK KO im Vergleich zu CASK CTRL. Außerdem zeigt sich eine signifikante Änderung des halbmaximalen Aktivierungspotentials bei CASK Flox im Vergleich zu CASK CTRL und CASK KO. Das Potential, bei dem bereits die

Hälfte des maximalen Stroms fließt, ist bereits bei einem negativeren Membranpotentialen erreicht

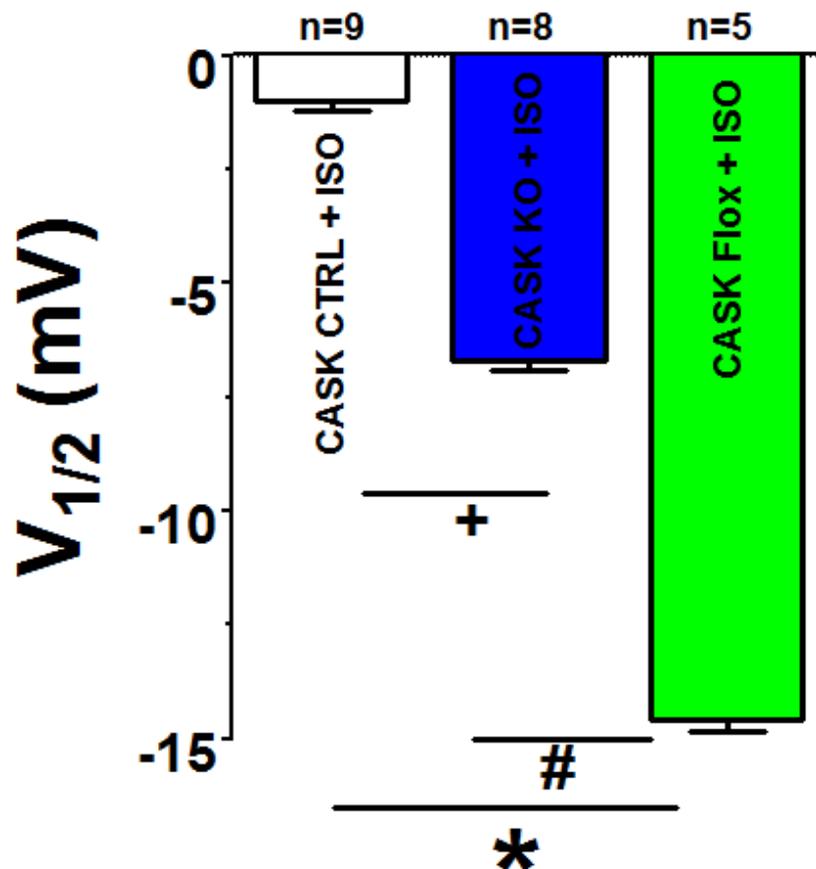


Abbildung 32

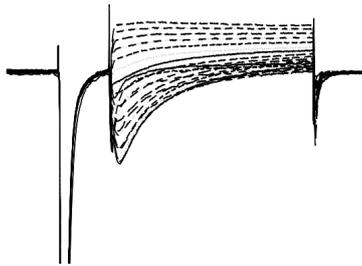
Aufgetragen sind die gemittelten Werte des $V_{1/2}$ unter der Stimulation mit Isoprenalin. Es zeigt sich die Verfügbarkeit der Kanäle $V_{1/2}$ bei CASK Flox signifikant bei negativerem Potential im Vergleich CASK CTRL und CASK KO (+ Einweg-ANOVA $p < 0.05$ CASK KO vs. CASK CTRL; * Einweg-ANOVA $p < 0.05$ CASK Flox vs. CASK CTRL; # Einweg-ANOVA $p < 0.05$ CASK Flox vs. CASK KO)

3.4 Die Bedeutung von CASK für die kalziumabhängige Regulation des LTCCs

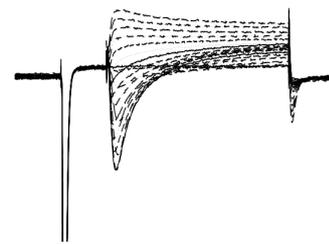
3.4.1 Veränderung des I_{Ca} bei CASK KO-, CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Kalzium (500 nM)

Die direkte Stimulation von CaMKII durch erhöhtes Calcium in der Pipette führt zu einer signifikanten Steigerung der Stromstärke bei CASK KO.

CASK CTRL



CASK KO



CASK Flox

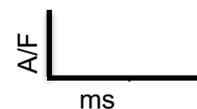
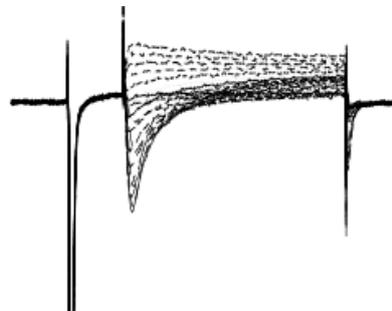


Abbildung 33

Originalregistrierungen von I_{Ca} in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Kalzium. Kalziumkonzentration 500 nmol/l in der Pipettenlösung. Die x-Achse zeigt den Zeitverlauf in Millisekunden, die y-Achse die Stromstärke in Ampere auf die Membrankapazität in Farad genormt.

500 nM Kalzium führte nur in den CASK KO-Kardiomyozyten zu einer signifikanten Aktivierung des peak I_{Ca} (Abb. 34).

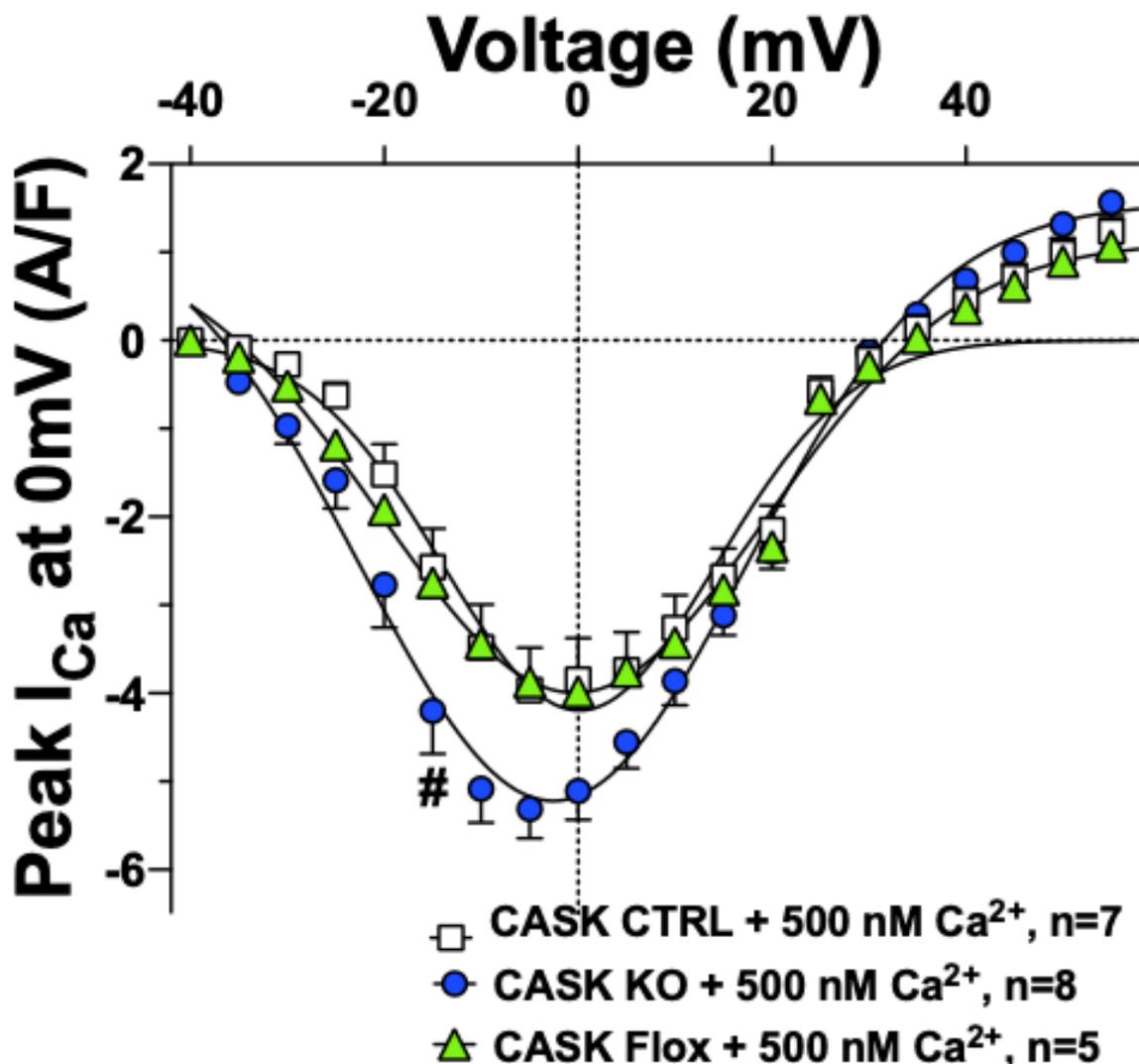


Abbildung 34

Stromspannungsbeziehung des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Kalzium. Kalziumkonzentration 500 nmol/l in der Pipettenlösung, die x-Achse zeigt die Spannung in mV, die y-Achse beschreibt den Peak I_{Ca} bei 0 mV (A/F), d.h. die Stromstärke in Ampere auf die Membrankapazität in Farad genormt. (# Zweiweg-ANOVA $p < 0.05$)

3.4.2 Öffnungsverhalten des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Kalzium (500 nM)

Setzt man isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten Kalzium (500 nM) aus, wird die schnelle Inaktivierung bei CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten nicht beeinflusst (Abb. 35).

Auch zeigen sich keine Unterschiede zu den ohne Kalziumstimulation bestimmten Basalwerten (Abb. 23).

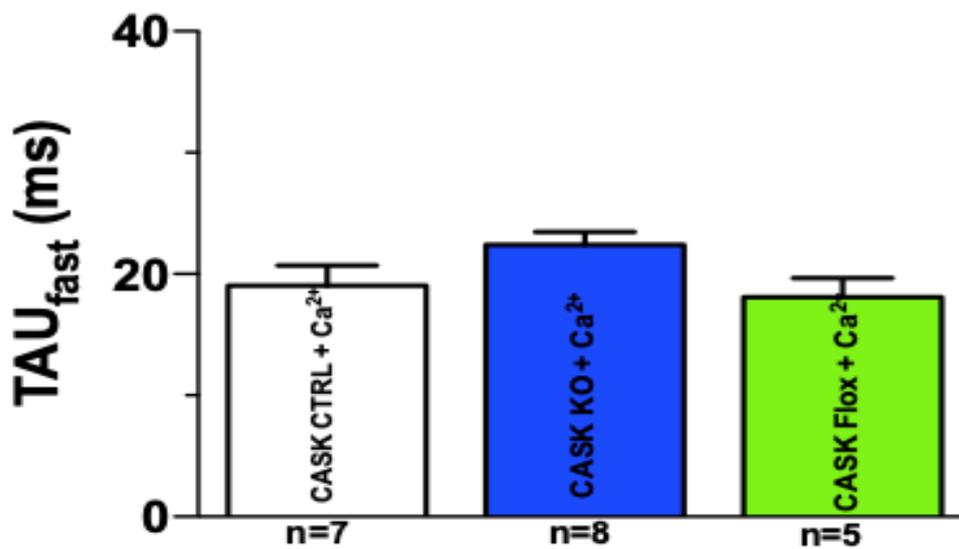


Abbildung 35

Schnelle Inaktivierung (T_{fast}) unter Kalzium. Mittelwerte \pm SEM, Kalziumkonzentration 500 nmol/l in der Pipettenlösung. Die y-Achse beschreibt die Dauer in ms.

Verglichen mit den basalen Messungen (Abb. 24) führte Kalzium (500 nM) in allen Kardiomyozytengruppen zu einer Verlangsamung der langsamen Inaktivierung. Bei den CASK KO-Kardiomyozyten war der Effekt am deutlichsten ausgeprägt.

Setzt man isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten Kalzium (500 nM) aus, ist die langsame Inaktivierung bei Kardiomyozyten ohne CASK (CASK KO) signifikant verlangsamt im Vergleich zur CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten (Abb. 36).

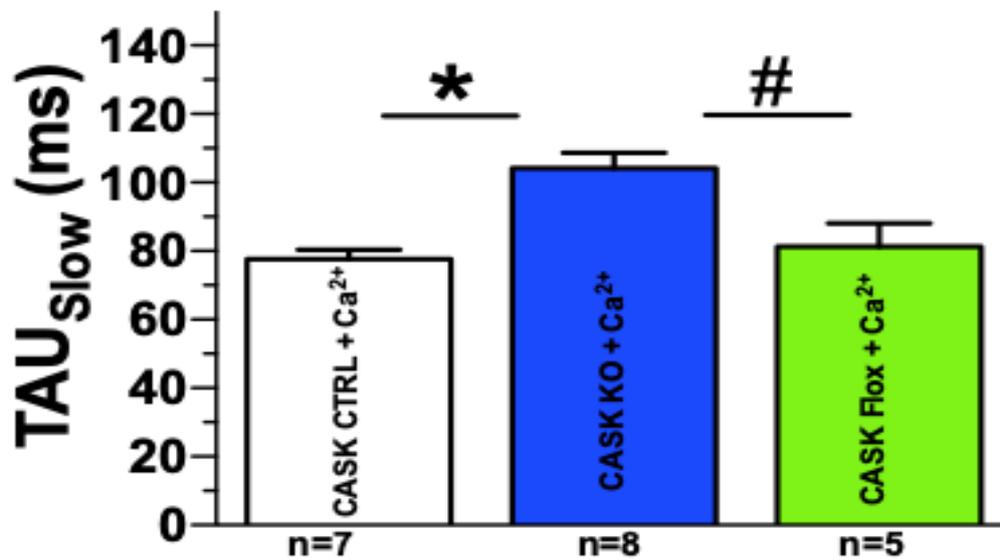


Abbildung 36

Langsame Inaktivierung in der späten Phase T_{slow} unter Kalzium. Mittelwerte \pm SEM, Kalziumkonzentration 500 nmol/l in der Pipettenlösung. Die y-Achse beschreibt die Dauer in ms. (* Einweg-ANOVA $p < 0.05$ CASK CTRL + Ca²⁺ vs. CASK KO + Ca²⁺, # Einweg-ANOVA $p < 0.05$ CASK Flox + Ca²⁺ vs. CASK KO + Ca²⁺).

3.4.3 Leitfähigkeit des LTCCs in CASK KO-, CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Isoprenalin und in Gegenwart von Kalzium (100 nM)

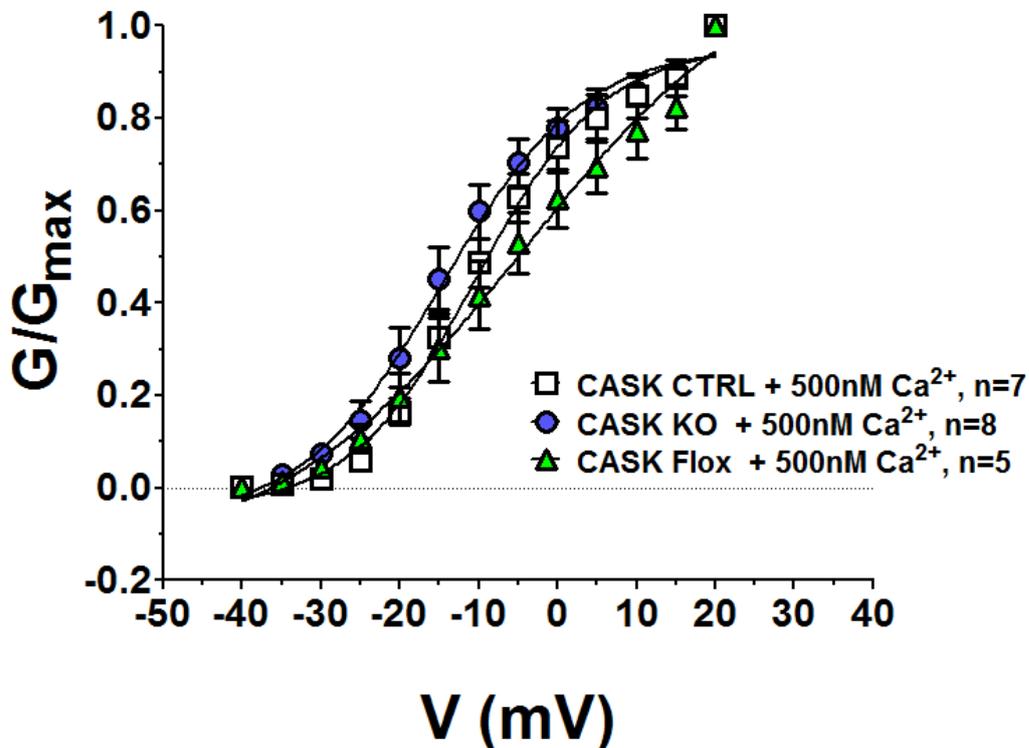


Abbildung 37

Leitfähigkeit des LTCCs in CASK CTRL-, CASK KO- und CASK Flox-Kardiomyozyten unter Kalzium. Kalziumkonzentration 500 nmol/l in der Pipettenlösung, die x-Achse zeigt die Spannung in mV, die y-Achse beschreibt G/G_{max}. G/G_{max} ist das Verhältnis der Leitfähigkeit (G) zur maximalen Leitfähigkeit (G_{max}) aufgetragen gegen die ausgelöste Membranspannung (mV).

In den Messungen mit erhöhtem Kalzium in der Pipette erkennt man eine leichte Linksverschiebung bei CASK CTRL gegenüber CASK KO und CASK Flox, sowie eine Linksverschiebung von CASK KO gegenüber CASK Flox. Das heißt, dass das Potential bei dem bereits die Hälfte des maximalen Stroms ($V_{1/2}$) fließt, ist schon bei negativeren Membranpotentialen erreicht. Bei CASK CTRL lag der $V_{1/2}$ -Wert -10.32 ± 1.02 mV (n=7), bei CASK KO lag der Wert bei -14.65 ± 1.37 mV (n=8) und bei CASK Flox lag der Wert bei -4.63 ± 4.18 (n=5). Es zeigt sich eine signifikante Änderung des halbmaximalen Aktivierungspotentials bei CASK KO im Vergleich zu CASK CTRL und CASK Flox. Das Potential, bei dem bereits die Hälfte des maximalen Stroms fließt, ist bereits bei einem negativeren Membranpotentialen erreicht.

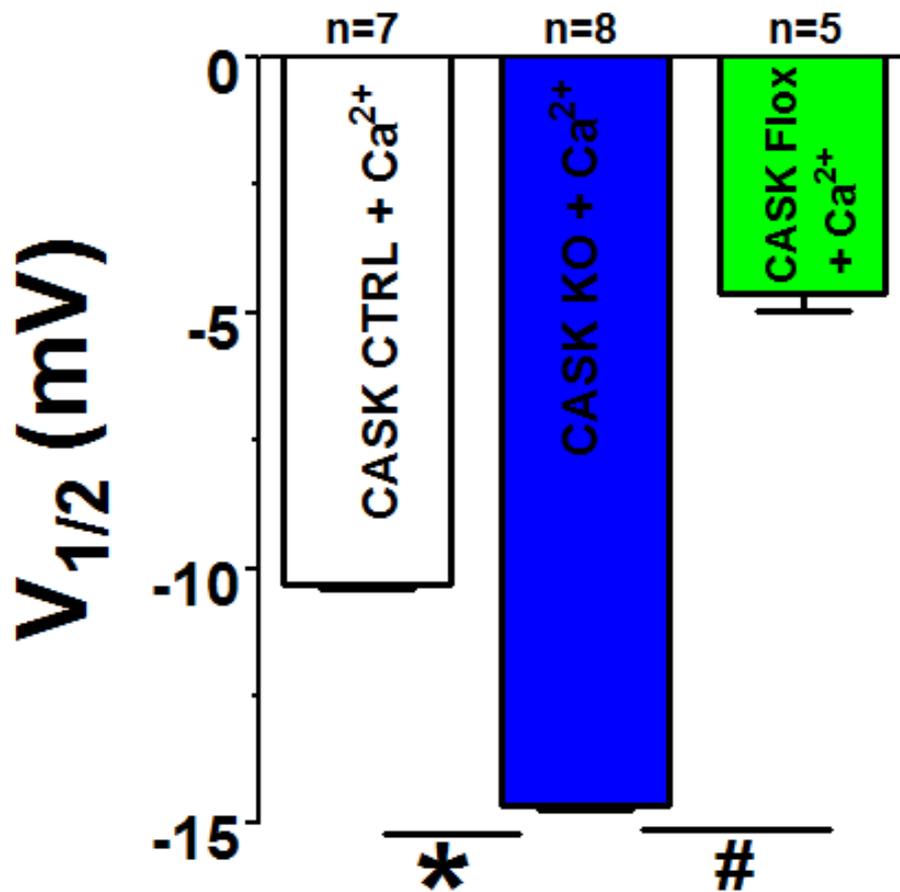


Abbildung 38

Aufgetragen sind die gemittelten Werte des $V_{1/2}$ Kalziumkonzentration bei einer Kalziumkonzentration von 500 nmol/l in der Pipettenlösung. Es zeigt sich die Verfügbarkeit der Kanäle $V_{1/2}$ bei CASK KO signifikant bei negativerem Potential im Vergleich CASK CTRL und CASK Flox (* Einweg-ANOVA $p < 0.05$ CASK KO vs. CASK CTRL; # Einweg-ANOVA $p < 0.05$ CASK KO vs. CASK Flox).

4 Diskussion

Es ist bekannt, dass die Expression und Aktivität der CaMKII bei Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht sind und einen Einfluss auf die kontraktile Dysfunktion sowie auf die Entstehung von Arrhythmien haben (Sag et al. 2009; Neef et al. 2010). Allerdings ist die Relevanz von CASK für die CaMKII-Aktivität sowie für kontraktile Dysfunktion und Arrhythmien bei Herzinsuffizienz bisher nicht hinreichend erforscht.

Trotz früherer Daten über die CASK-Expression im Myokard, wurde die spezifische Rolle von CASK für die CaMKII-Aktivität im Herzen auch unabhängig vom Vorliegen einer Herzinsuffizienz bisher nicht untersucht. Bisweilen wurde CASK hauptsächlich als ein MAGUK-Protein betrachtet, das eine Multidomänenstruktur aufweist und somit mit mehreren Proteinen interagieren kann. Infolgedessen haben sich bisherige Forschungsgruppen hauptsächlich auf die Gerüstfunktion des Proteins konzentriert.

Eichel et al. berichteten, dass CASK mit dem C-Terminus von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Nav1.5) interagiert und dadurch einen hemmenden Effekt auf die Oberflächenexpression von Nav1.5 ausübt. Dies trifft insbesondere auf die Kanäle der lateralen Membran zu. Der CASK KO führt zu einer erhöhten Nav1.5-Expression und infolgedessen zu einem erhöhten whole-cell Natriumstrom (Eichel et al. 2016).

CASK ist einzigartig unter den MAGUK-Proteinen, da es eine CaMKII-homologe Domäne in der N-terminalen Region aufweist. Diese Domäne wurde ursprünglich als katalytisch inaktiv betrachtet, weil das für die Magnesiumbindung erforderliche kanonische DFG-Motiv fehlt. Es wurde jedoch gezeigt, dass diese Domäne Substrate phosphorylieren kann, wenn sie durch die CASK-Gerüstaktivität rekrutiert wurden (Eichel et al. 2016). Dies könnte erklären, warum eine direkte CASK-CaMKII-Wechselwirkung die inhibitorische CaMKII-Autophosphorylierung bei Thr305/306 fördert, und dass umgekehrt das Fehlen von CASK (CASK KO) die CaMKII-Aktivität erhöht. Dadurch wird bereits ein Hinweis auf die mögliche Relevanz von CASK für die CaMKII-Aktivität gegeben.

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass CASK als Gerüstprotein die CaMKII Aktivität in Neuronen inhibiert (Hodge James J.L. et al. 2006). In neuronalen Zellen verschiebt das Fehlen von CASK das Gleichgewicht in Richtung erhöhter CaMKII-Thr286-Phosphorylierung und weniger inhibitorischer Thr305/306-Phosphorylierung, was zu einer erhöhten CaMKII-Aktivität führt (Hodge James J.L. et al. 2006).

Die Ergebnisse unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das Herz-spezifische CASK-KO in Mäusen die CaMKII-Aktivität in Kardiomyozyten wesentlich erhöhte, bedingt durch die Zunahme der Phosphorylierung von Thr286 und Abnahme der Phosphorylierung von Thr305 (Mustroph et al. 2021).

Die bisherigen Daten lassen somit vermuten, dass CASK in Kardiomyozyten wie in Neuronen in der Lage ist, die stimulatorische und inhibitorische Autophosphorylierung und somit die CaMKII-Aktivität zu regulieren.

Wenn also bisher die Aktivierung von CaMKII durch CASK eher auf der biochemischen Ebene, die Phosphorylierungsmuster des Enzyms betreffend, gezeigt werden konnte, wird in dieser Dissertation die Aktivierung von CaMKII durch CASK auf elektrisch-physiologischer Ebene, die Regulation des LTCCs betreffend, untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig mittels der Patch-Clamp-Methode gezeigt werden, dass der knock-out von CASK in Kardiomyozyten, einen Effekt auf den I_{Ca} hat. I_{Ca} ist an der Regulation der Dauer des Aktionspotenzials und damit an der Erzeugung von frühen Nachdepolarisationen beteiligt.

4.1 Die verwendeten Modelle

Die homozygot geflochten Mäuse ohne Expression der Cre-Rekombinase zeigten eine kleine, aber signifikante Reduktion von Körpergewicht (und Herzgewicht) im Vergleich zu Mäusen mit dem Wildtyp - CASK - Allel (CASK Flox vs. CASK CTRL, siehe 3.1.1), was mit zuvor veröffentlichten Daten übereinstimmt. Atasoy et al. diskutierten, dass die Veränderungen im CASK-Gen, welche durch die Insertion von loxP-Stellen und/oder der Neomycin-Resistenz-Genkassette implementiert wurden, die neuronale CASK-Expression beeinträchtigen könnte (Atasoy et al. 2007). Sie fanden eine

Verringerung der CASK-Expression auf 33% in Gehirnhomogenaten von neugeborenen CASK Flox-Mäusen. Veröffentlichte Daten unseres Forschungslabors zeigen, dass interessanterweise im Gegensatz zu Atasoy et al., die CASK-Expression in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von CASK Flox-Mäusen (vs. CASK CTRL) nicht reduziert, aber dagegen in CASK KO vollständig aufgehoben war (Mustroph et al. 2021). Es konnte bisher nicht bewiesen werden, dass das gefloxt Allel das Herz per se beeinflusst, da das kleinere Herzgewicht (HG) proportional zu dem kleineren Körpergewicht (KG) ist und die HG/KG-Verhältnisse nicht unterschiedlich waren.

4.2 Der I_{Ca} unter basalen Messbedingungen

Unter basalen Messbedingungen mit einer intrazellulär physiologischen und diastolischen Kalziumkonzentration von 100 nmol/l, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Messungen in den CASK KO-, CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten. Alle erreichten ihren maximalen Kalziumstrom bei -2,5 mV. Dies legt nahe, dass CASK für die Herzfunktion im Ruhezustand in vivo, ähnlich wie CaMKII, nicht von großer Relevanz ist. Es wurde bereits mehrfach in Arbeiten gezeigt, dass CaMKII für die Herzfunktion in Ruhe in vivo nicht entscheidend ist (Backs et al. 2009; Neef et al. 2013; Kreusser et al. 2014).

4.3 Die Veränderung von I_{Ca} nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin

Nach Andocken eines Sympathomimetikums vom Typ des Isoprenalins an seine Rezeptoren, wird eine Kaskade in Gang gesetzt. Primär wird das Enzym Adenylatcyclase aktiviert, welches für die Bildung von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) katalytisch verantwortlich ist. Der Konzentrationsanstieg von cAMP führt zur Aktivierung von Proteinkinase A (PKA), welche die spannungsabhängigen Kalziumkanäle phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung der Kanäle kommt es während der Depolarisation zu einem vermehrten Kalziumstrom in die Zelle, was zu einer erhöhten Herzkontraktilität führt. Des Weiteren führt Isoprenalin am AV-Knoten zu einer erhöhten Dromotropie.

Es ist bekannt, dass eine erhöhte β -adrenerge Stimulation zu einer ausgeprägten CaMKII-Aktivierung und zu Veränderungen in der elektro-mechanischen Kopplung

führen kann (Mangmool S. et al. 2010). Auch in meinen Versuchen zeigte sich nach Applikation von Isoprenalin 10^{-4} mmol/l in die Badlösung, bei einer Kalziumkonzentration in der Pipettenlösung von 100 nmol/l, eine signifikante Zunahme des I_{Ca} in CASK KO- im Vergleich zu CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten.

In neuronalen Zellen wurde gezeigt, dass das Fehlen von CASK das Gleichgewicht in Richtung erhöhter CaMKII-Thr286-Phosphorylierung und weniger inhibitorischer Thr305/306-Phosphorylierung verschiebt, was zu einer erhöhten CaMKII-Aktivität führt (Hodge James J.L. et al. 2006). Die bisherigen Daten lassen somit vermuten, dass CASK in Kardiomyozyten wie in Neuronen in der Lage ist, die stimulatorische und inhibitorische Autophosphorylierung und somit die CaMKII-Aktivität zu regulieren. Das würde bedeuten, dass bei fehlendem Vorliegen des Protein CASK die Selbstregulierung der Zelle zur Hemmung der CaMKII fehlt. Dies hat in Ruhe keine Auswirkung auf die Zelle. Aber unter großem Stress (β -adrenerge Stimulation) kommt es zu einer unregulierten Aktivierung von CaMKII und somit zur Phosphorylierung des LTCCs mit einem erhöhten Peak I_{Ca} . Dies korreliert mit den bereits 2008 publizierten Daten von Wang et al., nach denen die Aktivierung von CaMKII zu einem erhöhten Peak- I_{Ca} am LTCC und dies wiederum zu einer verlangsamten Inaktivierung von I_{Ca} führt (Wang et al. 2008). Dies ist kongruent mit Daten unserer Forschungsgruppe. Es wurde untersucht, ob ein Mangel an CASK-Expression die CaMKII-Aktivität beeinflusst. Dafür wurde die stimulierende CaMKII-Autophosphorylierung an Thr286 bewertet. Es konnte gezeigt werden, dass CASK KO-Mäuse im Vergleich zu CASK CTRL- und CASK Flox-Mäusen einen Anstieg der Thr286-Phosphorylierung im Herzmuskel aufwiesen (Mustroph et al. 2021). Des Weiteren wurde die Phospholamban abhängige Phosphorylierung der CaMKII-Konsensusstelle Thr17 untersucht. In Übereinstimmung mit Thr286-Phosphorylierungsdaten war die CaMKII-abhängige PLN-Phosphorylierung im Herzmuskel von CASK KO- im Vergleich zu CASK CTRL- und CASK Flox-Mäusen signifikant erhöht.

Um zu testen, ob Gegenregulationspfade, die die CaMKII-Aktivität begrenzen bereits zu Beginn der Studie aktiviert wurden, wurde die inhibitorische Thr305-Autophosphorylierung gemessen. Hierdurch wurde die CaM-Bindung und damit die CaMKII-Aktivität limitiert. Unsere Forschungsgruppe fand jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied, was darauf hindeutet, dass CaMKII inhibierende Bahnen in Ruhe möglicherweise keine signifikante Rolle spielen.

Man kann also die wichtige Frage aufwerfen, ob eine ausbleibende Regulierung der CaMKII durch CASK den gleichen Effekt hat wie eine Hochregulierung der CaMKII bei der Herzinsuffizienz. Es ist bekannt, dass die β -adrenerge Stimulation von Herzzellen zur einer erhöhten Aktivität von CaMKII führt (Mangmool Supachoke et al. 2010).

In normalen Herzen ist der β -adrenerge Rezeptor der primäre I_{Ca} -Regulator. Da die CaMKII ein Ziel des Signalweges der β -adrenergen Stimulation ist, spielt sie eine wichtige Rolle bei der I_{Ca} -Regulierung und damit auch als mögliches Target für die Entwicklung von Arzneimitteln zur Therapie der Herzinsuffizienz. Da die CaMKII den LTCC durch Phosphorylierung an verschiedenen Stellen der Kanaluntereinheiten reguliert, kann eine Hemmung der CaMKII nicht komplett den Effekt der β -adrenergen Stimulation inhibieren. Dies passt zu unseren Daten, die in den Gruppen CASK CTRL- und CASK Flox-Kardiomyozyten einen Anstieg des I_{Ca} unter Stimulation mit Isoprenalin zeigen. Der Anstieg von I_{Ca} spiegelt sich auch in der Leitfähigkeitsanalyse wider. Unter der Stimulation mit Isoprenalin zeigt sich eine signifikante Veränderung von $V_{1/2}$ im Vergleich von CASK KO gegen CASK CTRL. Dies spricht für eine Öffnung des LTCC bei bereits niedrigerem Membranpotentials und somit einem früheren I_{Ca} . Durch die gesteigerte Aktivierung und die gestiegerte Leitfähigkeit kommt es zu einem *gain of function* vom LTCC.

Es ist bekannt, dass CaMKII bei Kardiomyopathien proarrhythmogen wirkt. Dabei ist die kardiale Repolarisation signifikant verlängert (Hoch et al. 1999). Eine übermäßige CaMKII-Aktivierung verstärkt die Fazilitation am LTCC und erhöht das Ca^{2+} -Leck aus dem sarkoplasmatisches Reticulum (Lai et al. 2013).

Ein erhöhter I_{Ca} in CASK KO-Kardiomyozyten könnte somit zu einer Verlängerung der Aktionspotenzialdauer und einem verlängerten window current führen und somit das Risiko für early afterdepolarizations (EAD) steigern, welche Arrhythmien auslösen können. EADs werden häufiger beobachtet bei Interventionen, die I_{Ca} erhöhen, wie z.B. nach Aktivierung von β -adrenergen Rezeptoren. Die Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren führt zu einem erhöhten I_{Ca} , da der window current auf ein mehr negatives Potenzial verschoben wird, wodurch das Auftreten von EADs begünstigt wird.

Mustroph et al. konnten zeigen, dass die Exposition von isolierten Kardiomyozyten gegenüber Isoprenalin die CaMKII-abhängige Phosphorylierung von RyR2 in CASK KO- im Vergleich zu CASK CTRL-Kardiomyozyten erhöhten (Mustroph et al. 2021). Dies führte zu einem erhöhten diastolischen SR Ca^{2+} -Leck. Die Erhöhung des SR

Ca²⁺-Lecks wurde nicht durch Stimulation der SERCA-Aktivität kompensiert, da der SR Ca²⁺-Gehalt und die Ca²⁺-Übergangsamplitude ebenfalls verringert waren.

Unsere Arbeitsgruppe hat multiple Phosphorylierungsstellen im Zusammenhang mit CASK und der Regulation CAMKII untersucht. Um herauszufinden ob das Fehlen der CASK-Expression die CaMKII-Aktivität beeinflusst, haben Mustroph et al. die stimulierende CaMKII-Autophosphorylierung an Thr286 (pThr286-CaMKII) untersucht (Mustroph et al. 2021). Die Daten von Mustroph et al. zeigen einen Anstieg der myokardialen Thr286-Phosphorylierung in CASK KO-Mäusen im Vergleich zu CASK CTRL und CASK-Flox. Als gegenregulatorischer Weg wurde die inhibitorische T305-Autophosphorylierung gemessen, welche die CaMKII-Aktivität limitiert. Wie bereits schon erwähnt zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der inhibitorischen Thr305-CaMKII-Phosphorylierung unter basalen Bedingungen (Mustroph et al. 2021). Mustroph et al. konnten zeigen, dass die akute Exposition von isolierten ventrikulären Myozyten gegenüber Isoproterenol die CaMKII-Autophosphorylierung an Thr286 erhöht und die inhibitorische CaMKII-Autophosphorylierung an Thr305 reduziert (Mustroph et al. 2021).

Um zu testen, ob die CASK-abhängige CaMKII-Regulation für die Entwicklung der Herzinsuffizienz wichtig ist, setzten Mustroph et al. Mäuse einer Drucküberlastung durch transversale Aortenkonstriktion (TAC) aus. Es konnte gezeigt werden, dass die stimulierende CaMKII Thr286-Phosphorylierung signifikant erhöht und die inhibitorische CaMKII Thr305-Phosphorylierung reduziert war (Mustroph et al. 2021). Mustroph et al. exponierten außerdem isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten von CASK CTRL-Mäusen dem oralen CaMKII-Inhibitor Exenatid (GLP-1-Rezeptor-Agonist, (GLP-1-RA)). Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte CASK-Expression (Mustroph et al. 2021). Damit einhergehend war die inhibitorische Thr305-Phosphorylierung unter GLP1-RA-Exposition in CASK CTRL signifikant erhöht. In CASK CTRL war die stimulierende Thr286-Phosphorylierung unter GLP1-RA reduziert (Mustroph et al. 2021). Mustroph et al. untersuchten auch die Phospholamban (PLN)-Phosphorylierung an Threonin 17, als Marker der CaMKII-Aktivität. Die PLN-Phosphorylierung war in CASK KO im Vergleich zu CASK CTRL und CASK Flox signifikant erhöht (Mustroph et al. 2021). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass CASK tatsächlich die CaMKII-Aktivität im Myokard reguliert.

Da I_{Ca} während des steady state stabil ist, wird der erhöhte I_{Ca} von einer erhöhten Kalzium-Entfernung aus der Zelle begleitet. Dies kann über den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) erfolgen, was ein Anzeichen dafür ist, dass es zu einer Verschiebung von Kalzium im SR zu einem mehr transsarkolemmalen, fokussierten Kalzium-Zyklus in CASK KO kommt.

Die spontane und kalziuminduzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR kann als "Kalziumfunken" gemessen werden, und die Häufigkeit der Ereignisse ist direkt proportional zur CaMKII-Aktivität (Erickson und Anderson 2008).

Maier et al. haben bereits 2003 gezeigt, dass transgene Mäuse mit einer Überexpression von CaMKII β nicht nur eine erhöhte Häufigkeit von Kalziumfunken zeigten, sondern dies auch eine Überfunktion und -expression von NCX und ein erhöhtes diastolisches SR Ca^{2+} Leck zur Folge hatte (Maier 2003). Es ist bekannt, dass bei der Ratte ca. 92% des Kalziums durch das SR freigelassen und wieder aufgenommen werden. 7% des Kalziums werden durch NCX extrudiert, wovon das meiste Kalzium über den LTCC wieder in die Zelle einströmt (Maier und Bers 2002). Im Allgemeinen ist bei Herzinsuffizienz die Expression und die Funktion der SERCA reduziert, während hingegen die Expression und die Funktion des NCX erhöht ist. Die erhöhte NCX-Aktivität kann somit ebenfalls zu verminderten Kontraktionen und verzögerten Nachdepolarisationen führen, welche ein arrhythmogenes Potenzial besitzen.

Dies alles steht in Übereinstimmung mit Daten von Nafzger und Rougier, die zeigen, dass das CASK-Silencing den Peak- I_{Ca} erhöht (Nafzger und Rougier 2017). Daher kann das erhöhte arrhythmogene Potenzial von CASK KO-Kardiomyozyten theoretisch auf zwei Faktoren zurückzuführen sein. Zum einen auf ein erhöhtes diastolisches Ca^{2+} -Leck und zum anderen auf den verstärkten I_{Ca} .

Unter Beachtung, dass es durch eine Hochregulierung von I_{Ca} zur Veränderung der Handhabung von SR Ca^{2+} und dem intrazellulären Signalwegen kommen kann, können Strategien zur Erhöhung der CASK-Expression vorteilhaft sein, um kontraktile Dysfunktion und Arrhythmien zu verhindern.

4.4 Der Effekt einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration auf I_{Ca}

Bei den Messergebnissen mit einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration von 500 nmol/l in der Pipettenlösung zeigten eine signifikante Zunahme des I_{Ca} bei CASK KO im Vergleich zu CASK CTRL- und CASK Flox. Außerdem zeigt sich eine gesteigerte Leitfähigkeit des LTCCs bei CASK KO im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen.

Die Erhöhung des I_{Ca} lässt sich dadurch erklären, dass das vermehrt vorliegende Kalzium an Calmodulin und der Ca^{2+} /CaM-Komplex an die CaMKII-Kinase bindet und diese direkt aktiviert. (Meyer et al. 1992; Erickson 2014), Es erfolgt eine Ca^{2+} -abhängige I_{Ca} - Erhöhung, welche durch die CaMKII-abhängige Phosphorylierung von LTCC vermittelt wird (Anderson et al. 1994; Xiao et al. 1994; Yuan und Bers 1994)

Der L-Typ Kalziumkanal $Ca_v1.2$ wird von der CaMKII phosphoryliert, indem sie an die α_1 -Untereinheit des Carboxyterminus in der Nähe des sogenannten IQ-Motivs bindet (Hudmon et al. 2005). Interessant ist, dass der damit ausgelöste Stress auf die Zelle einen vermehrten Einfluss auf die CASK KO, aber auch auf CASK CTRL und CASK Flox zeigte.

4.5 Die Veränderung des Inaktivierungsverhaltens des LTCCs

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die direkte Stimulation von CaMKII durch Erhöhung der Kalziumkonzentration in der Pipette auf 500nmol/l zu einer Beeinflussung der Inaktivierung führt. Die Mittelwerte der langsamen Inaktivierung (T_{slow}) zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen CASK CTRL- und CASK KO- sowie CASK Flox-Kardiomyozyten. Nach der Stimulation mit Isoprenalin zeigte sich, dass sich die Inaktivierung bei CASK KO-Kardiomyozyten sowohl für T_{slow} als auch für T_{fast} signifikant verlangsamen.

Mit Ca^{2+} als Ladungsträger ist die I_{Ca} -Inaktivierung üblicherweise ein biexponentieller Prozess und in Abhängigkeit von der Spannung „u-förmig“. Die Normwerte für die Zeitkonstanten $T_{schnell}$ und $T_{langsam}$ liegen von 4 bis 10 ms ($T_{schnell}$) und 40 bis 60 ms ($T_{langsam}$) bei etwa 0 und +10 mV, abhängig vom Kardiomyozytentyp (Bers 2001).

Die CaMKII ist Teil der Regulierung des I_{Ca} während des kardialen AP.

Die kalziumabhängige Inaktivierung (calcium dependent inactivation - CDI) des LTCC hängt zum einen von dem I_{Ca} über den LTCC und zum anderen von dem Kalzium, das aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird, ab. Dieses Kalzium bindet an das CaM und verursacht somit die CDI. CaM assoziiert dabei mit dem C-Terminus der $\alpha 1C$ -Untereinheit. Wenn das intrazelluläre Calcium ansteigt, bindet Calcium am Carboxyende von CaM, welches eine hohe Affinität für Kalzium besitzt. Dadurch bindet der Ca-CaM-Komplex an einem kritischen IQ-Motiv nahe der ApoCaM-Bindungsstelle an das $\alpha 1C$ des LTCC, wodurch die Inaktivierung beschleunigt wird (Bers 2008).

In den Kardiomyozyten dominiert CDI normalerweise über die spannungsabhängige Inaktivierung (voltage dependent inactivation – VDI) (Bers und Morotti 2014). Angesichts der Rolle von I_{Ca} zur Aufrechterhaltung des AP-Plateaus sind CDI und VDI wichtige Determinanten für die Regulation der Dauer des Aktionspotenzials. Eine Verlängerung bis zur Inaktivierung des LTCCs induziert somit eine Verlängerung des Aktionspotenzials und hat proarrhythmogene Folgen. Schon 1992 wurde von Beuckelmann et al. berichtet, dass es bei Herzinsuffizienz zu einer fehlenden CDI und somit zu einem verlängerten AP und defekten Kalzium-Zyklus kommen kann (Beuckelmann et al. 1992).

Der LTCC inaktiviert mit den beiden Zeitkonstanten $T_{schnell}$ und $T_{langsam}$. Es wird im Allgemeinen angenommen, dass der anfänglich schnelle Abfall CDI darstellt und die langsamere Phase VDI reflektiert (Grandi et al. 2010).

Ein verlängerter I_{Ca} in CASK KO-Kardiomyozyten könnte die Aktionspotenzialdauer (APD) verlängern, den I_{Ca} -window current erhöhen, frühe Nachdepolarisationen fördern und Arrhythmien auslösen. In unserer Arbeitsgruppe wurde deshalb die APD gemessen. Die Daten von Mustroph et al. zeigen, dass es unter basalen Bedingungen keinen Unterschied von Frequenz und Ausprägung der nicht-stimulierten zellulären Arrhythmien zwischen den CASK KO- und CASK CTRL-Gruppen gibt. Die Exposition der Zellen gegenüber Isoprenalin führte im Vergleich zu den basalen Messbedingungen zwar auch zu einer erhöhten Arrhythmie-Neigung in CASK CTRL-Kardiomyozyten, aber zu einer eindeutig signifikanten Erhöhung bei den CASK KO-Kardiomyozyten. Bemerkenswerterweise gab es keine Unterschiede in der Arrhythmie-Neigung zwischen den CASK CTRL- und CASK Flox-Gruppen, wobei der

Unterschied zwischen CASK Flox- und CASK KO-Kardiomyozyten signifikant war (Mustroph et al. 2021).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass ein erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} die Inaktivierung von LTCC auslöst und damit einen wichtigen negativen Feedback-Mechanismus repräsentiert (Peterson et al. 1999; Grandi et al. 2010). Die CDI hängt dabei von der Interaktion von Calmodulin (CaM) mit dem LTCC ab. Die Studie von (Peterson et al. 1999) zeigt, dass die Ca^{2+} -abhängige CaM-Bindungssequenz ("IQ-Motiv") im zytoplasmatischen C-terminalen Schwanz der porenbildenden $\alpha 1C$ -Untereinheit des Kanals als Effektorregion für CDI dient. Peterson et al verwendeten weiterhin mutierte CaMs, an welche Ca^{2+} weder an den N- noch an den C-Lappen von CaM binden konnte. Damit konnten die Autoren zeigen, dass die Ca^{2+} -Bindung an den C-Lappen der Hauptsensor für die Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung und damit für die Verlängerung der Dauer des Aktionspotenzials ist (Peterson et al. 1999).

Die Ergebnisse unserer Studie, dass der knock-out von CASK zu einem erhöhten I_{Ca} führt und es zu einem verlängerten Schließungsverhalten des Kanals kommt, steht also im Konträren zu den oben beschriebenen Annahmen, dass erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} die Inaktivierung von LTCC auslöst. Warum dies so ist, ist aktuell noch ungeklärt und muss in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Saucermann und Bers haben 2012 in ihrer Studie zwei Formen von CaM unterschieden, „dedicated“ (fest zugeordnet) und „promiscuous“ (häufig wechselnd) (Saucerman und Bers 2012). Sie gehen davon aus, dass die dedicated CaM einem LTCC fest zugeordnet ist und auch im passiven Zustand den LTCC reguliert. Eine promiscuous CaM reguliert den Kanal nur indirekt via Phosphatasen und Kinasen.

Es bleibt also für zukünftige Forschungsansätze zu klären, welchen genauen Einfluss CASK auf die CaM hat und damit auf das Schließungsverhalten des LTCC.

4.6 Der Knock-out von CASK wirkt proarrhythmogen

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, kann man davon ausgehen, dass CASK einen proarrhythmogenen Effekt hat. CASK ist ein MAGUK Protein, das eine Gerüstfunktion hat. Das Protein ist lange Zeit nicht weiter erforscht worden in der

Annahme, dass es keine katalytische Funktion besitzt. CASK ist allerdings einzigartig unter den MAGUK Proteinen, weil es eine CaMKII ähnliche Domäne in der N-terminalen Region besitzt.

Diese Domäne wurde zunächst als katalytisch inaktiv angesehen, da ihr das für die Magnesiumbindung erforderliche kanonische DFG-Motiv fehlt (Mukherjee et al. 2008a). Mukherjee et al. konnten zeigen, dass die Domäne Substrate phosphorylieren kann, wenn sie durch die CASK-Gerüstaktivität rekrutiert wurden.

In dieser Arbeit konnte nach dem knock-out von CASK ein erhöhter I_{Ca} in Kardiomyozyten gezeigt werden, welche mit einer verlängerten Inaktivierung der LTCC Kanäle unter β -adrenerger Stimulation einhergeht. Bisläng gibt es keine weiteren Studien, welche dieses CASK Modell im Herzen bestätigen. Aber aus den vorliegenden Daten zur CaMKII Überexpression wissen wir, dass eine Überexpression der CaMKII zu einem erhöhten I_{Ca} führen kann (Maier und Bers 2002). Dies hat proarrhythmogene Folgen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Verlust von CASK im Knock-Out-Modell zu einer erhöhten CaMKII-Aktivität führte, einhergehend mit zellulären Arrhythmien und gestörter Kalzium-Homöostase. Unter basalen Messbedingungen zeigte sich zwischen CASK KO und CASK CTRL kein Unterschied was den Schweregrad und die Häufigkeit von arrhythmischen Ereignissen betrifft. Nach Exposition mit Isoprenalin zeigte sich eine signifikante Zunahme der Arrhythmien in CASK CTRL, CASK Flox und CASK KO-Myozyten im Vergleich zu den Ausgangswerten. Die Anteile der Gesamtarrhythmien war bei den CASK KO-Myozyten im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erhöht (Mustroph et al. 2021). In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden rechtsventrikuläre Arrhythmien in vivo induziert. EKG Untersuchungen zeigten, dass die Neigung zu lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien in CASK KO-Mäusen stark erhöht war im Vergleich CASK CTRL und auch CASK Flox. Darüber hinaus zeigten CASK KO-Mäuse außerdem eine erhöhte Neigung zu spontanen, unprovokierten Arrhythmien ohne eine Stimulation von außen. Ebenso zeigten die CASK KO Mäuse verlängerte QT-Intervalle im Vergleich zu CASK CTRL und CASK Flox auf. Nach Verabreichung von GLP-1-RA, war die Induzierbarkeit von ventrikulären Arrhythmien deutlich aufgehoben. Das Medikament verkürzte außerdem die QT-Zeit bei CASK KO nach Isoproterenol Gabe auf ähnliche Werte wie bei CASK CTRL nach Stimulaton mit Isoproterenol (Mustroph et al. 2021).

Die Mechanismen, welche die räumliche Organisation von Ionenkanälen regulieren, sind weitestgehend noch unbekannt. Allerdings weiß man, dass für die Organisation spezialisierter Membrandomänen in Kardiomyozyten das Targeting und das Clustering von Transmembranproteinen zu Zellverbindungsstellen entscheidend sind. MAGUK-Proteine spielen dabei in dieser Organisation eine wichtige Rolle (Eichel et al. 2016). Eichel et al. berichteten, dass CASK mit dem C-Terminus der spannungsabhängigen Na-Kanäle ($Na_V1.5$) im Herzen interagieren und dadurch eine repressive Wirkung auf die Oberflächenexpression von $Na_V1.5$ speziell an der lateralen Membran ausübt. Der Knock-out von CASK resultierte in einer erhöhten Oberflächenexpression von $Na_V1.5$ und somit einem erhöhten I_{Na} über die Membran.

Mustroph et al. konnten zeigen, dass die akute Exposition von isolierten ventrikulären Myozyten gegenüber Isoproterenol die CaMKII-Autophosphorylierung an Thr286 erhöht und die inhibitorische CaMKII-Autophosphorylierung an Thr305 reduziert. Die mangelnde CASK-Expression hat somit Einfluss auf die CaMKII-Aktivität (Mustroph et al. 2021).

Auf molekularer Ebene kann die Überexpression von CamKII zu einem kardialen Remodeling und einer damit einhergehenden Herzinsuffizienz führen. Maier et al. zeigten, dass eine Überexpression der CaMKII δ_c im transgenen Mausmodell zu einer kardialen Hypertrophie und dilatativen Kardiomyopathie führt (Maier 2003). Die Splicevariante CaMKII δ_c befindet sich dabei ausschließlich im Zytosol der Zellen. Die Splicevariante CaMKII δ_b befindet sich im Zellkern (Edman und Schulman 1994). Ramirez et al. konnten zeigen, dass die intranukleäre Erhöhung der δ_b -Isoform zu einer Induktion eines ANF-Reportergens und zu einem Anstieg des endogenen ANF-Proteins führt, wobei der genaue Signalweg noch ungeklärt ist (Ramirez et al. 1997). ANF (atrialer natriuretischer Faktor) entsteht beim insuffizienten Myokard durch die erhöhte Druck-/Volumenbelastung der Herzkammern und ist somit ein etablierter Indikator für ventrikuläre Hypertrophie. Zhang et al. zeigten in ihrer Arbeit von 2003, dass eine Überexpression der transgenen Splicevariante von CaMKII δ_b zu einer kardialen Hypertrophie führt (Zhang et al. 2003).

Schon 2002 zeigten Zang et al., dass die chronische Erhöhung von Calmodulin zu einer Hypertrophie des Herzmuskels führt (Zhang et al. 2002). Dabei zeigt sich intrazellulär eine erhöhte Phosphorylierung von CaMKII, welches für eine

kalziumunabhängige erhöhte Aktivität von CaMKII spricht. Dies bestätigt die Rolle der CaMKII in der Entstehung einer Hypertrophie des Myokards.

Ein erhöhter I_{Ca} führt zur Entstehung von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz (Bers 2008). Bei der Herzinsuffizienz kann es durch eine verlängerte Aktionspotenzialdauer zu einer verstärkten CaMKII-Aktivierung und somit zu einem vermehrten Ca^{2+} Einstrom durch den LTCC kommen (Beuckelmann et al. 1993). Außerdem konnten Hullin et al. 2007 auf molekularer Ebene zeigen, dass eine Überexpression der β -Untereinheit des LTCC eine signifikante Steigerung des I_{Ca} zur Folge hat. Dabei ist die Aktivität des einzelnen LTCC beim insuffizienten Myokard deutlich erhöht (Schröder Frank et al. 1998).

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von CASK auf die CaMKII-abhängige Regulation des L-Typ Kalziumkanals (LTCC) im Herzen zu untersuchen.

Der LTCC ist ein wichtiger Regulator bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen. Herzrhythmusstörungen resultieren aus dem Zusammenspiel von strukturellen und funktionellen Veränderungen des Herzens und genetischen Prädispositionen. Ein „Trigger“-Event kann zu elektrophysiologischen Veränderungen führen, welche in Herzrhythmusstörungen resultieren. Diese „Trigger“-Events können zum Beispiel Resultate der EADs oder DADs sein, bei denen es zu einer Verlängerung des I_{Ca} und damit zu einer Verlängerung des Aktionspotenzials kommen kann. Veränderungen des I_{Ca} bei insuffizienten Herzen können zur elektrischen Instabilität beitragen. Ein wichtiges Protein, welches Einfluss auf die intrazellulären Abläufe der Kardiomyozyten hat, ist die CaMKII. Die CaMKII ist unter anderem verantwortlich für die Phosphorylierung von Phospholamban, aber auch für die des Ryanodinrezeptors und damit für die Ausschüttung von Kalzium aus dem SR (Maier, 2003). Des Weiteren ist sie zuständig für die Phosphorylierung des LTCCs und eventuell der SERCA (Maier und Bers, 2002).

Dieser Doktorarbeit liegt die These zu Grunde, dass das intrazelluläre MAGUK Protein CASK einen modulierenden Effekt auf die CaMKII hat. In neuronalen Zellen wurde bereits gezeigt, dass das Fehlen von CASK das Gleichgewicht in Richtung erhöhter CaMKII-Thr286-Phosphorylierung und weniger inhibitorischer Thr305/306-Phosphorylierung verschiebt, was zu einer erhöhten CaMKII-Aktivität führt (Hodge James J.L. et al. 2006).

Es wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von CaMKII und die CaMKII-abhängige Phosphorylierung entscheidend an der Entstehung von Arrhythmien und kontraktile Dysfunktionen bei der Herzinsuffizienz beteiligt sind (Wagner et al. 2009; Toischer et al. 2010; Wagner et al. 2011). Deshalb wurde untersucht, ob ein Knock-out von CASK einen CaMKII gesteuerten Einfluss auf den LTCC hat. Dies wurde an einem knock-out Mausmodell untersucht, welches mittels cre/flox zu einer Ausschaltung des CASK Gens in den Kardiomyozyten führte.

Es wurden zwei Kontrollgruppen verwendet: Mäuse mit Wildtyp-CASK-Allelen und Kardiomyozyten-spezifischer Expression der Cre-Rekombinase (CASK CTRL) und homozygote geflochte Mäuse ohne Expression der Cre-Rekombinase (CASK Flox).

Mustroph et al. konnten zeigen, dass im Gegensatz zu Ergebnissen von Atasoy et al., die CASK-Expression in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von CASK Flox-Mäusen (vs. CASK CTRL) nicht reduziert, aber dagegen in CASK KO vollständig aufgehoben war (Atasoy et al. 2007; Mustroph et al. 2021).

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden mittels Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Mittels der Whole-Cell-Konfiguration wurde der I_{Ca} unter verschiedenen Messbedingungen und Einflussfaktoren gemessen.

Wenn man die Ergebnisse dieser Messungen in Kontext bringt, legen diese nahe, dass CASK in Kardiomyozyten, ähnlich wie in Neuronen, in der Lage ist, die stimulatorische und inhibitorische Autophosphorylierung und somit die CaMKII-Aktivität zu regulieren. Unter basalen Messbedingungen zeigten die CASK KO-, CASK Flox- und die CASK CTRL-Kardiomyozyten kaum Unterschiede. Dies legt nahe, dass CASK ähnlich wie CaMKII für die Herzentwicklung und die Herzfunktion im Ruhezustand entbehrlich sein könnten. Unter Verwendung von CaMKII-Knock-out-Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass CaMKII für die Herzfunktion in Ruhe in vivo nicht von entscheidender Bedeutung ist (Bucks et al. 2009; Neef et al. 2013; Kreusser et al. 2014).

Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass eine erhöhte β -adrenerge Stimulation zu einer erhöhten CaMKII-Aktivierung und zu CaMKII-abhängigen Veränderungen in der elektromechanischen Koppelung führen kann (Dybкова et al. 2014).

Aufgrund dessen wurde I_{Ca} gemessen, wobei kein Unterschied in der Peak- I_{Ca} unter basalen Messbedingungen festgestellt wohl aber ein verstärkter I_{Ca} nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin in CASK KO-Kardiomyozyten festgestellt wurde. Dies könnte einen Anstieg der APD erklären, was wiederum in Übereinstimmung mit neueren Daten steht, welche zeigen, dass der CASK-Knock-out das Peak- I_{Ca} erhöht (Nafzger und Rougier 2017).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CASK mit der CaMKII-Aktivität im Herzen assoziiert ist und diese reguliert. Die Regulation scheint unter CaMKII-Aktivität stimulierenden Bedingungen, wie z.B. der Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren, relevant zu sein. Es kann angenommen werden, dass eine übermäßige CaMKII-

Aktivierung durch β -adrenerge Stimulation zu verschiedenen Effekten führt, wie zum Beispiel eine erhöhte Thr286-Autophosphorylierung. Diese kann zu einer erhöhten CaMKII-Phosphorylierung von RyR2, einem erhöhten diastolischen SR Kalziumleck, einem reduzierten Kalzium-Gehalt im SR und einer transienten Kalzium-Amplitude führen. Dies sind neue und entscheidende Erkenntnisse über den Einfluss von CASK auf die CaMKII im Herzen und könnte für die Entwicklung von neuen Behandlungsmethoden bei Herzinsuffizienz von großer Bedeutung sein.

Literaturverzeichnis

- Aktories, Klaus, Förstermann, Ulrich, Hofmann, Franz Bernhard, Starke, Klaus: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage; Elsevier GmbH, München 2009
- Anastasi G, Cutroneo G, Santoro G, Arco A, Rizzo G, Bramanti P, Rinaldi C, Sidoti A, Amato A, Favalaro A (2008): Costameric proteins in human skeletal muscle during muscular inactivity. *J Anat* 213, 284–295
- Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA (1994): Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca(2+)-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 75, 854–861
- Anderson ME, Brown JH, Bers DM (2011): CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 51, 468–473
- Armoundas AA, Wu R, Juang G, Marbán E, Tomaselli GF (2001): Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. *Pharmacol Ther* 92, 213–230
- Atasoy D, Schoch S, Ho A, Nadasy KA, Liu X, Zhang W, Mukherjee K, Nosyreva ED, Fernandez-Chacon R, Missler M (2007): Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proc Natl Acad Sci* 104, 2525–2530
- Backs J, Backs T, Neef S, Kreuzer MM, Lehmann LH, Patrick DM, Grueter CE, Qi X, Richardson JA, Hill JA (2009): The δ isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci* 106, 2342–2347
- Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM (1995): CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268, H703-712
- Bers DM: Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force (Developments in Cardiovascular Medicine). Springer Netherlands 2001
- Bers DM (2002): Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Force.
- Bers DM (2008): Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70, 23–49
- Bers DM, Morotti S (2014): Ca²⁺ current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Front Pharmacol* 5
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1992): Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85, 1046–1055
- Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E (1993): Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73, 379–385
- Böhm M, Beuckelmann D, Brown L, Feiler G, Lorenz B, Näbauer M, Kemkes B, Erdmann E (1988): Reduction of beta-adrenoceptor density and evaluation of positive inotropic responses in isolated, diseased human myocardium. *Eur Heart J* 9, 844–852
- Braun AP, Schulman H (1995): A non-selective cation current activated via the multifunctional Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase in human epithelial cells. *J Physiol* 488 (Pt 1), 37–55
- Braunwald E, Bristow MR (2000): Congestive Heart Failure: Fifty Years of Progress. *Circulation* 102, Iv-14-Iv-23
- Brittsan AG, Kranias EG (2000): Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2131–2139
- Bünemann M, Gerhardstein BL, Gao T, Hosey MM (1999): Functional regulation of L-

- type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *J Biol Chem* 274, 33851–33854
- Carbone E, Lux HD (1984): A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310, 501–502
- Catterall WA (2011): Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
- Catterall WA (2015): Regulation of Cardiac Calcium Channels in the Fight-or-Flight Response. *Curr Mol Pharmacol* 8, 12–21
- Chen Y, Escoubet B, Prunier F, Amour J, Simonides WS, Vivien B, Lenoir C, Heimbürger M, Choqueux C, Gellen B, et al. (2004): Constitutive cardiac overexpression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase delays myocardial failure after myocardial infarction in rats at a cost of increased acute arrhythmias. *Circulation* 109, 1898–1903
- Cohen AR, Wood DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH, Anderson JM (1998): Human CASK/LIN-2 Binds Syndecan-2 and Protein 4.1 and Localizes to the Basolateral Membrane of Epithelial Cells. *J Cell Biol* 142, 129–138
- Dimitratos SD, Woods DF, J Bryant P (1997): Camguk, Lin-2, and CASK: novel membrane-associated guanylate kinase homologs that also contain CaM kinase domains. *Mech Dev* 63, 127–130
- Dybkova N, Wagner S, Backs J, Hund TJ, Mohler PJ, Sowa T, Nikolaev VO, Maier LS (2014): Tubulin polymerization disrupts cardiac β -adrenergic regulation of late INa. *Cardiovasc Res* 103, 168–177
- Edman CF, Schulman H (1994): Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1221, 89–101
- Eichel CA, Beuriot A, Chevalier M, Rougier J-S, Louault F, Dilanian G, Amour J, Coulombe A, Abriel H, Hatem SN, Balse E (2016): Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates NaV1.5 Channel in Cardiac Myocytes. *Circ Res*
- El-Armouche A, Eschenhagen T (2008): β -Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14, 225–241
- Erickson JR (2014): Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Front Pharmacol* 5, 59
- Erickson JR, Anderson ME (2008): CaMKII and its role in cardiac arrhythmia. *J Cardiovasc Electrophysiol* 19, 1332–1336
- Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, et al. (2008): A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell* 133, 462–474
- Eschenhagen T (2008): Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 14, 485–487
- Fidzinski, Pawel (2006): Dissertation: Elektrophysiologische Charakterisierung künstlicher Ionenkanäle in lebenden Zellen.
- Fischer TH, Rokita AG, Maier LS (2011): Schlüsselrolle des Ca²⁺ in der Herzinsuffizienz und mögliche neue therapeutische Ansatzpunkte. *Kardiologie* 5, 80–90
- Fu Y, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA (2013): Phosphorylation sites required for regulation of cardiac calcium channels in the fight-or-flight response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 19621–19626
- Fuller MD, Fu Y, Scheuer T, Catterall WA (2014): Differential regulation of CaV1.2 channels by cAMP-dependent protein kinase bound to A-kinase anchoring proteins 15 and 79/150. *J Gen Physiol* 143, 315–324

- Ganesan AN, Maack C, Johns DC, Sidor A, O'Rourke B (2006): Beta-adrenergic stimulation of L-type Ca²⁺ channels in cardiac myocytes requires the distal carboxyl terminus of alpha1C but not serine 1928. *Circ Res* 98, e11-18
- Grandi E, Morotti S, Ginsburg KS, Severi S, Bers DM (2010): Interplay of Voltage and Ca-dependent inactivation of L-type Ca current. *Prog Biophys Mol Biol* 103, 44–50
- Grodin JL (2016): Pharmacologic Approaches to Electrolyte Abnormalities in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep* 13, 181–189
- Guellich A, Negroni E, Decostre V, Demoule A, Coirault C: Altered cross-bridge properties in skeletal muscle dystrophies. Band 5; 2014
- Gutierrez DA, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E (2013): NO-dependent CaMKII activation during β -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 100, 392–401
- Harvey RD, Hell JW (2013): CaV1.2 Signaling Complexes in the Heart. *J Mol Cell Cardiol* 58, 143–152
- Hata Y, Butz S, Sudhof TC (1996): CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *J Neurosci* 16, 2488–2494
- Herold G: *Innere Medizin*. Band 2016; 2016
- Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause E-G, Karczewski P (1999): Identification and Expression of δ -Isoforms of the Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase in Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ Res* 84, 713–721
- Hodge James J. L., Mullasseril P, Griffith LC (2006): Activity-Dependent Gating of CaMKII Autonomous Activity by Drosophila CASK. *Neuron* 51, 327–337
- Hodge James J.L., Mullasseril P, Griffith LC (2006): Activity-Dependent Gating of CaMKII Autonomous Activity by Drosophila CASK. *Neuron* 51, 327–337
- Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz EE, Erdmann E (2005): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (2005). *Z Für Kardiologie* Band 94
- Horn R, Marty, A (1988): Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 145–59
- Hsueh Y-P, Wang T-F, Yang F-C, Sheng M (2000): Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* 404, 298–302
- Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS (2005): CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *J Cell Biol* 171, 537–547
- Huke S, Bers DM (2007): Temporal Dissociation of Frequency-Dependent Acceleration of Relaxation and Protein Phosphorylation by CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 42, 590–599
- Hulme JT, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA (2006): Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac CaV1.2 channels during beta1-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16574–16579
- Huxley HE (1969): The Mechanism of Muscular Contraction. *Science* 164, 1356–1366
- Huxley HE (1973): Structural Changes in the Actin- and Myosin-containing Filaments during Contraction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 37, 361–376
- Huxley HE (2004): Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. *Eur J Biochem* 271, 1403–1415
- Inamdar AA, Inamdar AC (2016): Heart Failure: Diagnosis, Management and

- Utilization. *J Clin Med* 5, 62
- Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H (1995): A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 806–812
- Jensen L, Troster SM, Cai K, Shack A, Chang Y-JR, Wang D, Kim JS, Turial D, Bierman AS (2016): Improving Heart Failure Outcomes in Ambulatory and Community Care A Scoping Study. *Med Care Res Rev* 1077558716655451
- Jett MF, Schworer CM, Bass M, Soderling TR (1987): Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Arch Biochem Biophys* 255, 354–360
- Katz AM, Zile MR (2006): New Molecular Mechanism in Diastolic Heart Failure. *Circulation* 113, 1922–1925
- Kleppisch T, Pedersen K, Strübing C, Bosse-Doenecke E, Flockerzi V, Hofmann F, Hescheler J (1994): Double-pulse facilitation of smooth muscle alpha 1-subunit Ca²⁺ channels expressed in CHO cells. *EMBO J* 13, 2502–2507
- Knollmann BC, Roden DM (2008): A genetic framework for improving arrhythmia therapy. *Nature* 451, 929–936
- Kobayashi T, Yamada Y, Fukao M, Tsutsuura M, Tohse N (2007): Regulation of Cav1.2 current: interaction with intracellular molecules. *J Pharmacol Sci* 103, 347–353
- Kohlhaas M: Die Bedeutung der subzellulären CaMKII δ -Überexpression auf den intrazellulären Ca²⁺ -Stoffwechsel in Herzmuskelzellen. 2006
- Kreusser MM, Lehmann LH, Keranov S, Hoting M-O, Oehl U, Kohlhaas M, Reil J-C, Neumann K, Schneider MD, Hill JA, et al. (2014): Cardiac CaM Kinase II genes δ and γ contribute to adverse remodeling but redundantly inhibit calcineurin-induced myocardial hypertrophy. *Circulation* 130, 1262–1273
- Kudrnac M, Beyl S, Hohaus A, Stry A, Peterbauer T, Timin E, Hering S (2009): Coupled and Independent Contributions of Residues in IS6 and IIS6 to Activation Gating of Ca_v 1.2. *J Biol Chem* 284, 12276–12284
- Lai D, Xu L, Cheng J, Guilbert AB, Lim HJ, Fu G, Wang Y (2013): Stretch Current-induced Abnormal Impulses in CaMKII δ Knockout Mouse Ventricular Myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 24, 457–463
- Langer GA, Peskoff A (1996): Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. *Biophys J* 70, 1169–1182
- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL (2010): Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003996
- Lee T-S, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, Kleppisch T, Welling A (2006): Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* 281, 25560–25567
- Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LMM, Vandenberg CA (2004): A Multiprotein Trafficking Complex Composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 Is Associated with Inward Rectifier Kir2 Potassium Channels. *J Biol Chem* 279, 19051–19063
- Lu CS, Hodge JJ, Mehren J, Sun XX, Griffith LC (2003): Regulation of the Ca²⁺/CaM-Responsive Pool of CaMKII by Scaffold-Dependent Autophosphorylation. *Neuron* 40, 1185–1197
- Lundby A, Andersen MN, Steffensen AB, Horn H, Kelstrup CD, Francavilla C, Jensen LJ, Schmitt N, Thomsen MB, Olsen JV (2013): In vivo phosphoproteomics analysis reveals the cardiac targets of β -adrenergic receptor signaling. *Sci Signal*

6, rs11

- Maeda S, Tsukihara T (2011): Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell Mol Life Sci CMLS* 68, 1115–1129
- Maier L, Bers D (2007): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation–contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73, 631–640
- Maier LS (2003): Transgenic CaMKII δ C Overexpression Uniquely Alters Cardiac Myocyte Ca²⁺ Handling: Reduced SR Ca²⁺ Load and Activated SR Ca²⁺ Release. *Circ Res* 92, 904–911
- Maier LS, Bers DM (2002): Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919–939
- Mangmool S., Shukla AK, Rockman HA (2010): -Arrestin-dependent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II after 1-adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol* 189, 573–587
- Mangmool Supachoke, Shukla AK, Rockman HA (2010): β -Arrestin–dependent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II after β 1–adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol* 189, 573–587
- McHugh D, Sharp EM, Scheuer T, Catterall WA (2000): Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci* 97, 12334–12338
- McMurray JJ, Pfeffer MA (2005): Heart failure. *The Lancet* 365, 1877–1889
- Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990): Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 85, 305–309
- Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H (1992): Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256, 1199–1202
- Mukherjee K, Sharma M, Urlaub H, Bourenkov GP, Jahn R, Südhof TC, Wahl MC (2008a): CASK Functions as a Mg²⁺-Independent Neurexin Kinase. *Cell* 133, 328–339
- Mukherjee K, Sharma M, Urlaub H, Bourenkov GP, Jahn R, Südhof TC, Wahl MC (2008b): CASK Functions as a Mg²⁺-Independent Neurexin Kinase. *Cell* 133, 328–339
- Mukherjee R, Spinale FG (1998): L-type Calcium Channel Abundance and Function with Cardiac Hypertrophy and Failure: A Review. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1899–1916
- Mustroph J, Sag CM, Bähr F, Schmidtman A-L, Gupta SN, Dietz A, Islam MT, Lücht CM, Beuthner BE, Pabel S, et al. (2021): Loss of CASK Accelerates Heart Failure Development. *Circ Res*
- Nafzger S, Rougier J-S (2017): Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase CASK modulates the L-type calcium current. *Cell Calcium* 61, 10–21
- Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010): CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 106, 1134–1144
- Neef S, Sag CM, Daut M, Bäumer H, Grefe C, El-Armouche A, DeSantiago J, Pereira L, Bers DM, Backs J, Maier LS (2013): While systolic cardiomyocyte function is preserved, diastolic myocyte function and recovery from acidosis are impaired in CaMKII δ -KO mice. *J Mol Cell Cardiol* 59, 107–116
- Nowicky MC, Fox AP, Tsien RW (1985): Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440–443
- Paolini C, Protasi F, Franzini-Armstrong C (2004): The Relative Position of RyR Feet

- and DHPR Tetrads in Skeletal Muscle. *J Mol Biol* 342, 145–153
- Penner R, Neher E (1989): The patch-clamp technique in the study of secretion. *Trends Neurosci* 12, 159–163
- Perez-Reyes E (2003): Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiol Rev* 83, 117–161
- Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT (1999): Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22, 549–558
- Pogwizd SM, Bers DM Na/Ca Exchange in Heart Failure. *Ann N Y Acad Sci* 976, 454–465
- Ramirez MT, Zhao X-L, Schulman H, Brown JH (1997): The Nuclear δ B Isoform of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Regulates Atrial Natriuretic Factor Gene Expression in Ventricular Myocytes. *J Biol Chem* 272, 31203–31208
- Rasenack E: Regulation des kardialen sarkolemmalen Natriumkanals durch die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ c (CaMKII δ c). Ein neuer Mechanismus für die Entstehung von Arrhythmien. 2006
- Rellos P, Pike ACW, Niesen FH, Salah E, Lee WH, Von Delft F, Knapp S (2010): Structure of the CaMKII delta calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol* 8
- Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skårdal K, et al. (2012): Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res* 110, 1474–1483
- Roger VL, Weston SA, Redfield MM, et al (2004): Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 292, 344–350
- Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela M-K, Backs J, Olson EN, Brown JH, et al. (2009): Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Contributes to Cardiac Arrhythmogenesis in Heart Failure. *Circ Heart Fail* 2, 664–675
- Saucerman JJ, Bers DM (2012): Calmodulin binding proteins provide domains of local Ca²⁺ signaling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 52, 312–316
- Schröder Frank, Handrock Renate, Beuckelmann Dirk J., Hirt Stephan, Hullin Roger, Priebe Leo, Schwinger Robert H. G., Weil Joachim, Herzig Stefan (1998): Increased Availability and Open Probability of Single L-Type Calcium Channels From Failing Compared With Nonfailing Human Ventricle. *Circulation* 98, 969–976
- Schuh K, Uldrijan S, Gambaryan S, Roethlein N, Neyses L (2003): Interaction of the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump 4b/C1 with the Ca²⁺/Calmodulin-dependent Membrane-associated Kinase CASK. *J Biol Chem* 278, 9778–9783
- Scriven DR, Dan P, Moore ED (2000): Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79, 2682–2691
- Shan J, Betzenhauser MJ, Kushnir A, Reiken S, Meli AC, Wronska A, Dura M, Chen B-X, Marks AR (2010): Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and β -adrenergic receptor blockade in mice. *J Clin Invest* 120, 4375–4387
- Shaw RM, Colecraft HM (2013): L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 98, 177–186
- Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, et al. (2010): Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107, 1150–1161

- Stenger RJ, Spiro D (1961): THE ULTRASTRUCTURE OF MAMMALIAN CARDIAC MUSCLE. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 325–351
- Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75, 443–453
- Sumi (1991): The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181(3):968–75
- Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng Z-J, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, et al. (2006): Heart Disease and Stroke Statistics—2006 Update. *Circulation* 113, e85–e151
- Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, et al. (2010): Differential Cardiac Remodeling in Preload Versus Afterload. *Circulation* 122, 993–1003
- Uemura A, Okazaki K, Takesue H, Matsubara T, Hidaka H (1995): A novel Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase lacking autophosphorylation activity in the rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun* 211, 562–569
- Wagner S: Die Bedeutung des Natrium-Kalzium-Austauschers für die Empfindlichkeit des Myokards gegenüber Sauerstoffradikalen. 2005
- Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, Sowa T, Fabritz L, Kirchhof P, Bers DM, Maier LS (2009): Ca/Calmodulin Kinase II Differentially Modulates Potassium Currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 285–294
- Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, et al. (2011): Reactive Oxygen Species–Activated Ca/Calmodulin Kinase II δ Is Required for Late INa Augmentation Leading to Cellular Na and Ca Overload. *Circ Res* 108, 555–565
- Wang Y, Yuan L (2015): [The role of calcium/calmodulin dependent serine protein kinase in embryonic development and related diseases]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet* 32, 422–425
- Wang Y, Tandan S, Cheng J, Yang C, Nguyen L, Sugianto J, Johnstone JL, Sun Y, Hill JA (2008): Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II-dependent Remodeling of Ca²⁺ Current in Pressure Overload Heart Failure. *J Biol Chem* 283, 25524–25532
- Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Chen P-S, Qu Z (2010): Early afterdepolarizations and cardiac arrhythmias. *Heart Rhythm* 7, 1891–1899
- Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Eric N, Olson, Colbran RJ (2002): Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106, 1288–1293
- Xiao RP, Cheng H, Lederer WJ, Suzuki T, Lakatta EG (1994): Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9659–9663
- Yang L, Dai D-F, Yuan C, Westenbroek RE, Yu H, West N, de la Iglesia HO, Catterall WA (2016): Loss of β -adrenergic–stimulated phosphorylation of CaV1.2 channels on Ser1700 leads to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E7976–E7985
- Yuan W, Bers DM (1994): Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 267, H982–H993
- Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, et al. (2002): The Cardiac-specific Nuclear δ B Isoform of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Induces

Hypertrophy and Dilated Cardiomyopathy Associated with Increased Protein Phosphatase 2A Activity. *J Biol Chem* 277, 1261–1267

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

Zühlke RD, Pitt GS, Tsien RW, Reuter H (2000): Ca²⁺-sensitive Inactivation and Facilitation of L-type Ca²⁺ Channels Both Depend on Specific Amino Acid Residues in a Consensus Calmodulin-binding Motif in the α 1C subunit. *J Biol Chem* 275, 21121–21129

American Heart Association.
http://professional.heart.org/professional/General/UCM_423811_Classification-of-Functional-Capacity-and-Objective-Assessment.jsp; Zugriff am 07.07.2016

Gesundheitsberichterstattung des B. http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_2&OPINDEX=9&HANDLER=_XWD_CUBE.SETPGS&DATACUBE=_XWD_30&D.000=3736&D.001=1000001&D.002=1000002&D.003=1000004&D.004=1000006&D.011=44302; Zugriff am 06.07.2016

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ
Statistisches Bundesamt.
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>; Zugriff am 06.07.2016

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei dieser Dissertation in jeglicher Weise unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Hr. Prof. Dr. med. L. Maier für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Team zu erstellen. Die herzliche Atmosphäre im Labor, die ausgezeichneten Leistungen der Arbeitsgruppe und die Begeisterung für die Forschung die mir dort entgegengebracht wurden, haben maßgebend zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen.

Außerdem gilt besonderem Dank Hr. Prof. Dr. med. S. Wagner für seine langjährige Unterstützung. Insbesondere während der experimentellen Versuche und der Erstellung der finalen Arbeit stand er mir mit Rat und Tat zur Seite.

Ebenfalls möchte ich den Mitarbeitern des Labors, insbesondere Timo Schulte, Thomas Sowa und Felicia Steuer für die konstruktive Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft danken, mir bei akuten Problemen oder Fragen zu helfen.

Ein besonderer Dank geht an meinen Ehemann Hr. Dr. med. Dr. med. dent. Max-Philipp Lentzen für die Geduld und den Rückhalt während der Erstellung dieser Arbeit.

Sehr Dankbar bin ich auch für die stets konstruktive und hilfreiche Kritik sowie die akribischen Korrekturen meines Schwiegervaters Hr. Prof. Dr. Hans Lentzen.

Besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern Dr. Annette und Dr. Ulrich Schmidtman sowie meinen Geschwistern Julia und Antonia Schmidtman für die endlose Unterstützung während des Studiums und bei Erstellung dieser Disseration.