

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

**Einfluss der Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors 2 an Ser-2814 auf
das SR Ca²⁺-Leck und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Modell
der CaMKIIδc-transgenen Maus**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mark-Tilman Seitz

2022

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

**Einfluss der Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors 2 an Ser-2814 auf
das SR Ca²⁺-Leck und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Modell
der CaMKIIδc-transgenen Maus**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mark-Tilman Seitz

2022

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Stefan Neef
2. Berichterstatter:	PD Dr. Simon Schopka
Tag der mündlichen Prüfung:	19.04.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Funktion und Anatomie des Herzens, Herzinsuffizienz	1
1.1.1 Herzinsuffizienz	1
1.1.2 Ultrastruktur des Herzens und der einzelnen Herzmuskelzellen	4
1.2 Elektromechanische Kopplung im Herzen	6
1.2.1 Der L-Typ-Kalzium-Kanal	9
1.2.2 Der Ryanodinrezeptor Typ 2	9
1.2.3 Die SR-Kalzium-ATPase	11
1.2.4 Der Natrium-Kalzium-Austauscher	11
1.2.5 Regulation der elektromechanischen Koppelung durch die Proteinkinase A	12
1.3 Die Kalzium / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II als zentraler Regulator der elektromechanischen Kopplung	13
1.4 SR Ca^{2+} -Leck und Remodelling der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz	17
1.4.1 Modell der transgen CaMKII δ_c überexprimierenden Maus	18
1.4.2 Bedeutung der CaMKII und der CaMKII-abhängigen RyR2 Phosphorylierung an Ser-2814 für das SR Ca^{2+} -Leck	19
1.4.3 Bedeutung der Arrhythmien bei chronischer Überexpression der CaMKII δ_c	20
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Promotionsarbeit	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Verpaarung der Mäuse	22
2.2 Vorbereitung der Materialien und Isolation der Kardiomyozyten	23
2.2.1 Isolation der Herzmuskelzellen aus Mäuseherzen	23
2.2.2 Erhebung biometrischer Daten	27
2.2.3 Vorbereitung der Messkammer und Plattieren der Kardiomyozyten	27
2.3 Verwendete Versuchslösungen	28
2.3.1 Zusammensetzung der Basistyrode	28
2.3.2 Zusammensetzung der Messtyrode	29
2.4 Kalziumfluoreszenzfarbstoffe	29
2.4.1 Fluo-4-AM	30
2.4.2 Zusammensetzung der verwendeten Fluoreszenzfarbstofflösungen	31
2.5 Messung vom SR Ca^{2+} -Leck am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop	32

2.5.1 Versuchsdurchführung	32
2.5.2 Datenauswertung	34
2.6 Echokardiographie.....	34
2.6.1 Versuchsaufbau	35
2.6.2 Versuchsdurchführung	35
2.6.3 Datenauswertung	37
2.7 Überlebenszeitanalyse	37
2.8 Verblindung	38
2.9 Statistik	38
2.10 Hersteller der verwendeten Substanzen	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Biometrische Daten	40
3.2 Echokardiographie.....	42
3.3 Spontanes diastolisches SR Ca ²⁺ -Leck.....	45
3.4 Sterblichkeit	48
4 Diskussion	49
4.1 Die RyR2 S2814A-Mutation verhindert das CaMKIIδ _C -TG induzierte diastolische SR Ca ²⁺ -Leck	49
4.2 ... schützt aber nicht vor der Entstehung von Herzinsuffizienz.....	51
4.3 ... und der vorzeitigen Sterblichkeit	53
4.4 RyR2-S2814 Phosphorylierungsstelle im (patho-) physiologischen Kontext.....	55
5 Zusammenfassung	58
6 Literaturverzeichnis	60
Danksagung	
Selbstständigkeitserklärung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Circulus Vitiosus der Herzinsuffizienz	3
Abbildung 1.2: Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle.....	5
Abbildung 2.1: Verpaarungsschema der Versuchstiere.....	23
Abbildung 2.2: Sicht auf den eröffneten Mäusethorax.....	24
Abbildung 2.3: Retrograde Kanülierung der Aorta	25
Abbildung 2.4: Fixiertes Herz	25
Abbildung 2.5: Langendorff-Isolationsanlage.....	26
Abbildung 2.6: Aufsicht auf eine Messkammer	27
Abbildung 2.7: Entstehung des Fluoreszenzlichts.....	29
Abbildung 2.8: Eigenschaften von Fluo-4.....	31
Abbildung 2.9: Echokardiographie einer 7 Wochen alten WT-Maus	36
Abbildung 3.1: Originalbilder entnommener Herzen der Genotypen im Vergleich	40
Abbildung 3.2: Herzgewicht der Genotypen im Vergleich.....	40
Abbildung 3.3: Lungengewicht der Genotypen im Vergleich.....	41
Abbildung 3.4: Lebergewicht der Genotypen im Vergleich	42
Abbildung 3.5: Echographische M-Mode Registrierungen der Genotypen im Vergleich	43
Abbildung 3.6: Vergleich der Ejektionsfraktion nach 7 und 12 Wochen.....	44
Abbildung 3.7: Vergleich des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers nach 7 und 12 Wochen	44
Abbildung 3.8: Herzfrequenz der Genotypen im Alter von 12 Wochen.....	45
Abbildung 3.9: Konfokale Line-Scans mit Ca^{2+} -Sparks der unterschiedlichen Genotypen.....	45
Abbildung 3.10: Ca^{2+} -Spark-Größe und -Frequenz der Genotypen im Vergleich	46
Abbildung 3.11: SR Ca^{2+} -Leck der Genotypen im Vergleich	47
Abbildung 3.12: Überlebenszeitanalyse der Genotypen dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Inhaltsstoffe der Basistyrode	28
Tabelle 2.2: Zusammensetzung Pluronic 20%	31
Tabelle 3: Herstellerangaben verwendeter Substanzen	39

Abkürzungsverzeichnis

A-Bande	anisotrope Bande
AM	Azetoxymethylester
ATP-Molekül	Adenosintriphosphat-Molekül
AP	Aktionspotenzial
AWThd	Vorderwanddicke des linken Ventrikels (<i>anterior wall thickness</i>)
BPM	Herzschläge pro Minute (<i>beats per minute</i>)
BW	Körpergewicht (<i>body weight</i>)
Ca ²⁺	Kalzium
CaMKII	Ca ²⁺ -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklischen Adenosinmonophosphat
CPVT	katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (<i>catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia</i>)
DAD	späte Nachdepolarisation (<i>delayed afterdepolarization</i>)
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
ECC	elektromechanischen Kopplung (<i>excitation-contraction coupling</i>)
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
FAS	Prozentuale Verkürzung (<i>fractional shortening</i>)
FD	Dauer eines Ca ²⁺ -Sparks (<i>full duration</i>)
FKBP	FK-506 <i>binding</i> Protein
FS	Größe eines Ca ²⁺ -Sparks (<i>full size</i>)
FW	Breite eines Ca ²⁺ -Sparks (<i>full width</i>)
H-Bande	Hensen-Linie
HDAC4	Histon-Deacetylase 4
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (<i>Heart failure with reduced ejection fraction</i>)
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (<i>Heart failure with preserved ejection fraction</i>)
HR	Herzfrequenz (<i>heart rate</i>)
HW	Herzgewicht (<i>heart weight</i>)
I-Bande	isotrope Bande
I _{Ca}	Kalziumeinstrom

NYHA	New York Heart Association
HZV	Herzzeitvolumen
LVIDd	linksventrikulärer enddiastolische Durchmesser (<i>left ventricular enddiastolic diameter</i>)
LuW	Lungengewicht (<i>lung weight</i>)
LiW	Lebergewicht (<i>liver weight</i>)
O ₂	Sauerstoff
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i>
M-Linie	Mittel-Linie
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
NF	Nekrosefaktor
TiL	Tibiallänge (<i>tibia lenght</i>)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2a	Proteinphosphatase 2A
PP2c	Proteinphosphatase 2C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
RyR	Ryanodinrezeptor
RyR2	Ryanodinrezeptor Typ 2
SEM	Standardfehler (<i>standard error of mean</i>)
SERCA2a	sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	transverse aortale Konstriktion (<i>transverse aortic constriction</i>)
T-Tubuli	transversalen Tubuli
WT	Wildtyp
Z-Linie	Zwischen-Linie

1 Einleitung

Aufgabe des Herzens ist es, den Organismus mit sauerstoffreichem Blut und Nährstoffen zu versorgen. Ist dieser Prozess durch eine nicht ausreichende Pumpleistung des Herzens gestört, spricht man von Herzinsuffizienz.

Veränderungen im Kalziumhaushalt der Herzmuskelzelle werden als eine der zentralen Ursachen für die Entstehung der Herzinsuffizienz angesehen [1].

1.1 Funktion und Anatomie des Herzens, Herzinsuffizienz

1.1.1 Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist definiert als Unfähigkeit des Herzens das Herzzeitvolumen (HZV) situationsgerecht aufrechtzuerhalten bzw. dieses nur unter erhöhten Füllungsdrücken (Vorlast) zu tun. Je nach Stadium der Krankheit kommt es zu typischen Symptomen wie Dyspnoe, Abgeschlagenheit und Ausprägung kardialer Ödeme [2]. Eingeteilt wird die Herzinsuffizienz nach der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA), anhand der körperlichen Beschwerden des Patienten unter Belastung. Die NYHA-Klassifikation umfasst vier Schweregrade: Stadium I: Beschwerdefreiheit unter körperlicher Belastung, Stadium II: Beschwerden unter stärkerer körperlicher Belastung, Stadium III: Beschwerden bei leichter Belastung, Stadium IV: Beschwerden in Ruhe.

In Deutschland leiden ca. 1,8 Mio. Menschen unter einer Herzinsuffizienz. Jährlich steigt die Zahl der Erkrankten um 300.000 Neuerkrankte [3]. Laut statistischem Bundesamt ist die Herzinsuffizienz 2014 die vierthäufigste Todesursache und stellt bei Patienten über 65 Jahren den häufigsten Grund für eine Krankenhauseinweisung dar [4].

Damit ist die Herzinsuffizienz eine der aktuell häufigsten und kostenintensivsten chronischen Erkrankungen. In der europäischen Bevölkerung wird die Gesamtprävalenz der Herzinsuffizienz auf etwa 2% geschätzt. Die Krankheitshäufigkeit ist altersabhängig. In der Altersgruppe der 45- bis 55-Jährigen sind <1% und bei den >80-Jährigen 10% betroffen [2]. Da die Prävalenz mit zunehmendem Alter steigt, ist durch die demographische Entwicklung und den heutigen medizinischen Fortschritt, verbunden mit einer immer höheren Lebenserwartung der Gesellschaft, mit einem Anstieg der jährlichen Neuerkrankungen zu rechnen [5]. Neben einer ethisch wünschenswerten besseren Versorgung der Erkrankung hat

ein besseres Verständnis der Herzinsuffizienz und sich daraus ergebende neue Behandlungsstrategien also auch hohe sozioökonomische Relevanz.

Einzuteilen ist sie in eine systolische Insuffizienz, die mit einer reduzierten Ejektionsfraktion (EF) des Ventrikels und dadurch einem verminderten Schlagvolumen einhergeht (Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion / „Heart failure with reduced ejection fraction“, HFrEF), und in eine diastolische Dysfunktion, bei der die systolische Auswurfleistung erhalten ist, aber eine Relaxationsstörung und eine damit einhergehende gestörte Blutfüllung insbesondere des linken Ventrikels besteht (Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion, „Heart failure with preserved ejection fraction“, HFpEF).

Es gibt viele Ursachen, die zu einer systolischen Herzinsuffizienz führen können: Die aktuell häufigste Ursache ist weiterhin die akute oder chronische Myokardischämie mit folgendem Untergang von Herzmuskelgewebe, aber auch Druck- oder Volumenbelastungen, toxische Kardiomyopathien (z.B. infolge Alkoholismus), Myokarditiden, Herzrhythmusstörungen, oder Mutationen in den für Sarkomere und Zytoskelett codierenden Genen. Alle genannten Pathologien können zu einer eingeschränkten Pumpfunktion des Herzens mit resultierendem Vorwärts- und/oder Rückwärtsversagen führen. Die genauen pathophysiologischen Ursachen der diastolischen Herzinsuffizienz sind derzeit weitaus weniger bekannt. Allgemein bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren sind u.a. Hypertonus, Diabetes mellitus und das weibliche Geschlecht. Infolge der Beeinträchtigung der Myokardfunktion kommt es gegenregulatorisch zu einer neuroendokrinen Aktivierung, die für kurze Zeit dem Abfall der Herzleistung entgegenwirkt, längerfristig aber in einem Circulos vitiosus (vgl. Abbildung 1.1) endet und dadurch das Fortschreiten der Herzinsuffizienz fördert [2].

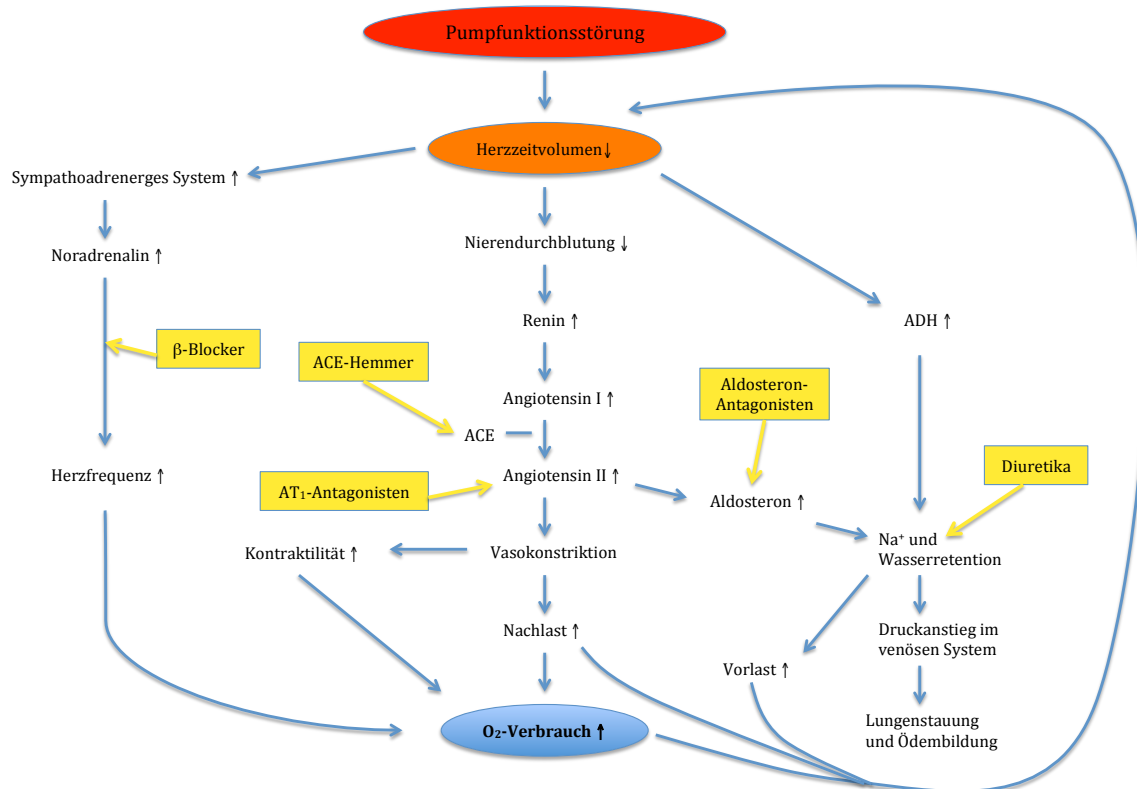


Abbildung 1.1: Circulus Vitiosus der Herzinsuffizienz

Zu diesen Gegenregulationsmechanismen zählen insbesondere das sympathische Nervensystem und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Das sympathische Nervensystem steigert die Ausschüttung von Katecholaminen (z.B. Noradrenalin) wodurch es zu einer Steigerung der Herzfrequenz und Kontraktionskraft, die im weiteren Verlauf aber zu einem Mehrbedarf an Sauerstoff (O_2) führt, kommt. Damit einhergehend ist eine Verkürzung der Diastole. Da das Herz in dieser durchblutet wird, nimmt die eigene Versorgung mit Sauerstoff ab und der gegenregulatorische Prozess führt zum weiteren Abfall des Herzzeitvolumens (HZV).

Gleichzeitig geht ein reduziertes HZV mit einer verminderten Durchblutung der Niere einher worauf eine Aktivierung des RAAS folgt. Diese führt zu einer Natrium- und Wasserretention. Damit zum Druckanstieg im venösen System und zur Ausbildung von Ödemen und Lungenstauung. Außerdem kommt es durch Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße zu einer erhöhten Nachlast des Herzens, so dass dieses weiter belastet wird.

Abhängig von der Ausprägung der Erkrankung kommt es unter Belastung oder in Ruhe zu typischen Kardinalsymptomen wie Luftnot, periphere Ödeme und Leistungsminderung [6].

Weitere klinische Symptome können vermehrter nächtlicher Harndrang, Tachykardie, Tachypnoe, Herzrhythmusstörungen, Pleuraergüsse und Lungenstauung sein[7].

Vorderstes Ziel der Herzinsuffizienz-Therapie ist es, die zur Herzinsuffizienz führende Grunderkrankung zu behandeln. Danach bzw. daneben erfolgt eine symptomatische Therapie, sowie eine medikamentöse Gegenregulation der neuroendokrinen Aktivierung, mit dem Ziel, den Circulus vitiosus zu durchbrechen. Die medikamentöse Therapie richtet sich dabei u.a. nach den NYHA-Stadien und vor allem der EF. Mögliche Herzinsuffizienzmedikamente zur Unterbrechung des Circulus Vitiosus und ihre Zielsubstrate sind in Abbildung 1.1. in gelb dargestellt.

Die Prognose der Herzinsuffizienz ist abhängig vom NYHA-Stadium. Die 1-Jahresletalität beträgt im Stadium I <10%. Im Vergleich dazu beträgt die jährliche Sterblichkeit im Stadium IV ca. 50%. Die Prognose verbessert sich deutlich durch eine leitliniengerechte Therapie.

1.1.2 Ultrastruktur des Herzens und der einzelnen Herzmuskelzellen

Eine einzelne Herzmuskelzelle (Kardiomyozyt) hat eine Länge ca. 100 µm und einen Durchmesser von 15-20 µm. Umschlossen werden die Kardiomyozyten von einer Zellmembran, dem Sarkolemm (vgl. Abbildung 1.2). Sie bildet zusammen mit den transversalen Tubuli (T-Tubuli) eine Permeabilitätsbarriere zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum. Das Sarkolemm besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, in die Cholesterin sowie zahlreiche integrale Proteine, z.B. Ionenpumpen und -kanäle eingebaut sind. Die Ionenkanäle steuern den Ein- und Ausstrom von Ionen in und aus dem Kardiomyozyten - zum einen passiv über die osmotischen Gradienten, zum anderen aktiv über energieverbrauchende Prozesse [8].

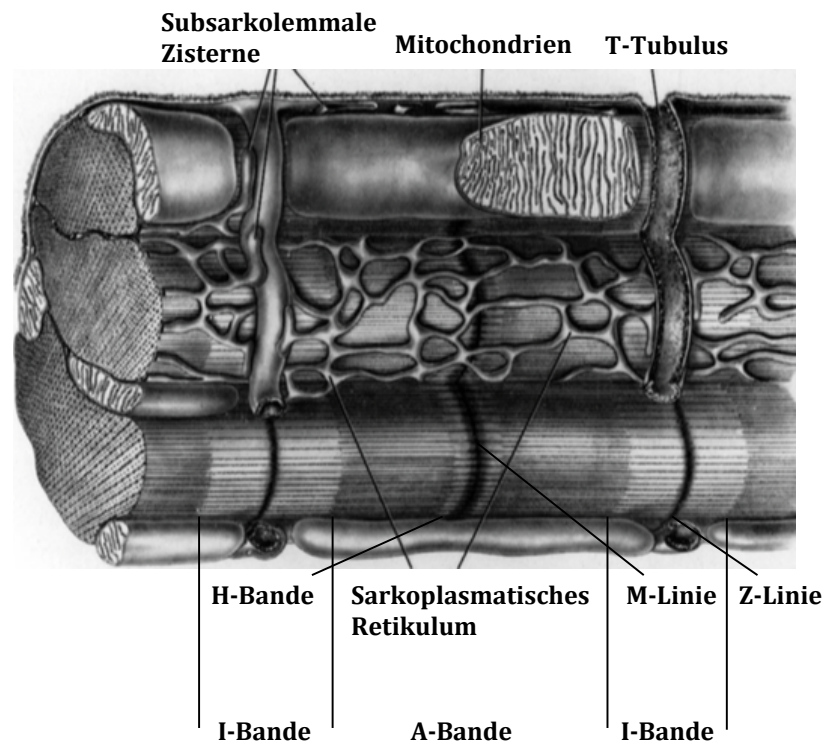


Abbildung 1.2: Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle

Aufbau eines Sarkomers, die I-Banden sind mit ihren Enden an den Z-Linien verbunden. Darauf folgt die A-Bande in dessen Mitte sich die M-Bande, die von der H-Bande umgeben ist, befindet. So weißt jeder Sarkomerabschnitt folgendes Muster auf: Z-I-A-H-M-H-A-I-Z. (Modifiziert nach Bers 2001, Seite 3)

Die Myofilamente nehmen 45-60% des Zellvolumens ein. Sie setzen die elektrische Erregung der Zelle in eine mechanische Kontraktion um. Die Filamente sind parallel angeordnet und bestehen aus Aktin (dem dünnen Teil) und Myosin, (dem dicken Teil). Zusammen ergeben sie ein Sarkomer. Beide Filamenttypen sind an unterschiedlichen Stellen im Sarkomer verankert, woraus sich der typische Aufbau des Sarkomers aus Z- und M-Linie und A- und I-Bande ergibt.

Durch die kontinuierliche Überlappung der Myosinfilamente kommt der als Querbrückenbildung beschriebene Kontraktionsvorgang zustande. Dieser wird im Kapitel 1.2 elektromechanische Koppelung näher beschrieben.

Zu den weiteren Zellorganellen der Herzmuskelzelle zählt das sarkoplasmatische Retikulum (SR).

In der elektromechanischen Kopplung (ECC) hat das SR durch seine Aufgaben Kalziumaufnahme, -einspeicherung, und schließlich -ausschüttung des Kalziums (Ca^{2+}) in das Zytosol während der Systole eine bedeutende Rolle.

Der Prozess von Speicherung, Ausschüttung und Wiederaufnahme des Ca^{2+} wird im Wesentlichen durch drei regulatorische Proteine in Balance gehalten: 1. Die Kalziumbindeproteine, wie Calsequestrin (welches mit einem Anteil von ungefähr 27% das wichtigste Bindepotein ist), das histidinreiche Ca^{2+} -bindende Protein, Juncate und Sarcalumenin, die der Kalziumspeicherung dienen; 2. die Ryanodinrezeptoren (RyR, SR-Kalziumfreisetzungs-Kanäle), durch die das Ca^{2+} ausgeschüttet wird; und 3. die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), welche das in der Systole freigesetzte Ca^{2+} anschließend wieder in das SR zurückpumpt [9]. Diese Funktion des SRs soll im folgenden Abschnitt detailliert dargestellt werden.

1.2 Elektromechanische Kopplung im Herzen

Schon vor etwa 140 Jahren zeigte Sydney Ringer in London in einem Experiment die Wichtigkeit von Ca^{2+} für die Muskelkontraktion. Er isolierte 1883 ein Rattenherz und ließ es in Leitungswasser schlagen. Nachdem er Leitungswasser gegen destilliertes Wasser tauschte wurde der Herzschlag bis hin zum Herzstillstand langsamer. Daraufhin fügte er der Lösung Kalziumsalz hinzu mit dem Ergebnis, dass die Herzkontraktion wieder einsetzte [10].

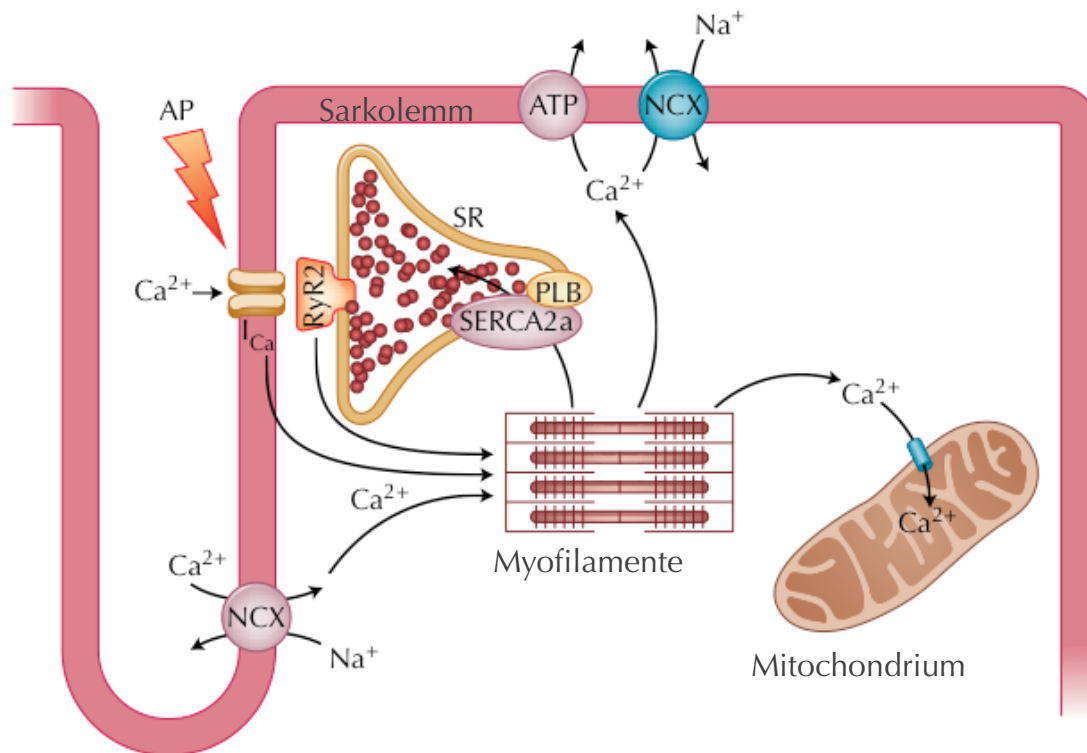


Abbildung 1.3: Die Elektromechanische Kopplung im Herzen

Die Herzmuskelzelle wird durch ein Aktionspotential (AP) erregt, wodurch es zur Öffnung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle kommt. Der Kalziumeinstrom führt zur Kalzium-induzierten-Kalziumfreisetzung aus dem SR. Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} führt zur Aktivierung der Myofilamente. Während der Diastole wird das Ca^{2+} über die SERCA2a zurück in das SR, über den NCX zurück in den Extrazellulärraum und zu geringen Teilen über die Kalzium-ATPase und den mitochondriale Kalzium-Uniporter in den Intrazellulärraum eliminiert.

Abbildung nach Neef und Maier 2007 [11], © 2007 by Current Medicine Group LLC mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags.

Der Prozess, der Umsetzung der elektrischen Erregung durch ein Aktionspotential (AP) in eine mechanische Kontraktion wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Dieser Ablauf wird hier zunächst dargestellt, wesentliche hierbei relevante Proteine werden im Anschluss vertiefend beschrieben.

Bei elektrischer Erregung der Zelle kommt es zur Depolarisation der Zellmembran. Daraufhin öffnen sich die in der Membran der T-Tubuli lokalisierten spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und Ca^{2+} strömt ins Zytosol ein. Außerdem kann es über den Natrium-Kalzium-Austauscher im Einwärtsmodus zum Ca^{2+} -Einstrom kommen. Es erfolgt daraufhin eine durch den Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, die 1975 von Fabiato und Fabiato erstmals beschrieben wurde: Das durch die L-Typ-Kanäle in die Zelle einströmende Ca^{2+} triggert die Öffnung von sich im SR befindlichen Ca^{2+} -Kanälen, der Ryanodinrezeptoren Typ 2, wodurch es zu einem noch viel größeren Ca^{2+} -Einstrom aus dem SR in das Zytosol kommt. Die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt

von etwa 100 nM auf 1 μM an [8]. Diese Ca^{2+} -induzierte- Ca^{2+} -Freisetzung ist in Abbildung 1.3 veranschaulicht.

Der zytosolische Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration führt zur Bindung des Ca^{2+} an Troponin C, woraufhin es zur Aktivierung der Myofilamente Aktin und Myosin und durch ihr ineinander gleiten (Querbrückenzyklus; „Gleitfilament-Theorie“ vgl. Abbildung 1.4) zur mechanischen Kontraktion der Zelle kommt [8].

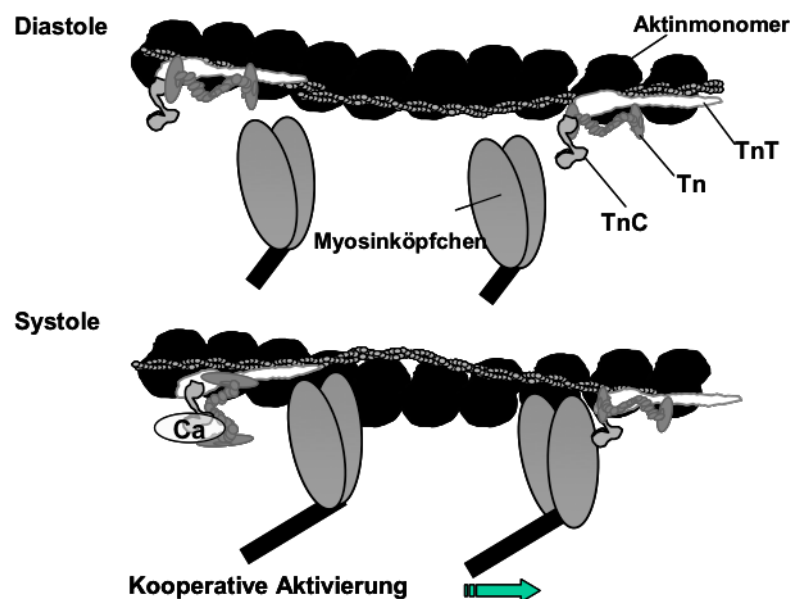


Abbildung 1.4: Querbrückenzyklus der Myofilamente

Durch die Bindung von Ca^{2+} an Troponin C gibt dieses die Myosinbindungsstellen am Aktinfilament frei. Nachfolgend kommt es zur Drehung des Myosinköpfchens und zur Verschiebung des Aktinfilaments, so dass beide Filamente ineinander gleiten und es zur Kontraktion der Zelle kommt. (Modifiziert nach Bers 2001, S. 25)

Damit die Zelle nach der Kontraktion wieder relaxieren kann, muss das Ca^{2+} in der Diastole aus dem Zytoplasma transportiert werden. Dies geschieht auf vier verschiedenen Wegen: Im Menschen wird der Großteil des Ca^{2+} (70%) über die SERCA2a zurück in das SR gepumpt. Weitere 28% des Ca^{2+} werden durch den NCX (im Austausch gegen Natrium) in den extrazellulären Raum befördert. Die letzten zwei Prozent des ausgeschütteten Ca^{2+} , werden über die sogenannten langsamen Transporter, die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter, eliminiert. Im Vergleich dazu findet die Kalziumeliminierung in Mäusekardiomyozyten zu etwa 90 % über die SERCA2a und nur zu 7 % über den NCX statt. [12].

1.2.1 Der L-Typ-Kalzium-Kanal

Der in der Membran des T-Tubulus lokalisierte spannungsabhängige L-Typ Kalzium-Kanal (Dihydropyridinrezeptor; DHPR; LTCC) öffnet sich durch die Depolarisation der Zellmembran während des Aktionspotentials bei -40 mV, wodurch es zum Kalziumeinstrom von extrazellulär durch den Kanal in die Zelle kommt.

Die Inaktivierung des Kanals wird einerseits durch einen negativen Feedbackmechanismus, der durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration entsteht, und andererseits durch eine lang anhaltende Depolarisation ausgelöst [8].

1.2.2 Der Ryanodinrezeptor Typ 2

1.2.2.1 Funktion und Struktur des Ryanodinrezeptors

Die Ryanodinrezeptoren (RyR) sind die größten integralen Kalziumkanäle in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums. Von den drei existierenden Isoformen im Herzen ist der Ryanodinrezeptor Typ 2 (RyR2) die dominante Form. Strukturanalysen haben gezeigt, dass der RyR ein Homotetramer zusammengesetzt aus vier identischen RyR Untereinheiten ist. Zusammen ergeben die Untereinheiten eine Kanalpore [13].

Die RyRs befinden sich in den terminalen Zisternen des SR und sind in großen Gruppen organisiert, die die Verbindung zwischen SR und T-Tubulus des Sarkolemmes herstellen. Ungefähr 10-25 L-Typ-Kalziumkanäle und 100 RyRs bilden gemeinsam einen Ca^{2+} -Freisetzungs-Komplex, der als *couplon* bezeichnet wird [12]. Auf seiner luminalen Seite ist der RyR2 kalziumsensibel, d.h. die Pore öffnet, wenn hier die Kalziumkonzentration steigt. So kommt es infolge des Einstroms von Ca^{2+} durch den L-Typ-Kalziumkanal im Zuge der Erregung der Zelle zum Öffnen des Ryanodinrezeptors, wodurch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR erfolgt.

Der RyR2 ist nicht nur für die Kalziumfreisetzung verantwortlich, sondern dient mit dem Kernstück des Rezeptors als Gerüst für andere Proteine („Scaffolding Protein“), die wiederum mit ihm interagieren und seine Funktion regulieren [12]. Dazu zählen Calmodulin, Phosphatase 1 und 2, FK-506 *binding* Protein (FKBP) 12.6, Proteinkinase A (PKA), Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), Triadin, Junctin und Calsequestrin [12].

1.2.2.2 Regulierung des RyR2

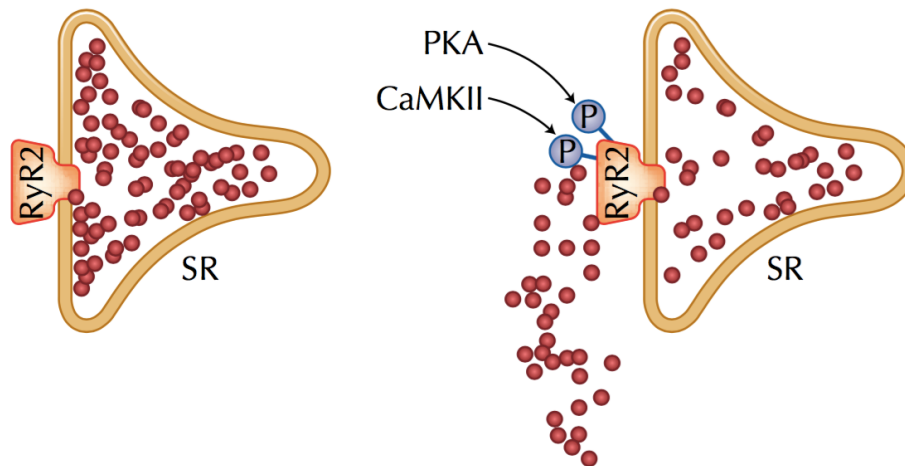


Abbildung 1.5: Entstehung des SR Ca^{2+} -Lecks durch Hyperphosphorylierung am RyR2

Veranschaulichung der Entstehung des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks durch Hyperphosphorylierung der CaMKII und der PKA am RyR2. Abbildung nach Neef und Maier 2007 [11], © 2007 by Current Medicine Group LLC mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags.

Die Ryanodinrezeptoren öffnen während der Systole (Kalziumfreisetzung aus dem SR) und sind während der Diastole idealerweise vollständig geschlossen (Einspeicherung von Kalzium in das SR) [11].

Die Aktivität des RyR2 wird zum einen von physiologischen Modulatoren wie Ca^{2+} , Magnesium, Adenosin Triphosphat und pharmakologischen Mitteln wie Ryanodin und Koffein beeinflusst. Ein zentral wichtiger Regulationsmechanismus des RyR2 ist aber seine Phosphorylierung (vgl. Abbildung 1.5) durch die Proteinkinase A (an Ser-2808) und die Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (an der Aminosäure Ser-2814) [14,15].

Die Effekte dieser RyR2-Phosphorylierung werden derzeit kontrovers diskutiert. Es gibt Befunde, dass eine Phosphorylierung an Ser-2808 zur Abdissoziation der regulatorischen Untereinheit des FKBP12.6 vom RyR2 führt und dadurch seine Öffnungswahrscheinlichkeit gesteigert wird – wohingegen umfangreiche andere Arbeiten dieses nicht zeigen konnten bzw. dokumentierten, dass diese Phosphorylierungsstelle keinen Einfluss auf das Öffnungsverhalten des Kanals hat [16–20].

Eindeutig belegt ist dagegen, dass eine vermehrte Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII die Hauptursache für eine gesteigerte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 ist, welche sich in einem vermehrten Auftreten von Ca^{2+} -Sparks widerspiegelt [21–25]. Ca^{2+} -Sparks (englisch für „Funken“) stellen die gleichzeitige Aktivierung einer Gruppe (*cluster*) von 6-20

RyR2 eines *couplon* wieder [12], welche sich als diastolisch stochastisches Ergebnis der spontanen und unsynchronisierten Kalziumfreisetzungen infolge der erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 ergibt [12]. Die Mechanismen und Bedeutung des SR Ca^{2+} -Lecks werden ausführlicher in Kapitel 1.4 diskutiert.

Es werden mehrere Möglichkeiten der RyR2-Inaktivierung diskutiert: Zum einen eine Art Refraktärzeit des Rezeptor in, der eine Wiederöffnung nicht möglich ist [26]. Zum anderen eine Inaktivierung des RyR2 aufgrund lokaler Entleerung des SR möglich. Eine weitere Möglichkeit wird als Adaption bezeichnet. In dieser hat der RyR2 eine geringe Öffnungswahrscheinlichkeit und lässt sich nur durch höhere Kalziumkonzentration aktivieren [27].

Die Aktivität der RyR2 wird neben seiner Phosphorylierung durch die Kinasen ebenfalls durch seine Dephosphorylierung beeinflusst, primär durch die Protein Phosphatase 1 (PP1). Auch in diesem Punkt ist die Datenlage noch nicht endgültig geklärt. Terentyev et al. sind der Meinung, dass die PP1 die RyR2-Aktivität steigert [28]. Hingegen beschreiben Sonnleitner et al. und Carr et al., dass die Aktivität des Rezeptors gesenkt wird [29,30].

1.2.3 Die SR-Kalzium-ATPase

In der humanen Herzmuskelzelle werden über die SR-Kalzium-ATPase (SERCA2a) 70% des sich systolisch im Zytosol befindlichen wieder in das SR aufgenommen, in Mäusen trägt die SERCA2a etwa 90% zur gesamten Kalziumelimination bei [12]. Unter Verbrauch von einem ATP-Molekül (Adenosintriphosphat-Molekül) transportiert sie zwei Ca^{2+} -Ionen in das Lumen des SR [31]. Reguliert wird die SERCA2a durch den Phosphorylierungszustand von Phospholamban (PLB) [32]. Dieses hemmt in unphosphoryliertem Zustand die SERCA2a, nach Phosphorylierung von PLB (durch PKA an Ser-16 oder die CaMKII an Thr-17) kommt es zur Abdissoziation des PLB und damit des Desinhibition der SERCA2a, also zu deren verstärkter Aktivität. [33,34]. Eine Dephosphorylierung von PLB findet durch SR-assoziierte Phosphatasen statt [35].

1.2.4 Der Natrium-Kalzium-Austauscher

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) ist in der Zellmembran lokalisiert und stellt neben der SERCA2a den zweiten wichtigen Weg der zytosolischen Kalziumeliminierung während der Diastole dar.

Der NCX befördert passiv entlang des elektrochemischen Gradienten ein Ca^{2+} -Ion von intrazellulär nach extrazellulär im Austausch gegen drei Na^{+} -Ionen, welche von extrazellulär nach intrazellulär transportiert werden [8]. Mit diesem Mechanismus trägt er zu ca. 7% bei Ratte und Maus und zu ca. 28% beim Menschen zur Kalziumelimination bei [12]. Der hierfür treibende Gradient von hoher extrazellulärer und niedriger intrazellulärer Natriumkonzentration wird durch die $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase erzeugt [36].

Dabei ist der NCX auch vom sarkolemmalen Membranpotenzial abhängig. Durch den Transport von einem Ca^{2+} -Ion gegen drei Na^{+} -Ionen verbleibt eine positive Ladung in Richtung des Natriumtransportes. Unter normalen diastolischen Bedingungen herrscht ein Membranpotential von ca. -80 mV und der NCX arbeitet in „*inward-mode*“. Bei höheren Membranpotentialen wie zum Beispiel in der Depolarisationsphase des Aktionspotentials entsteht ein Membranpotential von 40 mV und der NCX arbeitet in „*reverse mode*“. Es erfolgt dann ein Wechsel der Transportrichtung und es kommt über den NCX entgegen der „normalen“ Transportrichtung zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle.

Eine Regulierbarkeit des NCX durch Phosphorylierung wird zwar vermutet, ist aber bis heute nicht nachgewiesen.

1.2.5 Regulation der elektromechanischen Koppelung durch die Proteinkinase A

Die elektromechanische Koppelung wird durch zwei verschiedenen Proteinkinasen ganz wesentlich moduliert: die Proteinkinase A (PKA) und die Kalzium/Calmodulin abhängige Kinase II (CaMKII). Als wichtiger Mediator des sympathischen Nervensystems wird die PKA *downstream* adrenerger Reize durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) aktiviert, welches am G-Protein nach Stimulation von β -Adrenorezeptoren gebildet wird. Die Aktivitätssteigerung der PKA führt zur Phosphorylierung diverser im Prozess der elektromechanischen Koppelung eingebundener Proteine (insbes. Phospholamban (PLB), L-Type- Ca^{2+} -Kanal, RyR2 und Troponin I) [12]. Phospholamban wird durch die PKA an der Aminosäure Ser-16 phosphoryliert, wodurch die SERCA2a desinhibiert (vgl. 1.2.3) und somit ein positiv inotroper und lusitroper Effekt vermittelt wird [11]. Infolge von Phosphorylierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle kommt es zu einem vermehrten systolischen Kalzium-Einstrom in die Zelle, welcher an den RyR2 wiederum (über die Ca^{2+} -induzierte- Ca^{2+} -Freisetzung) zu einer vermehrten systolischen Kalziumausschüttung führt. Dieser Effekt wird möglicherweise durch eine infolge der PKA-vermittelte Phosphorylierung des RyR2 an Ser-2808 und daraufhin erhöhte

Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals weiter verstärkt. Es kommt so zu einem starken positiv inotropen Effekt (vgl. Kapitel 1.2.2.2) [8,37,38].

1.3 Die Kalzium / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II als zentraler Regulator der elektromechanischen Kopplung

Die Kalzium- / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist eine multifunktionale Serin / Threonin Proteinkinase. Neben ihrem Vorkommen im Herzen spielt sie noch in anderen Geweben wichtige Rollen, wie dem Nervensystem, in welchem sie an Lernprozessen beteiligt ist [39] oder auch in der Regulation von Entzündungsprozessen [40,41].

Es existieren vier verschiedenen Isoformen der CaMKII (α , β , γ , und δ) [39]. Die Isoformen α und β sind im Nervengewebe vertreten, wohingegen die CaMKII δ und γ im Herzen exprimiert sind [42]. Dabei stellt die CaMKII δ mengenmäßig den größeren Anteil [43]. Es gibt zwei verschiedene Splicevarianten der CaMKII δ , die eine unterschiedliche intrazelluläre Verteilung haben. Die δ_B Variante ist vornehmlich im Nukleus lokalisiert und die δ_C ist überwiegend im Zytosol zu finden [44].

Die CaMKII ist ein Holoenzym, das aus Homo- oder Heteromultimeren besteht, die sich aus sechs bis zwölf Kinase Untereinheiten zusammensetzen. Zusammen ergeben sie eine radartige Struktur (vgl. Abbildung 1.6) [39].

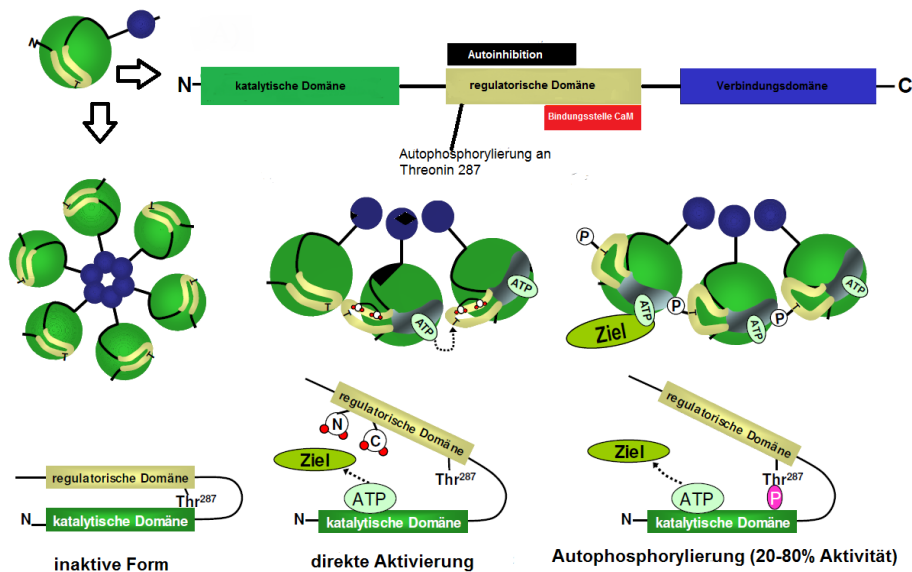


Abbildung 1.6: Struktur und funktionelle Domänen der CaMKII

Die CaMKII δ ist aus drei funktionellen Domänen aufgebaut, einer katalytischen, einer regulatorischen und einer Verbindungsdomäne. Ihre radartige Struktur ergibt sich aus der Oligomerisierung von 6-12 Monomeren zu einem Holoenzym. Sie wird direkt durch den Ca²⁺-Calmodulin-Komplex oder durch Autophosphorylierung aktiviert. (Modifiziert nach Maier und Bers 2002, S. 924)

Jede Kinase Untereinheit ist aus drei verschiedenen Domänen aufgebaut, einer katalytischen Einheit am amino-terminalen Ende, einer zentralen regulatorischen Domäne, die die autoinhibitorische Region beinhaltet, und einer Verbindungsdomäne am carboxyterminalen Ende, die die Oligomerisierung zwischen den einzelnen Kinase Untereinheiten ermöglicht. Zusammen steuern sie die Aktivität des Enzyms [45]. Veranschaulicht ist die Zusammensetzung aus den drei Domänen in Abbildung 1.6. Die autoinhibitorische Region befindet sich nahe der aktiven Seite der katalytischen Domäne und blockiert den Zugang zu den Zielsubstraten, welche die katalytische Domäne bei Aktivierung phosphoryliert.

Bei Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, z.B. während der Systole im Herzen, kommt es zur Aktivierung der CaMKII. Calmodulin bindet vier Ca²⁺-Ionen, woraufhin der entstehende Ca²⁺-Calmodulin Komplex an die Regulationsdomäne der CaMKII bindet und eine Konformationsänderung an dieser bewirkt. Die autoinhibitorische Regulationsstelle wird verdrängt, so dass die katalytische Untereinheit mit ihrem Zielsubstrat interagieren kann [44].

Im Anschluss an die Ca²⁺/CaM-abhängige Aktivierung kann sich die CaMKII durch Autophosphorylierung an der Aminosäure Threonin 287 an der autoinhibitorischen Domäne selber in einem aktiven Zustand halten [39,46].

Der Mechanismus der Autophosphorylierung ist nicht notwendig für die CaMKII-Aktivität, hat aber wichtige Auswirkungen: Zum einen steigt die Affinität zum Ca²⁺-Calmodulin

Komplex um das 700-fache und zum anderen bleibt eine Restaktivität der CaMKII von 20-80 % auch nach Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration und darauf folgender Abdissoziation von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, erhalten [44].

Wieder inaktiviert wird die CaMKII durch Dephosphorylierung von Proteinphosphatasen. Zu diesen zählen die Proteinphosphatase 2C (PP2c), die Proteinphosphatase 2A (PP2a) und die Proteinphosphatase 1 (PP1) [46].

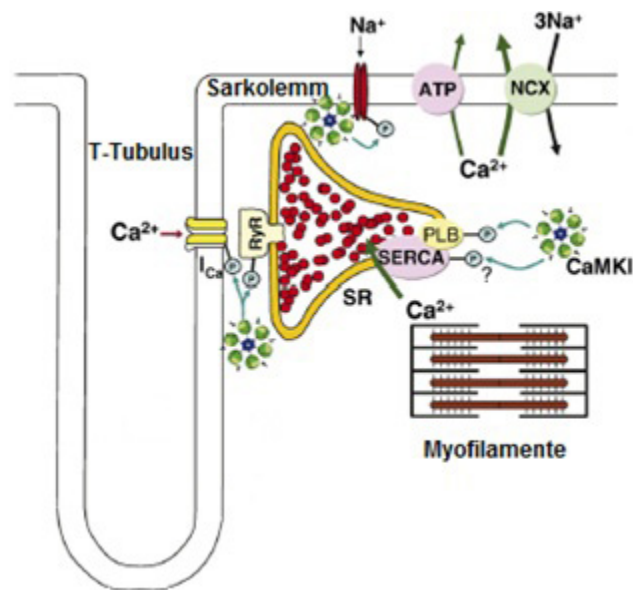


Abbildung 1.7: Übersicht über die Zielproteine der CaMKIIδC Phosphorylierung

Veranschaulichung der verschiedenen Phosphorylierungsstellen der CaMKIIδC als wichtiger Regulator der elektromechanischen Kopplung. (Modifiziert nach Maier und Bers 2007, S.632)

Neben der PKA (vgl. 1.5) ist die CaMKII einer der Hauptregulatoren im kardialen Kalziumhaushalt. Sie phosphoryliert verschiedene Ca^{2+} Transportproteine und beeinflusst dadurch die elektromechanische Kopplung am Herzen. Abbildung 1.7 zeigt ihre Zielproteine in der elektromechanischen Kopplung, den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal [45], den RyR2 [16,47] und PLB [37,48]. Außerdem wurde gezeigt [49], dass die CaMKII auch Einfluss auf kardiale Na^{+} -Kanäle und Ca^{2+} -Ströme [50] hat.

Die Phosphorylierung am L-Typ- Ca^{2+} -Kanal bewirkt einen längeren Kalziumeinstrom (I_{Ca}) und eine verzögerte Inaktivierung des Kanals ausgelöst durch wiederholte Depolarisationen („Facilitation“) [51,52]. Mehrere Studien zeigten, dass der Effekt, der als Ca^{2+} abhängige Facilitation beschrieben wird, tatsächlich CaMKII vermittelt ist [44].

Ein weiteres Ziel der CaMKII ist wie bereits erwähnt die Phosphorylierung des RyR2. Hierbei scheint vor allem die CaMKII-spezifische Ser-2814 Stelle des RyR2 eine wichtige Rolle zu spielen: Witcher et al (1991) und Hain et al. (1995) berichten, dass die CaMKII die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 erhöht und damit eine verstärkte SR- Ca^{2+} -Ausschüttung einhergeht. Im Gegensatz dazu beschreibt jedoch Lokuta et al. (1995) eine Verringerung derselben [16,47,53]. Eine Reihe von Arbeiten belegen einen Zusammenhang, zwischen CaMKII-Aktivität am RyR2 und dem Auftreten vom pathologischem diastolischem Ca^{2+} -Leck, was nachfolgend in Kapitel 1.4.2 ausführlich dargestellt wird.

Zudem ist die CaMKII, wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben, durch Phosphorylierung von Thr-17 an PLB auch an der Regulation der SERCA2a beteiligt. Umstritten ist, ob die SERCA2a auch direkt durch die CaMKII phosphoryliert werden kann. Einige Autoren beschreiben eine direkte Interaktion zwischen CaMKII und SERCA2a [54,55] und eine damit einhergehende beschleunigte Aufnahme des Ca^{2+} ins SR [56]. Demgegenüber zeigen andere Studien keine direkte Phosphorylierung der SERCA2a durch die CaMKII [57].

Des Weiteren wird diskutiert, ob die CaMKII an der frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation (*Frequency dependent acceleration of relaxation* / FDAR) beteiligt ist. FDAR beschreibt die Fähigkeit des Herzens sich bei steigender Herzfrequenz mit einer ebenfalls schnelleren intrazellulären Kalziumeliminierung und damit einer schnelleren Relaxation und Diastolendauer der kürzeren Herzzyklusdauer anzupassen [44].

Neben der Modulation der elektromechanischen Kopplung hat die CaMKII auch Einfluss auf die Gentranskription [58]. Vor allem die nukleär lokalisierte CaMKII δ_B phosphoryliert die Histon-Deacetylase 4 (HDAC4), einen Suppressor des Transkriptionsfaktors Myozyten-Enhancer-Faktor-2 (MEF2). Durch Phosphorylierung entfällt der unterdrückende Effekt von HDAC4 auf MEF2, wodurch MEF2 und andere Transkriptionsfaktoren nicht mehr durch HDAC4 gehemmt werden und Einfluss auf die Gentranskription nehmen [59]. Es wird dabei vermutet, dass die Phosphorylierung von HDAC4 durch CaMKII zum kardialen Remodelling (Umbau) bei Herzinsuffizienz und kardialer Hypertrophie beiträgt [43]. Auch in tierexperimenteller [60,61] und humaner Herzinsuffizienz [62–64] wurde eine Erhöhung der CaMKII-Expression und -Aktivität festgestellt und transgene Überexpression der CaMKII kann zu schwerer Herzinsuffizienz mit massiver Hypertrophie und Dilatation des schwer eingeschränkt kontraktiven Herzens führen [65,66].

1.4 SR Ca^{2+} -Leck und Remodelling der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz

Wichtige Ursachen für die verminderte Kontraktionskraft bei Herzinsuffizienz (vgl. Kapitel 1.2) sind Veränderungen der elektromechanischen Kopplung, welche mit vermindertem SR Ca^{2+} -Gehalt, damit verminderter systolischer Ca^{2+} -Freisetzung und folglich verminderter Kraftentwicklung an den Myofilamenten einhergehen [1,46,67]. Es gibt zwei wesentliche Gründe für den verminderten SR Ca^{2+} -Gehalt: 1. Eine reduzierte Rückaufnahme des systolisch freigesetzten Ca^{2+} in das SR und 2. ein vermehrter Verlust von Kalzium aus dem SR infolge Zunahme des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks.

In insuffizienten menschlichen Herzen ist die Expression und Aktivität der SERCA2a deutlich reduziert, wodurch es zu einer verminderten Kalziumrückaufnahme in das SR kommt [68,69]. Des Weiteren wird diskutiert, ob eine verminderte Phosphorylierungsgrad von PLB (und dadurch eine vermehrte Inhibition der SERCA2a durch PLB) zur verminderten SERCA2a-Aktivität bei Herzinsuffizienz beitragen. Einige Autoren beschreiben keine Veränderung an der von PKA phosphorylierten Aminosäure Ser-16 [70,71]. Arbeiten von Sande et al. (2002) und Yano et al. (2005) zeigen jedoch eine reduzierte Phosphorylierung von PLB an Ser-16 [1,72]. Zudem ist die NCX-Expression und -Aktivität bei Herzinsuffizienz erhöht [67,73]. Zwar kommt es durch die vermehrte NCX-Aktivität zu einer vermehrten Ca^{2+} -Ausfuhr aus der Zelle, welche damit Ca^{2+} verliert. Andererseits gleicht eine vermehrte NCX-Aktivität die infolge der verminderten SERCA2a Funktion verlangsamte Relaxation zumindest zu einem gewissen Grad aus, so dass sie einer verlangsamten diastolischen Entspannung des Herzens entgegenwirkt. Dementsprechend wurde in denjenigen insuffizienten humanen Herzen mit einer verminderten SERCA2a-Expression, welche aber keine gesteigerter NCX-Aktivität aufwiesen, eine diastolische Dysfunktion zusätzlich zur systolischen Insuffizienz aufgrund einer intrazellulären Kalziumakkumulation postuliert [74]. Zudem wurde gezeigt, dass bei Herzinsuffizienz Kalziumeintritt in die Zelle über den NCX im Reverse-Mode in der späten Phase des Aktionspotentials direkt zur Kontraktion beiträgt [75].

Im insuffizienten Myokard ist die RyR2-Funktion deutlich verändert. Eine stark erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des Kanals führt zu spontanen und unkoordinierten Kalziumausschüttungen aus dem SR, dem diastolischen Ca^{2+} -Leck. Bei Herzinsuffizienz ist das SR Ca^{2+} -Leck (Ca^{2+} -Sparks) stark erhöht [1,65,76].

Auch in den herzinsuffizienten CaMKII δ c überexprimierenden Mäusen (vgl. Kapitel 1.4.1) zeigte sich ein stark erhöhtes SR Ca²⁺-Leck. Gleichzeitig war in diesen Tieren der RyR2 an der CaMKII-spezifischen Ser-2814 Stelle hyperphosphoryliert, so dass hier ein Kausalzusammenhang vermutet wurde.

Die Bedeutung der Ser-2814 Phosphorylierungsstelle am RyR2 wurde 2012 von Respress et al. nochmals verdeutlicht. Sie bewiesen mit dem Knock-In-Mausmodell S2814-A, dass eine Verhinderung der Phosphorylierung an der Aminosäure Ser-2814 durch die CaMKII vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz schützt [25].

Durch eine Vielzahl von Arbeiten ist mittlerweile der Zusammenhang zwischen CaMKII-abhängiger RyR2-Hyperphosphorylierung und einem SR Ca²⁺-Leck untermauert worden [77,78].

Dabei scheint eine pathologisch erhöhte CaMKII-Aktivität und insbesondere das dadurch induziert SR Ca²⁺-Leck auch bei der Entstehung von Arrhythmien eine wichtige Rolle zu spielen [77,79].

CaMKII ist dementsprechend nicht nur ein wichtiger Modulator in der elektromechanischen Kopplung, sondern mit besonderer Beachtung des CaMKII induzierten SR Ca²⁺-Lecks auch als zentraler Mechanismus des reduzierten SR Ca²⁺-Gehalts und der Entwicklung von Herzinsuffizienz in den Fokus wissenschaftlicher, translationaler Untersuchungen gerückt.

1.4.1 Modell der transgen CaMKII δ c überexprimierenden Maus

Die transgene Überexpression der CaMKII δ c im Mausmodell führt zur Entwicklung einer schweren Herzinsuffizienz mit kontraktile Dysfunktion, kardialer Dilatation und kardialer Hypertrophie, einhergehend mit ausgeprägten Veränderungen des kardiomyozytären Kalziumhaushalts verbunden mit gesteigerter Arrhythmieanfälligkeit (vgl. Kapitel 1.4.3) [49,65,66,79].

Auf zellulärer Ebene ist in CaMKII δ c-überexprimierten Mäuseherzen eine dreifach höhere CaMKII-Aktivität zu finden. Dabei wurde gezeigt, dass im Vergleich zur WT-Maus die vermehrte Aktivität zu einer Verdopplung des SR Ca²⁺-Lecks, Hyperphosphorylierung des RyR2 an der CaMKII-Stelle, vermehrter NCX-Funktion und verminderten SERCA2a-Expression führt. Es zeigte sich dabei ein reduzierter SR Ca²⁺-Gehalt, eine 50%-Abnahme der Kontraktilität und einer Verminderung des diastolischen Ca²⁺. Außerdem geht mit der

Überexpression eine mehr als zweifache Erhöhung des Verhältnisses vom Herz- zum Körpergewicht und eine Verdopplung der Kardiomyozytengröße einher [65,66].

1.4.2 Bedeutung der CaMKII und der CaMKII-abhängigen RyR2 Phosphorylierung an Ser-2814 für das SR Ca²⁺-Leck

Ein Zusammenhang zwischen CaMKII und SR Ca²⁺-Leck konnte in einer Vielzahl von Untersuchungen gezeigt werden. Neben den bereits genannten Befunden aus der CaMKII-transgenen Maus konnten z.B. Curran et al. (2007) zeigen, dass die beta-adrenerg induzierte Zunahme von einem SR Ca²⁺-Leck durch die CaMKII vermittelt ist und Currie et al. (2004) bestätigten den Effekt, indem sie die CaMKII mit AIP inhibierten und eine deutliche Reduzierung der Sparkfrequenz zeigten [23,80]. Für humane Herzinsuffizienz wurde einen Zusammenhang zwischen SR Ca²⁺-Lecks und CaMKII-spezifischer RyR2-Phosphorylierung gezeigt [81] sowie eine Reduktion des SR Ca²⁺-Leck durch Inhibition der CaMKII [82]. Auch im Tiermodell führt eine vermehrte Phosphorylierung der RyR2 zu verstärkten spontanen diastolischen Ca²⁺-Entladungen aus dem SR und vermindert dadurch die SR Ca²⁺-Konzentration [22,65,83]. In mehreren Studien konnte dazu gezeigt werden, dass die damit verbundene Reduktion des SR Ca²⁺-Gehalts zu Kontraktionsstörungen des kardialen Gewebes führt [21,65,79]. Konsistent damit ist bei einer Herzinsuffizienz die Expression der CaMKII erhöht und ihre Aktivität geht mit Einschränkungen der Auswurfleistung einher [63].

Auch bei Vorhofflimmern konnte gezeigt werden, dass ein CaMKII-abhängiges SR Ca²⁺-Leck besteht [77,84].

Wie bereits erwähnt, wird der RyR2 spezifisch durch die CaMKII an Ser-2814 phosphoryliert. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle bewirkt eine höhere Kalzium Sensitivität und damit einhergehend eine erhöhte Rezeptoraktivität [15].

Untersuchungen zur speziellen Bedeutung der Ser-2814 Phosphorylierungsstelle des RyR2 erfolgten in transgenen Tiermodellen. Mäuse mit der phosphomimetischen S2814D Mutation zeigten ein vermehrtes SR Ca²⁺-Leck bei erhöhter Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 sowie einen verminderten SR Ca²⁺-Gehalt. Sie hatten aber strukturell und funktionell gesunde Herzen und entwickelten keine spontane Herzinsuffizienz, so dass diese Befunde die zentrale Bedeutung der Ser-2814 Phosphorylierung und des SR Ca²⁺-Lecks für die Entstehung von Herzinsuffizienz infrage stellen. Konsistent mit der vermuteten Bedeutung des SR Ca²⁺-Lecks für Arrhythmien wiesen diese Mäuse aber eine Prädisposition für ventrikuläre Tachykardien

auf [24]. Die transgene S2814A-Mutation stellt einen Schutz vor Phosphorylierung an dieser Stelle dar (konstitutiv nicht-phosphorylierbar). Mäuse mit dieser Mutation zeigten im Kontext chronischer Nachlasterrhöhung (transversale Aortenkonstriktion, TAC) deutlich weniger SR Ca^{2+} -Leck, einen verbesserten SR Ca^{2+} -Gehalt und waren zu einem gewissen Grad vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz infolge der TAC geschützt. Vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt schützte diese Mutation jedoch nicht [25].

1.4.3 Bedeutung der Arrhythmien bei chronischer Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_c$

Vorherige Arbeiten konnten zeigen, dass sowohl die humane Herzinsuffizienz, als auch die CaMKII -induzierte Herzinsuffizienz zu einer gesteigerten Arrhythmieanfälligkeit führt [49,79].

Die Zunahme des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks durch die Hyperphosphorylierung der RyR2 führt zu einer Aktivitätssteigerung des NCX. Durch eine Erhöhung des sich im Zytosol befindlichen Ca^{2+} kommt es zu einer vermehrten Elimination nach extrazellulär. Mit jedem doppelt positiv geladenen Ca^{2+} -Ion werden drei Na^+ -Ionen nach intrazellulär transportiert. Folge dessen ist ein transienter Einwärtsstrom von Natrium-Ionen, der zu einer Depolarisierung der Zellmembran führt. Bei überschreiten des Schwellenwertes kommt es zur Öffnung der spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle woraufhin letztlich ein Aktionspotenzial ausgelöst wird und eine späte Nachdepolarisation folgt („*delayed afterdepolarization*“, DAD), die als Trigger für Arrhythmien wirken kann [49]. Weiterhin können späte Nachdepolarisationen die Entstehung von Vorhofflimmern und weiteren lebensbedrohlichen Arrhythmien begünstigen [77,85].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Promotionsarbeit

Überaktivität der CaMKII spielt eine wichtige Rolle im pathophysiologischen Remodelling der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz. Transgene Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_c$ führt zu einer schweren dilatativen Kardiomyopathie. Eine pharmakologische Inhibition der CaMKII wird als neuartiger Therapieansatz der Herzinsuffizienz angesehen. Zahlreiche Studien der letzten Jahre legen nahe, dass das CaMKII -induzierte SR Ca^{2+} -Leck eine zentrale Rolle bei Herzinsuffizienz spielen könnte, so dass eine pharmakologische Reduktion des SR Ca^{2+} -Lecks als neuer Therapieansatz bei Herzinsuffizienz vorgeschlagen

wurde. Als wesentlicher Mechanismus gilt hierbei die CaMKII-spezifische Hyperphosphorylierung des RyR2 an Ser-2814. Die CaMKII hat jedoch auch einen starken Einfluss auf andere Bereiche der elektromechanischen Kopplung (z.B. Regulation von SERCA2a, LTCC, spätem Natriumstrom oder Myofilament-Phosphorylierung) und beeinflusst (pathologische) Genexpressionen. Es stellt sich damit die Frage, welche Bedeutung spezifisch die RyR2 Ser-2814 Phosphorylierung für die Entstehung der CaMKII δ_C -induzierten Herzinsuffizienz und der mit ihr einhergehenden Mortalität hat.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten deswegen CaMKII δ_C überexprimierende Mäuse (CaMKII δ_C -TG) mit Mäusen gekreuzt werden, in welchen der RyR2 nicht mehr an der CaMKII-spezifischen Ser-2814 Stelle phosphoryliert werden kann (S2814A Mutation) und die daraus entstehenden Wildtyp-, S2814A-, CaMKII δ_C -TG-, und CaMKII δ_C -TG/S2814A-Mäuse untersucht und mit einander verglichen werden. Dabei sollten insbesondere folgende Teilaspekte untersucht werden:

- Führt die Verhinderung der CaMKII-spezifischen RyR2 Ser-2814 Phosphorylierung im Kontext der CaMKII δ_C -Überexpression tatsächlich zu einer Reduktion des durch die CaMKII-Überexpression induzierten SR Ca²⁺-Lecks?
- Kann hierdurch die Entstehung der schweren kontraktilen Dysfunktion vermindert oder sogar verhindert werden und
- werden biometrische Parameter des Herzinsuffizienz-Phänotyps, insbesondere der kardialen Hypertrophie sowie von Lungengewicht (als Messgröße für pulmonale Stauung und Rückwärtsversagen des linken Ventrikels) und Lebergewicht (als Messgröße für hepatische Stauung und Rückwärtsversagen des rechten Ventrikels), hierdurch verbessert und
- führt dieses schließlich zu einer Verringerung der Mortalität?

2 Material und Methoden

Für die Versuche wurden weibliche und männliche Mäuse in einem Durchschnittsalter von 7 Wochen untersucht. Es wurde bewusst ein möglichst junges Alter gewählt, um mögliche Einflüsse der RyR2 S2814A Mutation auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz infolge der CaMKII δ C Überexpression detektieren zu können, welche bereits sehr früh stark einsetzt. Für die als Tierversuch genehmigungspflichtigen Echokardiographien lag eine entsprechende Genehmigung vor (Tierversuchsantrag LAS AZ 33.14-42502-04-11/0651). Alle Maßnahmen an Tieren wurden unter Berücksichtigung der GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS (1996) durchgeführt. Sowohl die Durchführung aller Messungen, als auch die Datenauswertung wurde verblindet durchgeführt und die Verblindungsmaske erst nach Fertigstellung der Auswertung entfernt.

2.1 Verpaarung der Mäuse

Um die für die Versuche gedachten Tiere der jeweiligen Genotypen als Geschwistertiere („Littermates“) zu züchten, wurde zunächst eine Elterngeneration („Founder“) erzeugt, welche für die RyR2 S2814A Mutation heterozygot war und in welcher der Vater heterozygot transgen für die CaMKII δ C Überexpression war. Aufgrund der durch die CaMKII δ C Überexpression hervorgerufenen Herzinsuffizienz wurden keine hierfür transgenen Muttertiere verwendet, um eine doppelte Belastung der Muttertiere durch Herzinsuffizienz und Schwangerschaft (mit erwarteter entsprechend hoher Mortalität) zu vermeiden. Von den aus diesen Verpaarungen hervorgehenden Mäusen wurden nur diejenigen verwendet, welche für die S2814A Mutation homozygot sind (d.h. entweder homozygot RyR2 Wildtyp oder homozygot RyR2 S2814A Knock-In). Das Verpaarungsschema ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

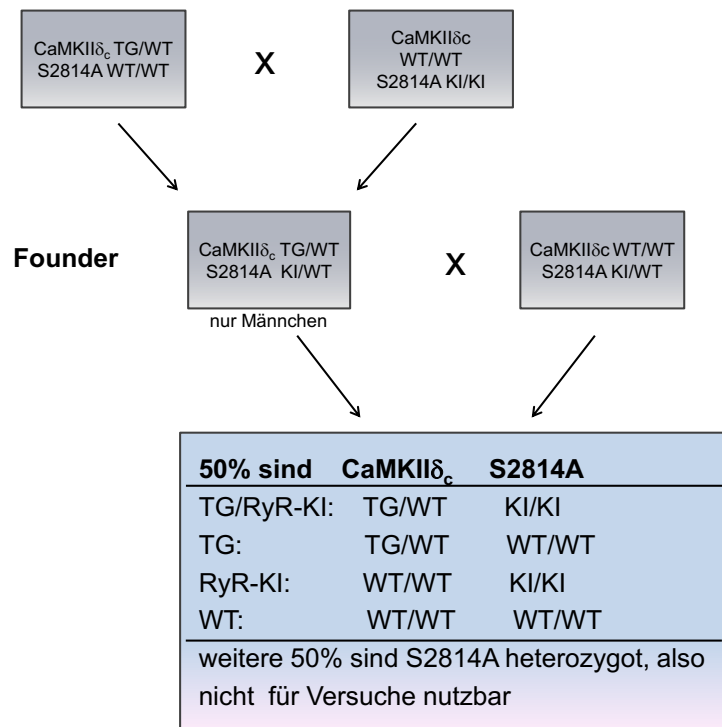


Abbildung 2.1: Verpaarungsschema der Versuchstiere

Veranschaulichung des im Abschnitt 2.1 erläuterten Verpaarungsschemas.

2.2 Vorbereitung der Materialien und Isolation der Kardiomyozyten

2.2.1 Isolation der Herzmuskelzellen aus Mäuser Herzen

Die Isolation der Herzmuskelzellen aus Mäuser Herzen wurde durch enzymatischen Verdau der Herzen mithilfe einer Langendorff-Perfusionsapparatur durchgeführt [86]. Vor der Herzentnahme wurden die Tiere durch einen geschulten Biologisch-Technischen-Assistenten des Labors mit 800 µl Isofluran in einer luftdichten Glaskammer anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Die tote Maus wurde zur Herzexplantation an allen vier Extremitäten auf einer Unterlage fixiert. Nach Thorakotomie wurde das Herz aus dem hinteren Mediastinum mittels Präparierschere (Firma Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) und gebogener Präparierpinzette (Firma Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) entnommen. Zusätzlich wurden Leber und Lunge aus dem Thorax und dem Bauchsitus zur Bestimmung der Biometrie-Parameter entfernt. Um verbliebenes Blut aus dem Herzen auszuwaschen, wurde das Herz im nächsten Schritt in gekühlte Isolationslösung überführt und unter leichtem Druck mit den Fingern komprimiert.

**Abbildung 2.2: Sicht auf den eröffneten Mäusethorax**

Das Herz wurde am Aortenabgang mit einer Pinzette gefasst. Mit einer Schere wurden zu gleicher Zeit Verwachsungen mit dem hinteren Mediastinum gelöst. Zur Organentfernung wurde die Thoraxwand mit einer Kanüle fixiert (Verwendung des Fotos mit freundlicher Genehmigung durch Johannes Vogt, Daniel Wadsack und Stefan Neef.).

Anschließend erfolgte die Kanülierung des Herzens unter einem binokularen Mikroskop (Firma Canon, Panthumthani, Thailand).

Für diese wurde das Herz in eine auf Eis stehenden Petrischale mit kalter Isolationslösung überführt. Nun wurde unter Sicht die Aorta mit einer gebogenen Pinzette (Firma Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) gefasst und auf eine Kanüle (20G) mit einem Insulinspritzen-Aufsatz bis kurz vor die Koronargefäße aufgezogen (Vgl. Abb. 2.3). Nachdem das Herz in korrekter Position mit einer vorbereiteten Fadenschlinge fixiert wurde, wurde die Kanüle mit Herz für den nachfolgenden „Herz-Verdau“ in die Langendorffperfusionsanlage eingesetzt.

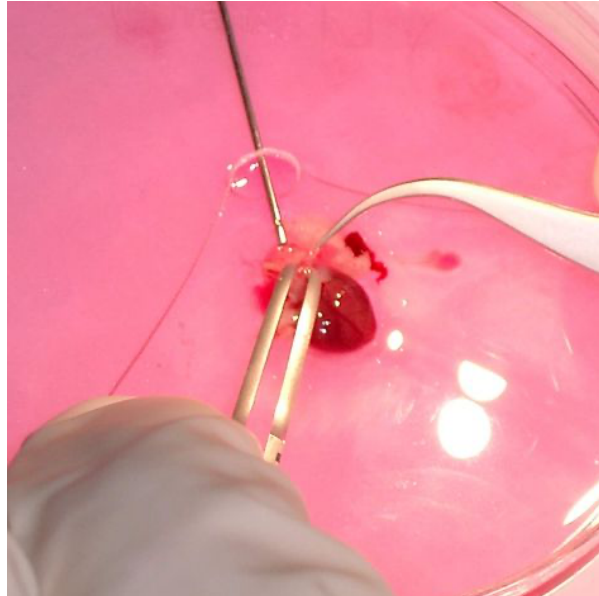


Abbildung 2.3: Retrograde Kanülierung der Aorta

Das Herz wurde vorsichtig über die Kanüle gezogen, um es im nächsten Schritt mit einem Knoten zu fixieren (Verwendung des Fotos mit freundlicher Genehmigung durch Johannes Vogt, Daniel Wadsack und Stefan Neef.).

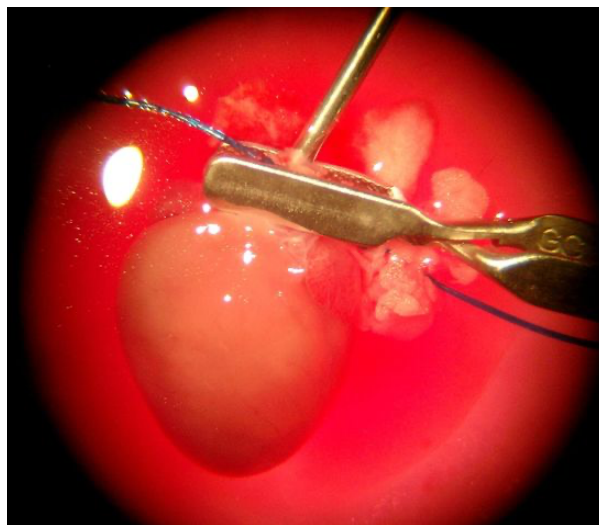


Abbildung 2.4: Fixiertes Herz

Das Herz wurde mit Knoten und Klemme an der Kanüle fixiert. Um die korrekte Position zu überprüfen, wurden die Koronargefäße anschließend mit Pufferlösung gespült. Bei korrekter Position wurde das Blut aus den Koronarien gewaschen (Verwendung des Fotos mit freundlicher Genehmigung durch Johannes Vogt, Daniel Wadsack und Stefan Neef.).

Der Herz-Verdau bestand aus der Spülung mit Isolationslösung und Enzymlösung mit Liberase TM. Das Enzym Liberase führte zur Auflösung des Herzskeletts, so dass sich die einzelnen Herzzellen aus ihrem Verband lösten und zur späteren Untersuchung isoliert und nicht gebunden vorlagen.

Im ersten Schritt der „Vorlaufzeit“ wurde das Herz für ca. 3 Minuten mit einer Flussgeschwindigkeit (*Flow*) von 3ml/min mit Isolationslösung durch eine zugeschaltete Pumpe (Reglo ICC, Ismatec, Wertheim, Deutschland) gespült. Die Lösung wurde zuvor in der Wärmespirale der Anlage auf 37°C erwärmt. Anschließend lief die Enzymlösung mit einem *Flow* von 3ml/min für ca. 4 Minuten hindurch, sodass eine Gesamtzeit der Verdauung von ca. 7-7,5 Minuten erreicht wurde.

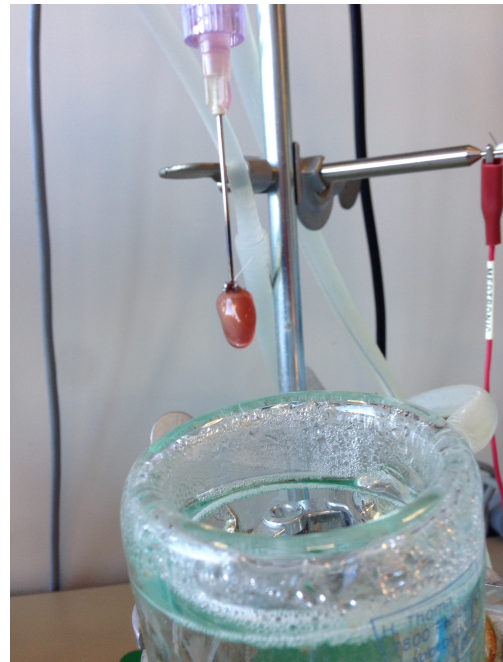
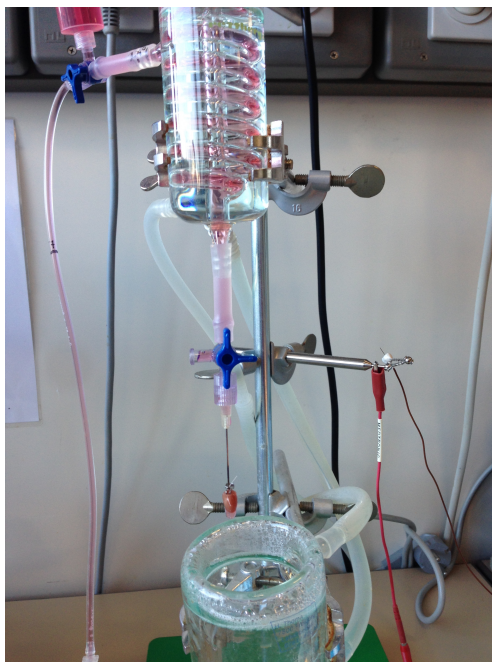


Abbildung 2.5: Langendorff-Isolationsanlage

Sicht auf ein Mäuseherz, das mit Isolationslösung zum enzymatischen Verdau durchspült wurde.

Nach Ende der Perfusion wurde der nun weich-verdaute Ventrikel vom Herzen getrennt und in eine Stopplösung, die das Enzym Liberase TM deaktiviert, überführt. Im Anschluss erfolgte die grobe Zerkleinerung des Ventrikels mittels Schere. Anschließend wurden die letzten Kardiomyozyten durch Auf- und Ab-Pipettierung mit einer 1000 µl Pipette aus ihrem Zellverband gelöst.

Nach diesem Schritt wurde die Zellsuspension durch eine Nylongaze mit einem Porendurchmesser von 200 µm in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen filtriert und dann zur siebenminütigen Sedimentation in ein 15 ml Falcon überführt.

Im Anschluss erfolgte die schrittweise Adaptation der Zellen an Lösungen mit steigenden Kalziumkonzentration („Kalziumaufbau“).

In siebenminütigen Abständen wurde die Konzentration von Beginn 0,1 mM über 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM, 1,2 mM, bis zum Ende auf 1,6 mM erhöht und dadurch an die im Experiment verwendete 2 molare Kalziumkonzentration adaptiert.

Nach jedem Zeitintervall wurde der Überstand abpipettiert und dem verbleibenden Zellpellet (absedimentierte Zellen) eine nächst höhere Kalziumtyrode hinzugegeben.

Nach Abschluss des Kalziumaufbaus verblieben ca. 70% überlebende Kardiomyozyten, die im nächsten Versuchsschritt auf die Messkammern verteilt wurden.

2.2.2 Erhebung biometrischer Daten

Um die Verhältnisse des Gewichts der einzelnen Organe zu einander zu berechnen, wurde zunächst das Körpergewicht der Maus sowie nach Organentnahme die Gewichte der entnommenen Herzen, Lungen und Lebern mit einer Feinwaage (Acculab Atilon, Sartorius, Göttingen, Deutschland) ermittelt. Die Entnahme von Lunge und Leber wurde ebenfalls nach Eröffnung des Thorax und des Bauchsitus mit einer Präparierschere und einer Präparierpinzette durchgeführt. Zuletzt wurde die Tibia eines Beines entfernt und ihre Länge mittels einer digitalen Schublehre (Firma INSIZE, Dillstädt, Deutschland) bestimmt, um die zuvor ermittelten Organgewichte auf die Tibialänge zu nominieren.

2.2.3 Vorbereitung der Messkammer und Plattieren der Kardiomyozyten

Die Messkammern bestanden aus einem vorgefertigte Kunststoffrahmen und einem auf dessen Unterseite geklebten Deckgläschen. Das aufgeklebte Glas bildete den Boden des Rahmens und fungierte gleichzeitig als Objektträger (vgl. Abbildung 2.6). Im Rahmen befand sich eine Aussparung durch die überflüssige Messlösung während des Messvorgangs abgesaugt wurde.

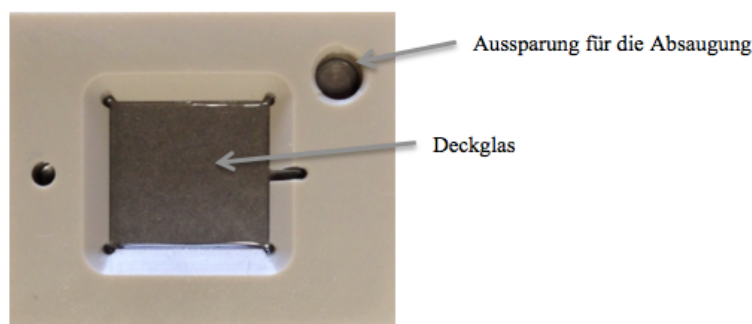


Abbildung 2.6: Aufsicht auf eine Messkammer

Vor jeder Messung wurden die Kammern mit Wasser gereinigt. Um ein Anhaften der isolierten Kardiomyozyten an den Boden der Messkammer zu ermöglichen, wurde das Deckglas mit einem gleichmäßigen Film aus 1,7 μl Laminin beschichtet. Anschließend wurden ca. 500 μl der Zellsuspension in die Kammer gegeben. Nach einer 15-minütigen Anheftungsphase („Setteln“) der Zellen auf den Boden des Deckglases wurden sie im nächsten Schritt in der Dunkelkammer mit Fluoreszenzfarbstoff beladen und untersucht.

2.3 Verwendete Versuchslösungen

2.3.1 Zusammensetzung der Basistyrode

Die Basistyrode, auch als „Normaltyrode“ bezeichnet, stellt die Grundlage aller Lösungen. Zur Herstellung wurden die in der Tabelle 2.1 aufgeführten Substanzen mit einer Feinwaage (Quintix124-1S, Sartorius, Göttingen, Deutschland) abgewogen und in einem Becherglas gesammelt. Anschließend wurde das Glas mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und die Lösung auf einem erhitzbaren Magnetrührer (IKAMAG RCT, IKA, Staufen, Deutschland) auf eine Temperatur 37°C erwärmt und mit NaOH auf pH 7,4 titriert. Zur Überprüfung des gewünschten pH-Wertes diente ein pH-Meter der Firma Sartorius (Basic Meter PB-11, Sartorius, Göttingen, Deutschland).

Tabelle 2.1: Inhaltsstoffe der Basistyrode

Substanz	Molarität (mM)	MG g/mol	Masse / Volumen (mg)	Gesamtvolumen (ml)
KCL	4	74,56	298,2 mg	1000
NaCl	140	58,44	8181,6 mg	
MgCl ₂	1	95,21	95,2 mg	
HEPES	5	238,31	1191,6 mg	
Glucose	10	180,16	1801,6 mg	
CaCl ₂	2	238,31	1 ml	
gelöst in ddH ₂ O (pH 7,4; 37 °C), Lagerung bei einer Temperatur von +4 °C				

2.3.2 Zusammensetzung der Messtyrode

Die Messtyrode diente den Kardiomyozyten während der Messung als Nährlösung. Sie entstand aus dem Hinzufügen von 2 mM Kalzium zur Basistyrode und wurde vor jeder Messung neu angefertigt.

2.4 Kalziumfluoreszenzfarbstoffe

Unter Fluoreszenz versteht man die spontane Emission von Licht, die durch den Übergang eines angeregten Systems zurück in einen Zustand niedriger Energie entsteht. Trifft Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungswellenlänge) auf ein fluoreszierendes Molekül werden Photonen des Lichts durch das Molekül absorbiert und dabei Elektronen auf ein höheres Energielevel befördert. Fallen diese nun wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück wird die dabei entstehende Energie in Form von Fluoreszenzlicht und Wärme abgegeben (vgl. Abbildung 2.7).

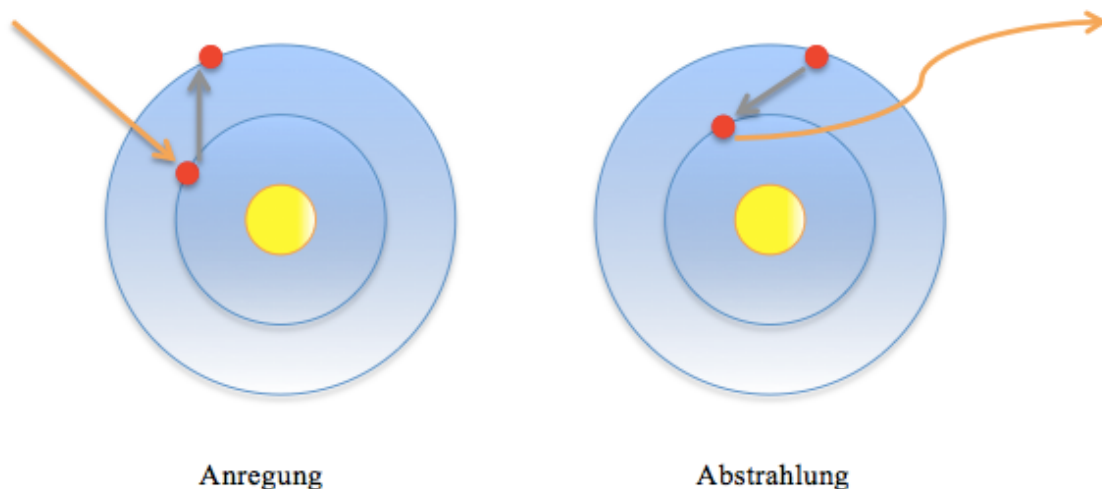


Abbildung 2.7: Entstehung des Fluoreszenzlichts

Die linke Abbildung veranschaulicht wie Anregungslicht (orangener Pfeil) auf ein Elektron (roter Punkt) trifft und es durch die Absorbierung von Photonen auf ein energetisch höheres Level hebt.

Die rechte Abbildung stellt das entstehende Fluoreszenzlicht (orangener Pfeil) und den Fall des Elektrons auf sein ursprüngliches Niveau dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 verwendet. Er besitzt fluoreszierende Eigenschaften wie Anregungswellenlänge, Intensität der Emission und Emissionswellenlänge.

Damit der Farbstoff in die Zelle aufgenommen werden kann, muss er die lipophile Zellmembran passieren. Da eine Permeabilität für polare Farbstoffe nicht möglich wäre,

wurde zur Beladung eine veresterte unpolare Form (Azetoxymethylester (AM), Bezeichnung des Farbstoffs entsprechend als Fluo-4-AM) verwendet. Innerhalb der Zelle spalten zytosolische Esterasen die Esterverbindungen, so dass der reine Farbstoff in seiner polaren (und damit aktiven Form) unter Freisetzung des Azethoxymethylrests entsteht. Der nun polare Farbstoff ist jetzt in der Lage, Kalzium-Ionen zu binden und kann nicht mehr aus der Zelle permeieren. Fluoreszenzfarbstoffe bilden mit freien Ionen wie z.B. Kalzium Chelatkomplexe, wodurch sich ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern [87]. Fluoreszenzfarbstoffe werden in ratiometrische und nicht ratiometrische Formen unterteilt.

2.4.1 Fluo-4-AM

Fluo-4-AM gehört zu der Gruppe der nicht ratiometrischen Farbstoffe. Deren Fluoreszenz-Intensität ist über das gesamte Spektrum gleichsinnig abhängig von der Kalziumkonzentration (bei den Fluo-Farbstoffen: Zunahme der emittierten Fluoreszenz bei steigender Kalziumkonzentration). Es können damit keine quantitativen Kalziumwerte gemessen werden, sondern lediglich relative Veränderungen in der Intensität, so dass allgemein (wie auch in der vorliegenden Arbeit) in aller Regel Fluoreszenzintensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten der Kontraktionszyklus auf die diastolische Fluoreszenzintensität normiert werden (Berechnung von F/F_0 mit F_0 : Fluoreszenzintensität in der Diastole und F : Fluoreszenzintensität zu einem beliebigen Zeitpunkt, z.B. systolische Fluoreszenzintensität). Ihr Vorteil ist, dass sie im Vergleich zu ratiometrischen Farbstoffen wie z.B. Fura-2 ein sehr viel besseres Verhältnis von Signal zur Hintergrundfluoreszenz besitzen (bessere „Signal-to-Noise“ Ratio) und sehr viel schwächere Kalziumpuffer sind, als Fura-2, dem raschen zeitlichen Verlauf des freien Kalziums während der Systole also rascher folgen.

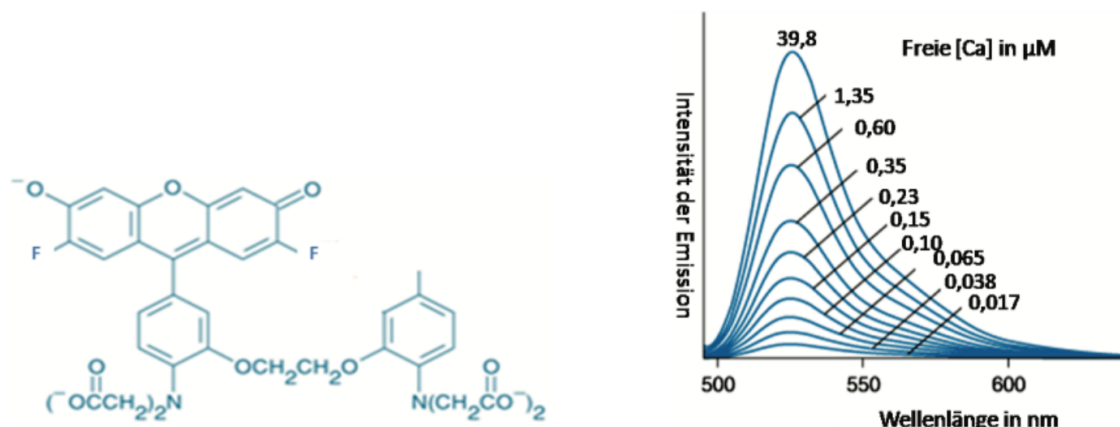


Abbildung 2.8: Eigenschaften von Fluo-4

Darstellung der Strukturformeln von Fluo-4 (links) und des Emissionsspektrum von Fluo-4 (rechts) gemessen bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen für unterschiedliche Kalziumkonzentrationen. (Modifiziert nach der Online Version von The Molecular Probes® Handbook 2012)

Fluo-4-AM ist ein Analogon des Farbstoffs Fluo-3-AM und hat anstelle von zwei Chloratomen zwei Fluoratome am 3-Ring-System (vgl. Abbildung 2.8). Der Farbstoff gilt als sehr sensibler Kalzium-Indikator und emittiert bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (vgl. Abb. 2.8). Durch diese Eigenschaft eignet er sich besser für Messungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

Sein Absorptionsmaximum liegt bei ca. 488 nm und das Emissionsmaximum bei ca. 520 nm [88].

2.4.2 Zusammensetzung der verwendeten Fluoreszenzfarbstofflösungen

2.4.2.1 Pluronic 20%

Tabelle 2.2: Zusammensetzung Pluronic 20%

Substanz	Masse (mg)	Gelöst in DMSO (ml)	Endkonzentration (mg/ml)
Pluronic w/v	200	1	200
Lagerung unter Raumtemperatur			

2.4.2.2 Fluo-4-AM-Gebrauchslösung (10 µM)

Die Herstellung der Farbstoff-Lösungen zur Beladung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte in der Dunkelkammer. Zunächst wurde durch Lösen des in Pulverform vorliegenden Farbstoffs in DMSO eine 1 mM Farbstoff-Lösung hergestellt. 50 µl

hiervon wurden mit 5 µl Pluronic F-127 (20 % Lösung in DMSO, Molecular Probes / Eugene, USA) (vgl. Tabelle 2.2.) und 4,950 ml Versuchslösung in einem Vibrationsmischer vermischt (Vortex, Genie 2™, Bender and Hobein AG, Zürich, Schweiz) und zu 200 µl in lichtundurchlässigen Eppendorf-Cups (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Beladungs-Lösungen enthielten also jeweils 10 µM des entsprechenden Farbstoffs.

2.5 Messung vom SR Ca^{2+} -Leck am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Um die spontanen Ca^{2+} -Freisetzungsereignisse der RyR2 während der Diastole zu messen, wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM 5 Pascal (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) genutzt. Ziel war es die Anzahl der Ca^{2+} -Sparks innerhalb einer definierten Zeit und Fläche zu registrieren und aus den gemessenen Daten die Ca^{2+} -Spark-Frequenz, -Größe und -Kinetik zu errechnen.

Die Konfokalmikroskopie zählt zu den lichtmikroskopischen Methoden, mit der detektierte Signale durch fluoreszierende Farbstoffe sichtbar gemacht werden. Unter Verwendung einer Lochblende, das sogenannte „*Pinhole*“, wird das Präparat nur von einem Lichtpunkt abgescannt. Damit wird gewährleistet, dass immer nur ein Punkt zur Fluoreszenz angeregt und die Entstehung von Streulicht reduziert wird. Das Pinhole blendet Licht unter und oberhalb der Fokusebene aus, wodurch nur Licht aus einer Ebene den Detektor erreicht.

In dieser Arbeit wurde das Anregungslicht von einem Argon Laser (Zeiss, Jena, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 488 nm erzeugt und über einen dichroitischen Spiegel auf das Objekt gespiegelt. Danach wurde über ein mobiles Spiegelsystem der Laser Punkt für Punkt über das Objekt geleitet.

Durch die Lochblende wurde der fokale Punkt angeregt, das entstehende Emissionslicht von einem Photomultiplier in seiner Intensität verstärkt und von einem Analog-Digital-Wandler in ein digitales Signal umgewandelt.

2.5.1 Versuchsdurchführung

Die Messungen wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mit isolierten Kardiomyozyten aller vier Mäuse Genotypen (WT, δ_C , S2814A, δ_C /S2814A) durchgeführt.

Nach erfolgter Kalziumadaptation (vgl. 2.1.1) wurden die isolierten Mäusekardiomyozyten auf die Messkammern gebracht und nach der Settle-Phase mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM (vgl. 2.3.2) beladen. Anschließend fand eine 20-minütige Farbstoffinkubation in einer Dunkelkammer statt, die auch gleichzeitig Ort der Messung war.

Die Messung wurde unter Raumtemperatur durchgeführt. Als Nährlösung für die Zellen wurde die Messtyorde, der vorher 2 mM Kalzium versetzt wurden, verwendet. Nachdem die Messkammer in ihre Halterung am Objektisch eingelegt und die Stimulationselektrode eingespannt wurde, fand eine Einschlagzeit von fünf Minuten unter einer Stimulation von 0,5 Hz bei 20 V statt. Die Perfusion der Messkammer fand unter einer Geschwindigkeit von 60 ml/h statt. Während der Einschlagzeit wurde auf dem Computer das Programm LSM Pascal (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) gestartet und das Konfigurationsprofil Fluo-4 AM ausgewählt.

Im Anschluss wurden die Zellen unter 40-facher Vergrößerung unter dem Ölimmersionsobjektiv eingestellt und im visuellen Modus ein rhythmisch kontrahierender Kardiomyozyt ausgesucht.

Die nachfolgende Messung fand im Konfokalmodus unter der Programmeinstellung *Line-Scan-Modus* statt. Hierbei wurde vor der Messung eine Linie entlang der langen Achse der Zelle, die den zu messende Bereich festgelegt, gezogen. 1/6 der Linienlänge befand sich außerhalb der Zelle, damit für die spätere Datenauswertung das Hintergrundsignal mit registriert wurde. Für die Messung wurden folgende weitere Einstellungen gewählt:

512 Pixel pro Linie, Scanbreite von 32,3 μm Pixelzeit 0,64 μs , Pixelgröße 0,07 μm x 0,07 μm x 0,1 μm , Intensitätsauflösung 12 bit, Lochblenden-Öffnung von 67 μm , Aufzeichnungsdauer 7,68 s.

Aus den oben aufgeführten Einstellungen ergibt sich, dass die Zelle entlang der gezogenen Achse über 10.000 Zyklen für 7,68 s gemessen wurde.

Jede Kammer wurde nicht länger als 15 Minuten gemessen und eine Gesamtmesszeit von 3 Std. pro Messtag wurde nicht überschritten, um die Ergebnisse nicht durch Einbußen der Zellqualität zu verfälschen.

2.5.2 Datenauswertung

Nach der Messung wurden die Ca^{2+} -Spark-Frequenz, -Größe und -Kinetik mittels der Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) und dem Plugin „ Ca^{2+} -SparkMaster“ von E. Picht errechnet [89].

Zur Errechnung der Ca^{2+} -Spark-Frequenz wurden die gemessenen Sparks pro Zelle gezählt, deren Anzahl in eine Excel-Tabelle übertragen und für jeden Mäusegenotyp der Mittelwert der Ca^{2+} -Sparkfrequenz bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellen, bezogen auf die sparkenden Zellen und die Summe der sparkenden Zellen an allen gemessenen Zellen, errechnet und mit Hilfe von T-Tests und Fischer-Tests auf statistische Signifikanz untersucht.

Die Auswertung der Ca^{2+} -Spark-Kinetik erfolgte durch den Plugin „ Ca^{2+} -SparkMaster“. Zuerst wurde die Hintergrundfluoreszenz der gemessenen Zelle abgezogen. Dann wurde um jeden gemessenen Spark ein Messfenster gelegt, um zu verhindern, dass weitere Sparks in die Berechnung mit einbezogen werden. Der ausgewählte Bereich mit dem Spark wurde vergrößert dupliziert und vom Plugin die Daten zur Amplitude = F/F_0 , Breite bei noch halbmaximaler Intensität (FW: „full width“), und Dauer bis zur halbmaximalen Intensität (FD: „full duration“) errechnet.

Nach übertragen der Daten wurde dann durch eine Excel-Tabelle die Ca^{2+} -Spark-Größe (CaSpS: „calcium spark size“) mit der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Ca}^{2+}\text{-Spark-Größe } (\mu\text{m} \cdot \text{ms}) = F/F_0 * \square \text{FW} * \square \text{FD}$$

Die Berechnung des Gesamt- Ca^{2+} -Lecks einer Zelle (FL: „full leak“) erfolgte durch die Addition der Ca^{2+} -Spark-Größe aller gemessener Ca^{2+} -Sparks innerhalb einer Messung.

2.6 Echokardiographie

Myokardiale Ischämie und kardiales Remodeling manifestieren sich am Herzen durch Veränderungen der kardialen Funktion, Größe und Form (vgl. Abb. 3.1).

Zur bildlichen Darstellung und Interpretation der Herzfunktion wurden die Parameter Ejektionsfraktion (EF), Herzfrequenz (Heart Rate; HR), Prozentuale Verkürzung (fractional shortening; FAS), linksventrikulärer enddiastolische Durchmesser (Left ventricular

enddiastolic diameter; LVEDD; LVIDd) und Vorderwanddicke des linken Ventrikels (anterior wall thickness; AWThd) erhoben.

Um Veränderungen der kardialen Leistung festzustellen, wurden echokardiographische Untersuchungen aller Genotypen nach sieben und zwölf Wochen durchgeführt.

Die Ejektionsfraktion wird in Prozent gemessen und gibt die Auswurfleistung des linken Ventrikels wieder. Durchmesser des linken Ventrikels und der Vorderwand spiegeln die Herzgröße wieder und können so als Hypertrophie-Parameter gewertet werden. Das FAS gilt als Parameter für Wandbewegungsstörungen, da es anzeigt um wie viel Prozent sich die Muskulatur des linken Ventrikels in der Systole im Vergleich zur Diastole verkürzt.

Die Durchführung der Echokardiographien erfolgte durch eine entsprechend geschulte Biologin, die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte in Zusammenarbeit.

2.6.1 Versuchsaufbau

Die Echokardiographie ist ein nicht-invasives Bildgebungsverfahren, das mittels Ultraschallwellen innere Organe und Strukturen, in diesem Fall das Herz und seine Funktion bzw. Bewegungsabläufe, darstellt.

Durch die nicht-invasive Untersuchungstechnik ist damit nicht nur eine Beurteilung der Herzfunktion ohne Verletzung des Tieres oder seiner Physiologie, sondern auch die Erhebung longitudinaler Studien am selben Tier möglich [90].

Die Ultraschallwellen entstehen durch die Verformung eines elastischen Festkörpers wodurch eine elektrische Spannung erzeugt wird. Der Vorgang wird als piezoelektrischer Effekt bezeichnet. Zur Erzeugung werden Kristalle im Ultraschallkopf genutzt. Die entstehenden Ultraschallwellen werden an der Grenzfläche unterschiedlicher Medien gebeugt und reflektiert. Im Verhältnis zum Dichteunterschied der Medien werden die auftreffenden Wellen mehr oder weniger stark reflektiert, zum Ultraschallkopf zurückgeleitet und vom Kristall durch den piezoelektrischen Effekt zurück in elektrische Spannung umgewandelt und aufgezeichnet. Über die Messung der Laufzeitunterschiede der reflektierten Wellen entsteht ein räumliches Echtzeit-Bild.

2.6.2 Versuchsdurchführung

Die Echokardiographien wurden mit einem Echokardiographie-Gerät (Model Vevo 2100; Firma Visual Sonics Toronto, USA) in der Einstellung „B-mode“ durchgeführt. Der Modus

„B-mode“ steht für „*Brightness-Modulation*“ und erzeugt durch die Kombination von mehreren Bildreihen ein zweidimensionales (2-D) schwarz-weiß Bild in Echtzeit (vgl. Abbildung 2.9).

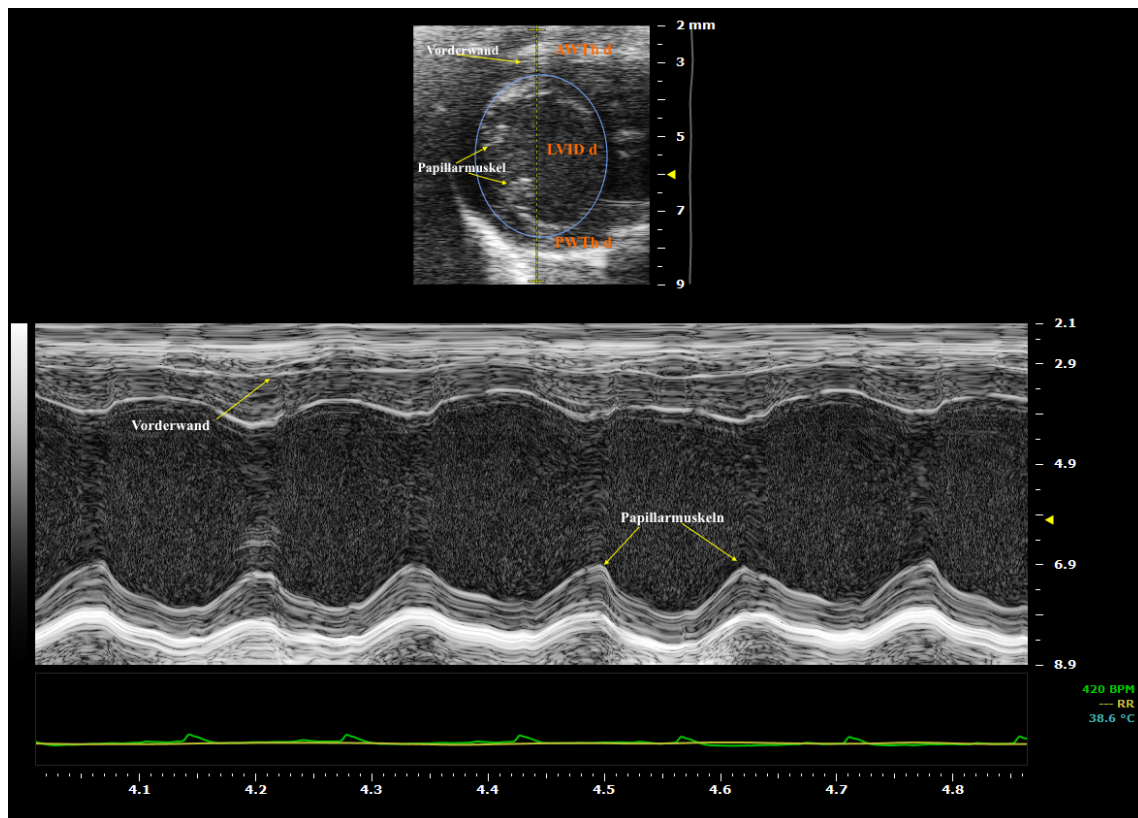


Abbildung 2.9: Echokardiographie einer 7 Wochen alten WT-Maus

Das obere Bild zeigt den linken Ventrikel in der Diastole eingestellt in der kurzen Achse mit Blick auf die Papillarmuskeln und die Vorderwand. Der blaue ovale Kreis in der Bildmitte zeigt den Durchmesser des Ventrikels (LVIDd; LVEDD). Im unteren Bild sind die Papillarmuskeln durch gelbe Pfeile erkenntlich gemacht.

Vor der Messung wurde die Maus mit 1.5 % Isofluran unter 100% Sauerstoff-Zufuhr 1l/min in einer Induktionskammer anästhesiert. Während der Untersuchung wurde die Narkose mit Isofluran durch eine Inhalationsmaske auf der Schnauze der Maus aufrechterhalten. Um eine Hypothermie und deren Auswirkungen auf die Herzfunktion zu verhindern, wurde die Körpertemperatur durch einen beheizten Untersuchungstisch konstant auf 37°C gehalten und mittels rektaler Temperatursonde kontrolliert.

Um eine bessere Bilderfassung der transthorakalen Untersuchung zu gewährleisten, wurde die Maus nach Eintritt der Narkose in Rückenlage fixiert und am ventralen Thorax das Fell mit Enthaarungscreme (Firma Veet, Heidelberg, Deutschland) entfernt. Parallel zur Untersuchung wurde ein Elektrokardiogramm (EKG) der Maus abgeleitet. Hierzu wurden zuvor an allen vier Pfoten EKG-Elektroden mit Klebestreifen befestigt.

Zur Untersuchung wurde Ultraschallgel auf den Brustkorb aufgetragen und die kardialen Strukturen mit dem Ultraschallkopf (Model MS400 MicroScan™ transducer) unter 30 MHz Signalarate untersucht. Es wurden Bilder in kurzer und langer Achse des linken Ventrikels registriert.

2.6.3 Datenauswertung

Zur Auswertung der registrierten Echokardiographien wurden als führende Parameter die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) und der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD) ausgemessen. Zur Berechnung der EF wurden die Flächen des Cavums innerhalb der Endokard-Kontur in Systole und Diastole ($Area_s$, $Area_d$) und die Länge der langen Achse in Systole (L_s) und Diastole (L_d) bestimmt. Die EF wurde dann wie folgt berechnet:

Volumen in Systole:

$$Vol_s = (5/6) \times (Area_s \times L_s)$$

Volumen in Diastole:

$$Vol_d = (5/6) \times (Area_d \times L_d)$$

Ejektionsfraktion (%):

$$EF = (Vol_d - Vol_s) / Vol_d \cdot 100$$

Zudem wurde aus den Aufzeichnungen die während der Messung bestehende Herzfrequenz bestimmt.

2.7 Überlebenszeitanalyse

Um heraus zu finden, ob die S2814A Mutation Auswirkungen auf die Mortalität der Mäuse hat, wurde mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven die Überlebenszeit der unterschiedlichen Mausgenotypen analysiert (Prism 6.0, GraphPad Software/La Jolla/USA).

2.8 Verblindung

Während der Durchführung der Messungen und deren Auswertung bestand eine Verblindung hinsichtlich des Genotyps der Tiere.

2.9 Statistik

Alle Daten der vier Genotypen wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Microsoft/Redmond/USA) gesammelt und ausgewertet. Im Anschluss wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler (SEM) errechnet. Die berechneten Daten werden im Ergebnisteil als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt.

Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels T-Test und 1-Wege-ANOVA-Test. Als statistisch signifikant wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt. Im Ergebnisteil werden die errechneten Mittelwerte mit SEM in Form eines Fehlerbalkens, in Balken- und Punktdiagrammen dargestellt. Bei erreichtem Signifikanzniveau wurden die Diagramme mit „ $p < 0,05$ “ gekennzeichnet. Nur wenn explizit darauf hingewiesen werden sollte, dass sich Gruppen *nicht* unterschieden, wurde teils mit „n.s.“ (nicht signifikant) beschriftet.

Alle dargestellten Diagramme wurden mit dem Programm Prism 6.0 (GraphPad Software/La Jolla/USA) erstellt, mit welchem auch die ANOVA-Testung erfolgte.

Zur statischen Auswertung der Überlebenszeitdaten wurden der Log-rank-Test und die Cox-Regression in Prism 6.0 angewendet.

2.10 Hersteller der verwendeten Substanzen

Tabelle 3: Herstellerangaben verwendeter Substanzen

Substanz	Hersteller
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
Fluo-4-AM	Molecular Probes, Eugene, USA
Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Koffein	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Laminin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MgCl ₂	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Liberase TM	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Isofluran	Abbvie, Ludwigshafen, Deutschland
Trypsin	Thermo Fisher, Grand Island, USA
Pluronic F-127	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Biometrische Daten

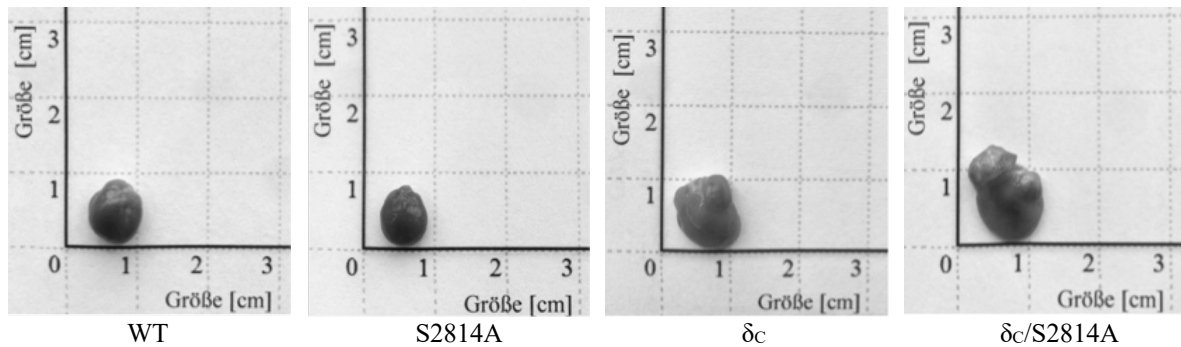


Abbildung 3.1: Originalbilder entnommener Herzen der Genotypen im Vergleich

Illustrative Original-Fotografien der Genotypen Wildtyp (WT), RyR2 S2814A knockin (S2814A), CaMKII δ -TG (δ c), CaMKII δ -TG/S2814A (δ c/S2814A), die makroskopisch das signifikant erhöhte Herzgewicht der δ c-Maus und die kardiale Hypertrophie veranschaulichen.

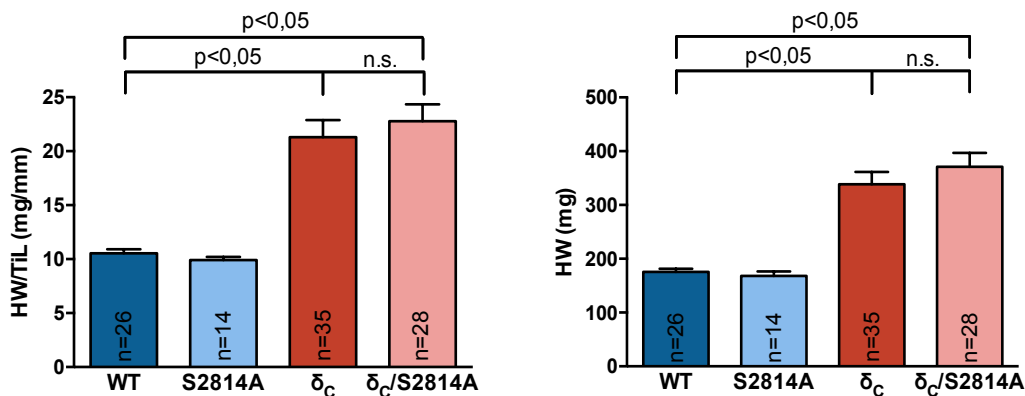


Abbildung 3.2: Herzgewicht der Genotypen im Vergleich

Veranschaulichung der kardialen Hypertrophie der δ c-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Die Abbildung 3.2 zeigt die Normierung des Herzgewichts (HW) auf die Tibialänge (TiL) (links) und die Darstellung der Mittelwerte des Herzgewichts (rechts). n = Mäuse

Von allen untersuchten Mäusen wurden das Herz- (heart weight; HW), Lungen- (lung weight; LuW), Lebergewicht (liver weight; LiW) in einem Alter von sieben Wochen ermittelt und auf Körpergewicht (body weight; BW) und Tibiallänge (tibia length; TiL) normiert. Im Vergleich der Genotypen (Original-Bilder entnommener Herzen sowie Mittelwerte in Abbildung 3.1 u. 3.2) zeigte in den δ c-Mäusen sich die vorbeschriebene ausgeprägte kardiale Hypertrophie mit einem HW/BW von $15,09 \pm 1,18$ mg/g bzw. HW/TiL von $21,30 \pm 1,59$ mg/mm verglichen mit $7,4 \pm 0,17$ mg/g bzw. $10,55 \pm 0,36$ mg/mm in der WT Vergleichsgruppe ($p < 0,05$). Das

Einkreuzen der RyR2 S2814A-Mutation in CaMKII δ_C -TG hatte auf die kardiale Hypertrophie keinen Einfluss, in den δ_C /S2814A Mäusen lag HW/BW unverändert bei $17,06 \pm 1,21$ mg/g und HW/TiL bei $22,77 \pm 1,58$ mg/mm ($p < 0,05$ vs. WT, n.s. vs. δ_C). Auch die S2814A-Mutation alleine hatte keinen Einfluss auf das Herzgewicht mit HW/BW $7,46 \pm 0,28$ und HW/TiL $10,07 \pm 0,46$ in der S2814A-Gruppe (n.s. vs WT, $p < 0,05$ vs. δ_C und $p < 0,05$ vs. δ_C /S2814A).

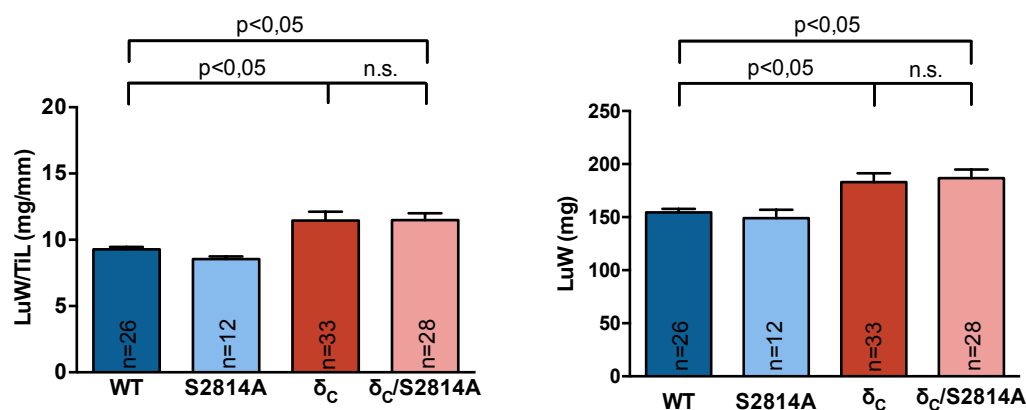


Abbildung 3.3: Lungengewicht der Genotypen im Vergleich

Die δ_C -Maus hatte ein signifikant erhöhtes Lungengewicht, das eine pulmonale Kongestion bzw. das linksventrikuläre Rückwärtsversagen widerspiegelt. Dieses wurde durch die Ser-2814 Phosphorylierungsresistenz nicht vermindert. Links ist das LuW normiert auf die TiL dargestellt, rechts die Absolutwerte. n = Mäuse

Das Lungengewicht als Parameter für pulmonale Kongestion bzw. Surrogatparameter für linksventrikuläres Rückwärtsversagen war in den δ_C -Mäusen gegenüber den WT-Mäusen deutlich erhöht ($183 \pm 8,29$ mg/g bzw. $11,45 \pm 0,67$ mg/mm vs. $154,54 \pm 3,31$ mg/g bzw. $9,28 \pm 0,18$ mg/mm, jeweils $p < 0,05$) (vgl. Abbildung 3.3). Die Phosphorylierungsresistenz des RyR2 an der CaMKII-Stelle führte in dieser Hinsicht nicht zu einer Abmilderung des Phänotyps (δ_C /S2814A $186,79 \pm 8,06$ mg/g bzw. $11,49 \pm 0,51$ mg/mm; n.s. vs. δ_C und $p < 0,05$ vs. WT). Erwartungsgemäß führte die RyR2-Mutation alleine (d.h. S2814A in CaMKII WT) zu keiner Veränderung des Lungengewichts (S2814A: $149 \pm 6,59$ mg/g bzw. $8,86 \pm 0,32$ mg/mm; n.s. vs WT, $p < 0,05$ vs. δ_C und vs. δ_C /S2814A).

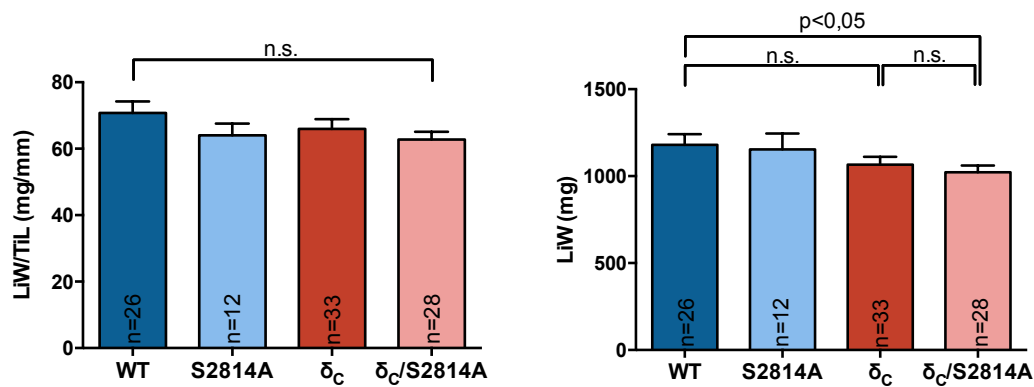


Abbildung 3.4: Lebergewicht der Genotypen im Vergleich

Darstellung des Lebergewichts normiert auf die Tibiallänge links und rechts die Absolutwerte. n = Mäuse

Als Surrogatparameter einer mit einer Leberstauung einhergehenden Rechtsherzinsuffizienz wurde das Lebergewicht bestimmt. Die ermittelten Daten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Genotypen (WT $70,79 \pm 3,45$ mg pro mm Tibiallänge; δ_C $65,97 \pm 2,95$ mg/mm; δ_C /S2814A $62,78 \pm 2,31$ mg/mm; S2814A $68,82 \pm 5,61$ mg/mm). Die fehlende Leberstauung in den δ_C /S2814A-Mäusen, als auch in den δ_C -Mäusen und die signifikante Lungenstauung legen eine führende Linksherzinsuffizienz infolge der CaMKII δ_C -Überexpression nahe.

3.2 Echokardiographie

Linksventrikuläre Funktion und Dimensionen wurden echokardiographisch im Alter von 7 und 12 Wochen untersucht (vgl. Kapitel 2.6).

Im Alter von 7 Wochen war in den Ser-2814-phosphoresistenten CaMKII δ_C -überexprimierenden δ_C /S2814A-Mäusen die Entwicklung der Herzinsuffizienz im Vergleich zu den CaMKII-überexprimierenden Mäusen mit nicht-mutiertem RyR2 etwas abgeschwächt: Ejektionsfraktion (EF) 7 Wochen: δ_C /S2814A EF $20,56 \pm 3,67$ % vs. δ_C $10,97 \pm 2,20$ %, $p < 0,05$. Die Echokardiographie im Alter von 12 Wochen zeigte aber, dass es sich hierbei nur um eine initiale Verlangsamung der Entwicklung und nicht um eine Protektion vor der Entstehung des Herzinsuffizienz-Phänotyps handelt (δ_C /S2814A 12 Wochen: EF $12,17 \pm 2,05$ % vs. δ_C $12,68 \pm 4,93$ %, n.s.).

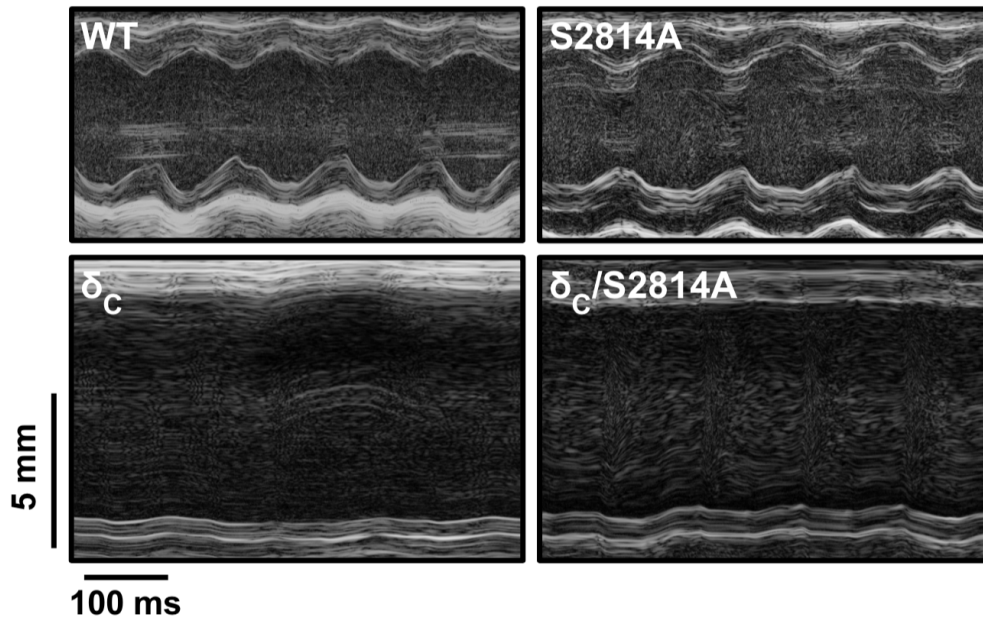


Abbildung 3.5: Echographische M-Mode Registrierungen der Genotypen im Vergleich

Originalaufzeichnungen von Echokardiographien, welche die schwere kontraktile Dysfunktion und Dilatation des linken Ventrikels in den CaMKII δ_C -überexprimierenden Genotypen veranschaulichen.

Wie in Abbildung 3.5 in originalen echokardiographischen M-Mode Registrierungen illustriert und in den Mittelwerten dargestellt (vgl. Abbildung 3.6 u. 3.7), führte die transgene Überexpression der CaMKII δ_C im Vergleich zum Wildtyp zu einer schweren kontraktile Dysfunktion (12 Wochen: EF $12,68 \pm 4,93$ % vs $45,15 \pm 9,14$ % im WT, $p < 0,05$) und Dilatation (12 Wochen: LVEDD $6,66 \pm 0,54$ mm vs. $4,58 \pm 0,08$ mm im WT, $p < 0,05$).

Die infolge der CaMKII-Überexpression entstandene schwere Herzinsuffizienz wurde durch die Phosphorylierungsresistenz am RyR2 an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle nicht verhindert oder abgeschwächt (δ_C /S2814A 12 Wochen: EF $12,17 \pm 2,05$ % und LVEDD $6,51 \pm 0,38$ mm; n.s. vs. δ_C , $p < 0,05$ vs. WT) (vgl. Abbildung 3.6). Die RyR2-Mutation alleine hatte keinen Einfluss auf linksventrikuläre Funktion oder Dimensionen (12 Wochen: EF $46,97 \pm 3,00$ % und LVEDD $4,46 \pm 0,15$ mm; n.s. vs. WT, $p < 0,05$ vs. δ_C und δ_C /S2814A).

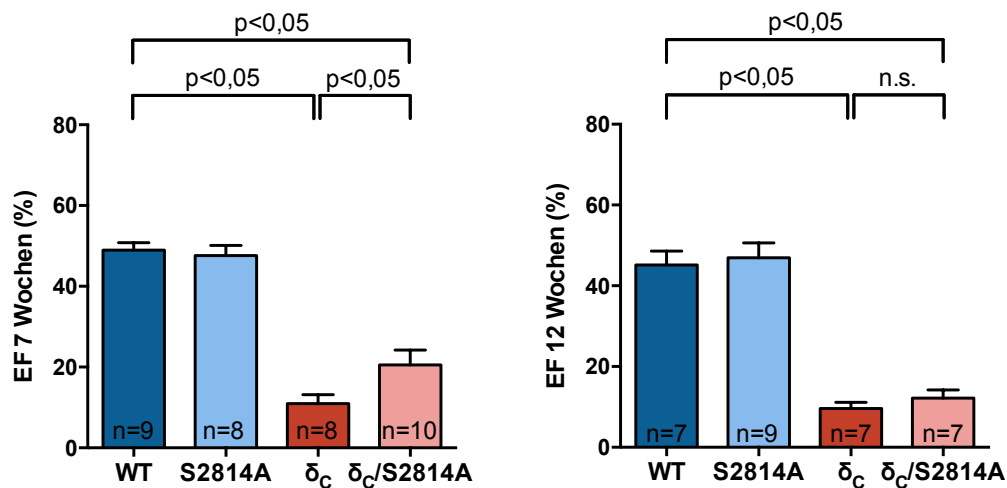


Abbildung 3.6: Vergleich der Ejektionsfraktion nach 7 und 12 Wochen

Abnahme der EF im Verlauf von 7 Wochen Alter (links) auf 12 Wochen (rechts). CaMKIIδ_c-überexprimierende Mäuse hatten bereits im Alter von 7 Wochen eine schwere Herzinsuffizienz. Die δ_c/S2814A-Maus zeigte dabei im Alter von 7 Wochen im Vergleich zur „reinen“ δ_c-Maus eine milde Protektion durch die Phosphorylierungsresistenz am RyR2. Im Alter von 12 Wochen war die anfängliche Protektion jedoch nicht mehr festzustellen, so dass vergleichbar schlechte Auswurfleistungen beider Genotypen bestanden. n = Mäuse

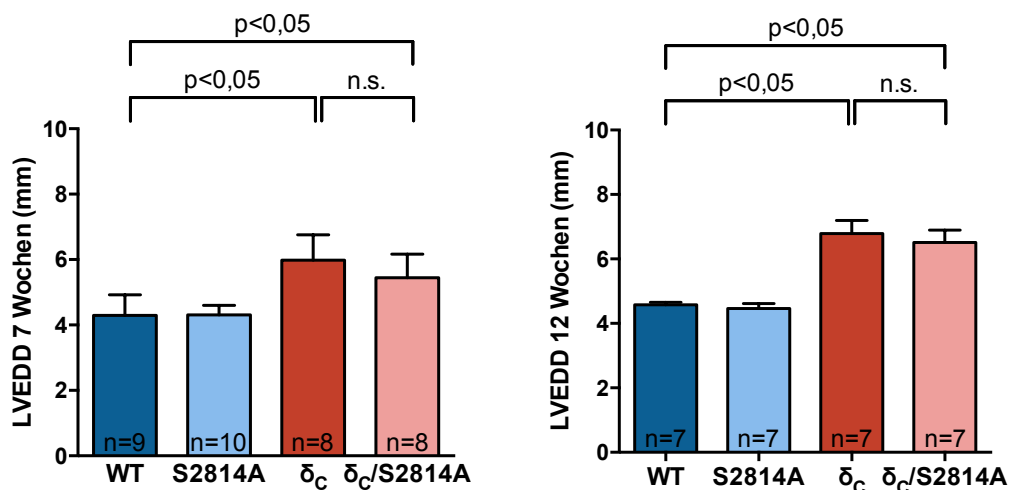


Abbildung 3.7: Vergleich des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers nach 7 und 12 Wochen

Die CaMKIIδ_c-Überexpression führt zu schwerer kontraktile Dysfunktion und Dilatation, die durch eine erhöhte LVEDD veranschaulicht wird. n = Mäuse

Übereinstimmend mit den biometrischen Daten aus der Organentnahme zeigte auch die Echokardiographie eine schwere linksventrikuläre Hypertrophie infolge der CaMKIIδ_c-Überexpression. Einhergehend mit dieser zeigten die δ_c-Mäuse und δ_c/S2814A-Mäuse eine signifikant erhöhte Herzfrequenz, die als gegenregulatorischer Mechanismus zur Aufrechterhaltung des Herzzeitvolumens bei Abnahme des Schlagvolumens gewertet wurde. (beats per minute, bpm) (12 Wochen: δ_c 492,49±18,74 bpm vs. δ_c/S2814A 452,93±12,22

bpm n.s., v.s. im WT $429,71 \pm 11,30$ bpm ns. v.s. S2814A, $p < 0,05$ vs. δ_C und $\delta_C/S2814A$, S2814A $430,68 \pm 26,75$ bpm, $p < 0,05$ vs. δ_C und $\delta_C/S2814A$) (vgl. Abbildung 3.8).

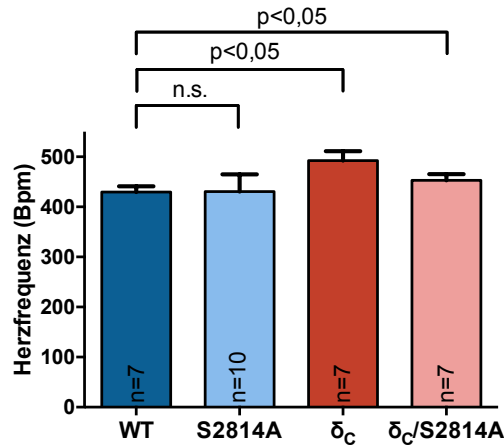


Abbildung 3.8: Herzfrequenz der Genotypen im Alter von 12 Wochen

CaMKII δ_C -TG-Mäuse und $\delta_C/S2814A$ -Mäuse zeigten eine signifikant erhöhte Herzfrequenz. n = Mäuse

3.3 Spontanes diastolisches SR Ca²⁺-Leck

Zur Bestimmung des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks wurden Ca²⁺-Sparks registriert und die Häufigkeit dieser spontanen Ca²⁺-Freisetzungseignisse und ihre jeweilige Größe analysiert.

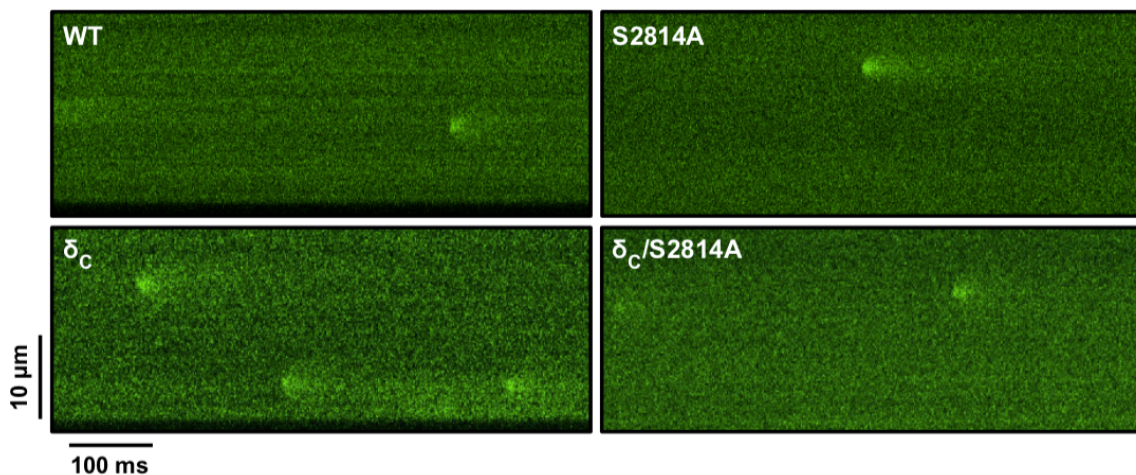


Abbildung 3.9: Konfokale Line-Scans mit Ca²⁺-Sparks der unterschiedlichen Genotypen

Die Originalabbildung konfokalmikroskopischer Messungen illustriert das massiv erhöhte diastolischen SR Ca²⁺-Lecks der CaMKII δ_C -TG Zellen und die vor einem erhöhten Leck geschützte $\delta_C/S2814A$ -Maus durch die S2814A Mutation.

Folge der CaMKII-Überaktivität war ein massiver Anstieg des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks in den CaMKII δ_C -TG Zellen. Zur Berechnung des Lecks wurde die Größe (CaSpS) aller gemessenen Sparks einer Zelle addiert (entsprechend dem Produkt aus Spark-Größe und -Frequenz). Die Originalabbildung 3.9 einer konfokalmikroskopischen Ca^{2+} -Spark Messung illustriert die signifikant erhöhte Ca^{2+} -Spark-Größe (δ_C $297,27 \pm 24,15$ nF/ F_0 *m*s vs. $185,78 \pm 15,85$ nF/ F_0 *m*s im WT, $p < 0,05$) und höhere Ca^{2+} -Spark-Frequenz (δ_C $1,57 \pm 0,16$ Ca^{2+} -Sparks/100 $\mu\text{m/s}$ vs. $1,01 \pm 0,10$ Ca^{2+} -Sparks/100 $\mu\text{m/s}$ im WT, $p < 0,05$) in Zellen sieben Wochen alter CaMKII δ_C -TG Mäuse (vgl. Abb. 3.10). Daraus resultierte der bekannte massive Anstieg des SR Ca^{2+} -Lecks infolge der CaMKII δ_C -Überexpression (δ_C $4,65 \pm 7,74$ mF/ F_0 vs. $1,88 \pm 0,30$ mF/ F_0 im WT, $p < 0,05$) (Abbildung 3.11).

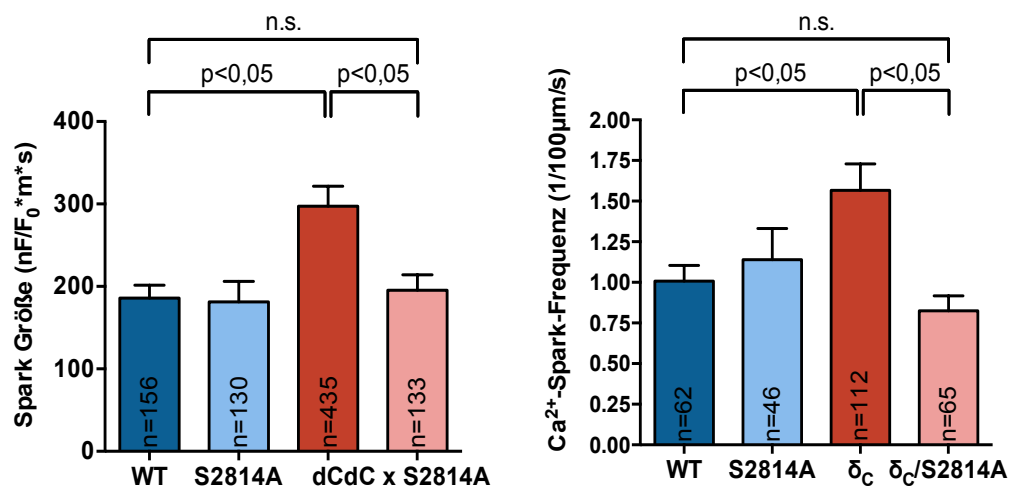


Abbildung 3.10: Ca^{2+} -Spark-Größe und -Frequenz der Genotypen im Vergleich

Der Vergleich veranschaulicht, dass die $\delta_C/\text{S2814A}$ -Maus durch die S2814A-Mutation vor einer Zunahme der Ca^{2+} -Spark-Größe (links) und -Frequenz (CaSpF) (rechts) geschützt war. links= Ca^{2+} -Sparks; rechts n = Zellen

Dabei schützte die S2814A-Mutation vor dem CaMKII δ_C -induzierten SR Ca^{2+} -Leck: Die Phosphorylierungsresistenz der CaMKII-spezifischen Ser-2814 Stelle des RyR2 verhinderte in den $\delta_C/\text{S2814A}$ Zellen eine Zunahme der Ca^{2+} -Spark-Größe ($\delta_C/\text{S2814A}$ $195,34 \pm 18,74$ nF/ F_0 *m*s, $p < 0,05$ vs. δ_C , n.s. vs. WT) und der Ca^{2+} -Spark-Frequenz ($\delta_C/\text{S2814A}$ $0,83 \pm 0,09$ sparks/100 $\mu\text{m/s}$, $p < 0,05$ vs. δ_C , n.s. vs. WT). Entsprechend war das Gesamt-Leck in $\delta_C/\text{S2814A}$ signifikant gegenüber der „reinen“ CaMKII δ_C -Überexpression vermindert und glich dem des WT ($\delta_C/\text{S2814A}$ $1,61 \pm 0,25$ mF/ F_0 , $p < 0,05$ vs. δ_C , n.s. vs. WT, vgl. Abb. 3.10-3.12). Nach Betrachtung des SR Ca^{2+} -Lecks aller untersuchten Zellen (d.h. inklusive derjenigen Zellen, in denen während der Dauer der konfokalen Aufzeichnung kein Spark zu

sehen war), entsprach das Gesamtleck der δ_C /S2814A-Maus ebenfalls dem der WT Geschwister und war signifikant niedriger als das der δ_C -Maus (δ_C /S2814A $0,36 \pm 0,07$ mF/F₀, vs. WT $0,22 \pm 0,04$ mF/F₀, n.s. vs. δ_C $1,24 \pm 0,22$ mF/F₀, $p < 0,05$).

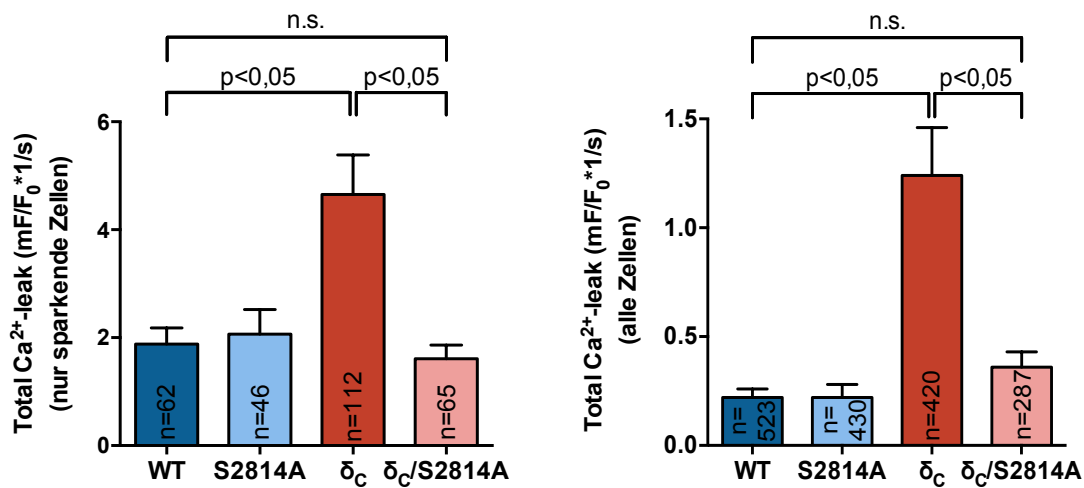


Abbildung 3.11: SR Ca²⁺-Leck der Genotypen im Vergleich

Die Phosphorylierungsresistenz am RyR2 verhinderte die Entwicklung eines erhöhten SR Ca²⁺-Lecks in der δ_C /S2814A-Maus. Das Gesamt-Leck entsprach dem der gesunden WT-Maus. Im Vergleich hatte die δ_C -Maus ein 2,5-fach höheres SR Ca²⁺-Leck. n = Zellen

Die Ergebnisse zeigen damit, dass das infolge der CaMKII δ_C -Überexpression erhöhte SR Ca²⁺-Leck durch die CaMKII-spezifische Phosphorylierung des RyR2 an Ser-2814 entstand bzw. durch die S2814A-Mutation hervorgerufene Phosphorylierungsresistenz am RyR2 verhindert werden konnte.

Im Kontext normaler CaMKII δ_C -Expressionslevel (d.h. CaMKII-WT) hatte die S2814A keine Auswirkung auf die Ca²⁺-Spark-Größe ($181,37 \pm 24,62$ nF/F₀*m*s., n.s. vs. WT), die Ca²⁺-Spark-Frequenz ($1,14 \pm 0,19$ Ca²⁺-Sparks/100 μ m/s, n.s. vs. WT) und damit das SR Ca²⁺-Leck ($2,07 \pm 0,46$ mF/F₀, n.s. vs. WT) (vgl. Abbildung 3.10 und 3.11). Der Phosphorylierungsstelle scheint damit nur bei erhöhter CaMKII-Aktivität bzw. bei Hyperphosphorylierung eine Bedeutung für das SR Ca²⁺-Leck zuzukommen, nicht aber bei normaler CaMKII-Aktivität bzw. normaler Ser-2814 Phosphorylierung.

3.4 Sterblichkeit

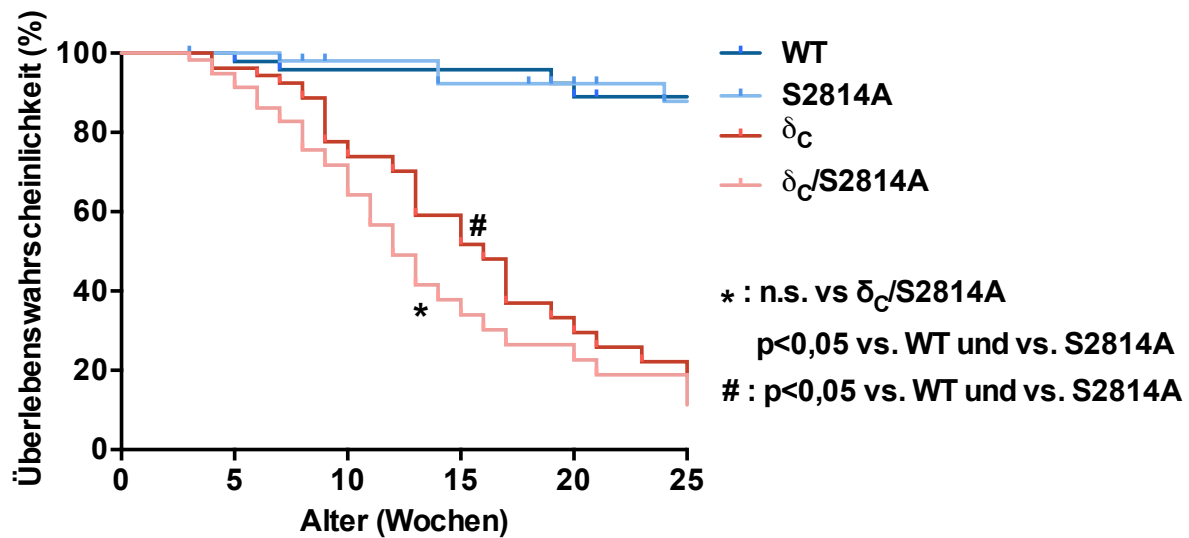


Abbildung 3.12: Überlebenszeitanalyse der Genotypen dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve

Die Abbildung der Überlebenszeit der Genotypen ($n \geq 48$) zeigt, dass bekannte frühe Versterben der $\delta_C/S2814A$ -Maus ($p < 0,05$ vs. WT und vs. S2814A).

In der Kaplan-Meier Analyse zeigte (vgl. Abbildung 3.13) sich wie zu erwarten ein normales Überleben im WT. Die CaMKII δ_C -Überexpression führte zu der bekannten Mortalität, wobei die Tiere etwa ab einem Alter von 4-5 Wochen begannen zu versterben. Die mittlere Überlebenszeit der δ_C -TG Mäuse betrug 20 Wochen. Das Einkreuzen der S2814A-Mutation führte im Phänotyp zu keiner Reduktion der Mortalität. Die Mortalität war in den $\delta_C/S2814A$ unverändert hoch (eher noch im Trend etwas verschlechtert). Das reine Vorliegen der S2814A-Mutation hatte keinen Einfluss auf die Mortalität im Vergleich zum WT.

4 Diskussion

Veränderungen der Kalziumhomöostase der Herzmuskelzelle und die daraus resultierenden Pathomechanismen in der Herzmuskelkontraktion gelten als wesentliche Mechanismen in der Entwicklung von Herzinsuffizienz. Besondere Bedeutung wird dabei mittlerweile dem SR Ca^{2+} -Leck zugemessen. Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten der vergangenen Jahre zeigen, dass eine Überaktivität der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) mit resultierender Hyperphosphorylierung des RyR2 an der CaMKII-spezifischen Ser-2814-Stelle ein wesentlicher Mechanismus ist, über den ein SR Ca^{2+} -Leck entsteht.

Überexpression der CaMKII δ_C im transgenen Mausmodell führt im Vergleich zur Wildtypmaus zu einer dreifach gesteigerten CaMKII-Aktivität (vergleichbar der dem gesteigerten Level der CaMKII-Aktivität bei humaner Herzinsuffizienz) und führt zu deutlichen Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase, insbesondere zu starkem SR Ca^{2+} -Leck und zu schwerer dilatativer Kardiomyopathie [65]. Auch bei humaner Herzinsuffizienz konnten eine erhöhte CaMKII-Aktivität, eine Hyperphosphorylierung des RyR2 an Ser-2814 und ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck festgestellt werden [81].

Vor diesem Hintergrund ergab sich die Hypothese, dass die CaMKII-spezifische RyR2-Phosphorylierung und das daraus resultierende SR Ca^{2+} -Leck der entscheidende Mechanismus sein könnte, über welchen die CaMKII-induziert Herzinsuffizienz entsteht. Die vorliegende Arbeit untersuchte nun erstmals die Bedeutung der CaMKII-spezifischen RyR2-Phosphorylierung für die Entwicklung der CaMKII δ_C -induzierten Herzinsuffizienz im Mausmodell. Dafür wurden transgen CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäuse mit Mäusen verpaart, in welchen der RyR2 nicht mehr an der CaMKII-spezifischen Ser-2814 Stelle phosphoryliert werden konnte (Austausch Ser-2814-Ala Knock-In, „S2814A“). Die hierdurch entstandenen δ_C /S2814A Mäuse wurden verglichen mit ihren Geschwistertieren (reiner Wildtyp, rein S2814A und rein δ_C).

4.1 Die RyR2 S2814A-Mutation verhindert das CaMKII δ_C -TG induzierte diastolische SR Ca^{2+} -Leck ...

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Entstehung von SR Ca^{2+} -Leck infolge der Kontext der chronisch erhöhten CaMKII δ_C -Expression und -Aktivität in der TG-Maus von der CaMKII-

spezifischen Phosphorylierung des RyR2 an Ser-2814 abhängig ist bzw. dass die Phosphorylierungsresistenz des RyR2 an Ser-2814 am RyR2 vor der Entwicklung eines diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks in diesem Mausmodell schützt. Die S2814A-Mutation führte in der $\delta\text{C}/\text{S2814A}$ -Maus zu einer Normalisierung des Lecks auf das Wildtyp-Niveau bzw. verhinderte die Entstehung des SR Ca^{2+} -Lecks in transgen CaMKII δC -überexprimierenden Mäusen:

Vorbeschrieben ist, dass die CaMKII δC -TG Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus ein massives SR Ca^{2+} -Leck entwickelte [65,66]. Dieser Befund zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Kardiomyozyten der CaMKII δC -TG Maus zeigten im Vergleich zum WT etwas größere Ca^{2+} -Sparks, insbesondere aber eine starke Zunahme der Ca^{2+} -Spark-Frequenz und damit ein massiv erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck (im Mittel ca. 247% so hoch wie das SR Ca^{2+} -Leck in Wildtyp Zellen). Die Phosphoresistenz des RyR2 an der CaMKII-Stelle Ser-2814 verhinderte die Entstehung des SR Ca^{2+} -Lecks im Kontext der CaMKII δC -Überexpression.

In den Kardiomyozyten aus $\delta\text{C}/\text{S2814A}$ -Mäusen war nicht nur die Ca^{2+} -Spark-Größe im Vergleich zum Wildtyp unverändert, sondern auch der Anstieg der Ca^{2+} -Spark-Frequenz wurde größtenteils verhindert. Insgesamt zeigte sich das SR Ca^{2+} -Leck (d.h. das Resultat aus Spark-Größe und der Häufigkeit des Auftretens von Sparks) in den $\delta\text{C}/\text{S2814A}$ -Mäusen somit nicht signifikant verändert gegenüber dem Wildtyp und hochsignifikant niedriger als in der CaMKII δC -Maus mit „reinem“ Wildtyp-RyR2. Damit scheint das durch die transgene chronische CaMKII δC -Überexpression induzierte SR Ca^{2+} -Leck praktisch vollständig von der Phosphorylierung des RyR2 an der CaMKII-spezifischen Ser-2814-Stelle abhängig zu sein. Andere mögliche Vermittlungsmechanismen (z.B. PLB Thr-17 Phosphorylierung, siehe Kapitel 1.4 und 1.5) scheinen eine maximal untergeordnete Rolle zu spielen.

Im Kontext physiologischer CaMKII-Aktivität (d.h. CaMKII-Wildtyp, „reine“ S2814A-Mutation) hatte die Phosphorylierungsresistenz des RyR2 dagegen keinen Einfluss auf das niedrige basale SR Ca^{2+} -Leck, welches sich in der S2814A-Maus gegenüber dem Wildtyp unverändert darstellte (vgl. Kapitel 3.3). Damit scheint der Ser-2814 Phosphorylierungsstelle keine Bedeutung für das basale, gewissermaßen physiologische SR Ca^{2+} -Leck zuzukommen, sondern nimmt mutmaßlich erst im pathophysiologischen Kontext durch die Überaktivität der CaMKII eine Rolle für die Entstehung des SR Ca^{2+} -Leck ein.

4.2 ... schützt aber nicht vor der Entstehung von Herzinsuffizienz

Die Daten der biometrischen und echokardiographischen Untersuchungen der reinen S2814A Maus zeigten einen unveränderten basalen kardialen Phänotypen und wie auch in zuvor zu diesem Mausmodell publizierten Arbeiten [25,78] gleichen die Parameter denen der gesunden WT-Mäuse.

Wie aus vorherigen Publikationen bekannt [65,66], entwickelten die untersuchten Mäuse infolge der chronischen CaMKII δ_C -Überexpression bereits im Alter von 7 Wochen eine schwere Herzinsuffizienz mit eingeschränkter LV-Pumpfunktion und pulmonaler Stauung (vgl. Kapitel 3.2 und Kapitel 3.1).

Trotz des Schutzes vor der Ausbildung eines erhöhten SR Ca²⁺-Lecks durch die Phosphorylierungsresistenz des RyR2 an der CaMKII-Stelle kam es in der δ_C /S2814A-Maus überraschenderweise weiterhin zur Entwicklung einer schweren Herzinsuffizienz: In den durchgeführten Echokardiographien im Alter von sieben Wochen zeigte sich im Vergleich zur δ_C -Maus nur eine etwas geringere Verschlechterung der kardialen Auswurfleistung (vgl. Kapitel 3.2). Diese verschlechterte sich jedoch im Verlauf und war den nachfolgenden Untersuchungen im Alter von 12 Wochen nicht mehr unterschiedlich im Vergleich zur reinen δ_C -Maus mit WT-RyR2. Auch kardiale Hypertrophie (vgl. Kapitel 3.1) und pulmonale Kongestion (vgl. Kapitel 3.1) waren in den vorliegenden Untersuchungen in den δ_C /S2814A gegenüber den δ_C -Tieren nicht verändert.

Damit scheint es, dass die S2814A-Mutation und der damit einhergehende Schutz vor SR Ca²⁺-Leck die Entwicklung einer CaMKII δ_C -induzierten Herzinsuffizienz teilweise verlangsamt. Für die letztendliche Entstehung der Herzinsuffizienz infolge der CaMKII-Überexpression/-Überaktivität und deren Schweregrad hatte die RyR2 Ser-2814-Phosphorylierung bzw. das damit einhergehende SR Ca²⁺-Leck aber keine relevante Bedeutung. Dieses ist ein überraschender und wichtiger Befund, da bislang das SR Ca²⁺-Leck als zumindest *ein*, wenn nicht *der* wesentliche Mechanismus angesehen wird, durch welchen die CaMKII-induzierte Herzinsuffizienz entsteht [65].

Bekräftigt wird dieser Befund durch Untersuchungen des konstitutiv-phosphomimetisch RyR2 S2814D-mutierten Mausmodells. Diese konstitutiv phosphomimetische (dauerhaft Phosphorylierung dieser Stelle nachbildenden) Mutation des Ser-2814 stellt gewissermaßen eine „CaMKII-spezifische Dauerphosphorylierung des RyR2“ und damit das Gegenstück zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten S2814A-Mutation dar. Hierdurch kommt es zwar

zu einem massiv erhöhten SR Ca^{2+} -Leck und damit einhergehend einem etwas verminderten SR Ca^{2+} -Gehalt [24,91], diese Mäuse wiesen aber basal ein strukturell gesundes Herz auf [24,92]. Auch in einem Mausmodell mit Herzinsuffizienz infolge eines Myokardinfarktes und Druckbelastung führte die Behandlung der Tiere mit einem hochselektiven RyR2-Stabilisator (RYCAL S36) zwar zu einer Reduzierung des SR Ca^{2+} -Lecks, nicht aber zu einer Verbesserung der LV-Funktion oder kardialer Hypertrophie im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren [93].

Es stellt sich damit die Frage, welches die anderen $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -abhängigen Mechanismen sind, die auch in Abwesenheit eines gesteigerten SR Ca^{2+} -Lecks zur Entstehung der Herzinsuffizienz (und der damit einhergehenden kardialen Hypertrophie) führen. Backs et al. zeigten, dass die $\text{CaMKII}\delta$ auf nukleärer Ebene durch die Phosphorylierung von HDAC4 dessen hemmende Wirkung auf den Transkriptionsfaktoren MEF2 unterbindet. Die nachfolgende Dissoziation von MEF2 führte zu einer Aktivierung Hypertrophie-induzierender Transkriptionsprozesse, wodurch ein kardiales Remodelling mit kardialer Hypertrophie erfolgte (vgl. Kapitel 1.3) [59,94]. Bezogen auf die eigenen Daten erklärt eine vermehrte Aktivierung pathologischer Genprozesse bei Vorliegen einer $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ -Überexpression zumindest die unveränderte starke kardiale Hypertrophie, pathologische Expressionsmuster könnten aber auch direkt in die Entstehung der Herzinsuffizienz involviert sein.

Vergangene Arbeiten zeigten, dass entzündliche Prozesse im kardialen Gewebe zu einer nachfolgenden Fibrose mit resultierender Herzinsuffizienz führen [95-97]. Ebenfalls konnten zurückliegende Arbeiten zeigen, dass die $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ nach kardialer Ischämie am kardialen Remodelling beteiligt ist [98,99]. Hier konnte vor allem in einem weiteren Mausmodell gezeigt werden, dass nach kardialer Minderperfusion und nachfolgender Reperfusion in Anwesenheit der CaMKII Isoform δ_{C} im Vergleich zur Isoform δ_{B} über den regulierenden Transkriptionsfaktor NF- κ B ein vermehrter Zelluntergang vorlag [98].

Die Arbeitsgruppe um Heller Brown postuliert, dass die $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ an der Auslösung von inflammatorischen Prozessen, die zur kardialen Fibrose beitragen beteiligt ist. In ihrem Mausmodell wurde die CaMKII durch eine Angiotensin-II Infusion aktiviert, woraufhin CaMKII -abhängige Genprozesse aktiviert wurden. Durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B wurden Entzündungsmediatoren ausgeschüttet, welche die Rekrutierung von Makrophagen stimulierten, so dass eine Entzündungsreaktion mit nachfolgender Fibrose induziert wurde [100].

Zusammenfassend zeigt das Modell der phosphoresistenten S2814A-Mutation, dass die CaMKII-spezifische Phosphorylierung des RyR2 an Ser-2814 Stelle die Entstehung des SR Ca^{2+} -Lecks bei CaMKII δ_{C} -Überexpression verursacht, dieses aber nicht der entscheidende Mechanismus für die CaMKII δ_{C} -induzierte Herzinsuffizienz ist. Vielmehr müssen andere CaMKII-abhängige Signalwege wie z.B. HDAC-Regulation mit resultierender pathologischer Genexpression die entscheidenden Auslöser für kontraktile Dysfunktion und kardiale Hypertrophie darstellen.

4.3 ... und der vorzeitigen Sterblichkeit

Die Daten der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass die Ser-2814-Phosphoresistenz und die damit einhergehende Verhinderung von SR Ca^{2+} -Leck keinen Einfluss auf die rapide Mortalität des CaMKII δ_{C} -Phänotyps haben.

Dieser Befund ist insofern wichtig und etwas überraschend, da das (CaMKII-induziertes) SR Ca^{2+} -Leck neben Herzinsuffizienz auch mit kardialen Arrhythmien in Verbindung gebracht wird [49,77,79].

Für die Entstehung von Vorhofflimmern konnte eine wichtige Rolle von SR Ca^{2+} -Leck und insbesondere auch der RyR Ser-2814-Phosphorylierung gezeigt werden [77,78,84]. Weiterhin wird auch für die Entstehung von ventrikuläre Rhythmusstörungen für CaMKII und SR Ca^{2+} -Leck eine wichtige Rolle vermutet [96]. Insbesondere hatte sich in CaMKII δ_{C} -transgenen Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit für ventrikuläre Arrhythmien durch β -adrenerge Provokation (Isoproterenol) oder programmierte elektrische Stimuli gezeigt [49,79].

Ein SR Ca^{2+} -Leck kann über den NCX (durch Austausch des „leckenden“ Ca^{2+} gegen Na^{+} , dabei Einstrom dreier positiver Ladungen im Austausch gegen zwei positive Valenzen) transiente Einwärtsströme (I_{Ti}) induzieren, welche wiederum zu arrhythmogenen späten Nachdepolarisationen führen können (DADs, vgl. Kapitel 1.4.3). Diese DADs können dabei als Trigger für sowohl atriale als auch ventrikuläre Arrhythmien wirken [101].

Van Oort und Kollegen (2010) untersuchten das bereits erwähnte Mausmodell mit RyR2 S2814D Mutation (vgl. Kapitel 4.1), also einer konstitutiv phosphomimetischen (dauerhaft Phosphorylierung dieser Stelle nachbildenden) Mutation [24]. Diese führte erwartungsgemäß zu einem erhöhten SR Ca^{2+} -Leck. Unter β -adrenerger Stimulation mit gleichzeitig gezielter Induktion weiteren SR Ca^{2+} -Lecks (Koffein/Epinephrin) oder programmierte elektrische

Stimulation - nicht jedoch spontan - entwickelten die Tiere vermehrt ventrikuläre Tachykardien und starben an einem plötzlichen Herztod.

Die beschriebene Datenlage zeigt, dass SR Ca^{2+} -Leck arrhythmiefördernd ist und dass der Phänotyp der δC -Maus anfälliger für kardiale Arrhythmien ist. Insofern hätte die durch die S2814A-Mutation bedingte Verhinderung des SR Ca^{2+} -Lecks, wenn nicht über die Herzinsuffizienz selbst, doch aber über die Verhinderung möglicher maligner Arrhythmien einen positiven Einfluss auf die rapide Mortalität des CaMKII δC -Phänotyps haben können. Inwieweit nicht-letale Arrhythmien von CaMKII δC -transgenen Tieren durch die S2814A-Mutation verhindert werden, kann in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden, da keine EKG-Telemetrie erfolgte. Aber auch ohne dass in der vorliegenden Untersuchung ein Rhythmusmonitoring der Tiere erfolgt wäre, kann zumindest eindeutig festgehalten werden, dass die S2814A-Mutation bzw. der Schutz vor SR Ca^{2+} -Leck in der CaMKII δC -transgenen Maus nicht zu einem Mortalitäts-relevanten Schutz vor Arrhythmien geführt hat.

Tatsächlich stellten Dewenter et al. (2017) in telemetrischen Aufzeichnungen von CaMKII δC -TG Mäusen zwar spontane ventrikuläre Arrhythmien fest, diese waren jedoch durchgehend selbstlimitierend und nicht die Todesursache in diesem Genotyp [102]. Vielmehr scheinen die CaMKII δC -TG Tiere im primären Pumpversagen zu versterben. Wie bereits diskutiert (Kapitel 4.2), führte die S2814A-Mutation nicht zu einer nachhaltigen Abschwächung des Herzinsuffizienz-Phänotyps bzw. zu einer Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion, so dass die Ser-2814-Phosphoresistenz bzw. die Verhinderung des SR Ca^{2+} -Lecks die Todesursache des CaMKII δC -TG Genotyps, nämlich das kardiale Pumpversagen nicht abzuschwächen vermag.

Vermutlich sind diese Befunde zur spezifisch CaMKII δC -induzierten Herzinsuffizienz, aber nicht auf jegliche Form der Herzinsuffizienz zu übertragen. Denn Mohamed et al. (2018) sahen in Mäusen mit Herzinsuffizienz infolge experimenteller Aorten-Konstriktion (TAC-OP) oder Myokardischämie, dass eine pharmakologische Stabilisierung des RyR2 (durch die Substanz Rycal S36) mit konsekutiver Reduzierung des SR Ca^{2+} -Lecks in diesen Tiermodellen zwar nicht die Herzinsuffizienz abschwächen, aber das Überleben verbessern konnte. Die Autoren erklärten das längere Überleben der Tiere damit, dass die Reduzierung des SR Ca^{2+} -Lecks zu einer geringeren Arrhythmieanfälligkeit der Tiere führte [93]. In dieser Arbeit war die kontraktile Dysfunktion aber deutlich schwächer und insbesondere auch die Mortalität sehr viel geringer ausgeprägt, als sie in der vorliegenden Arbeit (und den bereits

zitierten entsprechenden Vorpublikationen) durch die CaMKII δ_c -Überexpression hervorgerufen wurde.

Somit scheint es plausibel, dass zwar das durch die CaMKII-spezifische Ser-2814-Hyperphosphorylierung induzierte SR Ca²⁺-Leck prinzipiell durchaus arrhythmogene Effekte hat und dass diese auch prinzipiell einen Einfluss auf die Mortalität haben können. Wie weit diese Effekte hinsichtlich des Überlebens zum Tragen kommen, könnte aber vom spezifischen Kontext abhängen: Zumindest im Kontext der sehr schweren CaMKII δ_c -induzierten Herzinsuffizienz scheinen sie hinsichtlich der Mortalität untergeordnet zu sein – vielmehr scheint hier hinsichtlich des Überlebens die schwere kardiale Dysfunktion limitierend zu sein.

4.4 RyR2-S2814 Phosphorylierungsstelle im (patho-) physiologischen Kontext

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen damit, dass das CaMKII δ_c -induzierte SR Ca²⁺-Leck durch (Hyper-)Phosphorylierung des RyR2 an Ser-2814 entsteht bzw. durch phosphoresistente Mutation dieser Stelle (S2814A-Mutation) verhindert wird. Auf die Entstehung der CaMKII δ_c -vermittelten Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie hatte dieses jedoch überraschenderweise keinen Einfluss (außer einer initialen leicht verlangsamten Entwicklung der Herzinsuffizienz) und auch die rasche Mortalität des CaMKII δ_c -Phänotyps wurde nicht reduziert. RyR2 Ser-2814-Phosphorylierung ist damit der entscheidende Mechanismus, durch den das CaMKII-induzierte SR Ca²⁺-Leck entsteht, dieses Ca²⁺-Leck ist jedoch (anders als vermutet) nicht der wesentliche Mechanismus, durch den die Herzinsuffizienz in der CaMKII δ_c überexprimierenden Maus entsteht.

Diese Ergebnisse sind jedoch primär im Kontext des spezifischen CaMKII δ_c -Modells zu werten. Hinsichtlich der grundsätzlichen Bedeutung des SR Ca²⁺-Lecks für Herzinsuffizienz (unterschiedlicher Genese) kann aus der vorliegenden Arbeit keine alleinige Schlussfolgerung abgeleitet werden. In dieser Hinsicht bleibt die Befundlage weiterhin widersprüchlich: Respress et al. hatten eine Abschwächung der durch TAC-OP induzierten Herzinsuffizienz in der S2814A-Maus beobachtet, nicht aber der infolge von Myokardinfarkt entstehenden Herzinsuffizienz [25].

Zudem ist festzustellen, dass eine konstitutiv phosphomimetische Mutation der Ser-2814-Stelle (S2814D-Mutation) zwar SR Ca²⁺-Leck induziert, aber nicht zu einem spontanen Herzinsuffizienz-Phänotyp führt [24]. Zusammenfassend ist damit festzuhalten, dass die Rolle

des (durch Ser-2814-Phosphorylierung induzierten) SR Ca^{2+} -Lecks für die Entwicklung von Herzinsuffizienz unklar ist, es aber mutmaßlich nicht den alleinigen entscheidenden Faktor darstellt. Dies gilt dabei insbesondere für die durch CaMKII δ_c -Überexpression hervorgerufene Herzinsuffizienz, wo ein anderer CaMKII-abhängiger Mechanismus oder das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen CaMKII-abhängigen Signalwege entscheidend sein müssen.

Welche dieser anderen CaMKII-vermittelten Mechanismen zur Entstehung der Herzinsuffizienz in der CaMKII δ_c -TG Maus führen (z.B. Aktivierung pathologischer Genprogramme durch HDAC-Phosphorylierung, später Natriumstrom infolge Nav1.5-Phosphorylierung...) und ob es hier *einen einzigen* ausschlaggebenden Mechanismus gibt oder letztlich *eine Kombination verschiedener* pathologischer Veränderungen, die zur Herzinsuffizienz führen, bleibt offen und sollte Gegenstand der weiteren Forschung sein.

In einem von der vorliegenden Doktorarbeit separaten Projekt, stellten wir unter Basalbedingungen keinen Einfluss der S2814A-Mutation auf die grundlegende elektromechanische Kopplung oder das SR Ca^{2+} -Leck fest. Die Ser-28214-Phosphoresistenz schützte jedoch vor dem durch β_1 -adrenerge Stimulation induzierte SR Ca^{2+} -Leck [103].

Welches die *physiologische* Relevanz der RyR2 Ser-2814-Phosphorylierung ist, ist bislang wenig erforscht. Befunde von Kushnir et al. (2010) zeigten, dass die Kraft-Frequenz-Beziehung (Bowditch-Effekt, [104]) in S2814-mutierten Herzen abgeschwächt war, d.h. die Zunahme der Kontraktionskraft mit steigender Herzfrequenz vermindert war. Der exakte Mechanismus hierfür blieb aber unklar [105]. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Ser-S2814 eine entscheidende Phosphorylierungsstelle in der Regulierung der Kraft-Frequenz-Beziehung ist. In Bezug auf die eigenen Ergebnisse kann die Phosphorylierungsresistenz und die daraus resultierende gestörte Kraft-Frequenz-Beziehung ein Ansatz für die gestörte Pumpfunktion der δ_c /S2814A-Maus sein. Limitiert ist der Erklärungsansatz jedoch durch die fehlenden Daten über die Auswirkungen der Überexpression der CaMKII. im Genotyp der δ_c -Maus. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um eine Aussage über den Effekt der resultierenden Hyperphosphorylierung an Ser-S2814 auf den Bowditch-Effekt treffen zu können. Zudem fanden sich Hinweise, dass die β_1 -adrenerg induzierte Beschleunigung der diastolischen zytosolischen Ca^{2+} -Elimination (d.h. im Wesentlichen Induktion vermehrter SERCA-Aktivität) in Kardiomyozyten aus S2814-Mäusen vermindert ist [106].

Perspektivisch zeichnet sich somit ab, dass die Ser-2814-Phosphorylierung ein klinisch interessantes therapeutisches Ziel für ventrikuläre und supraventrikuläre Rhythmusstörungen sein könnte (vgl. insbes [24,84]). Ihre Rolle hinsichtlich einer Herzinsuffizienz letztlich aber unklar bleibt und zumindest im Kontext des starken Induktors von Herzinsuffizienz der CaMKII δ_C -Überexpression am ehesten nur eine untergeordnete Rolle spielt.

5 Zusammenfassung

Veränderungen der Kalziumhomöostase und die daraus entstehenden Pathomechanismen in der Herzmuskelkontraktion gelten als zentrale Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz.

Im insuffizienten Myokard führt eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodin-Rezeptors 2 (RyR2) zu spontanen und unkoordinierten diastolischen Ca^{2+} -Ausschüttungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Das resultierende SR Ca^{2+} -Leck führt zu einem verminderten SR Ca^{2+} -Gehalt, der wiederum in einer verminderten systolischen Kalzium-Freisetzung resultiert, wodurch es folglich zu einer geringeren Kraftentwicklung an den Myofilamenten kommt.

Die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) gilt als einer der wesentlichen Regulatoren der Umsetzung von elektrischer Erregung der Herzmuskelzellen in eine mechanische Kontraktion, der sogenannten elektromechanischen Koppelung, und des zellulären Ca^{2+} -Haushalts. Weiterhin reguliert sie den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, steuert die SERCA2a-Funktion und die Phosphorylierung des RyR2, wodurch sie auf zellulärer Ebene zur Genese einer Herzinsuffizienz, Arrhythmien und Herzhypertrophie beitragen kann.

Die transgene Überexpression der CaMKII δ_C im Mausmodell führt zur Entstehung einer schweren Herzinsuffizienz mit kontraktile Dysfunktion, kardialer Dilatation und kardialer Hypertrophie einhergehend mit ausgeprägten Veränderungen des kardiomyozytären Ca^{2+} -Haushalts und insbesondere einem starken SR Ca^{2+} -Leck. Durch eine experimentelle Inhibition der CaMKII konnten protektive Effekte gegen die Entwicklung von Herzinsuffizienz gezeigt werden. Mutmaßlich spielt dabei die CaMKII-spezifische Phosphorylierung des RyR2 an Ser-2814 eine wichtige Rolle, welche als wesentliche Ursache für das SR Ca^{2+} -Leck angesehen wird.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Bedeutung der CaMKII-spezifischen RyR2-Phosphorylierung für die Entwicklung der CaMKII δ_C -induzierten Herzinsuffizienz untersucht. Dafür wurden die transgen CaMKII δ_C -überexprimierenden Mäuse mit Mäusen verpaart, in welchen der RyR2 nicht mehr durch die CaMKII-phosphoryliert werden konnte. Die hierdurch entstandenen δ_C /S2814A Mäuse wurden verglichen mit ihren Geschwistertieren (reiner Wildtyp, rein S2814A und rein δ_C).

Dazu wurden im Alter von sieben und zwölf Wochen Echokardiographien durchgeführt und biometrische Daten erhoben. An isolierten Kardiomyozyten wurde mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop das diastolische SR Ca^{2+} -Leck durch Registrierung und Quantifizierung von spontanen diastolischen Ca^{2+} -Freisetzungseignissen, sogenannten Ca^{2+} -Sparks, untersucht.

Die Untersuchung des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks bestätigte dabei das hohe SR Ca^{2+} -Leck infolge der CaMKII δ C-Überexpression (ca. 2,5-fach höher, als im Wildtyp). Die S2814A-Mutation hatte hingegen keinen relevanten Einfluss auf das SR Ca^{2+} -Leck. Im Kontext der CaMKII-Überexpression zeigte sich jedoch, dass die S2814A-Mutation die δ C/S2814A-Maus vollständig vor einem erhöhten SR- Ca^{2+} -Leck schützte. Die Ergebnisse zeigen damit erstmals, dass das CaMKII-induzierte SR Ca^{2+} -Leck somit vollständig von der Phosphorylierung der CaMKII-spezifischen Stelle am RyR2 abhängt.

Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass trotz der Protektion vor der Entwicklung eines SR- Ca^{2+} -Lecks die RyR2 S2814A-Mutation die δ C/S2814A-Maus nicht vor der Entstehung einer Herzinsuffizienz schützte. Die echokardiographischen Untersuchungen der Tiere zeigten eine unveränderte linksventrikuläre Dilatation, Myokardhypertrophie und starke kontraktile Dysfunktion infolge der CaMKII δ C-Überexpression. Auch die biometrischen Daten zeigten eine unverminderte pulmonale Stauung in den δ C/S2814A Tieren und bestätigten die unverändert starke kardiale Hypertrophie. Ebenfalls zeigten Überlebenszeitkurven dass die durch die CaMKII induzierte hohe frühzeitige Sterblichkeit durch die S2814A-Mutation nicht signifikant vermindert wurde.

Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse, dass das CaMKII δ C-induzierte SR Ca^{2+} -Leck von der Hyperphosphorylierung des RyR2 an der Ser-2814-Stelle abhängt und die δ C/S2814A-Mäuse mit phosphoresistenter Mutation dieser Stelle vollständig vor der Induktion des SR Ca^{2+} -Lecks geschützt sind. Die Mutation hatte dabei jedoch keinen Einfluss auf die infolge der CaMKII δ C-Überexpression entstandene Herzinsuffizienz und die resultierende Mortalität. Infolgedessen muss in künftigen Arbeiten untersucht werden, welche weiteren durch die CaMKII δ C induzierten Pathomechanismen verantwortlich für die Genese der Herzinsuffizienz sein könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular Ca^{2+} handling in heart failure. *J Clin Invest*. 1. März 2005;115(3):556–64.
2. Fischer TH, Rokita AG, Maier PDLS. Schlüsselrolle des Ca^{2+} in der Herzinsuffizienz und mögliche neue therapeutische Ansatzpunkte. *Kardiologe*. 18. März 2011;5(2):80–90.
3. Zugck C, Müller A, Helms T, Wildau H, Becks T, Hacker J, u. a. Gesundheitsökonomische Bedeutung der Herzinsuffizienz: Analyse bundesweiter Daten. *DMW - Dtsch Med Wochenschr*. April 2010;135(13):633–8.
4. Roger VL. The Heart Failure Epidemic. *Int J Environ Res Public Health*. April 2010;7(4):1807–30.
5. Neumann T. Heart Failure: the Commonest Reason for Hospitalization in Germany- Medical and Economic Perspectives. *Dtsch Aerzteblatt Online*. 17. April 2009
6. McMurray JJV. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med*. 21. Januar 2010;362(3):228–38.
7. Bundesärztekammer, Herausgeber. Evidenzbasierte Therapieleitlinien: Therapieempfehlungen. 2., überarb. und erw. Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl; 2004. 469 S.
8. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractil force. 2. Aufl. Dordrecht: Kluwer Academic Press; 2001.
9. Rossi AE, Dirksen RT. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve*. Juni 2006;33(6):715–31.
10. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5. Februar 2002;99(3):1115–22.
11. Neef S, Maier LS. Remodeling of excitation-contraction coupling in the heart: inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak as a novel therapeutic approach. *Curr Heart Fail Rep*. März 2007;4(1):11–7.
12. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 10. Januar

- 2002;415(6868):198–205.
13. Serysheva II. Structural insights into excitation-contraction coupling by electron cryomicroscopy. *Biochemistry Mosc.* November 2004;69(11):1226–32.
 14. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, u. a. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol.* 14. Mai 2001;153(4):699–708.
 15. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.* 2. April 2004;94(6):e61–70.
 16. Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H. Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem.* 3. Februar 1995;270(5):2074–81.
 17. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, u. a. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 12. Mai 2000;101(4):365–76.
 18. Li Y, Kranias EG, Mignery GA, Bers DM. Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res.* 22. Februar 2002;90(3):309–16.
 19. Wehrens XHT, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, u. a. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell.* 27. Juni 2003;113(7):829–40.
 20. Xiao B, Sutherland C, Walsh MP, Chen SRW. Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca^{2+} -release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res.* 5. März 2004;94(4):487–95.
 21. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ Res.* 9. Dezember 2005;97(12):1314–22.
 22. Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM. Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res.* 18. August 2006;99(4):398–406.

23. Curran J, Hinton MJ, Rios E, Bers DM, Shannon TR. β -Adrenergic Enhancement of Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak in Cardiac Myocytes Is Mediated by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Circ Res.* 16. Februar 2007;100(3):391–8.
24. van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, u. a. Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation.* 21. Dezember 2010;122(25):2669–79.
25. Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, u. a. Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res.* 25. Mai 2012;110(11):1474–83.
26. Sham JS, Song LS, Chen Y, Deng LH, Stern MD, Lakatta EG, u. a. Termination of Ca^{2+} release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8. Dezember 1998;95(25):15096–101.
27. Györke S, Fill M. Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in heart. *Science.* 7. Mai 1993;260(5109):807–9.
28. Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Györke I, Terentyeva R, Györke S. Protein phosphatases decrease sarcoplasmic reticulum calcium content by stimulating calcium release in cardiac myocytes. *J Physiol.* 1. Oktober 2003;552(Pt 1):109–18.
29. Sonnleitner A, Fleischer S, Schindler H. Gating of the skeletal calcium release channel by ATP is inhibited by protein phosphatase 1 but not by Mg^{2+} . *Cell Calcium.* April 1997;21(4):283–90.
30. Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, u. a. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol.* Juni 2002;22(12):4124–35.
31. Tada M, Yamada M, Kadoma M, Inui M, Ohmori F. Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Mol Cell Biochem.* 23. Juli 1982;46(2):73–95.
32. Tada M, Kirchberger MA, Katz AM. Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 10. April 1975;250(7):2640–7.

33. Simmerman HK, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem.* 5. Oktober 1986;261(28):13333–41.
34. Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG. Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry (Mosc).* 13. November 1979;18(23):5150–7.
35. Kranias EG, Di Salvo J. A phospholamban protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 5. August 1986;261(22):10029–32.
36. Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol.* März 1968;195(2):451–70.
37. Maier LS, Braunhalter J, Horn W, Weichert S, Pieske B. The role of SR Ca(2+)-content in blunted inotropic responsiveness of failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* April 2002;34(4):455–67.
38. Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, u. a. Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1. September 1995;92(5):1169–78.
39. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:417–45.
40. Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. Impaired spatial learning in alpha - calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 10. Juli 1992;257(5067):206–11.
41. Westra J, Brouwer E, Bouwman E, Doornbos-van der Meer B, Posthumus MD, van Leeuwen MA, u. a. Role for CaMKII inhibition in rheumatoid arthritis: effects on HIF-1-induced VEGF production by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci.* September 2009;1173:706–11.
42. Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, u. a. The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17. Februar 2009;106(7):2342–7.
43. Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase

- and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta*. 10. März 1994;1221(1):89–101.
44. Maier LS, Bers DM. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res*. 1. März 2007;73(4):631–40.
45. Maier LS, Bers DM. Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *J Mol Cell Cardiol*. August 2002;34(8):919–39.
46. Zhang T, Brown JH. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*. 15. August 2004;63(3):476–86.
47. Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem*. 15. Juni 1991;266(17):11144–52.
48. Davis BA, Schwartz A, Samaha FJ, Kranias EG. Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*. 25. November 1983;258(22):13587–91.
49. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, u. a. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na^{+} channels. *J Clin Invest*. Dezember 2006;116(12):3127–38.
50. Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, u. a. Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. Juni 2009;2(3):285–94.
51. Lee KS. Potentiation of the calcium-channel currents of internally perfused mammalian heart cells by repetitive depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Juni 1987;84(11):3941–5.
52. Hryshko LV, Bers DM. Ca current facilitation during postrest recovery depends on Ca entry. *Am J Physiol*. September 1990;259(3 Pt 2):H951–61.
53. Lokuta AJ, Rogers TB, Lederer WJ, Valdivia HH. Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Physiol*. 15. September 1995;487 (Pt 3):609–22.

54. Xu A, Hawkins C, Narayanan N. Phosphorylation and activation of the Ca^{2+} -pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 25. April 1993;268(12):8394–7.
55. Toyofuku T, Curotto Kurzydowski K, Narayanan N, MacLennan DH. Identification of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase that is phosphorylated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 21. Oktober 1994;269(42):26492–6.
56. DeSantiago J, Maier LS, Bers DM. Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* August 2002;34(8):975–84.
57. Reddy LG, Jones LR, Pace RC, Stokes DL. Purified, reconstituted cardiac Ca^{2+} -ATPase is regulated by phospholamban but not by direct phosphorylation with Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 21. Juni 1996;271(25):14964–70.
58. Zhang T, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, u. a. CaMKII δ Isoforms Differentially Affect Calcium Handling but Similarly Regulate HDAC/MEF2 Transcriptional Responses. *J Biol Chem.* 30. November 2007;282(48):35078–87.
59. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* Juli 2006;116(7):1853–64.
60. Hagemann D, Bohlender J, Hoch B, Krause EG, Karczewski P. Expression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II delta-subunit isoforms in rats with hypertensive cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem.* April 2001;220(1-2):69–76.
61. Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, u. a. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation.* 7. September 2010;122(10):993–1003.
62. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* 2. April 1999;84(6):713–21.
63. Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J. Activity of cAMP-dependent protein

- kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res.* April 1999;42(1):254–61.
64. Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, u. a. Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res.* 29. Oktober 2010;107(9):1150–61.
65. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res.* 2. Mai 2003;92(8):904–11.
66. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, u. a. The δ C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res.* 2. Mai 2003;92(8):912–9.
67. Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* August 2002;34(8):951–69.
68. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, u. a. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 15. August 1995;92(4):778–84.
69. Schwinger RH, Münch G, Bölc B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serine-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* März 1999;31(3):479–91.
70. Böhm M, Reiger B, Schwinger RH, Erdmann E. cAMP concentrations, cAMP dependent protein kinase activity, and phospholamban in non-failing and failing myocardium. *Cardiovasc Res.* November 1994;28(11):1713–9.
71. Netticadan T, Temsah RM, Kawabata K, Dhalla NS. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase is altered in heart failure. *Circ Res.* 17. März 2000;86(5):596–605.
72. Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bøkenes J, Tønnessen T, Holt E, u. a. Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res.* 1. Februar 2002;53(2):382–91.
73. Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM. Upregulation of Na⁺/Ca²⁺

- Exchanger Expression and Function in an Arrhythmogenic Rabbit Model of Heart Failure. *Circ Res.* 26. November 1999;85(11):1009–19.
74. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, u. a. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation.* 9. Februar 1999;99(5):641–8.
75. Weisser-Thomas J, Piacentino V, Gaughan JP, Margulies K, Houser SR. Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 15. März 2003;57(4):974–85.
76. Lehnart SE, Mongillo M, Bellinger A, Lindegger N, Chen BX, Hsueh W, u. a. Leaky Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J Clin Invest.* Juni 2008;118(6):2230–45.
77. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, u. a. CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res.* 2. April 2010;106(6):1134–44.
78. Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort RJ, Skapura DG, u. a. Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest.* Juli 2009;119(7):1940–51.
79. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, u. a. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail.* November 2009;2(6):664–75.
80. Currie S, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J.* 15. Januar 2004;377(Pt 2):357–66.
81. Fischer TH, Maier LS, Sossalla S. The ryanodine receptor leak: how a tattered receptor plunges the failing heart into crisis. *Heart Fail Rev.* Juli 2013;18(4):475–83.
82. Fischer TH, Eiringhaus J, Dybkova N, Förster A, Herting J, Kleinwächter A, u. a. Ca(2+) /calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* Dezember 2014;16(12):1292–300.

83. Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, u. a. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res.* 3. Februar 2006;98(2):235–44.
84. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, u. a. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation.* 1. Mai 2012;125(17):2059–70.
85. Sedej S, Heinzel FR, Walther S, Dybkova N, Wakula P, Groborz J, u. a. Na⁺-dependent SR Ca²⁺ overload induces arrhythmogenic events in mouse cardiomyocytes with a human CPVT mutation. *Cardiovasc Res.* 1. Juli 2010;87(1):50–9.
86. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. Bd. 61. *Pflügers Arch*; 1985. 291-332 S.
87. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 25. März 1985;260(6):3440–50.
88. Molecular ProbesTM Handbook. In 2010.
89. Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol.* September 2007;293(3):C1073–81.
90. Ram R, Mickelsen DM, Theodoropoulos C, Blaxall BC. New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* November 2011;301(5):H1765–80.
91. Cely-Ortiz A, Felice JI, Díaz-Zegarra LA, Valverde CA, Federico M, Palomeque J, u. a. Determinants of Ca²⁺ release restitution: Insights from genetically altered animals and mathematical modeling. *J Gen Physiol.* 02 2020;152(11).
92. Valverde CA, Mazzocchi G, Di Carlo MN, Ciocci Pardo A, Salas N, Ragone MI, u. a. Ablation of phospholamban rescues reperfusion arrhythmias but exacerbates myocardium infarction in hearts with Ca²⁺/calmodulin kinase II constitutive phosphorylation of ryanodine receptors. *Cardiovasc Res.* 01 2019;115(3):556–69.
93. Mohamed BA, Hartmann N, Tirilomis P, Sekeres K, Li W, Neef S, u. a. Sarcoplasmic

- reticulum calcium leak contributes to arrhythmia but not to heart failure progression. *Sci Transl Med.* 12 2018;10(458).
94. Lu J., McKinsey T.A., Nicol R.L., Olson E.N. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:4070–4075.
 95. Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev.* (2014) 19:173–85.
 96. Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res.* (2012) 110:1646–60.
 97. Prabhu S. D., Frangogiannis N. G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. *Circ Res.* 2016;119(1):91–112.
 98. Ling H, Gray CB, Zambon AC, Grimm M, Gu Y, Dalton N, Purcell NH, Peterson K, Brown JH. Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II δ mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor- κ B. *Circ Res.* 2013; 112:935–944.
 99. Gray CB, Suetomi T, Xiang S, Mishra S, Blackwood EA, Glembotski CC, Miyamoto S, Westenbrink BD, Brown JH. CaMKII δ subtypes differentially regulate infarct formation following ex vivo myocardial ischemia/reperfusion through NF- κ B and TNF- α . *J Mol Cell Cardiol.* 2017; 103:48–55.
 100. Willeford A, Suetomi T, Nickle A, Hoffman HM, Miyamoto S, Heller Brown J. CaMKII δ -mediated inflammatory gene expression and inflammasome activation in cardiomyocytes initiate inflammation and induce fibrosis. *JCI Insight.* 2018; 3:97054.
 101. Fink M, Noble PJ, Noble D. Ca(2)(+)-induced delayed afterdepolarizations are triggered by dyadic subspace Ca(2)(+) affirming that increasing SERCA reduces aftercontractions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(3):H921–35.
 102. Dewenter M., Neef S., Vettel C., Lämmle S., Beushausen C., Zelarayan L.C., Katz S., von der Lieth A., Meyer-Roxlau S., Weber S., et al. Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Activity Persists During Chronic β -Adrenoceptor Blockade in Experimental and Human Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* 2017;10:e003840.
 103. Baier MJ, Noack J, Seitz MT, Maier LS, Neef S. Phosphorylation of RyR2 Ser-2814 by CaMKII mediates β 1-adrenergic stress induced Ca²⁺ -leak from the sarcoplasmic reticulum. *FEBS Open Bio.* 2021;11(10):2756–62.

104. Puglisi J. L., Negroni J. A., Chen-Izu Y., Bers D. M. (2013). The force-frequency relationship: insights from mathematical modeling. *Adv. Physiol. Educ.* 37 28–34.
105. Kushnir A, Shan J, Betzenhauser MJ, Reiken S, Marks AR. Role of CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1. Juni 2010;107(22):10274–9.
106. Noack J: Die Bedeutung der Ca²⁺-Calmodulin-Kinase-II-spezifischen Ryanodin-Rezeptor Typ-2-Phosphorylierung an Ser-2814 für das Isoprenalin-induzierte SR-Ca²⁺-Leck in Kardiomyozyten. Med. Diss. Regensburg 2021.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Stephan Neef. Es gelang ihm zu jederzeit mir mit seinem Wissen und seiner Perfektion zum Detail zur Seite zu stehen und mich auch bei Rückschlägen mit seiner freundlichen Art aufzubauen.

Ebenfalls gilt ein großes Dankeschön den MTAs Julia Steinbrecher, Felicia Radtke, Timo Schulte und Thomas Sowa. Sie sorgten nicht nur tagtäglich für gute Laune im Labor, sondern ermöglichten mir mit ihrer unermüdlichen Hilfe eine reibungslose Durchführung der Versuche.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, 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 Arbeit 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.

Göttingen, den 20.07.2022

Mark-Tilman Seitz