

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin II  
Prof. Dr. Lars S. Maier  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Der Einfluss des GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid auf das MAGUK-Protein  
CASK in murinen Kardiomyozyten

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Charlotte Lina-Maria Lücht

2025



Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin II  
Prof. Dr. Lars S. Maier  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Der Einfluss des GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid auf das MAGUK-Protein  
CASK in murinen Kardiomyozyten

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Charlotte Lina-Maria Lücht

2025

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Wagner  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Diane Bitzinger  
Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>6</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1 Klinische Studien mit GLP-1-Rezeptoragonisten.....	8
1.2 Charakterisierung des GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid .....	10
1.3 Der Aufbau einer Herzmuskelzelle .....	11
1.3.1 Die Zellmembran und die Transversaltubuli .....	11
1.3.2 L-Typ-Kalziumkanal .....	11
1.3.3 Das sarkoplasmatische Retikulum und Phospholamban.....	12
1.3.4 Der kardiale Ryanodinrezeptor .....	13
1.3.5 Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX).....	13
1.4 Ruhepotential und Aktionspotential.....	14
1.5 Die elektromechanische Kopplung .....	15
1.6 Herzinsuffizienz .....	17
1.7 Die Ca <sup>2+</sup> -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II delta (CaMKII δ) .....	18
1.7.1 Die Struktur der CaMKII δ.....	19
1.7.2 Aktivierung und Inhibition der CaMKII δ.....	20
1.7.3 Alternative Mechanismen der Aktivierung der CaMKII δ .....	20
1.8 Die Zielstrukturen der CaMKII δ .....	21
1.9 Auswirkungen von Exenatid auf die Regulation der CaMKII .....	24
1.10 Die Ca <sup>2+</sup> -/CaM-abhängige Serin-Proteinkinase (CASK).....	24
1.11 Interaktion von CASK und CaMKII .....	25
1.12 Zielsetzung und Hypothesen der Arbeit .....	26
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
2.1 Mausmodell.....	28
2.1.1 Cre-Lox-Rekombinationssystem.....	28
2.1.2 Das murine Herzinsuffizienzmodell (TAC).....	29
2.2 Isolation muriner Kardiomyozyten .....	30
2.3 Kalziumaufbau .....	32
2.4 Zellkulturen .....	33

<b>2.5 Kalziumfluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM.....</b>	<b>34</b>
<b>2.6 Epifluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7 Versuchsablauf.....</b>	<b>36</b>
2.7.1 Messung von Kalziumtransienten.....	37
2.7.2 Messungen des SR-Kalziumgehalts mittels Koffeinapplikation .....	38
2.7.3 Hintergrundmessung .....	38
<b>2.8 Messlösungen .....</b>	<b>39</b>
2.8.1 Normaltyrode .....	39
2.8.2 Isoprenalintyrode .....	39
2.8.3 Koffeintyrode.....	40
<b>2.9 Auswertung der Messdaten .....</b>	<b>40</b>
<b>2.10 Statistische Auswertung der erhobenen Daten .....</b>	<b>41</b>
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Auswertung der biometrischen Daten im CASK-Modell .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 Das Modell der chronischen Nachlasterhöhung mittels transverser Aortenkonstriktion (TAC-Modell) führt zur kardialen Hypertrophie.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Die Funktion der SERCA (RT 80) .....</b>	<b>45</b>
3.3.1 SERCA-Funktion im CASK-Modell .....	45
3.3.2 SERCA-Funktion im TAC-Modell.....	47
<b>3.4 Einfluss des GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid auf die systolische Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum .....</b>	<b>48</b>
3.4.1 Effekt von Exenatid auf die systolische Kaziumfreisetzung im CASK-Modell .....	48
3.4.2 Effekt von Exenatid auf die systolische Kalziumfreisetzung im TAC-Modell .....	51
<b>3.5 Bestimmung des Kalziumgehalts im sarkoplasmatischen Retikulum.....</b>	<b>53</b>
3.5.1 Kalziumgehalt im sarkoplasmatischen Retikulum im CASK-Modell .....	53
3.5.2 Kalziumgehalt im sarkoplasmatischen Retikulum im TAC-Modell.....	57
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1 Einfluss der CASK-Expression auf die kardiale Hypertrophie .....</b>	<b>60</b>
<b>4.2 Die Exposition von Exenatid steigert die diastolische Relaxation in gesunden Kardiomyozyten- Auswirkungen auf die Funktion der SERCA .....</b>	<b>61</b>
<b>4.3 Die Exposition mit dem GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid führt CASK-vermittelt zu einer Steigerung der systolischen Funktion.....</b>	<b>63</b>
<b>4.4 Einfluss von Exenatid auf den Kalziumgehalt im sarkoplasmatischen Retikulum.....</b>	<b>65</b>
<b>4.5 Exenatid als möglicher Ansatz bei der Therapie der Herzinsuffizienz.....</b>	<b>66</b>
<b>4.6 Limitationen dieser Arbeit .....</b>	<b>67</b>
<b>4.7 Zusammenfassung.....</b>	<b>68</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 schematische Darstellung des ventrikulären Aktionspotentials. Eigene Abbildung, modifiziert nach Schmidt, Lang, Heckmann, Physiologie des Menschen, 31. Auflage, 2010	15
Abbildung 2 schematische Darstellung eines Kardiomyozyten mit der elektromechanischen Kopplung. Mit den blauen Pfeilen dargestellt ist die Bereitstellung des Kalziums in der Systole, mit den roten Pfeilen die Elimination des Kalziums. Eigene Abbildung, modifiziert nach Bers, 2001	16
Abbildung 3 Die Struktur der $\text{Ca}^{2+}$ -/ Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II delta (CaMKII $\delta$ ) sowie die Aktivierungswege der CaMKII $\delta$ als direkte Aktivierung durch Bindung von Kalziumionen an Calmodulin, sowie durch Autophosphorylierung an Threonin 287 (Thr287). Modifiziert nach Maier und Bers, 2002	19
Abbildung 4 Schematische Darstellung eines Kardiomyozyten. Einfluss der CaMKII delta auf die wichtigen Proteine und Kanäle der elektromechanischen Kopplung. Eigene Abbildung, modifiziert nach Maier und Bers, 2007	23
Abbildung 5 schematische Darstellung der transversalen Aortenkonstriktion (modifiziert nach Rockman et al., 1991)	29
Abbildung 6 Links: Strukturformel von Fluo-4. Rechts: Fluoreszenzspektrum von Fluo-4, Absorptionsmaximum bei 490 nm (blau), eine Verschiebung des Emissionsmaximums bei 520 nm wird erreicht (rot) (Thermo Fisher Scientific)	35
Abbildung 7 schematischer Aufbau der Epifluoreszenzmikroskopie. Eigene Abbildung, modifiziert nach Mustroph 2017	36
Abbildung 8 Originalabbildung eines Kalziumtransienten	40
Abbildung 9 biometrische Daten der CASK-Kontrollgruppe (CASK-CTRL) im Vergleich zum CASK-Knockout Modell (CASK- KO). Links: Körpergewicht in g, Mitte: Herzgewicht in mg, rechts: Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht in mg/g	43
Abbildung 10 Biometrische Daten im Sham-Modell und im TAC-Modell. Links: Körpergewicht (g) im TAC-Modell und im Sham-Modell, Rechts: Herzgewicht (mg) im TAC-Modell und im Sham-Modell	44
Abbildung 11 Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG) in mg/g, Sham vs. TAC	45

Abbildung 12 Relaxationszeit der Kalziumtransienten (RT 80) in s, CASK CTRL unter basalen Bedingungen (links) und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin 10-7 mmol/L (rechts)	46
Abbildung 13 Relaxationszeit des Kalziumtransienten (RT 80) in s, CASK-KO unter basalen Bedingungen und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin 10-7 mmol/L	47
Abbildung 14 Relaxationszeit des Kalziumtransienten (RT 80) in s in Abhangigkeit von der Stimulationsfrequenz Sham-Modell (links) und im TAC-Modell (rechts), 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid	48
Abbildung 15 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid. Oben: Originale Abbildung registrierter Kalziumtransienten (normierte Darstellung) im CASK-CTRL unter Exenatid (grau) und Vehikel (schwarz) sowie im CASK-KO unter Exenatid (rot) und Vehikel (blau). Unten: Die systolische Kalziumtransientenamplitude CASK-CTRL vs. CASK-KO unter Normaltyrode bei einer Frequenz von 0,5 Hz	49
Abbildung 16 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid. Die systolische Kalziumtransientenamplitude CASK-CTRL vs. CASK-KO unter $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin 10-7 mmol/L	51
Abbildung 17 Die systolische Kalziumtransientenamplitude im TAC-Modell in Abhangigkeit der Stimulationsfrequenzen unter Exenatid oder Vehikel	52
Abbildung 18 Die systolische Kalziumtransientenamplitude im Sham-Modell in Abhangigkeit der Stimulationsfrequenzen unter Exenatid oder Vehikel	53
Abbildung 19 Originale Abbildung, systolische Kalziumtransientenamplitude bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz im TAC-Modell (grau: Exenatid, schwarz: Vehikel) und Sham-Modell (blau: Exenatid, rot: Vehikel)	53
Abbildung 20 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude. Links: Originale Abbildung (normierte Darstellung) von Exenatid (grau) und Vehikel (schwarz) im CASK-CTRL. Rechts: CASK-CTRL, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid.	54
Abbildung 21 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude nach $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin, CASK-CTRL, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid	55
Abbildung 22 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude CASK-KO, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid.	56
Abbildung 23 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude nach $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin, CASK-KO 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid.	57

Abbildung 24 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude im TAC-Modell, links:

Originale Abbildung (normierte Darstellung) von Exenatid (grau) und Vehikel

(schwarz), rechts: murines TAC-Modell, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid 58

Abbildung 25 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude im Sham-Modell. Links:

Originale Abbildung (normierte Darstellung) von Exenatid (grau) und Vehikel

(schwarz), rechts: Sham-Modell, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid 59

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Isolationslösung 1-facher Stock	31
Tabelle 2 Enzymlösung	32
Tabelle 3 Kalziumaufbau nach erfolgter Zellisolation	33
Tabelle 4 Kulturmedium g	34
Tabelle 5 Normaltyrode 1-facher Stock	39
Tabelle 6 Isoprenalintyrode	40
Tabelle 7 Koffeintyrode	40

# Abkürzungsverzeichnis

ACS	<i>akutes Koronarsyndrom</i>	Hz	<i>Hertz</i>
ADH	<i>antidiuretisches Hormon</i>	$I_{K1}$	<i>stabilisierender Kaliumstrom</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>	$I_{Na}$	<i>Natriumstrom, Natriumstrom</i>
AM	<i>Acetoxymethylester</i>	$loxP$	<i>locus of X-over P1</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variants</i>	$K_d$	<i>Dissoziationskonstante</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>	KHK	<i>koronare Herzerkrankung</i>
BCS	<i>Bovine Calf Serum</i>	KO	<i>Knockout</i>
BDM	<i>2,3-Butandionmonoxim</i>	MACE	<i>major adverse cardiovascular events</i>
BSA	<i>bovines Serumalbumin</i>	MAGUK	<i>membranassoziierte Guanylatkinase</i>
$Ca^{2+}$	<i>Kalzium</i>	MEM	<i>Minimal-Essential-Medium</i>
CaM	<i>Calmodulin</i>	mmol/l	<i>Millimol pro Liter</i>
CaMKII	<i>Ca2+-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II</i>	mol/l	<i>Mol pro Liter</i>
cAMP	<i>zyklisches Adenosinmonophosphat, zirkantisches Adenosinmonophosphat</i>	mV	<i>Millivolt</i>
CASK	<i>Ca2+-/CaM-abhängige Serin-Proteinkinase</i>	NCX	<i>Natrium-Kalzium-Austauscher</i>
Cre	<i>Cre-Rekombinase</i>	NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor</i>
CTRL	<i>Kontrollgruppe</i>	PKA	<i>Proteinkinase A</i>
DHPR	<i>Dihydropyridin-Rezeptor</i>	PKC	<i>Proteinkinase C</i>
DM	<i>Diabetes mellitus</i>	PLB	<i>Phospholamban</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>	RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>	ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
F	<i>Transientenfluoreszenz</i>	RT	<i>Relaxation Time</i>
$F_0$	<i>Fluoreszenz der Baseline</i>	SEM	<i>Standardfehler des Mittelwertes</i>
GLP	<i>Glucagon-like Peptide</i>	SERCA	<i>sarkoplasmatische Kalzium-ATPase</i>
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure</i>	SR	<i>sarkoplasmatische Retikulum</i>
		TAC	<i>Transversale Aortenkonstriktion</i>

# **1. Einleitung**

Das metabolische Syndrom umfasst verschiedene Risikofaktoren wie Adipositas, Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie sowie Insulinresistenz bzw. eine gestörte Glukosetoleranz. Zahlreiche Studien, darunter insbesondere die Framingham-Studie (Dawber, 1980), haben gezeigt, dass dieses Syndrom ein bedeutender Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse ist. Kardiovaskuläre Ereignisse zählen neben Krebserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Industrienationen. Zudem wurde gezeigt, dass diese metabolischen Risikofaktoren einzeln und in Kombination die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ II deutlich erhöhen (World Health Organisation, 1999).

Patienten mit einem Diabetes mellitus (DM) Typ II weisen ein erhöhtes Risiko auf, kardiovaskulären Erkrankungen zu entwickeln, die hauptsächlich und langfristig in eine der häufigsten Todesursachen, der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, münden (Kannel et al., 1974; Seferović et al., 2018).

Neben gesellschaftlichen Präventionsmaßnahmen besteht ein dringender Bedarf an effektiven Therapiemöglichkeiten. Ein besseres Verständnis relevanter molekularer Mechanismen konnte in den letzten Jahren zur Entwicklung neuer medikamentöser Strategien zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II beitragen, die neben einer direkten Therapie des Diabetes mellitus Typ II auch protektive Effekte hinsichtlich des Risikos kardiovaskulärer Folgeerkrankungen aufweisen (Heerspink et al., 2020; Kosiborod et al., 2023).

## **1.1 Klinische Studien mit GLP-1-Rezeptoragonisten**

Interessant sind in diesem Zusammenhang die GLP-1-Rezeptoragonisten, die unabhängig von ihrer blutzuckersenkenden Wirkung auch das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse zu reduzieren und die Gesamtmortalität signifikant senken können (Lincoff et al., 2023; Marso S et al., 2016). In den publizierten klinischen Studien konnte eine geringere Inzidenzrate von MACE-Ereignissen (major adverse cardiovascular events), definiert als kardiovaskulären Tod, ischämischen Schlaganfall oder Myokardinfarkt, beobachtet werden. Es wurden molekulare Signalwege

identifiziert, die die Kardioprotektion von GLP-1-Rezeptoragonisten in *in vivo*- und *in vitro*-Modellen erklären können (Ravassa et al., 2012).

Neben klinischen Daten zur Kardioprotektion bei Patienten mit einem DM Typ II und einer Herzinsuffizienz (Nathanson et al., 2012) konnte GLP-1 im Tiermodell die kardialen Mikrogefäße vor oxidativem Stress, Apoptose und der daraus resultierenden kardialen Dysfunktion schützen, was zu einer Verbesserung der diastolischen Herzfunktion führt (Wang et al., 2013). Zudem reduzierte die Behandlung mit Exenatid das kardiale Remodeling im infarzierten und herzinsuffizienten Myokard (Chen et al., 2017).

Die klinisch randomisierte SELECT-Studie (*Semaglutide Effects on Cardiovascular Outcomes in People with Overweight or Obesity*) untersuchte die Wirksamkeit von Semaglutid (2,4 mg) im Vergleich zu Placebo. Diese wurde zusätzlich zur Standardbehandlung bei adipösen Patienten mit bestehender kardiovaskulärer Erkrankung, jedoch ohne Vorgeschichte eines Diabetes, verabreicht. Die Ergebnisse zeigten, dass Semaglutid das Risiko für MACE-Ereignisse um etwa 20% im Vergleich zum Placebo reduzierte (Lincoff et al., 2023).

In der bereits 2016 publizierten LEADER-Studie (*Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results*) wurden Patienten mit einer Behandlung mit Liraglutid oder mit einem Placebo randomisiert, welche jeweils zusätzlich zu ihrer bereits bestehenden antidiabetischen Therapie über einen Zeitraum von knapp 4 Jahren behandelt wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Inzidenzrate von MACE-Ereignissen bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ II und zusätzlichen kardiovaskulären Risikofaktoren durch die Behandlung mit dem GLP-1-Rezeptoragonisten Liraglutid im Vergleich zum Placebo signifikant verringert wird (Marso S et al., 2016). In einer weiteren Analyse der LEADER-Studie konnte dies unabhängig von einer bereits bestehenden Herzinsuffizienz bestätigt werden (Marso et al., 2020).

Im Gegensatz dazu konnte der GLP-1-Rezeptoragonist Exenatid in der placebokontrollierten EXSCEL-Studie (*Exenatide Study of Cardiovascular Event Lowering*) diesen Effekt nicht reproduzieren (Holman et al., 2017). Das Patientenkollektiv setzte sich aus ca. 14000 Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ II zusammen, sowohl mit als auch ohne eine vorausgegangene kardiovaskuläre

Erkrankung. Diese Studie untersuchte die kardiovaskulären Effekte der Therapie mit einer einmalig wöchentlichen Gabe von 2 mg Exenatid subkutan oder einem Placebo. Hinsichtlich des primären Endpunkts (kardiovaskulär bedingter Tod, nicht tödlicher Herzinfarkt oder Schlaganfall) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Allerdings wurde eine Reduktion der Gesamtmortalität zugunsten von Exenatid festgestellt.

Grundsätzlich bleibt die Frage offen, ob die Kohorten von LEADER und EXSCEL vergleichbar sind und ob bestimmte Untergruppen besonders von einer Therapie mit Exenatid profitieren könnten. Ein wesentlicher Kritikpunkt beim Vergleich dieser beiden Studien ist die größere Anzahl von Patienten mit koronarer Herzerkrankung in der LEADER-Studie. Somit könnten spezifische Effekte von Exenatid auf Kardiomyozyten eine mögliche Erklärung der aktuell noch uneindeutigen Studienlage sein. Auf molekularer Ebene ist dies noch unzureichend geklärt. Daher habe ich mich in der vorliegenden Arbeit mit dem Einfluss des GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid auf die zelluläre Kalziumhomöostase in murinen Kardiomyozyten beschäftigt.

## **1.2 Charakterisierung des GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid**

GLP-1 (Glucagon-like Peptide 1) ist ein natürlich vorkommendes Hormon, welches die Insulinsekretion stimuliert und die Blutzuckerkontrolle verbessert. Es wird im Gastrointestinaltrakt als Reaktion auf hohe Glukosespiegel freigesetzt und senkt den Blutzuckerspiegel. Inkretinimetika, auch GLP-1-Rezeptoragonisten genannt, imitieren die Wirkung des körpereigenen Hormons GLP-1 und verstärken dessen blutzuckersenkende Eigenschaften durch Stimulation der Insulinproduktion der  $\beta$ -Zellen im Pankreas und der Hemmung der Glukagonsekretion (Nauck et al., 2021).

Exenatid (Byetta®, AstraZeneca, Wilmington, DE, USA) wird zur Therapie des Diabetes mellitus (DM) Typ II bereits im klinischen Alltag verwendet, meist als Kombinationstherapie mit weiteren oralen Antidiabetika wie Metformin, Sulfonylharnstoffen oder auch als Kombinationsmedikation bei der Insulintherapie (European Medicines Agency, 2012). Es senkt den Nüchternenglukosewert und die postprandialen Glukoselevel (Riddle et al., 2006). Das kurzwirksame GLP-1-Analogon Exenatid entspricht der hier in der Arbeit verwendeten Substanz Exendin-4 (Sigma-Aldrich, USA), dem Speichelgift der Gila-Krustenechse (*Heloderma suspectum*).

## 1.3 Der Aufbau einer Herzmuskelzelle

### 1.3.1 Die Zellmembran und die Transversaltubuli

In der Herzmuskelzelle wird die Zellmembran als Sarkolemm bezeichnet. Diese besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht und dient als Barriere zwischen dem Intrazellularraum und dem Extrazellularraum.

Die tiefen Invaginationen der Zellmembran werden als transversale Tubuli (T-Tubuli) bezeichnet. An die Transversaltubuli grenzen die terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Aufgrund der strukturellen Nähe bilden ein Transversaltubulus zusammen mit einer einzelnen terminalen SR-Zisterne die sogenannte Diade. Im Bereich der T-Tubuli befinden sich vermehrt die L-Typ-Kalziumkanäle (Bers, 2001), die maßgeblich für die Ausbildung der elektromechanischen Kopplung verantwortlich sind.

### 1.3.2 L-Typ-Kalziumkanal

Der spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanal, auch Dihydropyridin-Rezeptor (DHPR) genannt, ist ein Kalziumkanal, welcher sich in der Zellmembran des transversalen Systems (T-Tubuli) befindet. Bei der Depolarisation der Zellmembran wird der Kanal zur Öffnung angeregt und sorgt für eine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Kalziumeinstrom in die Zelle. Im Zuge der Nähe zu den Ryanodinrezeptoren (RyR2) im sarkoplasmatischen Retikulum kommt es nach der Depolarisation der Herzmuskelzelle zu einer konsekutiven Aktivierung der RyR2 und zu einer Kalziumfreisetzung aus dem SR.

Bei erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen wird der Kanal über eine kalziumabhängige negative Rückkopplung inaktiviert (Peterson et al., 1999).

### 1.3.3 Das sarkoplasmatische Retikulum und Phospholamban

Das glatte endoplasmatische Retikulum der Kardiomyozyten wird als sarkoplasmatisches Retikulum bezeichnet. In der Herzmuskelzelle ist das SR ein wesentlicher Bestandteil der elektromechanischen Kopplung. Es besteht aus longitudinalen Tubuli (L-Tubuli) entlang der Myofibrillen sowie den bereits erwähnten terminalen Zisternen. Es stellt den internen Kalziumspeicher der Herzmuskelzelle dar. Das im SR gespeicherte Kalzium kann durch kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung über aktivierte Ryanodinrezeptoren (RyR2) in das Sarkoplasma ausgeschüttet werden und so im Folgenden zu einer Kontraktion der Myofibrillen führen. Die hohen intraluminalen Kalziumkonzentrationen werden durch das kalziumbindende Protein Calsequestrin gepuffert, welches in der Lage ist, pro Molekül bis zu vierzig  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gleichzeitig zu binden (Mitchell et al., 1988). Diese schwache Bindung ermöglicht wiederum eine schnelle Freisetzung der Kalziumionen. Calsequestrin ist ebenfalls in den terminalen Zisternen und an den Ryanodinrezeptoren verankert (Franzini-Armstrong et al., 1987).

Nachdem eine Kontraktion stattgefunden hat, wird das Kalzium aus dem Sarkoplasma über die sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), die sich in den L-Tubuli befindet, wieder zurück in das SR gepumpt. Hier werden je zwei Kalziumionen unter Verbrauch eines Moleküls ATP transportiert (Tada et al., 1975).

Die kardiale SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) unterliegt einem inhibierenden Regulationsmechanismus durch das Protein Phospholamban (PLB). Durch Phosphorylierung bildet sich ein Phospholamban-Pentamer aus, welches von der SERCA2a abdissoziiert und die Hemmung aufhebt, sodass mehr Kalzium in das SR aufgenommen wird und die Kardiomyozyten relaxieren. Diese Phosphorylierung wird über die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) als auch über die  $\text{Ca}^{2+}$ -/Phospholipid-abhängige Proteinkinase C (PKC) an Serin 16 oder über die  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKII) an Threonin 17 reguliert (Simmerman et al., 1986).

Liegt Phospholamban im dephosphorylierten Zustand vor, wird die SERCA2a gehemmt und das Kalzium kann nicht über das SR aufgenommen werden. Die Dephosphorylierung erfolgt durch das SR-assoziierte Protein Phosphatase 1 (Kranias & Di Salvo, 1986).

### 1.3.4 Der kardiale Ryanodinrezeptor

Der kardiale Ryanodinrezeptor (RyR2) fungiert als transmembraner Kalziumkanal des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Die Monomere formieren sich zu Homotetrameren als funktionelle Einheiten.

Die Ryanodinrezeptoren befinden sich im Bereich der terminalen Zisternen sowie in der Nähe der T-Tubuli. Diese räumliche Nähe spielt eine entscheidende Rolle in der Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung aus dem SR bei Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Bei einer Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration wird der Kanal aktiviert und zur Kalziumfreisetzung angeregt. Zusätzlich werden die RyR2 durch Calmodulin sowie durch Phosphorylierung der PKA an Serin 2809 als auch durch Phosphorylierung der CaMKII an Serin 2814 (Wehrens et al., 2004) reguliert und so die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 erhöht (Witcher et al., 1991)

### 1.3.5 Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX)

Nebst der SERCA ist der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) ein wesentlicher Bestandteil für die Elimination des Kalziums während der Diastole. Er ist hauptsächlich in der Zellmembran und in den T-Tubuli verankert (Shattock et al., 2015).

Als Antiporter arbeitet der NCX entlang eines elektrochemischen Gradienten. Es werden drei Natriumionen (nach intrazellulär) gegen ein Kalziumion (nach extrazellulär) ausgetauscht. Insgesamt werden drei positive Ladungen gegen zwei positive Ladungen ausgetauscht, sodass ein Netto-Ladungstransport stattfindet und sich das Membranpotential ändert.

## 1.4 Ruhepotential und Aktionspotential

Das Ruhepotential des Arbeitsmyokards wird durch die starke Leitfähigkeit des Einwärtsgleichrichters für Kalium ( $I_{K1}$ ) bei ca. -90 mV aufrechterhalten. Dies entspricht etwa dem Nernst-Gleichgewichtspotential für Kaliumionen (Ackerman & Clapham, 1997). Mit einer intrazellulären Kaliumkonzentration von 140 mmol/L und einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 4 mmol/l ergibt sich dabei mit der Nernst-Gleichung das Kaliumgleichgewichtspotential ( $E_K$ ). Das Aktionspotential (AP) lässt sich in fünf Phasen einteilen (siehe Abbildung 1). Es kommt zu einer Erregung der Herzmuskelzelle. Wird eine Herzmuskelzelle so weit depolarisiert, dass ein Schwellenwert von ca. -70 mV erreicht wird, werden membranständige, schnelle spannungsabhängige Natriumkanäle ( $I_{Na}$ ) geöffnet, es kommt zum Einstrom von Natriumionen und die Zelle wird weiter depolarisiert. Dies bildet die Phase 0 des Aktionspotentials, auch die Phase des schnellen Aufstrichs genannt. Gleichzeitig werden hier die Kalium-Einwärtsgleichrichter inaktiviert. Das Natriumgleichgewichtspotential nach der Nernst-Gleichung liegt bei +60 mV. Dieser Wert wird jedoch nicht erreicht, da die Natriumkanäle spannungsabhängig geschlossen und inaktiviert werden. Das Membranpotential erreicht einen Spitzenwert von +20 mV (Phase 1, initiale Spurze). Hierfür verantwortlich für die frühe partielle Repolarisation ist der transiente Auswärtsstrom von Kalium ( $i_{to}$ ). Es schließt sich eine lange Plateauphase (Phase 2) an. Hier kommt es zu einer Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanälen ( $I_{Ca}$ ) und einem langsamen Kalziumeinstrom in die Zelle. Diese Kanäle werden ab einer Membranspannung von -40 mV aktiviert und bestimmen die Plateauphase des Membranpotentials, welches bei 0 mV konstant gehalten wird. Sobald die Kalziumkanäle inaktiviert werden, überwiegen die repolarisierenden Ströme, vor allem Kaliumströme, und es folgt die Repolarisation (Phase 3). Hier dominiert der Kalium-Auswärtsgleichrichter  $I_K$ . Die Leitfähigkeit der Zellmembran für Kaliumionen überwiegt und demnach wird das Gleichgewichtspotential der Kaliumionen bei -90 mV angestrebt. Ab einem Membranpotential von -30 mV übernimmt der Kalium-Einwärtsgleichrichter  $I_{K1}$ , der für die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials (Phase 4) verantwortlich ist.

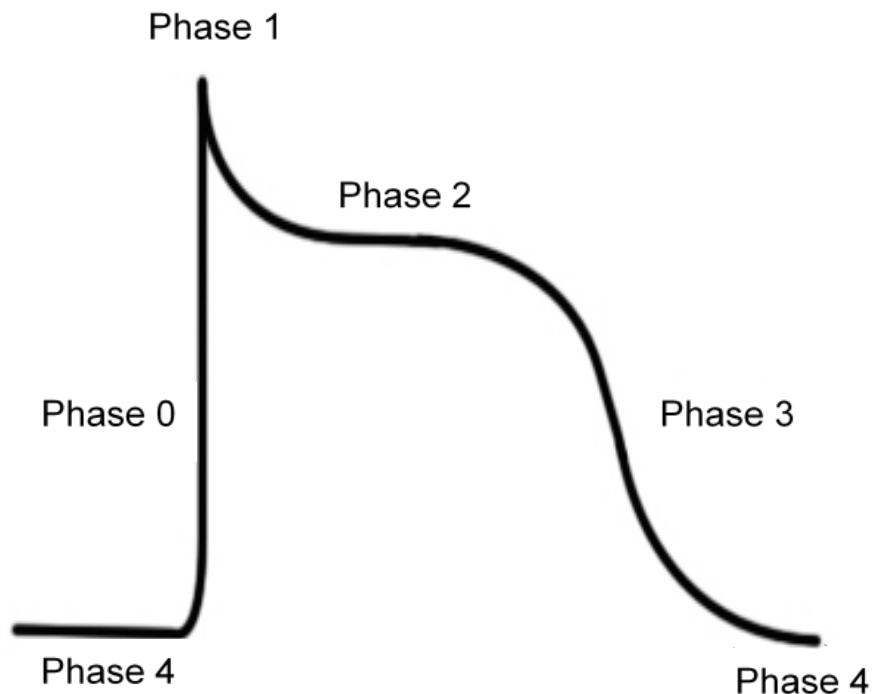


Abbildung 1 schematische Darstellung des ventrikulären Aktionspotentials. Eigene Abbildung, modifiziert nach Schmidt, Lang, Heckmann, Physiologie des Menschen, 31. Auflage, 2010

### **1.5 Die elektromechanische Kopplung**

Die Aufgabe des Herzens ist die Versorgung des Körpers mit Sauerstoff. Hierfür ist eine regelmäßige Kontraktion des Herzens notwendig. Die elektromechanische Kopplung des Herzens beschreibt den Prozess von der elektrischen Erregung bis hin zur Kontraktion einer Herzmuskelzelle. Das Myokard wird durch ein Aktionspotential des Schrittmacherzentrums erregt.

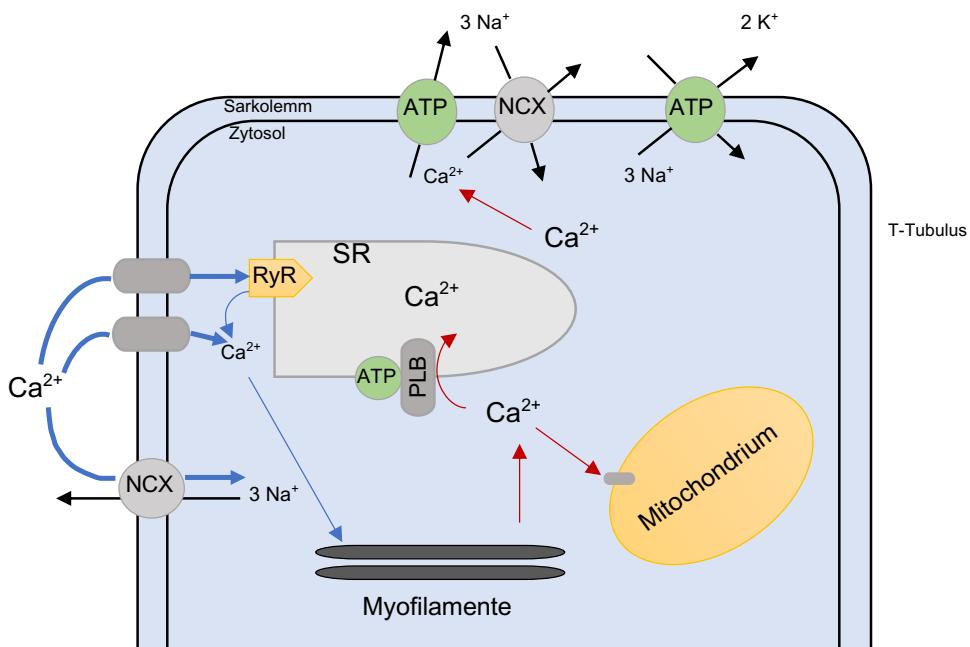


Abbildung 2 schematische Darstellung eines Kardiomyozyten mit der elektromechanischen Kopplung. Mit den blauen Pfeilen dargestellt ist die Bereitstellung des Kalziums in der Systole, mit den roten Pfeilen die Elimination des Kalziums. Eigene Abbildung, modifiziert nach Bers, 2001

Die Ausbreitung der Erregung führt über die Myokardmembran bis in die T-Tubuli (siehe Abbildung 2), die eine Öffnung der dortigen spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle induziert und einen Kalziumstrom von extrazellulär nach intrazellulär hervorruft. Durch den Einstrom des Kalziums nach intrazellulär kommt es zu einer Aktivierung und der Öffnung der im SR lokalisierten Ryanodinrezeptoren Typ 2 (RyR2), die für die sogenannte Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung (Fabiato & Fabiato, 1975) aus dem SR in das Zytosol verantwortlich sind. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von  $10^{-7}$  mol/L auf  $10^{-5}$  mol/L triggert die Kaskade der Kontraktion der Herzmuskelzelle.

Das freigesetzte Kalzium aus dem SR als auch das von extra- nach intrazellulär transportierte Kalzium binden an das myofibrilläre Regulatorprotein Troponin C, wodurch die Bindungsstellen für das Aktin an Myosin freigegeben werden und Aktin an Myosin binden kann. Es erfolgt eine Hydrolysereaktion der Myosin-ATPase am Myosinköpfchen. Durch Abgabe von Phosphat und ADP sowie gleichzeitiger Querbrückenbildung zwischen Myosin und Aktin kann das Myosinköpfchen gegenüber Aktin abkippen und ein Gleiten der Myofilamente ermöglichen. Bei erneuter ATP-

Bindung an Myosin kann sich das Myosinköpfchen vom Aktin lösen und der Kontraktionszyklus kann, sofern die Kalziumkonzentration erneut ansteigt, von Neuem beginnen. Die Relaxation der Myofilamente erfolgt durch Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Export aus dem Zytosol. Hier nimmt die Bindung von Kalzium an Troponin C ab und dadurch endet die Aktivierung des kontraktilen Apparates. Die aktive Wiederaufnahme des Kalziums in das SR über die SERCA stellt den wichtigsten Mechanismus des Kalziumeffluxes dar (Bers & Bridge, 1989). Des Weiteren, zu einem weitaus geringeren Anteil, erfolgt die Elimination des Kalziums über den NCX. Auf diese Weise wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf  $10^{-7}$  mol/L normalisiert und eine erneute Erregung ist möglich.

## 1.6 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz beschreibt das Unvermögen des Herzens, die peripheren Organe des Körpers mit der benötigten Menge an sauerstoffhaltigem Blut zu versorgen (McMurray et al., 2012). Sie wird als klinisches Syndrom unterschiedlicher Ätiologie bezeichnet und stellt die gemeinsame Endstrecke zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Zu den Hauptursachen für die Entstehung der Herzinsuffizienz gehören neben der koronaren Herzerkrankung (KHK) in Zusammenhang mit dem akuten Koronarsyndrom (ACS) auch die Erkrankungen der Herzklappen wie der Aortenklappenstenose oder der Mitralklappeninsuffizienz. Diese führen zu einer systolischen Funktionsstörung des Ventrikels, bedingt durch eine Kontraktionsschwäche oder eine Volumen-/ bzw. Druckbelastung. Diese systolische Dysfunktion unterscheidet sich von der diastolischen Ventrikelfunktionsstörung, die durch Ventrikelhypertrophie und eine unzureichende Füllung des Ventrikels gekennzeichnet ist (Herold, 2019).

Zu Beginn der Erkrankung greifen vermehrt neuroendokrine Kompensationsmechanismen, wie z.B. die Aktivierung des Sympathikus mit Ausschüttung von Katecholaminen, Vasopressin (ADH)-Aktivierung oder die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Diese Mechanismen dienen zunächst der Aufrechterhaltung der Organversorgung durch Vasokonstriktion und Volumenretention. Im weiteren Verlauf der Herzinsuffizienz verschlechtern diese Mechanismen jedoch die hämodynamische Situation durch zunehmende Druck- und

Volumenbelastung. Sie wirken sich negativ auf die Prognose (Shah et al., 2017) aus und es kommt zu einer Progression der Herzinsuffizienz (Francis et al., 1993). Langfristig führen diese pathologischen Prozesse zu strukturellen Umbauprozessen des Herzens, die als kardiales „Remodeling“ bezeichnet werden. Parallel dazu kommt es zu einer reaktiven Veränderung der Genexpression kardialer Proteine, was ein Ungleichgewicht in der intrazellulären Kalziumhomöostase zur Folge hat. Hervorzuheben sind hier die systolische Kalziumfreisetzung, die über das RyR-abhängige diastolische Kalziumleck aus dem SR abnimmt, sowie die verringerte SERCA-abhängige Kalziumaufnahme in das SR einhergehend mit einer Abnahme des SR-Kalziumgehalts (Maier & Bers, 2002).

### **1.7 Die $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II delta (CaMKII $\delta$ )**

Für die Entstehung und die Therapie der Herzinsuffizienz konnten wichtige Signalwege identifiziert werden. Hier gilt die  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II delta (CaMKII  $\delta$ ) aufgrund der pleiotropen Effekte hinsichtlich der Kalziumhomöostase als wichtiges Schlüsselenzym und stellt somit ein vielversprechendes Ziel für weitere therapeutische Ansätze dar.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II delta (CaMKII  $\delta$ ) übernimmt neben der Proteinkinase A (PKA) eine zentrale Funktion in der elektromechanischen Kopplung des Herzens. Als Serin-Threonin-Proteinkinase ist die CaMKII in der Lage, wichtige Proteine, die für die elektromechanische Kopplung verantwortlich sind, zu phosphorylieren. Die Phosphorylierungen beeinflussen die Kalziumhomöostase durch Modulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die L-Typ-Kalziumkanäle, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus dem SR über die Ryanodinrezeptoren sowie die Elimination des Kalziums über das SR oder den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) (Maier & Bers, 2002). Die detaillierten Mechanismen der CaMKII  $\delta$  werden in den weiteren Abschnitten näher erläutert. Das Enzym wird durch mehrere Gene kodiert und es existieren vier Isoformen (Tobimatsu & Fujisawa, 1989). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Isoformen sind vor allem in neuronalem Gewebe zu finden (Hudmon & Schulman, 2002). Hier sind sie für neuronale Plastizität, die Modulation von Neurotransmittern als auch für Lernprozesse und die Gedächtnisentwicklung verantwortlich (Yamauchi, 2005). Die  $\gamma$ - und die  $\delta$ -

Isoformen sind ubiquitär exprimiert, wobei die CaMKII  $\delta$  die dominante Isoform im Herzen darstellt (Edman & Schulman, 1994; Maier & Bers, 2002).

### 1.7.1 Die Struktur der CaMKII $\delta$

Das Holoenzym der CaMKII besteht aus einem Dodekamer, das durch die Fusion von zwei hexameren Ringen gebildet wird, wobei jeder Ring aus sechs Monomeren zusammengesetzt ist.

Das CaMKII-Monomer besteht aus drei Domänen (Abbildung 3). Die katalytische Untereinheit der CaMKII  $\delta$  an der aminoterminalen Domäne übernimmt die Serin-Threonin-Kinasefunktion des Enzyms und phosphoryliert ATP-abhängig ihre Zielproteine. An der nachfolgenden autoregulatorischen Domäne befinden sich die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin (Ca $^{2+}$ /CaM)-Bindungsstelle sowie die Phosphorylierungsstellen (Threonin 287, 306 und 307) (Hudmon & Schulman, 2002). An der carboxyterminalen Domäne befindet sich die Assoziationsdomäne, die für die Oligomerisation des Holoenzymes verantwortlich ist, sodass eine ringförmige Struktur entsteht (Maier & Bers, 2002).

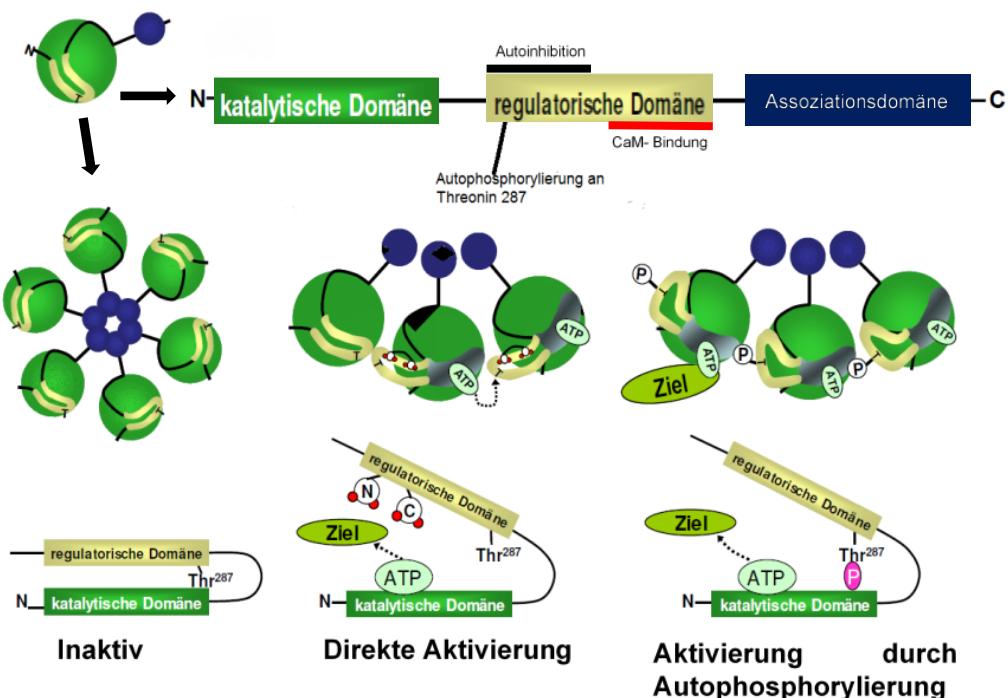


Abbildung 3 Die Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -/ Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II delta (CaMKII  $\delta$ ) sowie die Aktivierungswege der CaMKII  $\delta$  als direkte Aktivierung durch Bindung von Kalziumionen an Calmodulin, sowie durch Autophosphorylierung an Threonin 287 (Thr287). Modifiziert nach Maier und Bers, 2002

### 1.7.2 Aktivierung und Inhibition der CaMKII δ

Die Aktivierung der CaMKII δ erfolgt bei Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole, indem vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit Calmodulin (CaM) einen Komplex bilden, um die Bindungsaffinität von Calmodulin zur CaMKII zu erhöhen. Durch die anschließende Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplexes an die regulatorische Domäne im Bereich von Threonin 305 des Enzyms kommt es nachfolgend zu einer Konformationsänderung, sodass die autoinhibitorische Domäne verdrängt, die katalytische Domäne freigelegt wird und nun die Substrate phosphoryliert werden können (Erickson, 2014). Interessanterweise kann eine Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Komplexes an der regulatorischen Domäne der CaMKII die Autoinhibition durch Autophosphorylierung von Threonin 287 unterbinden, welche die CaMKII in einen  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -unabhängigen aktiven Zustand führt, indem eine Reassoziation der Kinasedomäne durch die autoinhibitorische Domäne verhindert wird (Hudmon & Schulman, 2002). Auf diese Weise verfügt die CaMKII δ aufgrund der Autophosphorylierung auch nach Absinken der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Diastole noch über Restaktivität (Lai et al., 1986). Zusätzlich kommt es im Zuge der Autophosphorylierung an Threonin 287 auch zu einer Autophosphorylierung an Threonin 305 (Rellos et al., 2010). Diese Autophosphorylierung verhindert nach der Abdissoziation des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Komplexes im aktivierte Zustand eine erneute Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin. Dieser Prozess wird als  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Capping bezeichnet. Dieser Mechanismus dient der Feinregulation der CaMKII-Aktivität und verhindert eine übermäßige Aktivierung der Kinasefunktion. Die Inaktivierung der CaMKII wird durch Proteinphosphatasen vermittelt (Onouchi et al., 2012).

### 1.7.3 Alternative Mechanismen der Aktivierung der CaMKII δ

Des Weiteren konnten alternative Aktivierungsmechanismen der CaMKII δ entschlüsselt werden.

Durch die Oxidation von Methionin 281/282 an der regulatorischen Domäne, durch erhöhten oxidativen Stress mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kann die Affinität der CaMKII zum  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex erhöht werden (Erickson et al., 2008). Auf diese Weise kommt es zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin- unabhängigen Aktivität.

Außerdem wurde gezeigt, dass die Übertragung einer O-gebundenen N-Acetylglukosamin-Gruppe auf Serin 279 die CaMKII  $\delta$  modifiziert und in einen konstant aktivierten Zustand versetzt. Dies erfolgt vor allem bei akuten Hyperglykämien sowie beim Diabetes mellitus (Erickson et al., 2013).

Ein weiterer alternativer Aktivierungsweg der CaMKII  $\delta$  ist die  $\beta$ -adrenerge Stimulation. Die Aktivierung der kardialen  $\beta 1$ -Rezeptoren über den Sympathikus induziert positive Inotropie und Chronotropie am Herzen. Diese  $\beta$ -adrenerge Stimulation führt über die Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung des cAMP, welches die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Über die PKA-abhängige Phosphorylierung des RyR2 sowie Phospholamban kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration, die zu einer Aktivierung der CaMKII führt.

## 1.8 Die Zielstrukturen der CaMKII $\delta$

Eine Aktivierung der CaMKII  $\delta$  zeigt im Myokard wichtige Funktionen in der Regulation des Kalzium- und Natriumhaushaltes und agiert als zentrale Protein bei der Adaption an Stresssituationen, wie sie bei der chronischen Herzinsuffizienz auftreten. (Beckendorf et al., 2018). Dabei können die Aktivierung der CaMKII  $\delta$  und die nachfolgenden Phosphorylierungen der Proteine der elektromechanischen Kopplung, insbesondere der L-Typ-Kalziumkanal, die Ryanodinrezeptoren als auch Phospholamban, zunächst als möglicher Kompensationsmechanismus gesehen werden.

Es ist beschrieben, dass die CaMKII  $\delta$  in humanen Herzen im Endstadium einer Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert und vermehrt aktiviert wird (Kirchhefer et al., 1999) und mit dem Fortschreiten der Herzinsuffizienz assoziiert ist (Backs et al., 2009). Untersuchungen im Tiermodell ergaben zudem, dass eine Überexpression der CaMKII  $\delta_c$  zu Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz führt (T. Zhang et al., 2003). Dies spricht dafür, dass die CaMKII  $\delta_c$  eine wesentliche Rolle bei der Progression der Herzinsuffizienz spielt. Die CaMKII interagiert in Kardiomyozyten mit Proteinen, die für die Aufrechterhaltung der Kalzium- und Natriumhomöostase verantwortlich sind. Eine Modulation dieser funktionellen Strukturen sowie ein verändertes Expressionsmuster resultieren in kontraktiler Dysfunktion sowie einer vermehrten Arrhythmieeigung (Ai

et al., 2005). Im Zusammenhang mit der Progression der Herzinsuffizienz wurden folgende Pathomechanismen und Zielstrukturen identifiziert.

Die CaMKII erreicht durch Phosphorylierung des L-Typ-Kalziumkanals eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals und verzögert dessen Inaktivierung. Dies führt zu einem vermehrten Kalziumeinstrom in die Zelle (M. E. Anderson et al., 1994) und führt konsekutiv zu einer intrazellulären Kalziumüberladung.

Zusätzlich wird der Ryanodinrezeptor durch die CaMKII an Serin 2814 phosphoryliert (Wehrens et al., 2004). Diese Phosphorylierung steigert sowohl die Kalziumsensitivität als auch die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2. Einhergehend mit der erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit kommt es zu einem erhöhten Kalziumverlust durch CaMKII-abhängige spontane diastolische Kalziumfreisetzung aus dem SR, den sogenannten „sparks“ (Maier et al., 2003).

Im Verlauf der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Herunterregulierung des RyR2 (Ai et al., 2005). Dies hat zur Folge, dass während der Systole weniger Kalzium aus dem SR freigesetzt wird, was eine reduzierte systolische Kalziumfreisetzung und somit eine eingeschränkte Kontraktilität des Myokards zur Folge hat.

Die CaMKII-vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban an Threonin 17 führt zu einem Verlust der Inhibitionswirkung von Phospholamban auf die SERCA, sodass es zu einer erhöhten SERCA-Aktivität kommt (Le Peuch et al., 1979; Mattiazzi & Kranias, 2014). Dadurch erfolgt eine raschere  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme in das SR sowie eine erhöhte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung. In unterschiedlichen Modellen der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Abnahme der SERCA-Expression (Haghghi et al., 2003). Dies hat zur Folge, dass zwar die Aktivität der SERCA durch vermehrte Phosphorylierung von Phospholamban gesteigert ist, es jedoch durch Abnahme des Verhältnisses von der SERCA zu Phospholamban letzten Endes zu einer reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR kommt (T. Zhang et al., 2003). Zusammen mit einer vermehrten Expression sowie einer erhöhten Aktivität des NCX (Pogwizd et al., 1999) ist eine verminderte Kalziumtransientenamplitude die Folge und bewirkt damit eine Reduktion der Kontraktionskraft (Maier et al., 2003).

In Kombination mit der oben genannten Phosphorylierung der L-Typ-Kalziumkanäle, sowie die verminderte Expression der SERCA kommt es zu einer Kalziumüberladung,

die die Entwicklung der kontraktilen Dysfunktion begünstigt, als auch in einer erhöhten Arrhythmieneigung mündet (Dzhura et al., 2000; Erickson, 2014).

Als weitere Zielstrukturen der CaMKII konnten Natriumkanäle ( $I_{NaFeh}$ ) identifiziert werden. Diese werden ebenfalls durch die Kinasefunktion der CaMKII phosphoryliert (Wagner et al., 2006). Eine verlängerte Inaktivierung des schnellen Natriumeinstroms zu Beginn eines Aktionspotentials sowie eine Erhöhung des späten Natriumstroms („late  $I_{Na}$ “) mit einer erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration sind die Folge. Bei einem starken Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration funktioniert der NCX in entgegengesetzter Richtung („reverse mode“) und es kommt zu einer Überladung der Zelle mit Kalziumionen. Hieraus resultiert eine Destabilisierung des Ruhemembranpotentials, was infolgedessen zu einer erhöhten Arrhythmieneigung führt (Wagner et al., 2006).

Zusammenfassend führt die erhöhte CaMKII-Aktivität zu einer Kalziumüberladung, welche konsekutiv in eine Abnahme der Kontraktilität, einer erhöhten Arrhythmieneigung, sowie zum kardialen Remodeling beiträgt.

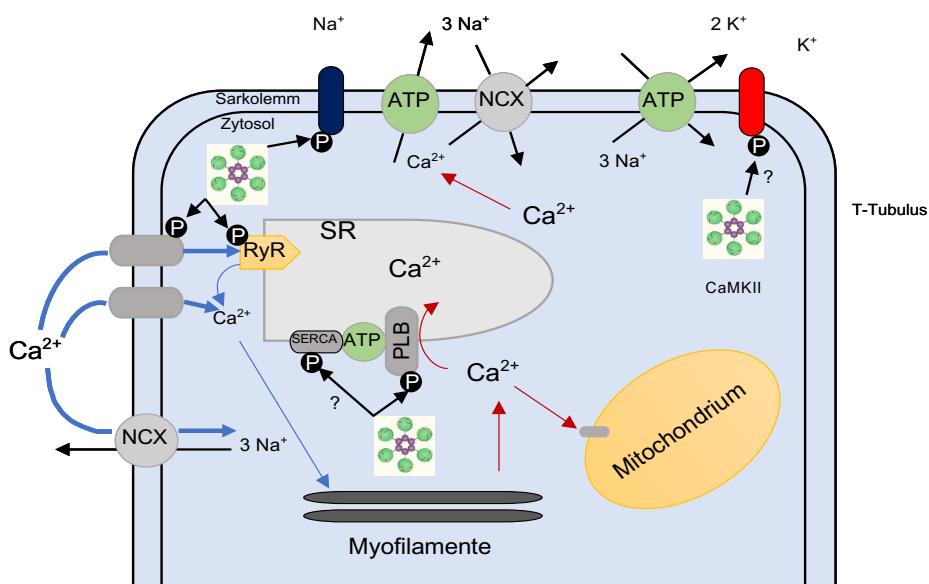


Abbildung 4 Schematische Darstellung eines Kardiomyozyten. Einfluss der CaMKII delta auf die wichtigen Proteine und Kanäle der elektromechanischen Kopplung. Eigene Abbildung, modifiziert nach Maier und Bers, 2007

## **1.9 Auswirkungen von Exenatid auf die Regulation der CaMKII**

Exenatid zeigt in Studien kardioprotektive Eigenschaften und hat sich als potenzieller Modulator der CaMKII-Aktivität erwiesen. Die Behandlung mit Exenatid normalisiert die phosphorylierte Form der CaMKII  $\delta$ , was auf eine Reduktion der hyperaktiven Kinasefunktion hinweist (Chen et al., 2020). Diese Normalisierung umfasst demnach auch die Zielproteine der CaMKII  $\delta$ , wie den RyR2, sodass das pathologische Kalziumleck aus dem SR signifikant verringert wird, wodurch die kardiale Stabilität verbessert und das Risiko ventrikulärer Arrhythmien gesenkt wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Exenatid das strukturelle Remodeling des Herzens hemmt und die Kalziumhomöostase verbessert. Im infarzierten Myokard konnte die Hypertrophie und Fibrose im Myokard reduziert werden (Chen et al., 2017). Hier beeinflusst die Behandlung mit Exenatid ebenfalls die phosphorylierte Form der CaMKII  $\delta$ . Insgesamt bleibt jedoch der zentrale Regulationsmechanismus der CaMKII  $\delta$  durch Exenatid unzureichend verstanden. Insbesondere ist unklar, ob Exenatid direkt auf die CaMKI  $\delta$  wirkt oder seine Effekte über sekundäre Signalwege vermittelt werden.

## **1.10 Die $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Serin-Proteinkinase (CASK)**

Die CASK gehört zu den sogenannten MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*)-Proteinen. MAGUK-Proteine gehören zu der Gruppe der Scaffolding-Moleküle, die für die Positionierung und Verankerung von Ionenkanälen, Rezeptoren und anderen Zellstrukturen an Membranen verantwortlich sind und auf diese Weise die Zell-Zell-Kommunikation und Signaltransduktion vermitteln (Zheng et al., 2011).

MAGUK-Proteine besitzen mindestens drei Domänen. Die N-terminale Domäne, die die direkte Interaktion zwischen Proteinen vermittelt, eine zentrale Domäne und eine C-terminale Guanylatkinase-Domäne (J. M. Anderson, 1996). Es gibt zwei Isoformen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoform) der CASK, welche sich primär über die N-terminale MAGUK-Domäne unterscheiden. Die  $\beta$ -Isoform der CASK verfügt als Lin2-ähnliche MAGUK über eine CaMKII-ähnliche N-terminale Domäne mit einer Bindungsstelle für Calmodulin sowie einem autoinhibitorischen Anteil, ergänzt durch die zentrale Domäne sowie die C-terminal gelegene Guanylatkinase-Domäne (Malik & Hodge, 2014).

Die CASK ist in neuronalem Gewebe weit verbreitet und beeinflusst die synaptische Plastizität, die eine wesentliche Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen hat (Hsueh, 2006). Zudem konnte die CASK als Transkriptionsfaktor für N-Typ-Kalziumkanäle (Maximov & Bezprozvanny, 2002) und den NMDA2-Rezeptor identifiziert werden (T. Huang et al., 2010). Zusätzlich dient die CASK als Bindungspartner für Neurexine (Hata et al., 1996), Syndecane und Syncam (Mukherjee et al., 2008) und spielt somit eine zentrale Rolle in der Synapsenbildung und -funktion.

Da die insulinproduzierenden Zellen des Pankreas neuronalen Vorläuferzellen entstammen (Hori et al., 2005), konnte ein Zusammenhang zwischen der Sekretion von Neurotransmittern sowie der Insulinsekretion hergestellt werden. Auf dieser Grundlage konnte nachgewiesen werden, dass CASK zudem in pankreatischen Inselzellen exprimiert wird, mit Proteinen in den Betazellen interagiert (Suckow et al., 2008) und an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt ist (Z. Zhang et al., 2020).

Die Expression der CASK und deren Funktion in Kardiomyozyten war bis vor kurzem noch kein Bestandteil wissenschaftlicher Forschung, jedoch konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass CASK in Kardiomyozyten exprimiert wird und die Aktivität der CaMKII in Kardiomyozyten reguliert (Mustroph et al., 2021).

## 1.11 Interaktion von CASK und CaMKII

Es ist bereits bekannt, dass nicht nur Calmodulin sondern auch die CASK die Autophosphorylierung der CaMKII reguliert (Hodge et al., 2006). Durch das sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-Capping vermittelt CASK eine Phosphorylierung an der regulatorischen Domäne der CaMKII. Diese Phosphorylierung verhindert eine erneute Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin und begrenzt somit die Aktivität der CaMKII (Hodge et al., 2006). Zusätzlich führt diese Regulation zu einer kontrollierten limitierenden Autophosphorylierung, welche ebenfalls die Aktivität der CaMKII einschränkt. Dieser Mechanismus konnte erstmals in Neuronen nachgewiesen werden (Malik & Hodge, 2014). In kardialem Gewebe konnte eine Interaktion zwischen der CaMKII und der CASK sowie eine CASK-vermittelte Regulation der CaMKII-Aktivität durch Vorarbeiten nachgewiesen werden, jedoch sind die genauen Mechanismen dieser Interaktion bisher nur unzureichend charakterisiert.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass ein kardiales CASK-Knockout (KO)-Modell in murinen Kardiomyozyten eine signifikant gesteigerte Autophosphorylierung der CaMKII an Threonin 286 auslöst, was zu einer erhöhten CaMKII-Aktivität führt. Im Gegensatz dazu konnte in Kardiomyozyten, die die CASK exprimieren, eine vermehrte Phosphorylierung der inhibitorischen Domäne der CaMKII an Threonin 305 beobachtet werden. Dies resultiert in einer Limitation der CaMKII-Aktivität, sodass eine Steigerung der CASK-Expression in Kardiomyozyten die CaMKII-Aktivität begrenzen kann und die Phosphorylierung an Threonin 287 sowie Threonin 305 steigern kann (Mustroph et al., 2021).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die CASK eine regulatorische Rolle bei der Modulation der CaMKII-Aktivität hat, indem sie die Aktivität der CaMKII verringert. Da die CaMKII ein wichtiges Schlüsselprotein bei der Entwicklung und Progression der Herzinsuffizienz darstellt, können Veränderungen in der CASK-Expression Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt und die Funktion der Kardiomyozyten haben. Dies umfasst insbesondere die Regulation der elektromechanischen Kopplung und die Kontraktilität des Herzens, die essenziell für die Aufrechterhaltung der Herzfunktion sind.

## **1.12 Zielsetzung und Hypothesen der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid auf die CaMKII δ sowie deren Zielproteine in murinen Kardiomyozyten näher charakterisiert werden. Insbesondere soll die Wirkung auf das MAGUK-Protein CASK untersucht werden. Der Zusammenhang zwischen der CASK und der CaMKII in Kardiomyozyten könnte weitere Erkenntnisse über relevante Signalwege ergeben, die einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt auf pharmakologischer Ebene der Herzinsuffizienz liefern. Zur Evaluation einer gesteigerten CASK-Expression auf die Zielproteine der CaMKII wurde ein murines kardiospezifisches Knockout-Modell genutzt. Primäre murine Kardiomyozyten wurden isoliert und in Zellkulturmodellen näher untersucht. Zusätzlich erfolgten funktionelle Untersuchungen zum Kalziumhaushalt.

Zunächst sollen die biometrischen Daten Aufschluss auf die Auswirkungen der kardialen CASK auf die Körpergröße und auf das Herzgewicht der Mäuse geben. Als

Surrogat für die klinische Herzinsuffizienz wurde eine kardiale Hypertrophie, das TAC-Modell gewählt. Eine ubiquitäre CASK-Deletion führt zu überlebensunfähigen Tieren. Im CASK-Knockdown Modell wurde gezeigt, dass die Mäuse kleiner sind und ein geringeres Herzgewicht aufweisen (Atasoy et al., 2007). Die kardiale CASK-Deletion im CASK-KO Modell führt ebenfalls zu einem geringeren Herzgewicht im Vergleich zu den CASK-Kontrolltieren.

Aus Vordaten ist bereits bekannt, dass Exenatid im Pankreas (Zhu et al., 2014) zu einer vermehrten Expression der CASK führt. Basierend auf diesen Daten nehme ich an, dass der GLP-1-Rezeptoragonist Exenatid in Kardiomyozyten ebenfalls die CASK-Expression steigert. Weitere Vorarbeiten konnten zeigen, dass eine CASK-Deletion in Neuronen der Drosophila mit einer gesteigerten CaMKII-Aktivität einhergeht (Hodge et al., 2006). Zudem konnten Mustroph et al. zeigen, dass ein muriner kardialer CASK-Knockout zu einer gesteigerten Aktivität der CaMKII führt und dies zu einem Fortschreiten der Herzinsuffizienz führt (Mustroph et al., 2021).

Somit könnte eine Exenatid-vermittelte Steigerung der CASK-Expression zu einer Reduktion der CaMKII-Aktivität führen und auf diese Weise die zellulären Regulationsmechanismen der CaMKII auf die Kalziumhomöostase beeinflussen.

Im Modell der artifiziellen Nachlasterhöhung, dem sogenannten TAC- Modell, ist eine gesteigerte CaMKII-Aktivität zu beobachten (Baier et al., 2020). Die Effekte von Exenatid im TAC-Modell sind ebenfalls noch nicht geklärt, sodass in dieser Arbeit Exenatid-vermittelte Effekte im TAC-Modell ebenfalls charakterisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Mausmodell

Für die nachfolgend beschriebenen murinen Zellkulturexperimente wurden männliche Mäuse im Alter von 8-12 Wochen der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld) verwendet. Es erfolgte eine artgerechte Haltung und Versorgung im zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Regensburg.

#### 2.1.1 Cre-Lox-Rekombinationssystem

Für die Gewinnung isolierter Kardiomyozyten wurde ein herzspezifisches CASK-KO und zum Vergleich die CASK-Kontrolltiere (CASK-CTRL) verwendet. Hierfür kam ein Modell zum Einsatz, welches auf dem Cre-Lox-Rekombinationssystem basiert (Sauer, 1987).

Es werden Gensequenzen des Bakteriophagen P1 verwendet, die für die sequenzspezifische Rekombinase Cre (cyclization recombination) sowie für deren loxP-Sequenz kodieren. Die Rekombinase Cre, ein 38 kDa großes Protein, katalysiert die Rekombination über Translokation, Exzision oder Inversion zwischen zwei loxP-Sequenzen. Über einen gewebespezifischen Promotor wird die Expression der loxP-Sequenzen induziert und so ein bestimmter DNA-Abschnitt markiert. Der Promotor wird zusammen mit der Rekombinase Cre in das Genom eingebracht. Diese Mauslinie wird mit einer weiteren Mauslinie gekreuzt, die nur die Rekombinase Cre exprimiert. Durch die Flankierung des CASK-Gens mit den gleichgerichteten loxP-Sequenzen wird mit Hilfe der Rekombinase Cre das CASK-Gen zirkulär exzidiert und anschließend werden die loxP-Sequenzen über eine End-zu-End-Verknüpfung miteinander verbunden. Auf diese Weise konnte ein herzspezifischer CASK-Knockout (CASK-KO, CASK flox<sup>+/+</sup>/Cre<sup>-/+</sup>) generiert werden. Für die Kontrollgruppe waren CASK-Kontrolltiere erforderlich, die die Rekombinase Cre heterozygot exprimieren, jedoch ohne gefloxtes CASK-Gen (CASK flox<sup>-/-</sup>/Cre<sup>-/+</sup>). Dieses Design stellt sicher, dass Unterschiede zwischen den Gruppen allein auf den Verlust des CASK-Gens in den Kardiomyozyten zurückzuführen sind.

## 2.1.2 Das murine Herzinsuffizienzmodell (TAC)

Die transverse Aortenkonstriktion (TAC) in der Maus ist ein experimentelles Modell, welches zur Untersuchung von kardiovaskulären Anpassungsmechanismen und der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz dient. Über eine Erhöhung der linksventrikulären Nachlast wird eine Hypertrophie mit zunächst erhaltener Pumpfunktion generiert. Im Verlauf entwickelt sich jedoch eine dekompensierte Herzinsuffizienz, die durch eine Ventrikeldilatation und eine verminderte Pumpfunktion gekennzeichnet ist (Rockman et al., 1991). Es wurden männliche C57BL/6-Mäuse, im Alter zwischen acht und zwölf Wochen, Operationen mit transverser Aortenkonstriktion (TAC) oder ohne (Sham) unterzogen. Hierzu wurden die Mäuse narkotisiert. Dies erfolgte durch die subkutane Applikation von Buprenorphin (60 µg/kg Körpergewicht), sowie die intraperitoneale Gabe von Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht), Midazolam (5 mg/kg Körpergewicht) und Fentanyl (0,05 mg/kg Körpergewicht). Es wurde die Haut mit einem 1,0 cm langen Querschnitt oberhalb des Sternums eröffnet und zunächst mittels stumpfer Präparation die Trachea identifiziert. Anschließend konnten die Arteria carotis communis und die Aorta dargestellt werden. Für die TAC-Operation wurde der Aortenbogen im Bereich zwischen der Arteria brachiocephalica und der Arteria carotis communis sinistra mit Hilfe einer 27 G-Injektionskanüle fixiert. Es erfolgte eine Ligatur mit einem chirurgischen Faden (6.0) um die Injektionskanüle, bevor diese entfernt wurde.

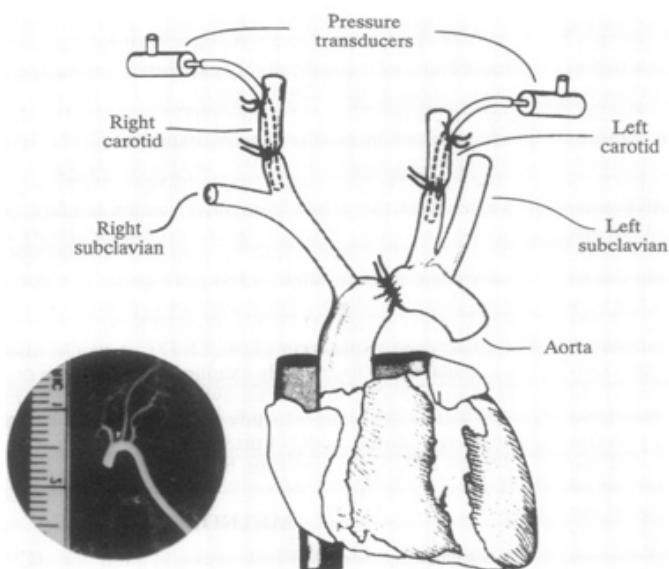


Abbildung 5 schematische Darstellung der transversalen Aortenkonstriktion (modifiziert nach Rockman et al., 1991)

Dieses Verfahren wurde gewählt, um intraindividuelle Schwankungen der Stenosierung der Aorta zu minimieren. Im Rahmen der Kontrollgruppe mittels Sham-Intervention wurde die Aorta nicht ligiert, sondern lediglich exponiert, sodass die Aorta nicht stenosiert wurde. Anschließend wurde die Haut mit Einzelknopfnähten geschlossen und die Anästhesie mittels intraperitoneal injizierter Mischung aus Atipamezol (2,5 mg/kg Körpergewicht) und Flumazenil (0,5 mg/kg Körpergewicht) antagonisiert und die Ligation mittels Doppler-Echokardiographie detektiert. Zur Evaluation der Kontraktionsfähigkeit sowie der kardialen Hypertrophie wurde die Echokardiographie präoperativ sowie postoperativ nach 7 Tagen und nach 6 Wochen in Maskennarkose mit einem Gasgemisch aus 1,5-2,5 % Isofluran und 97,5-98,5 % Sauerstoff durchgeführt. Die Maus wurde nach Enthaarung des Brustkorbs auf einer Wärmeplatte fixiert und anschließend mit einem Kleintierechokardiograph „Vevo 3100 Visualsonics Fujifilm MX400“ echokardiographiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Vevo LAB (FUJIFILM VisualSonics).

## **2.2 Isolation muriner Kardiomyozyten**

Für die funktionellen Experimente war die Gewinnung von murinen ventrikulären Kardiomyozyten notwendig. Die Isolation erfolgte nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maier, welches im Einklang mit den Vorgaben der Tierschutzzkommission war. Hierzu wurde die Maus zuerst mit einer gewichtsadaptierter Menge des volatilen Anästhetikums Isofluran in einem Käfig betäubt. Sobald die Schnappatmung erreicht war und somit gewährleistet war, dass die Maus in ausreichendem Maße analgosediert ist, wurde sie mittels Genickbruch getötet. Auf einer Styroporplatte wurde die Maus fixiert und der Thorax durch einen v-förmigen Schnitt eröffnet. Anschließend wurde das Herz mit der Aorta und den abgehenden Gefäßen entnommen und gewogen. Direkt im Anschluss erfolgte über die Aorta eine retrograde Kanülierung mittels einer Perfusionslösung nach Langendorff (siehe Tabelle 1). Für eine Trennung der Kardiomyozyten aus dem Zellverband wurde ein so genannter retrograder enzymatischer Verdau über die Aorta ascendens mit einer im Labor standardisierten Enzymlösung (siehe Tabelle 2) durchgeführt. Der Verdau des Herzens erfolgte mit einem konstanten Fluss der Langendorff-Anlage von 3 ml/min bei 37°C. Der Verdau erfolgte so lange bis nach 6:30-8:00 Minuten das Herz milchglasartig verfärbt war. Zum Abbruch des Verdauvorgangs wird die u.g.

Stopplösung (siehe Tabelle 2) mit bovinem Kalb-Serum (BCS) verwendet. Die Ventrikel wurden auf Höhe der Herzklappen von den Vorhöfen abgesetzt, vorsichtig mit einer Schere zerkleinert und mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Anschließend wurden die einzelnen Kardiomyozyten durch leichte mechanische Manipulation aus ihrem Zellverband gelöst und in ein 50 ml Falconrörchen gegeben, damit die Sedimentation der Zellen möglich ist.

Damit ein Vergleich der Genotypen zwischen den Mäusen erfolgen kann, wurde zudem das Herzgewicht als auch das Körpergewicht bestimmt und ins Verhältnis zueinander gesetzt, um eine mögliche kardiale Hypertrophie detektieren zu können.

$$\frac{\text{Herzgewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} = \frac{HG}{KG} \text{ Verhältnis}$$

Isolationstyrode 1 x		Menge
	NaCl	113,00 mM
	KCl (Merck)	4,70 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)	0,60 mM
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma Aldrich)	1,20 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Merck)	0,60 mM
	NaHCO <sub>3</sub> (Sigma Aldrich)	12,00 mM
	KHCO <sub>3</sub> (Sigma Aldrich)	10,00 mM
	HEPES (Sigma Aldrich)	10,00 mM
	Taurine (Sigma Aldrich)	30,00 mM
	Phenol-Red (Sigma Aldrich)	0,032 mM
	Glukose (Merck)	5,50 mM
	BDM 50x Stock (Sigma Aldrich)	10,00 mM

Tabelle 1 Isolationslösung 1-facher Stock; gelöst Aqua Pura (Braun) mit NaOH auf pH 7,42 bei 36,5°C eingestellt

Enzymlösung		Menge
	Trypsin 10x (2,5%)	85 µL
	Liberase TM	140 µL
	CaCl <sub>2</sub> (0,0125 nM)	25 µL
Stopplösung		
	Bovine Calf Serum (BCS)	250 µL
	CaCl <sub>2</sub> (0,0125 nM)	3,125 µL

Tabelle 2 Enzymlösung, gelöst in 20 mL Isolationstyrode, Stopplösung gelöst in 2,25 mL Isolationstyrode.  
Substanzen von Sigma Aldrich

### 2.3 Kalziumaufbau

Um die nachfolgenden Epifluoreszenzmessungen entsprechend bei einer Kalziumkonzentration von 1mM durchführen zu können, wurde eine Konditionierung mit steigenden Kalziumkonzentrationen im Anschluss an die Zellisolation vorgenommen (siehe Tabelle 3).

Nach einer Sedimentationsphase der isolierten Zellen von 7 Minuten wurde der zellarme Überstand abpipettiert und mit einer 0,1 mM Kalziumchloridlösung (5 ml) aufgefüllt. Nach weiteren 7 Minuten erfolgte ein erneutes Abpipettieren, gefolgt von einer 0,2 mM Kalziumlösung (5 ml). Dieses Prozedere wurde ebenfalls mit 5 ml einer 0,4 mM Kalziumlösung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen auf zwei 15 ml-Röhrchen aufgeteilt und dann mit der 0,8 mM Kalziumlösung (5 ml) aufgefüllt und die Zellen konnten sich absetzen.

Kalziumaufbau		Menge
0,1 mM	BCS	250 µL
	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	5 µL
	Isolationstyrode 1 x	4,75 mL
0,2 mM	BCS	250 µL
	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	10 µL
	Isolationstyrode 1 x	4,75 mL
0,4 mM	BCS	250 µL
	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	20 µL
	Isolationstyrode 1 x	4,75 mL
0,8 mM	BCS	250 µL
	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	80 µL
	Isolationstyrode 1 x	9,5 mL

Tabelle 3 Kalziumaufbau nach erfolgter Zellisolation

## 2.4 Zellkulturen

Nach der erfolgten Isolation der Kardiomyozyten wurden diese mittels einer Pasteurpipette jeweils zur Hälfte in je eine sterile 30 mL Zellkulturschale überführt. Zusätzlich wurde das Kontrollmedium (mit MEM) sowie auch das exenatidhaltige (100 nM) Medium in die Zellkulturschale gegeben, sodass ein Gesamtvolumen des Kulturmediums (siehe Tabelle 4) von 20 mL erreicht wird. Das Kulturmedium umfasst neben dem Minimal-Essential-Medium (MEM), Penicillin/Streptomycin zur antibakteriellen Prävention, Insulin-Transferrin-Selenium und L-Glutamin zur Zellernährung, bovines Serumalbumin (BSA) zur Stabilisierung der Zellmembran, sowie 2,3 Butanedion-Monoxim (BDM) als Inhibitor der Myosin ATPase. Die Zellkulturschalen wurden anschließend mit den isolierten Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>- gesättigter Raumluft inkubiert.

Kulturmedium		Menge
	Penicillin/Streptomycin 100x Stock (life technologies™)	1 mL
	Insulin-Transferrin-Selenium G (life technologies™)	1 mL
	L-Glutamin 100x Stock (2 mM)	1 mL
	BDM (10 mM)	2 mL
	BSA (0,1%)	1,33 mL
	Exendin-4 ≥ 97% (Sigma Aldrich)	100 µL
	Kontrolle (MEM 5,56 mM Glukose)	100 µL

Tabelle 4 Kulturmedium gelöst in Minimal-Essential-Medium (MEM, gibco) auf 100 mL.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen vorsichtig mit einer Pasteurpipette aus der Zellkulturschale erneut in einen 50 ml Falcon überführt. Im Anschluss an die zwanzigminütige Sedimentationsphase wurde der zellarme Überstand entfernt und die Zellen für die funktionellen Experimente verwendet.

## 2.5 Kalziumfluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM

Die Beladung von Kardiomyozyten mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht eine Beurteilung von intrazellulären Kalziumkonzentrationen. Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Lage, Licht zu absorbieren, wodurch Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Da dieses Niveau jedoch nicht stabil ist, kommt es zu einer spontanen Emission von Licht beim Übergang in das niedrigere Energieniveau, welche der Fluoreszenz entspricht. Für jeden Fluoreszenzfarbstoff ergeben sich aufgrund der chemischen Struktur charakteristische Exzitations- und Emissionskurven bei bestimmten Wellenlängen.

Der in dieser Arbeit genutzte Kalziumfarbstoff Fluo -4-AM (Invitrogen F14217) ist im Vergleich zum Vorgänger Fluo-3-AM (Gee et al., 2000) mit zusätzlichen Fluor-Atomen angereichert worden und liefert so bei 448 nm eine größere Signalintensität. Die Emissionswellenlänge von Fluo-4 beträgt 516 nm. Die AM (Acetoxyethyl)-Ester-Gruppen maskieren durch Bindung an Sauerstoffatome die negativen Ladungen des Farbstoffes, wodurch es dem Farbstoff ermöglicht wird, die Zellmembran zu passieren. Nach Diffusion durch die Zellmembran werden die AM-Ester-Gruppen im Zytosol durch

zelleigene Esterasen hydrolysiert, der Farbstoff wird somit in seine aktive, geladene Form überführt. Diese Form kann die Zellmembran nicht mehr passieren und bindet selektiv Kalziumionen, wodurch das Fluoreszenzverhalten des Farbstoffes verändert wird (Kao et al., 1989). Die Affinität für Kalziumionen, gemessen als Dissoziationskonstante  $K_d$ , beträgt 345 nM (Fluo-4) bzw. 325 nM (Fluo-3). Somit wird bei der Verwendung von Fluo-4 eine geringere Menge an freiem Kalzium benötigt, um eine Signalantwort zu erzeugen (Gee et al., 2000). Fluo-4 ist ein nicht-ratiometrischer Farbstoff. Die Intensität der Emissionswellen ist demnach abhängig von der Menge des gebundenen Kalziums. Auf diese Weise können selektiv Änderungen des intrazellulären Kalziums detektiert werden.

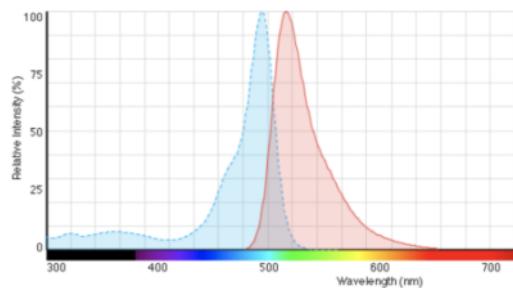
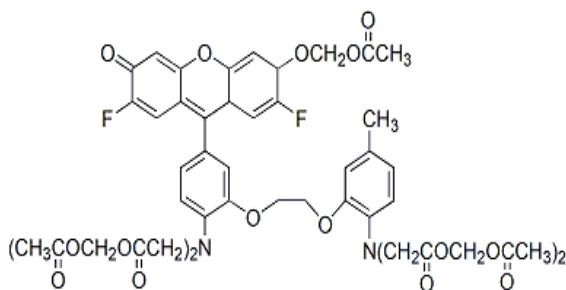


Abbildung 6 Links: Strukturformel von Fluo-4. Rechts: Fluoreszenzspektrum von Fluo-4, Absorptionsmaximum bei 490 nm (blau), eine Verschiebung des Emissionsmaximums bei 520 nm wird erreicht (rot) (Thermo Fisher Scientific)

Für die Messung mittels Epifluoreszenzmikroskop wird Fluo-4-AM (50 µg) mit 44,4 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) vermischt. Anschließend werden jeweils 5 µl der Lösung in ein Eppendorfgefäß gegeben. Zusätzlich werden pro Gefäß je 1 µl 0,02% Pluronic-Acid (life technologies™, USA) und 500 µl der 1 M kalziumhaltigen Normaltyrode hinzugefügt. Dies geschieht unter lichtgeschützten Bedingungen. Pro Messkammer werden 250 µl der Farbstofflösung aufgetragen. Um eine adäquate Beladung sowie eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten, werden die Zellen für 12 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur mit der Farbstofflösung inkubiert.

## 2.6 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Epifluoreszenzmikroskopie, die mit Fluoreszenzfarbstoffen selektiv Ionen bindet, ist eine Weiterentwicklung der klassischen Mikroskopie. Die lichtmikroskopisch dargestellten Zellen auf dem Objektträger werden durch die Myozytenkamera aufgezeichnet.

Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wird kurzwelliges Licht mit Hilfe einer Xenon-Bogenlampe auf die Zellen gerichtet. Der Anregungsfilter lässt nur den Teil des erzeugten Lichts durch, welcher für die spezifische Anregung des verwendeten Farbstoffes notwendig ist. Ein dichroitischer Strahlteiler sorgt für eine Auf trennung des Lichtes und spiegelt das Anregungslicht in Richtung des Objektivs. Nach Umlenkung über einen weiteren dichroitischen Spiegel wird das emittierte Fluoreszenzlicht zu einem Detektor mit einem Photomultiplier (IonOptix) geleitet und das Rotlicht über die Myozytenkamera detektiert und am Computer mithilfe des Programms IonWizard abgebildet.

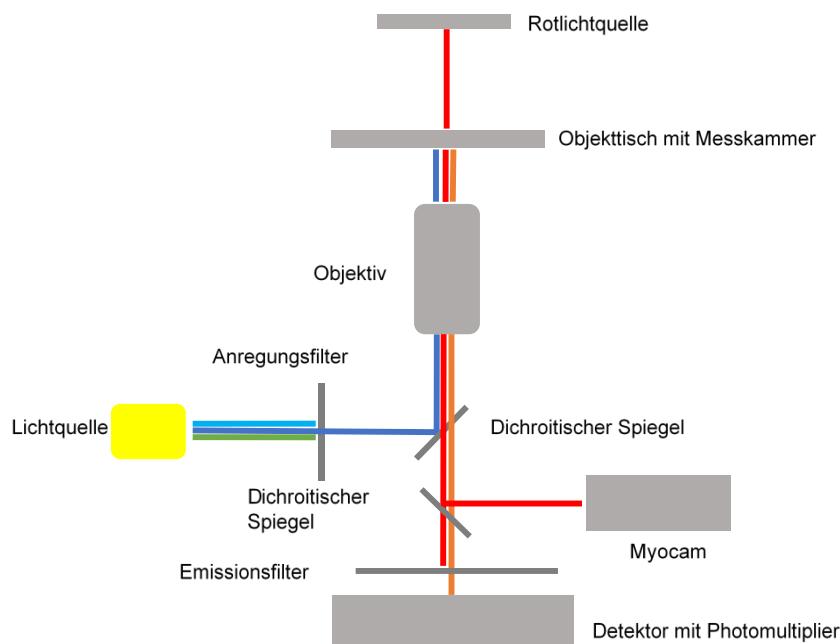


Abbildung 7 schematischer Aufbau der Epifluoreszenzmikroskopie. Eigene Abbildung, modifiziert nach Mustroph 2017

## 2.7 Versuchsablauf

Die Messungen mittels Epifluoreszenzmikroskopie werden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Die isolierten und kultivierten Kardiomyozyten werden auf die mit dem Glykoprotein Laminin („Zellkleber“) benetzten Messkammern übertragen. Die Messkammern werden in die Halterung auf dem Objekttisch des Mikroskops gespannt und mit einem 40-fach vergrößerndem Objektiv mittels Öl- Immersion eingestellt. Des Weiteren wird eine Stimulationselektrode in die Messkammer positioniert und fest

verankert. Durch ein angeschlossenes Heizsystem kann eine konstante Temperatur von 37°C der Messlösungen gewährleistet werden. Außerdem wird eine gleichmäßige Flussrate der Messlösungen von 75 ml/h durch einen zuführenden Schlauch eingestellt. Die Absaugung, welche an die gegenüberliegende Seite der Messkammer angebracht wurde, ist mit einer Pumpe verbunden und sorgt dafür, dass der Flüssigkeitsspiegel in der Messkammer ebenfalls konstant ist und Messstörungen vermieden werden.

Nachdem die Zellen bereits mit dem Farbstoff inkubiert wurden, wurde dieser vor Beginn der Messung mit der 1x Normaltyrode (siehe Tabelle 7) für mindestens fünf Minuten ausgewaschen. Währenddessen wird mit Hilfe des Mikroskops ein repräsentativer Kardiomyozyt ausgewählt, welcher eine gleichmäßige rhythmische Kontraktilität sowie eine intakte Morphologie aufweist. Die Zelle wird mittels der Kamera so eingestellt, dass diese den Bildausschnitt ausfüllt. Mit Hilfe von Blenden werden weitere Zellen und der Hintergrund abgedeckt. Anschließend folgt das Messprotokoll. Zunächst wird mittels der Elektrode eine Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz eingestellt bis die Kalziumtransienten und die Sarkomer verkürzungen eine gleichbleibende Amplitude („steady state“) erreicht hatten. Nach Erreichen dieses Zustandes werden simultane Messungen mit einer Frequenz von 1 Hz und nachfolgend von 2 Hz durchgeführt. Um eine Aussage über die Reaktion der Kardiomyozyten auf β-adrenerge Stimulation machen zu können, werden an die Messungen mit der Normaltyrode analoge Messungen mit einer Isoprenalintyrode angeschlossen. Es wird anschließend der Zulauf der Messlösung auf die Isoprenalintyrode umgeschaltet und diese wird mit der gleichen Flussrate von 75 ml/h eingewaschen. Nach fünf Minuten mit einer Frequenz von 0,5 Hz ist die Wirkung des Isoprenalin deutlich sichtbar und es kann ein neuer „steady state“ eingestellt werden.

### 2.7.1 Messung von Kalziumtransienten

Die Messung der Kalziumtransienten erfolgt als Maß für die systolische Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die Kalziumtransienten spiegeln die Photonen wider, die durch die mit Kalzium-gebundenen Farbstoffmolekülen emittiert werden. Diese werden über den Detektor aufgenommen und als Transienten sichtbar gemacht. Während der Systole kommt es im Zytosol zu

einer Komplexierung der Kalziumionen mit den Molekülen des Farbstoffes. In der Diastole sinkt die Kalziumkonzentration und es kommt zu einer Verminderung der Emission. Diese Veränderung der Emission wird durch die Software IonWizard Aquire in einen Transienten umgewandelt und als  $F/F_0$  dargestellt. Zusätzlich zur Bestimmung von  $F/F_0$  wurde die RT (Relaxation Time) 80, die Zeit des Transientenabfalls, als Maß für die SERCA-Funktion bestimmt, da während der Diastole das Kalzium, welches sich im Zytosol befindet, zu ca. 90 % durch die SERCA eliminiert wird (Bers, 2001).

### 2.7.2 Messungen des SR-Kalziumgehalts mittels Koffeinapplikation

Der größte Teil des Kalziums, welches für die Kontraktion der Herzmuskelzelle verantwortlich ist, befindet sich im sarkoplasmatischen Retikulum. Durch zellnahe Applikation einer 10 mmol Koffeinlösung, die die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 erhöht (Kong et al., 2008), erfolgt eine maximale Kalziumfreisetzung aus dem SR. Durch dieses Verfahren entsteht ein Koffein-induzierter Kalziumtransient, der über das Epifluoreszenzmikroskop den SR-Kalziumgehalt bestimmen kann. Aufgrund des Koffeins verbleiben die RyR2 in einem konstant geöffneten Zustand, sodass das Kalzium, welches durch die SERCA zurück ins SR befördert wird, direkt zurück in das Zytosol gelangt. Die Elimination des Kalziums, entsprechend dem Abfall des Transienten, erfolgt hier fast ausschließlich über den NCX (Bers, 2001), woraufhin eine Aussage über die Funktion des NCX getroffen werden könnte. Die Zelle wird hierfür zunächst mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert. Nach Erreichen des „steady state“ wird diese Messung unterbrochen und statt einer erneuten Stimulation erfolgt die Applikation der Koffeintyrode über das Schlauchsystem.

### 2.7.3 Hintergrundmessung

Nach jeder Messung wurde die Hintergrundfluoreszenz bestimmt. Dazu wurde mit dem Mikroskop ein Bereich direkt neben der Zelle ausgewählt, der weder die Zelle selbst noch andere Zellen enthielt. Es wurde über mindestens zehn Sekunden die Fluoreszenz aufgezeichnet. Diese Messung wurde vor der Auswertung für jede Zelle angegeben und dann abgezogen, damit ausschließlich die Fluoreszenz der zu untersuchenden Zelle in der Auswertung berücksichtigt wird.

## 2.8 Messlösungen

### 2.8.1 Normaltyrode

Als Umgebungslösung der isolierten Kardiomyozyten wurde während der Messungen eine Normaltyrode verwendet. Die einfache Verdünnung (1x Stock) der Normaltyrode (Tabelle 5) wird aus der zehnfach konzentrierten Lösung (10x Stock) angesetzt. Hierfür wurden 100 ml des 10x Stocks mit 900 ml bidestilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung mit Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 7,4 bei 37°C eingestellt. Die Tyrode wird vor Versuchsbeginn mit 1 M Kalziumchlorid-Lösung angesetzt.

Normaltyrode	1x	Menge
	NaCl	8,18 g
	KCl	298,2 mg
	MgCl <sub>2</sub>	95,2 mg
	HEPES (Sigma Aldrich)	1,19 g
	Glukose	1,8 g
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM

Tabelle 5 Normaltyrode 1-facher Stock, gelöst in ddH<sub>2</sub>O; mit NaOH auf pH 7,4 bei Raumtemperatur eingestellt

### 2.8.2 Isoprenalintyrode

Der selektive β-Rezeptoragonist Isoprenalin induziert eine in den Zellen artificielle Stresssituation, die wiederrum mit einer Aktivierung der CaMKII einhergeht. Die Isoprenalintyrode wird nach dem Prinzip der Normaltyrode hergestellt. Zusätzlich enthält die Lösung 10<sup>-7</sup> mM Isoprenalin. Des Weiteren wird der Lösung 1 M Kalziumchlorid-Lösung hinzugefügt. Die Lösung wird vor der Messung ebenfalls auf einen pH-Wert von 7,4 bei 37°C eingestellt.

Isoprenalintyrode	Menge
Isoprenalin (Sigma Aldrich)	10 <sup>-7</sup> mM

Tabelle 6 Isoprenalintyrode, gelöst in 100 mL Normaltyrode

### 2.8.3 Koffeintyrode

Die Koffeintyrode wird aus der Normaltyrode (s.o.) hergestellt, in der zusätzlich 10 mM Koffein enthalten sind. Die Lösung wird vor der Messung ebenfalls auf einen pH-Wert von 7,4 bei 37°C eingestellt. Der Lösung wird ebenfalls 1 M Kalziumchlorid-Lösung hinzugefügt.

Koffeintyrode	Menge
Koffein (Sigma Aldrich)	10 mM

Tabelle 7 Koffeintyrode, gelöst in 100 mL Normaltyrode

## 2.9 Auswertung der Messdaten

Die Auswertung der Messungen am Epifluoreszenzmikroskop erfolgte mit der Software IonWizard 6 (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) und Microsoft Excel. Über das Analyseprogramm von IonWizard wurden die Parameter und Berechnungen der Transienten durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden dann in eine Excel-Datei übertragen und mittels Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) weiter statistisch analysiert.

Nach Normalisierung zur Hintergrundfluoreszenz wurde aus den gemessenen Daten der Mittelwert aus einer Reihe von Transienten im „steady state“ bei der gleichen Stimulationsfrequenz (0,5 Hz) bestimmt. Die Amplitude eines Kalziumtransienten wurde jeweils als Quotient der maximalen Transientenfluoreszenz „Peak“ (F) und der Fluoreszenz der Baseline ( $F_0$ ) angegeben. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Kalziumtransientenamplitude der Zellen.

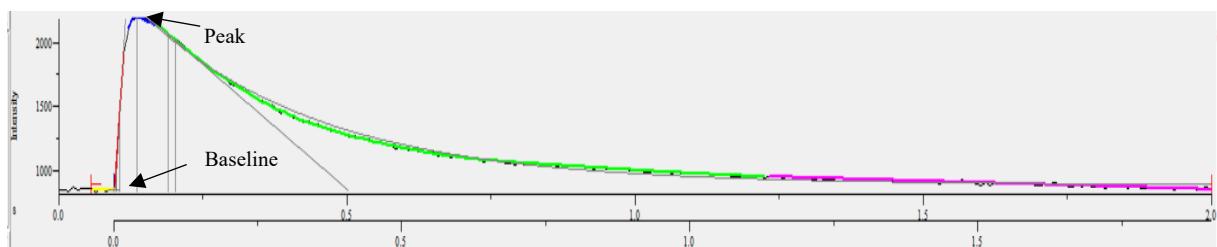


Abbildung 8 Originalabbildung eines Kalziumtransienten

$$\text{Kalziumtransientenamplitude} = \text{Peak } (F) - \text{Baseline } (F_0)$$

Zur Bestimmung der SERCA-Funktion wird die RT80 aus dem Kalziumtransienten bestimmt. Die RT80 gibt die Zeit an, die benötigt wird, damit die intrazelluläre Kalziumkonzentration nach der systolischen Spitze auf 80% des Ausgangsniveaus abgesunken ist.

## 2.10 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism Software Inc., Kalifornien, USA). Im folgenden Ergebnisteil sind die erhobenen Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aufgetragen. Der Student t-Test kam je nach Anforderungslage der Daten gepaart oder ungepaart zur statistischen Analyse zur Anwendung. Bei mehr als zwei Gruppen wurde die zweifaktorielle ANOVA als statistisches Berechnungsmaß verwendet. Als statistisches Signifikanzniveau wurde p unter 0,05 gewählt. Sofern nicht anders vermerkt wurden die signifikanten Unterschiede in den verglichenen Gruppen in den Diagrammen mit \* gekennzeichnet. Die n-Zahl bezieht sich auf die Anzahl der Zellen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Auswertung der biometrischen Daten im CASK-Modell**

Für die nachfolgenden Zellkulturexperimente wurden isolierte Kardiomyozyten von männlichen Mäusen im Alter von 8 bis 12 Wochen ausgesucht. Es wurden zunächst zwei Gruppen untersucht, um direkte Effekte der CASK nachweisen zu können. Neben den CASK- Knockout Mäusen ( $\text{CASKflox}^{+/+}/\text{Cre}^{-/+}$ ) wurde auch eine Kontrollgruppe untersucht, die kein gefloxtes CASK-Gen (CASK-CTRL) enthält, jedoch die Cre-Rekombinase ( $\text{CASKflox}^{-/-}/\text{Cre}^{-/+}$ ) exprimiert. Die beiden Genotypen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Eigenschaften phänotypisiert. Hierfür wurden biometrische Daten der Tiere im Rahmen der Isolation der Kardiomyozyten erfasst. Insgesamt zeigten beide Mauslinien keine Unterschiede im Verhalten oder bei der Nahrungsaufnahme, zeigten keine Fehlbildungen oder Gedeihstörungen.

Das Herz- und das Körpergewicht der Mäuse wurde bestimmt, sowie der Quotient (HG/KG) dieser beiden Messwerte berechnet. Es zeigte sich ein signifikant vermindertes Körpergewicht (in g) bei den CASK-defizienten Mäusen (CASK-KO) im Vergleich zur Kontrollgruppe (CASK-CTRL versus CASK-KO,  $29,95 \pm 0,49$  versus  $28,09 \pm 0,50$  n=30 versus n=19, t-test \*p=0,02). Außerdem zeigte sich ein signifikant vermindertes Herzgewicht (in mg) im CASK-KO (CASK-CTRL versus CASK-KO,  $203,5 \pm 5,20$  versus  $186,6 \pm 5,26$ , n=30 versus n=19, t-test \*p=0,03). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Atasoy et al., die bereits ein geringeres Herzgewicht bei CASK-Knockdown Mäusen beobachteten (Atasoy et al., 2007).

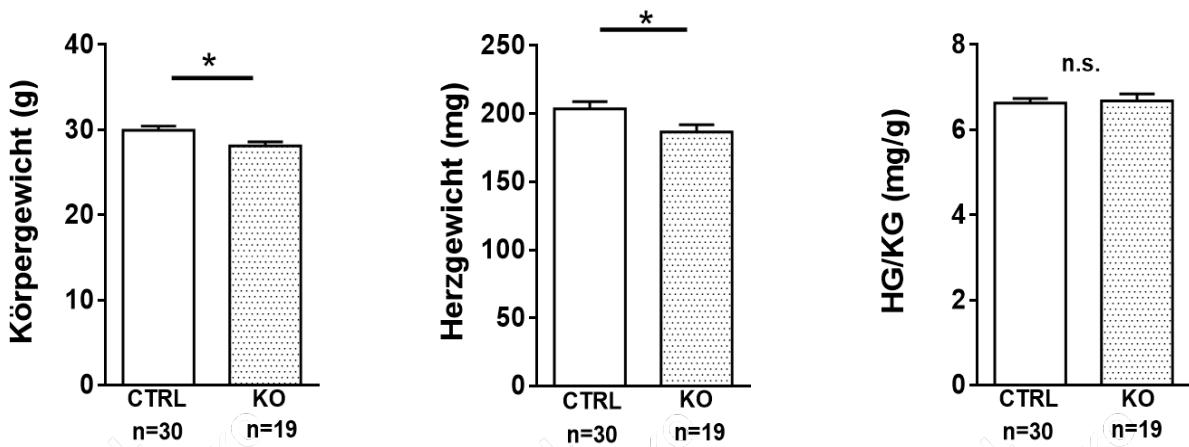


Abbildung 9 biometrische Daten der CASK-Kontrollgruppe (CASK-CTRL) im Vergleich zum CASK-Knockout Modell (CASK- KO). Links: Körpergewicht in g, Mitte: Herzgewicht in mg, rechts: Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht in mg/g

Der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht (HG/KG) ist interessanterweise nicht signifikant verändert, die Mäuse im CASK-KO sind demnach kleinwüchsig, ein Phänotyp im Sinne eines hypertrophierten Herzens zeigt sich jedoch nicht (CASK-CTRL versus CASK-KO,  $6,63 \pm 0,11$  versus  $6,68 \pm 0,16$ , n=30 versus n=19, t-test p=0,79).

### 3.2 Das Modell der chronischen Nachlasterhöhung mittels transverser Aortenkonstriktion (TAC-Modell) führt zur kardialen Hypertrophie

Das TAC-Modell gilt als etabliertes murines in vivo-Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Durch die künstliche Erhöhung der Nachlast kommt es konsekutiv zu einer erhöhten Druckbelastung des linken Ventrikels und demzufolge zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz. Dies führt zu einer erhöhten Expression der phosphorylierten, demnach der aktivierte CaMKII, die zu einer kardialen Hypertrophie sowie einer Veränderung der elektromechanischen Kopplung über Phosphorylierung kardialer Proteine führt.

Eine vermehrte CaMKII-Aktivität in Kardiomyozyten führt zur kardialen Hypertrophie (Zhang et al., 2002), welche zu einer ventrikulären Dilatation und einer verminderten Herzfunktion führt. Eine erhöhte CaMKII-Aktivität ist im TAC-Modell nachzuweisen. Folglich kommt es bei Mäusen, bei denen eine TAC-Operation durchgeführt wurde, zu einer kardialen Hypertrophie einhergehend mit einem erhöhten Herzgewicht. Eine

Veränderung beim Körpergewicht wird nicht beobachtet, sodass das Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis im TAC-Modell vergrößert ist. Diese Veränderungen sind spezifisch für das TAC-Modell und lassen sich bei Kontrolltieren im Sham-Modell nicht beobachten.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden ebenfalls die biometrischen Daten im Zuge der Zellisolation erhoben. Bei der Bestimmung des Körpergewichts (in g) konnte kein Unterschied zwischen den Mäusen 6 Wochen nach Durchführung der TAC-Operation oder Sham-Operation gezeigt werden (Sham versus TAC,  $22,78 \pm 0,87$  versus  $23,10 \pm 0,21$ , n=5 versus n=5, t-test p= 0,70). Unter Berücksichtigung der bereits bekannten Ergebnisse bei TAC-operierten Mäusen, ergaben auch meine eigenen Untersuchungen eine signifikante Zunahme des Herzgewichts nach der TAC-Operation (Sham versus TAC,  $127,8 \pm 3,68$  versus  $182,6 \pm 22,82$ , n=5 versus n=5, t-test \*p=0,04).

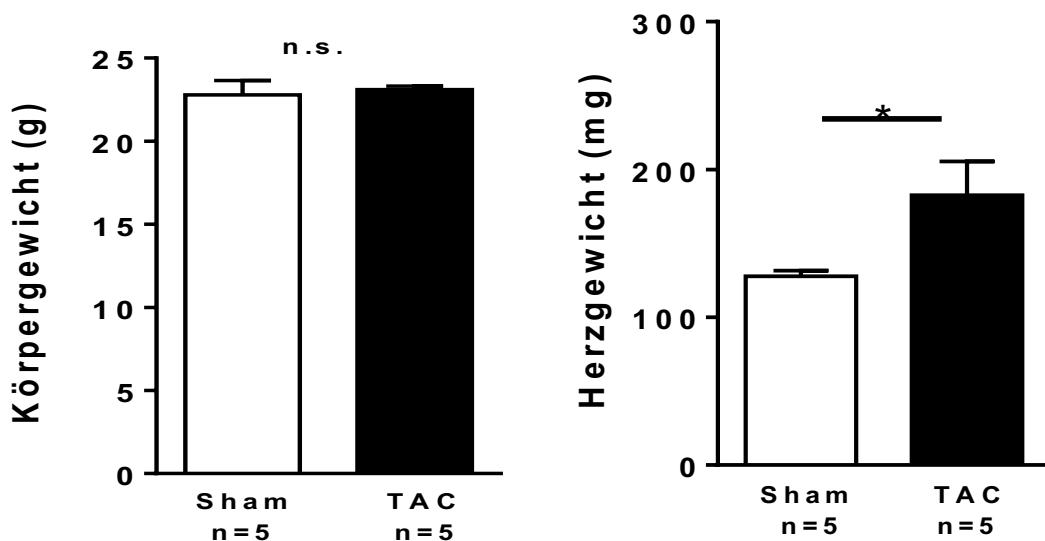


Abbildung 10 Biometrische Daten im Sham-Modell und im TAC-Modell. Links: Körpergewicht (g) im TAC-Modell und im Sham-Modell, Rechts: Herzgewicht (mg) im TAC-Modell und im Sham-Modell

Signifikant verändert ist demnach auch der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht (HG/KG, Sham versus TAC,  $5,63 \pm 0,17$  versus  $7,99$  versus, n=5 versus n=5, t-test \*p=0,04). Dies lässt auf ein hypertrophiertes Herz in Bezug auf das Körpergewicht im TAC-Modell schließen im Vergleich zum Sham-Modell.

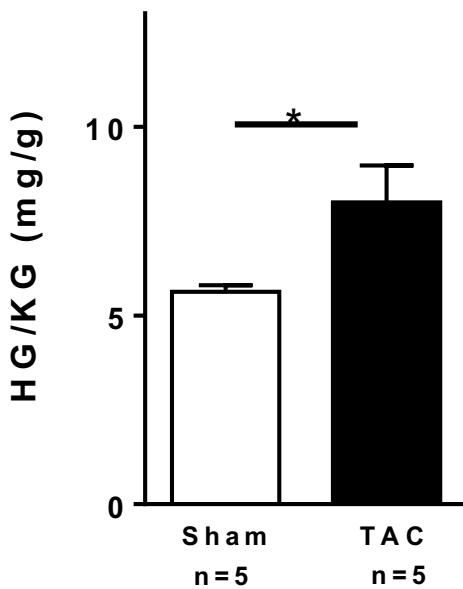


Abbildung 11 Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG) in mg/g, Sham vs. TAC

### 3.3 Die Funktion der SERCA (RT 80)

#### 3.3.1 SERCA-Funktion im CASK-Modell

Im Rahmen der Epifluoreszenzmessung wurde die Relaxation des Kalziumtransienten (Zeit bis zum Abfall des Kalziumtransienten um 80%) als RT 80 bestimmt. Die Elimination des Kalziums während der Diastole wird hauptsächlich über die SERCA vermittelt, ein wesentlich geringerer Anteil, hier vernachlässigbar, erfolgt über den membranständigen Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX). Die Geschwindigkeit des Abfalls des Kalziumtransienten ist demnach abhängig von der Funktion dieser beiden Kanäle, jedoch überwiegt die Funktion der SERCA, sodass die RT 80 als Maß für die SERCA-Funktion herangezogen werden kann.

Durch Inkubation mit Exenatid wird eine signifikant gesteigerte SERCA-Funktion in CASK-CTRL Kardiomyozyten erwartet. In Kardiomyozyten des CASK-Knockouts erzielt die Zellkultur mit Exenatid keine signifikante Veränderung in der SERCA-Funktion.

Die Zellkultur mit Exenatid führt in isolierten CASK-CTRL Kardiomyozyten zu einer signifikant gesteigerten systolischen Kalziumfreisetzung aus dem SR. Gleichzeitig kommt es zu einem gesteigerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt durch eine verminderte

Phosphorylierung der Zielproteine der CaMKII auf Basis einer verminderten Aktivität der CaMKII unter Superfusion mit der Normaltyrode. Dies kann auf eine vermehrte Kalziumaufnahme durch die SERCA während der Diastole zurückgeführt werden. In der CASK-Kontrollgruppe (CASK-CTRL) konnte ein signifikanter Unterschied nach 24 h-Zellkultur mit Exenatid im Vergleich zur Vehikellösung festgestellt werden. Unter Superfusion mit der Normaltyrode ist der Fluoreszenzabfall in der Exenatidgruppe signifikant verkürzt, was für eine gesteigerte Funktion der SERCA spricht, da die Zeit zur Elimination des Kalziums zurück ins SR verringert wurde (CASK-CTRL, Vehikel versus Exenatid,  $0,41 \pm 0,03$  versus  $0,33 \pm 0,02$ , n=20 versus n=24, t-test \*p=0,01). Eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Isoprenalin führt zu einer Aktivierung der CaMKII. Über eine CaMKII-vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban kommt es zu einem Verlust der Inhibitionswirkung von Phospholamban auf die SERCA, die vermehrt aktiviert wird. Unter Superfusion mit Isoprenalin kann der Effekt von Exenatid auf eine vermehrte CaMKII-Aktivierung untersucht werden. Hier zeigte sich eine tendenziell verringerte RT 80 in der Exenatidgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch erwies sich dieser Unterschied als nicht signifikant (CASK-CTRL, Vehikel versus Exenatid,  $0,18 \pm 0,01$  versus  $0,16 \pm 0,01$ , n=21 versus n=15, t-test p=0,31).

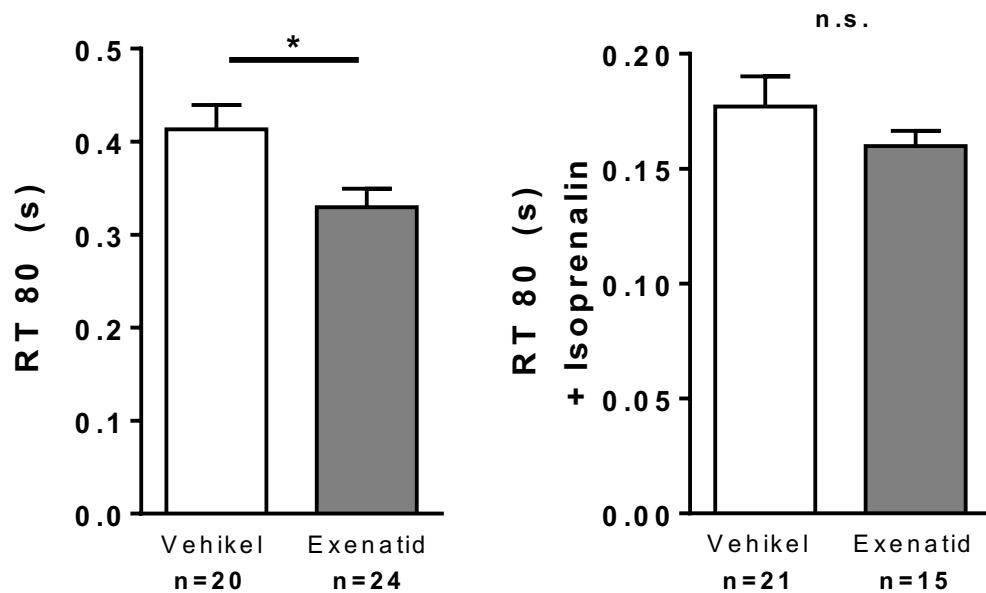


Abbildung 12 Relaxationszeit der Kalziumtransienten (RT 80) in s, CASK CTRL unter basalen Bedingungen (links) und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin 10-7 mmol/L (rechts)

Eine Veränderung der RT 80 in den CASK-defizienten isolierten Kardiomyozyten (CASK-KO) konnte durch die Zellkultur mit Exenatid im Vergleich zur Vehikellösung

nicht gemessen werden. Unter basaler Stimulation nach Superfusion mit der Normaltyrode gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit Exenatid-kultivierten Kardiomyozyten und den Kardiomyozyten der Vehikelgruppe (Vehikel versus Exenatid,  $0,39 \pm 0,02$  versus  $0,38 \pm 0,02$ , n=27 versus n=29, t-test p=0,94).

Die Superfusion mit dem  $\beta$ -adrenergen Stimulator Isoprenalin, die mit einer vermehrten CaMKII-Aktivität einhergeht, führt in Kardiomyozyten des CASK-Knockouts zu keiner signifikanten Veränderung der RT 80. (Vehikel versus Exenatid,  $0,15 \pm 0,01$  versus  $0,17 \pm 0,01$ , n=24 versus n=25, t-test p=0,07).

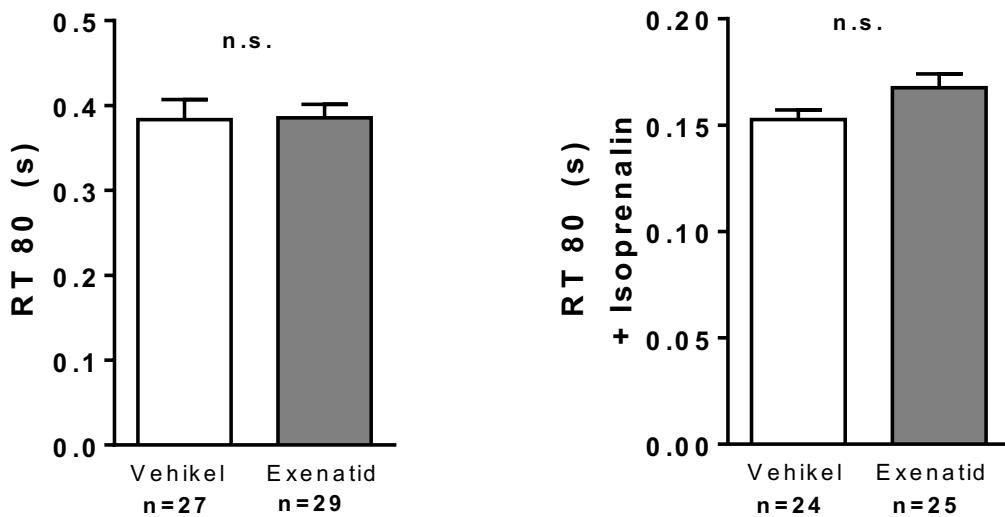


Abbildung 13 Relaxationszeit des Kalziumtransienten (RT 80) in s, CASK-KO unter basalen Bedingungen und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin 10-7 mmol/L

### 3.3.2 SERCA-Funktion im TAC-Modell

Basierend auf den Ergebnissen der biometrischen Analyse sollten sich auch auf zellulärer Ebene Veränderungen im TAC-Modell nachweisen lassen. Die Stimulation mit Exenatid führt im TAC-Modell nach einer 24-stündigen Zellkultur durch eine CASK-vermittelte Reduktion der CaMKII. Dies resultiert in einer reduzierten SERCA-Funktion, einhergehend mit einer verminderten Kalziumaufnahme in das SR, sodass die Amplitude der systolischen Kalziumtransienten als auch der SR-Kalziumgehalt reduziert sein müssten.

Um die Funktion der SERCA zu bestimmen und auf diese Weise Rückschlüsse auf die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR zu schließen, wurde in diesem Mausmodell

ebenfalls die RT 80 der Kalziumtransienten bestimmt. Sowohl im Sham-Modell (Vehikel versus Exenatid, 0,5 Hz:  $0,271 \pm 0,02$  versus  $0,28 \pm 0,04$ ; 1,0 Hz:  $0,25 \pm 0,01$  versus  $0,26 \pm 0,03$ ; 2,0 Hz:  $0,2 \pm 0,01$  versus  $0,2 \pm 0,01$ ; n=11 versus n=12, 2-Wege-ANOVA p= 0,76) als auch im TAC-Modell (Vehikel versus Exenatid, 0,5 Hz:  $0,31 \pm 0,02$  versus  $0,29 \pm 0,02$ ; 1,0 Hz:  $0,26 \pm 0,02$  versus  $0,26 \pm 0,01$ ; 2,0 Hz:  $0,21 \pm 0,01$  versus  $0,21 \pm 0,01$ , n=23 versus n=22, 2-Wege-ANOVA p= 0,78) zeigte sich keine Veränderung der SERCA-Funktion nach Zellkultur mit der Exenatidlösung im Vergleich zur Vehikellösung.

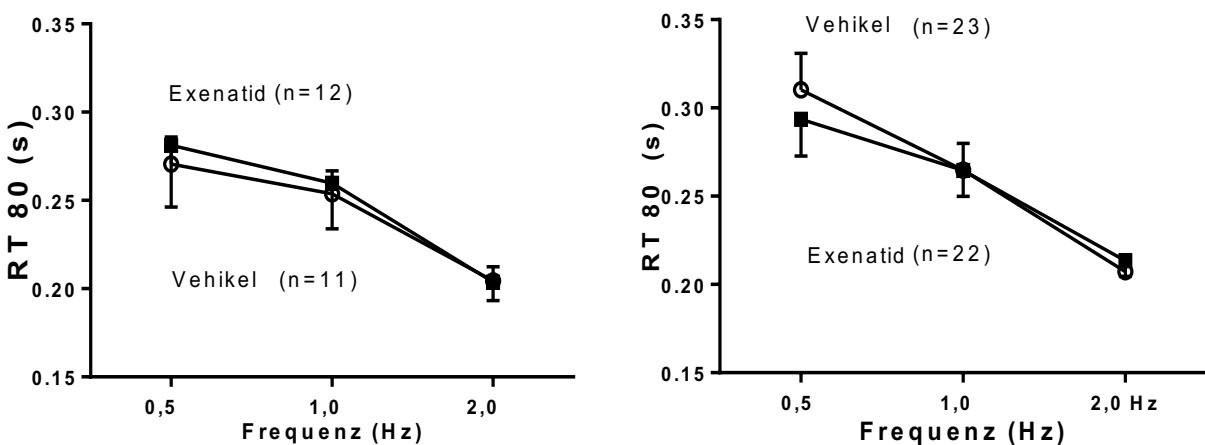


Abbildung 14 Relaxationszeit des Kalziumtransienten (RT 80) in s in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz  
Sham-Modell (links) und im TAC-Modell (rechts), 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid

### **3.4 Einfluss des GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid auf die systolische Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum**

#### **3.4.1 Effekt von Exenatid auf die systolische Kalziumfreisetzung im CASK-Modell**

Eine 24-stündige Zellkultur mit Exenatid führt in isolierten ventrikulären CASK-CTRL Kardiomyozyten zu einer signifikant gesteigerten systolischen Kalziumfreisetzung aus dem SR, einhergehend mit einem signifikant gesteigerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt. In isolierten ventrikulären Kardiomyozyten aus CASK-defizienten Mäusen (CASK-KO) bewirkt Exenatid keine Veränderung der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase.

Die mit Exenatid kultivierten CASK-CTRL Kardiomyozyten zeigten eine signifikant größere Kalziumtransientenamplitude unter Superfusion mit der Normaltyrode im Vergleich zu den mit der Vehikellösung kultivierten Zellen (Vehikel versus Exenatid,

$2,81 \pm 0,18$  versus  $3,42 \pm 0,20$ , n=18 versus n=21, t-test \*p=0,03). Die 24 h- Zellkultur mit Exenatid in den CASK-defizienten Kardiomyozyten (CASK-KO) konnte keine signifikante Veränderung der systolischen Kalziumtransientenamplitude im Vergleich zu den mit Vehikellösung kultivierten CASK-KO Zellen bewirken (Vehikel versus Exenatid,  $3,36 \pm 0,19$  versus  $3,23 \pm 0,16$ , n=27 versus n=29, t-test p=0,62).

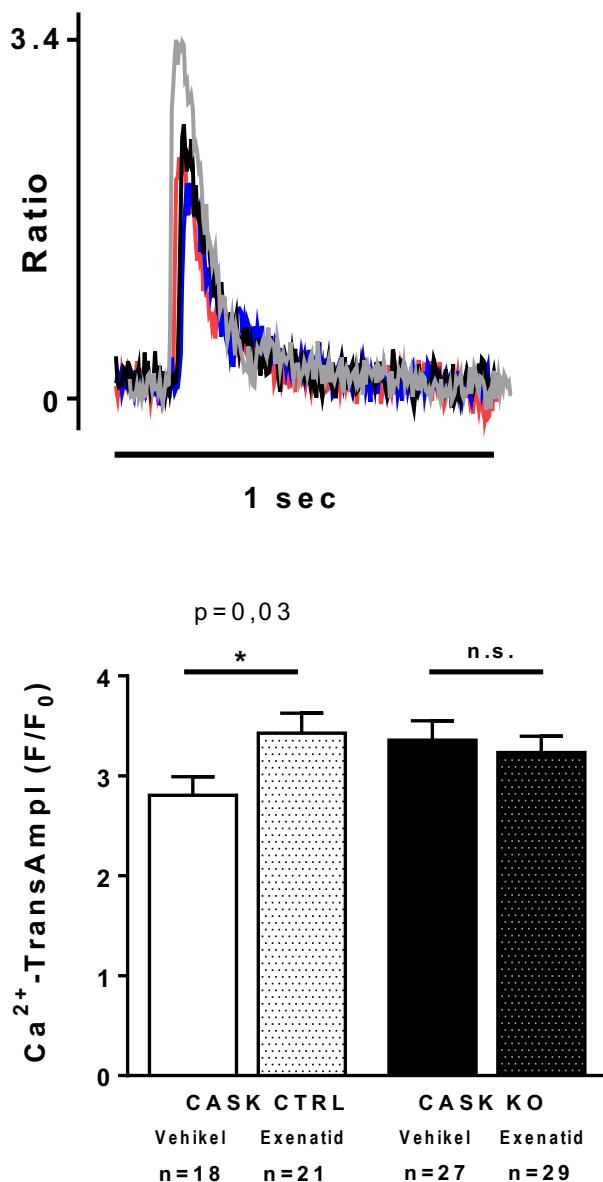


Abbildung 15 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid. Oben: Originale Abbildung registrierter Kalziumtransienten (normierte Darstellung) im CASK-CTRL unter Exenatid (grau) und Vehikel (schwarz) sowie im CASK-KO unter Exenatid (rot) und Vehikel (blau). Unten: Die systolische Kalziumtransientenamplitude CASK-CTRL vs. CASK-KO unter Normaltyrode bei einer Frequenz von 0,5 Hz

Da eine CaMKII-Aktivierung vor allem unter pathophysiologischen Bedingungen (z.B.  $\beta$ -adrenerge Stimulation) stattfindet, wurde an die Messung mit der Normaltyrode ein Wash-In mit dem  $\beta$ -Rezeptorstimulator Isoprenalin angeschlossen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM mit einer elektrischen Stimulation bei 0,5 Hz wiederholt. Die Superfusion mit Isoprenalin führt zu einer gesteigerten Aktivität der CaMKII. Die aktivierte CaMKII phosphoryliert den Ryanodinrezeptor, sodass es zu einem gesteigerten diastolischem Kalziumleck aus dem sarkoplasmatischen Retikulum kommt (Mustroph et al., 2021). Dies hat zur Folge, dass die systolische Kalziumfreisetzung aus dem SR sowie der Kalziumgehalt im SR sinkt. Zudem wird durch die CaMKII Phospholamban phosphoryliert und die SERCA wird vermehrt aktiviert. Die 24- stündige Zellkultur mit Exenatid steigert die Expression der CASK in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der CASK-Kontrollgruppe. Die vermehrte Expression der CASK führt zu einer Herunterregulierung der CaMKII-Aktivität in der CASK-Kontrollgruppe, sodass die systolische Kalziumfreisetzung aus dem SR als auch der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt signifikant gesteigert ist im Vergleich zu der mit Exenatid-kultivierten Kardiomyozyten der CASK-Knockout Gruppe.

Interessanterweise zeigten sich sowohl in der CASK-Kontrollgruppe (Vehikel versus Exenatid,  $5,72 \pm 0,33$  versus  $5,46 \pm 0,49$ , n=21 versus n=15, t-test p=0,65) als auch im CASK-KO (Vehikel versus Exenatid,  $4,63 \pm 0,24$  versus  $5,01 \pm 0,30$ , n=16 versus n=18, t-test p= 0,35) keine signifikanten Unterschiede der systolischen Kalziumtransientenamplitude in den mit Exenatid kultivierten Kardiomyozyten im Vergleich zu der Vehikellösung nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin.

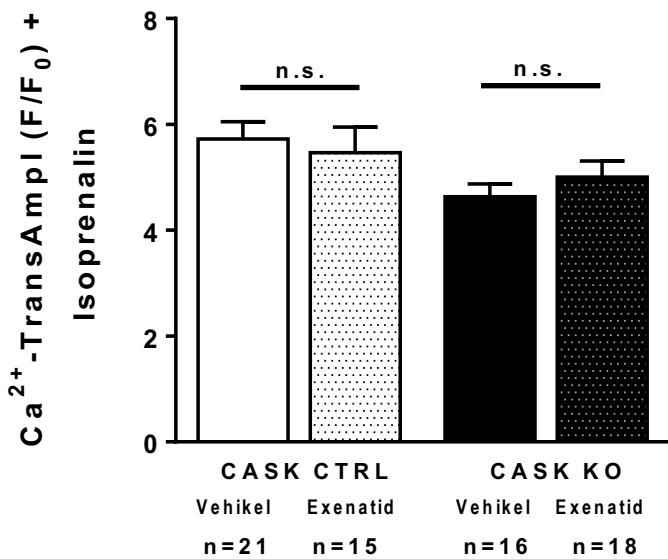


Abbildung 16 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid. Die systolische Kalziumtransientenamplitude CASK-CTRL vs. CASK-KO unter β-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin 10-7 mmol/L

### 3.4.2 Effekt von Exenatid auf die systolische Kalziumfreisetzung im TAC-Modell

Basierend auf den Ergebnissen der biometrischen Analyse sollten sich auch auf zellulärer Ebene Veränderungen im TAC-Modell nachweisen lassen.

Die gesteigerte CaMKII-Aktivität in TAC-operierten Mäusen phosphoryliert die CaMKII-abhängigen Zielproteine. Hierzu zählt der Ryanodinrezepter RyR2 im sarkoplasmatischen Retikulum. Eine Phosphorylierung der RyR2 resultiert in einem gesteigerten Kalziumleck aus dem SR aufgrund einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, dies geht mit einer verminderten systolischen Kalziumfreisetzung einher. Die 24 h-Zellkultur mit dem GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid steigert die Expression der CASK, die eine Reduktion der CaMKII-Aktivität bewirkt (Mustroph et al., 2021). Eine Reduktion der CaMKII-Aktivität führt in Kardiomyozyten von TAC-operierten Mäusen zu einer Steigerung der systolischen Kalziumfreisetzung. In der Kontrollgruppe bei Sham-operierten Mäusen wird keine signifikante Steigerung der systolischen Kalziumfreisetzung zu erwarten sein. Im Sham-Modell ist die CaMKII nicht vermehrt aktiviert, sodass die Zellkultur mit Exenatid nicht über eine Regulierung der CASK-Expression in die Regulation der CaMKII-Aktivität eingreifen kann. Diese Kalziummessungen am Epifluoreszenzmikroskop wurden an die 24 h-Zellkultur angeschlossen. Die Abbildung 17 zeigt den Vergleich der systolischen Kalziumfreisetzung nach der F/F<sub>0</sub>-Methode in isolierten

Kardiomyozyten der TAC-Mäuse nach Zellkultur mit Exenatid und Vehikellösung mit Stimulationsfrequenzen von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz. Hier konnte eine signifikante Steigerung der Kalziumtransientenamplitude frequenzadaptiert im TAC-Modell nach Zellkultur mit Exenatid im Vergleich zu der Vehikelgruppe nachgewiesen werden (Vehikel versus Exenatid, 0,5 Hz:  $3,04 \pm 0,13$  versus  $3,6 \pm 0,20$ ; 1,0 Hz:  $3,11 \pm 0,16$  versus  $3,57 \pm 0,21$ ; 2,0 Hz:  $3,11 \pm 0,17$  versus  $3,47 \pm 0,24$ , n=20 versus n=24, 2-Wege ANOVA \*p=0,045).

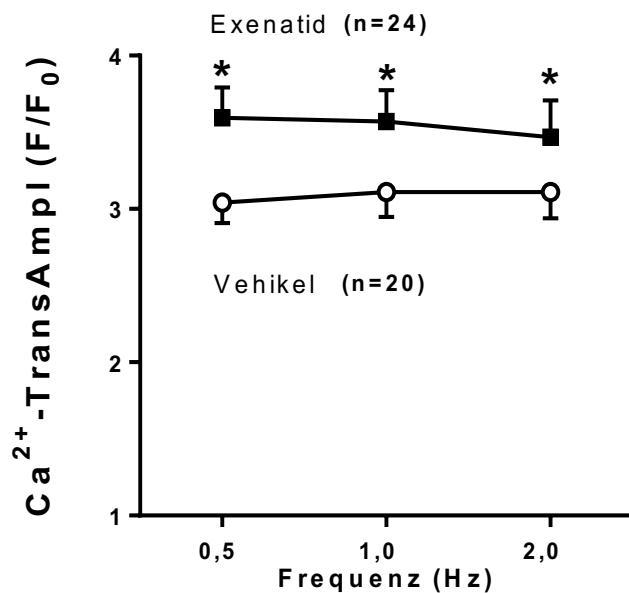


Abbildung 17 Die systolische Kalziumtransientenamplitude im TAC-Modell in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenzen unter Exenatid oder Vehikel

Im Vergleich zum TAC-Modell zeigt sich in der Kontrollgruppe nach Sham-Intervention keine signifikante Veränderung der systolischen Kalziumtransientenamplitude in den kultivierten Kardiomyozyten (Vehikel versus Exenatid, 0,5 Hz:  $3,58 \pm 0,30$  versus  $3,87 \pm 0,28$ ; 1,0 Hz:  $3,37 \pm 0,30$  versus  $3,6 \pm 0,27$ ; 2,0 Hz:  $3,16 \pm 0,26$  versus  $3,36 \pm 0,27$ , n=11 versus n=12, 2-Wege-ANOVA p=0,29).

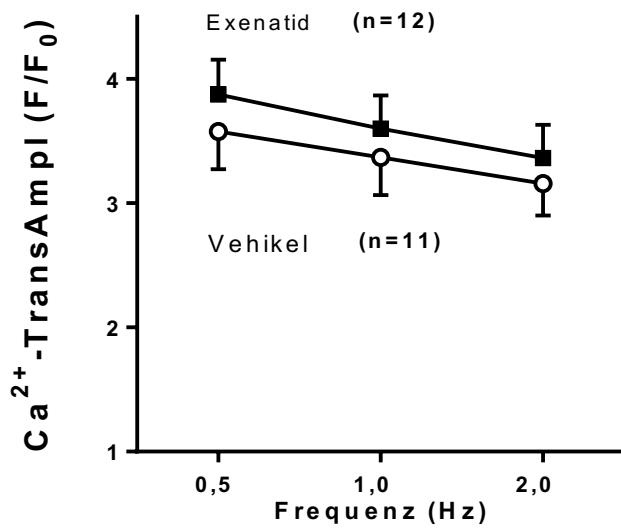


Abbildung 18 Die systolische Kalziumtransientenamplitude im Sham-Modell in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenzen unter Exenatid oder Vehikel

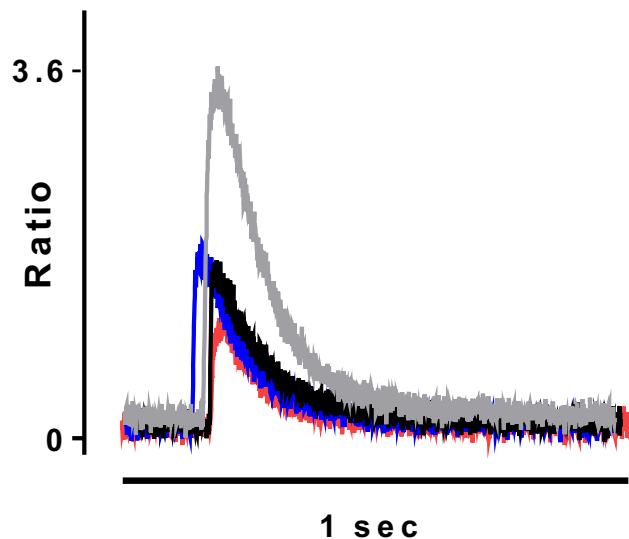


Abbildung 19 Originale Abbildung, systolische Kalziumtransientenamplitude bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz im TAC-Modell (grau: Exenatid, schwarz: Vehikel) und Sham-Modell (blau: Exenatid, rot: Vehikel)

### 3.5 Bestimmung des Kalziumgehalts im sarkoplasmatischen Retikulum

#### 3.5.1 Kalziumgehalt im sarkoplasmatischen Retikulum im CASK-Modell

Die Messung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts erfolgte nach 24 h-Zellkultur mittels der Applikation von Koffein. Durch die reversible Bindung an den Ryanodinrezeptor bewirkt es eine

permanente Öffnung des Rezeptors, sodass es zu einer maximalen Kalziumfreisetzung aus dem SR kommt. Die elektrische Stimulation während der Messung der Kardiomyozyten wird unterbrochen und zum Zeitpunkt der erneuten elektrischen Stimulation wird stattdessen die Koffeintyrode zellnah appliziert. Somit entspricht der gemessene Kalziumtransient nach  $F/F_0$ -Methode den Kalziumgehalt des SR. Die isolierten Kardiomyozyten der CASK-Kontrollgruppe, die mit Exenatid kultiviert wurden, zeigten unter Superfusion mit der Normaltyrode einen signifikant erhöhten Koffein-induzierten Kalziumtransienten im Vergleich zu den mit Vehikellösung kultivierten Zellen (Vehikel versus Exenatid,  $3,12 \pm 0,42$  versus  $4,59 \pm 0,58$ ,  $n=15$  versus  $n=11$ , t-test  $*p=0,04$ ).

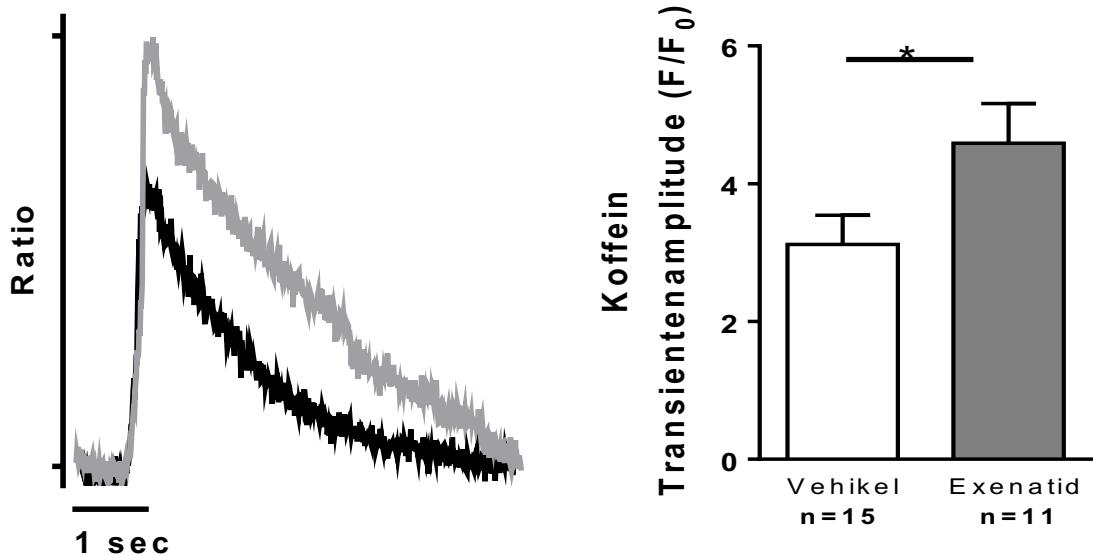


Abbildung 20 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude. Links: Originale Abbildung (normierte Darstellung) von Exenatid (grau) und Vehikel (schwarz) im CASK-CTRL. Rechts: CASK-CTRL, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid.

Diese Messung wurde ebenfalls mit dem  $\beta$ -adrenergen Stimulator Isoprenalin durchgeführt. Die durch Isoprenalin gesteigerte CaMKII-Aktivität wird durch die vermehrte CASK-Expression nach der 24 h-Zellkultur mit Exenatid in CASK-CTRL Kardiomyozyten reduziert, einhergehend mit einem gesteigerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im Vergleich zu den Kardiomyozyten, die mit der Vehikellösung kultiviert wurden.

Nach der Messung der systolischen Kalziumfreisetzung unter Superfusion mit Isoprenalin und einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz wurde Koffein zellnah an die isolierten murinen Kardiomyozyten appliziert und ebenfalls der Koffein-induzierte

Kalzium transient bestimmt, der als Maß für den Kalziumgehalt im SR gilt. Hier konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied nach Superfusion mit Isoprenalin nachgewiesen werden. In kultivierten isolierten murinen Kardiomyozyten der CASK-Kontrollgruppe zeigt sich eine signifikante Steigerung des SR-Kalziumgehalts nach Zellkultur mit Exenatid im Vergleich zur Vehikellösung ( $F/F_0$ , Vehikel versus Exenatid,  $5,65 \pm 0,51$  versus  $7,55 \pm 0,57$ , n=7 versus n=4, t-test \*p=0,04).

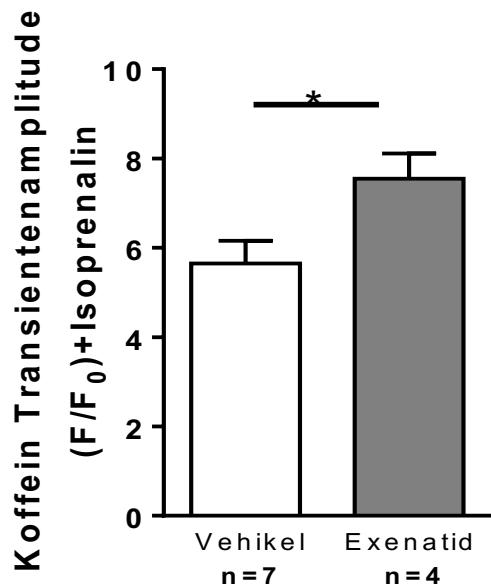


Abbildung 21 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin, CASK-CTRL, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid

In Kardiomyozyten des CASK-Knockouts ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kardiomyozyten der Exenatid- und der Vehikelgruppe nachweisen. Die 24 h-Zellkultur mit Exenatid konnte bei Kardiomyozyten des CASK-Knockouts keinen Effekt auf den Koffein-induzierten Kalziumtransienten erzielen, der den Kalziumgehalt im SR abbildet. Dieser war nach Superfusion mit der Koffeintyrode nicht signifikant verändert (Vehikel versus Exenatid,  $4,66 \pm 0,46$  versus  $4,133 \pm 0,27$ , n=8 versus n=5, t-test p=0,33).

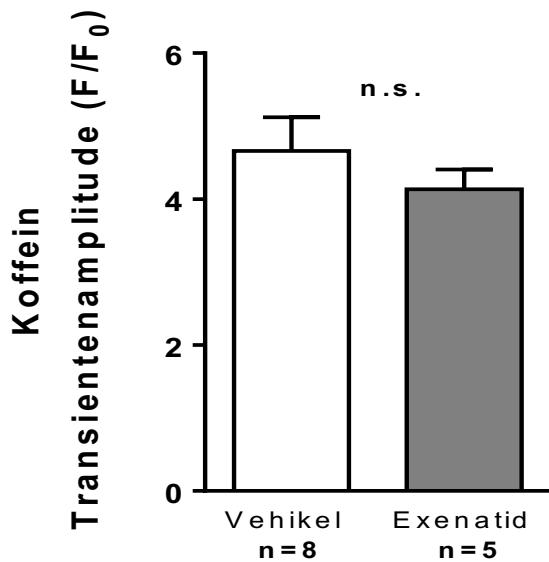


Abbildung 22 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude CASK-KO, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid.

Bei Kardiomyozyten des CASK-Knockouts erreicht die Zellkultur mit Exenatid ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf den Kalziumgehalt des SR nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin, einhergehend mit einer gesteigerten CaMKII-Aktivität und einer zellnahen Applikation des Koffeins. Hier erkennt man eine Steigerung des Kalziumgehalts im SR, jedoch gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit Vehikel-kultivierten Kardiomyozyten und denen mit Exenatid-kultivierten Kardiomyozyten des CASK-KO (Vehikel versus Exenatid,  $6,73 \pm 0,79$  versus  $5,01 \pm 0,48$ , n=3 versus n=3, t-test p=0,09).

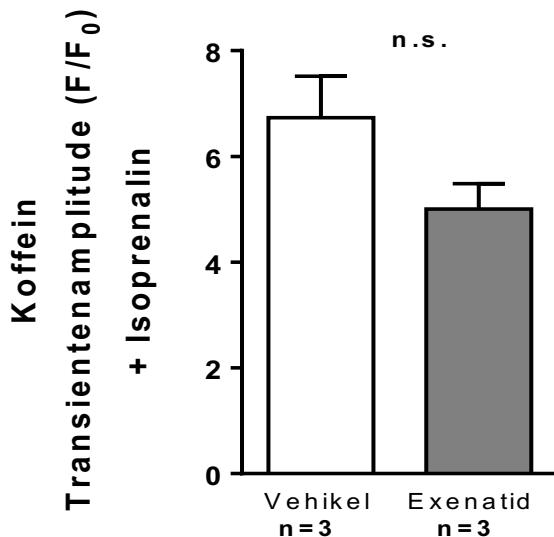


Abbildung 23 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin, CASK-KO 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid.

### 3.5.2 Kalziumgehalt im sarkoplasmatischen Retikulum im TAC-Modell

Da die gesteigerte systolische Kalziumtransientenamplitude im TAC-Modell nach Zellkultur mit der Exenatidlösung im Vergleich zu den mit der Vehikellösung-kultivierten Kardiomyozyten durch einen gesteigerten SR-Kalziumgehalt erklärt werden könnte, wurde ebenfalls der SR-Kalziumgehalt durch die Koffeinapplikationsmethode bestimmt. Die Messung des SR-Kalziumgehaltes wurde an die Messung mit der Normaltyrode mit einer Stimulation von 0,5 Hz angeschlossen. Die Koffeintyrode wurde während einer Stimulationspause zinnah appliziert.

Die mit Exenatid-kultivierten Kardiomyozyten im TAC-Modell (Abbildung 24) zeigen eine signifikant gesteigerte Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude im Vergleich zu den mit der Vehikellösung-kultivierten Zellen (Vehikel versus Exenatid,  $3,86 \pm 0,19$  versus  $4,82 \pm 0,14$ ,  $n=9$  versus  $n=10$ , t-test \* $p=0,001$ ).

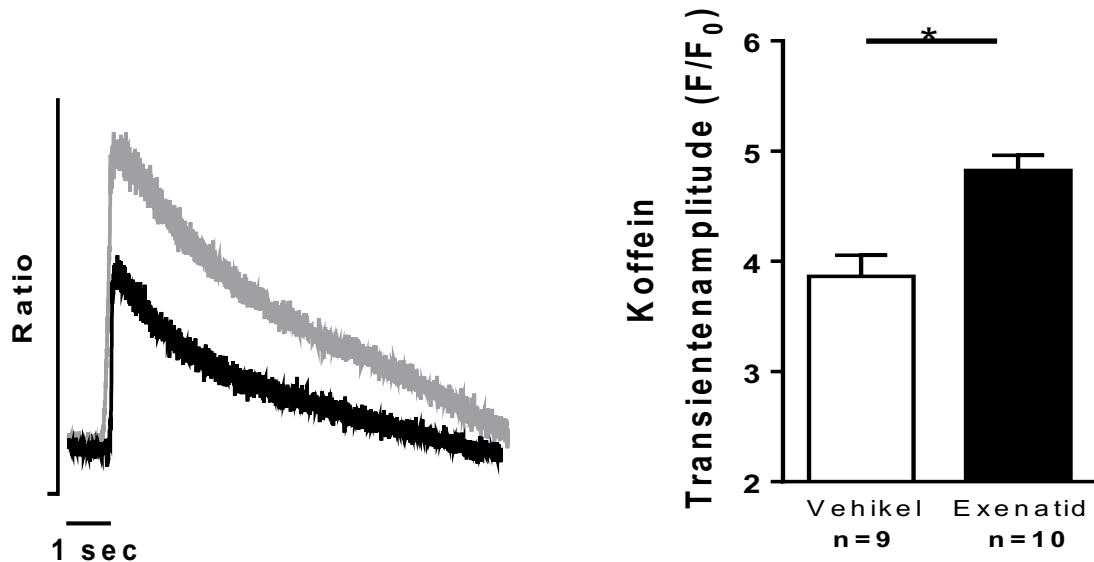


Abbildung 24 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude im TAC-Modell, links: Originale Abbildung (normierte Darstellung) von Exenatid (grau) und Vehikel (schwarz), rechts: murines TAC-Modell, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid

Die im TAC-Modell gesteigerte CaMKII-Aktivität phosphoryliert die RyR2, sodass die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht wird. Dies führt zu einem gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck aus dem SR, sodass der Kalziumgehalt im SR im TAC-Modell, verglichen mit dem Sham-Modell, vermindert ist. Zudem senken die mit Exenatid-kultivierten Kardiomyozyten im TAC-Modell über eine Steigerung der CASK-Expression die Aktivität der CaMKII, einhergehend mit einem signifikant gesteigerten sarkoplasmatischen Kalziumgehalt durch eine verminderte Phosphorylierung der RyR2 resultierend in einem verminderten systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck. Dieser Effekt lässt sich in mit Exenatid-kultivierten Kardiomyozyten im Sham-Modell nicht nachweisen (Vehikel versus Exenatid  $4,51 \pm 0,35$  versus  $5,18 \pm 0,41$ , n=11 versus n=10, t-test p= 0,23).

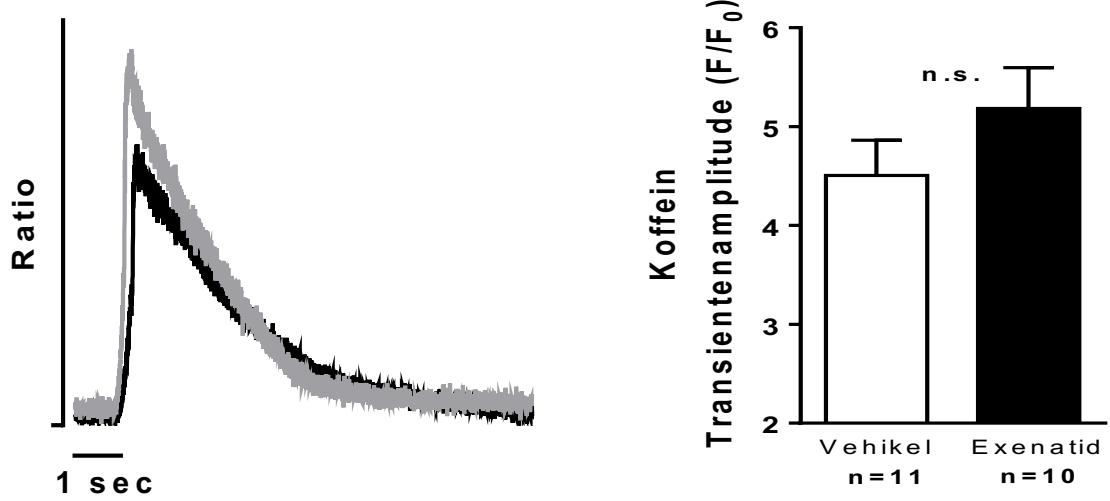


Abbildung 25 Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude im Sham-Modell. Links: Originale Abbildung (normierte Darstellung) von Exenatid (grau) und Vehikel (schwarz), rechts: Sham-Modell, 24 h-Zellkultur, Vehikel vs. Exenatid

## **4. Diskussion**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Inkretinimetikums Exenatid auf die Zielproteine der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II delta ( $\delta$ ) und deren Einfluss auf die Kalziumhomöostase in isolierten murinen Kardiomyozyten untersucht. Das Regulatorprotein CASK nimmt hier einen wichtigen Stellenwert bei der Regulation der CaMKII-Aktivität ein. In isolierten ventrikulären Kardiomyozyten nach Exenatid-Exposition beeinflusst eine CASK-Expression positiv die systolische Kalziumfreisetzung aus dem SR und den Kalziumgehalt im SR. Ein positiver Einfluss auf die Elimination des Kalziums während der Diastole zeigt sich unter basalen Bedingungen. Im Herzinsuffizienzmodell (TAC-Modell) erzielt die Exposition mit Exenatid ebenfalls einen positiven Effekt auf die systolische Kalziumfreisetzung als auch zusammenhängend auf den Kalziumgehalt im SR.

### **4.1 Einfluss der CASK-Expression auf die kardiale Hypertrophie**

Die Ergebnisse zeigten signifikant geringere Werte für Körper- und Herzgewicht im CASK-KO im Vergleich zur CASK-Kontrollgruppe (CASK-CTRL), allerdings wurde kein signifikanter Unterschied im Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis detektiert.

Atasoy et al. beschrieben bereits, dass CASK-Knockdown Mäuse kleiner sind und ein geringeres Herzgewicht als die Wildtypen aufweisen. Ein ubiquitärer CASK-KO führte aufgrund von ausgeprägten neuronalen Abnormalitäten zu nicht überlebensfähigen Mäusen (Atasoy et al., 2007). In dieser Arbeit wurde das CASK-Gen kardiomyozytenspezifisch deletiert. Das verminderte Herzgewicht im CASK-KO verglichen mit der CASK-Kontrollgruppe zeigt, dass die kardiale CASK einen Einfluss auf die Entwicklung des Herzmuskels hat, dies jedoch durch ein insgesamt geringeres Körpergewicht erklärt werden kann. Das Herz zeigte eine normale Morphologie und es konnte kein Einfluss auf die Überlebenszeit der Mäuse festgestellt werden (Mustroph et al., 2021). Die kardiale Ausschaltung des Regulatorproteins CASK im CASK-KO führt insgesamt zu einem kleinwüchsigen murinen Phänotyp. Bei jedoch gleichzeitig relativ gesehen kleinem Herzen, zeigte sich kein signifikanter Effekt der basalen CaMKII-Aktivität im CASK-KO im Sinne einer Hypertrophie.

Vor diesem Hintergrund, dass ein murines kardiales CASK-KO-Modell allein unter basalen Bedingungen keinen Stimulus zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie bietet, nutzten wir das etablierte TAC-Modell. Die artifizielle Erhöhung der Nachlast, die im TAC-Modell entsteht, führt zu einer vermehrten Expression der kardialen CaMKII sowie zu einer vermehrten CaMKII-Aktivität durch Autophosphorylierung (T. Zhang et al., 2003). Zudem konnte in murinen Kardiomyozyten, die die CaMKII überexprimieren, eine erhöhte Expression von Markern nachgewiesen werden, die an der kardialen Hypertrophie beteiligt sind (T. Zhang et al., 2002).

Dies spiegelt sich bei der Bestimmung von Körper- und Herzgewicht im TAC-Modell wider. Es zeigte sich zwar keine Veränderung des Körpergewichts verglichen mit der Kontrollgruppe (Sham-Modell), allerdings war insgesamt das Herzgewicht im TAC-Modell signifikant höher als in der Kontrollgruppe im Sham-Modell. Dass dies CaMKII-abhängig ist, zeigten Backs et al. (2008), da in einem Modell des CaMKII-Knockouts keine signifikanten Veränderungen nach TAC-Intervention auftauchten. In Zusammenschau sprechen diese Ergebnisse für eine CaMKII-abhängige kardiale Hypertrophie im TAC-Modell.

#### **4.2 Die Exposition von Exenatid steigert die diastolische Relaxation in gesunden Kardiomyozyten- Auswirkungen auf die Funktion der SERCA**

Die Relaxationszeit des Kalziumtransienten gilt als Maß für die Funktion der SERCA (Maier et al., 2003). Die CaMKII phosphoryliert Phospholamban an Threonin 17 und führt zu einem Verlust der Inhibitionswirkung von Phospholamban auf die SERCA, sodass es zu einer vermehrten SERCA-Aktivität kommt (Le Peuch et al., 1979).

Eine chronische Aktivierung der CaMKII hingegen, wie es bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz der Fall ist, führt langfristig zu einem veränderten Verhältnis von Phospholamban und der SERCA. Das Expressionslevel der SERCA sowie die Aktivität der SERCA werden reduziert (Hasenfuss et al., 1994). Es kommt konsekutiv zu einer Reduktion der diastolischen Kalziumaufnahme in das SR (Bers, 2001). Jedoch führt die Phosphorylierung von Phospholamban an Threonin 17 durch die CaMKII zu einer Reduktion der inhibitorischen Wirkung von Phospholamban auf die SERCA, sodass zunächst deren Aktivität erhöht wird (Mattiazzi & Kranias, 2014). Insgesamt verschiebt sich jedoch das Verhältnis von Phospholamban und SERCA und es kommt durch diese Mechanismen zu einem verminderten Kalziumgehalt im SR durch eine

verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über die SERCA. Konsekutiv führt dies zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols.

Die Ergebnisse der Messungen in kultivierten Kardiomyozyten mit Exenatid zeigen einen signifikanten Unterschied der Relaxationszeit des Kalziumtransienten unter basalen Bedingungen. In der CASK-Kontrollgruppe kommt es nach Superfusion mit der Normaltyrode zu einer signifikanten Verkürzung der RT 80 im Vergleich zum CASK-KO. Dies spricht für eine vermehrte Exenatid-induzierte CASK-abhängige Aktivität der SERCA unter basalen Bedingungen.

Unklar ist jedoch, ob dieser Effekt einzig über die CaMKII vermittelt wird, da deren Aktivität unter basalen Bedingungen herunterreguliert ist. Ergebnisse von Dineen (Dineen et al., 2015) zeigten die Wirkung von Exenatid auf die SERCA unter reduzierter CaMKII-Aktivität. Sie konnten nachweisen, dass eine direkte Interaktion zwischen Exenatid und der SERCA erfolgt.

Eine Steigerung der Kalziumtransienten und des Kalziumgehalts im SR wurde in HL-1 Vorhofmyozyten gezeigt. Trotz unverändertem Expressionslevel der SERCA durch Exenatid, wurde ein signifikant vermindertes Phospholamban gefunden, welches die SERCA-Aktivität erhöht (J.-H. Huang et al., 2016) und somit insgesamt eine CaMKII-unabhängige Wirkung von Exenatid auf Kardiomyozyten zeigt.

Interessanterweise konnte nach Superfusion von Isoprenalin, einhergehend mit einer gesteigerten CaMKII-Aktivität, keine Veränderung der RT 80 in mit Exenatid-kultivierten Kardiomyozyten der CASK-Kontrollgruppe im Vergleich zum CASK-KO gezeigt werden. Im murinen Modell der transversen Aortenkonstriktion (TAC-Modell) erzielt die Zellkultur mit Exenatid ebenfalls keine signifikante Veränderung der RT 80. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der veränderten intrazellulären Signalwege. Eine mögliche Erklärung, dass Exenatid keine statistisch signifikante Wirkung zeigen konnte, wäre ein inadäquater Stressreiz der Kardiomyozyten induziert durch Isoprenalin oder im TAC-Modell. Klinisch entwickelt sich eine Herzinsuffizienz in der Regel über Jahre, sodass die hier genutzten Modelle nicht ausreichen oder eine stärkere Stressreaktion durch höhere Konzentration oder Exposition der Stressoren notwendig wäre.

Zudem ist die Expression der SERCA bei vermehrter CaMKII-Aktivität reduziert. Zwar erfolgt eine Phosphorylierung von PLB durch die CaMKII, welche zu einer verminderten Inhibitionswirkung auf die SERCA führt, jedoch kommt es insgesamt zu einer reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR (Mustroph et al., 2021). Dies spricht

ebenfalls für eine verminderte Wirkung von Exenatid auf die Funktion der SERCA. Hingegen konnte in einem weiteren herzinsuffizienten Tiermodell die Expression der SERCA und phosphoryliertem PLB durch Exenatid erhöht werden (Chen et al., 2017), sodass die diastolische Kalziumaufnahme in das SR erhöht werden konnte. Diese Daten entstammen einer *in vivo* Studie, bei der die CaMKII-Aktivität durch Exenatid ohne Beteiligung der CASK reduziert wird.

#### **4.3 Die Exposition mit dem GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid führt CASK-vermittelt zu einer Steigerung der systolischen Funktion**

Zhu et al. zeigten, dass Exenatid die CASK-Expression im Pankreas steigert und die Exenatid-vermittelte Insulinsekretion über die CASK vermittelt wird (Zhu et al., 2014). Eine Expression der CASK in Kardiomyozyten konnte bereits nachgewiesen werden (Eichel et al., 2016; Leonoudakis et al., 2004). Die Rolle und die Wirkung der kardial exprimierten CASK insbesondere auf die Aktivität der CaMKII und die mögliche Relevanz in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Bei der Entwicklung und dem Fortschreiten der Herzinsuffizienz ist nicht nur die Expression der CaMKII erhöht, sondern auch die CaMKII-abhängige Phosphorylierung der Kalzium-regulierenden Proteine. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten zeigen, dass die CASK in murinen Kardiomyozyten mit der CaMKII als Schlüsselenzym der Herzinsuffizienz interagiert. Ein Fehlen der CASK in Kardiomyozyten (CASK-KO) resultiert in einer erhöhten Aktivität der CaMKII durch Threonin 286-Phosphorylierung. Dies resultiert wiederum in einer vermehrten Phosphorylierung der RyR2, sodass das Kalziumleck aus dem SR erhöht wird und die systolische Kalziumtransientenamplitude (als Maß für die systolische Kalziumfreisetzung) aus dem SR vermindert ist (Mustroph et al., 2021). In Kardiomyozyten der CASK-Kontrollgruppe existiert eine signifikant reduzierte Phosphorylierung an Threonin 286 und nachfolgend eine signifikant gesteigerte systolische Kalziumtransientenamplitude aufgrund des verminderten Kalziumlecks aus dem SR bei verminderter Phosphorylierung der RyR2.

Die hier vorgelegte Arbeit liefert mechanistische Erklärungen für diese Beobachtung. Die gesteigerte CASK-Expression führt über eine verminderte Phosphorylierung der RyR2 zu einer signifikant gesteigerten systolischen Kalziumfreisetzung durch ein reduziertes Kalziumleck aus dem SR.

In hier aufbauenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass es in der CASK-Kontrollgruppe nach 24 h-Zellkultur mit dem GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid zu einer Reduktion der Phosphorylierung der stimulatorischen T286-Domäne sowie zu einer Steigerung der Phosphorylierung der inhibitorischen T305-Domäne der CaMKII $\delta$  kommt. In der vorliegenden Arbeit wird dies untermauert. Es zeigt, dass die Modulation der CaMKII-Aktivität durch Exenatid abhängig von der CASK-Expression in Kardiomyozyten ist (Mustroph et al., 2021).

Die CaMKII-abhängigen Effekte auf Ionenkanäle und Signalproteine scheinen vor allem unter pathophysiologischen Bedingungen bei einer vermehrten  $\beta$ -adrenergen Stimulation oder im Modell der artifiziellen Nachlasterhöhung relevant zu sein, da in den Experimenten besonders starke Effekte nachgewiesen werden konnten.

Während in der CASK-Kontrollgruppe demonstriert werden konnte, dass nach Superfusion mit Isoprenalin eine signifikante Steigerung der Kalziumtransientenamplitude erreicht wurde (Mustroph et al., 2021), konnte ein ähnlicher Effekt durch Exenatid nicht nachgewiesen werden. Die 24 h-Zellkultur mit Exenatid konnte interessanterweise nach Superfusion mit Isoprenalin keine signifikante Steigerung der systolischen Kalziumtransientenamplitude erzielen. Dies könnte an der Herunterregulierung des RyR2 liegen, die bei vermehrter CaMKII-Aktivität auftritt, sodass insgesamt weniger Kalzium in der Systole aus dem SR ausgeschüttet werden kann. Fraglich interagiert Exenatid unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation nicht nur über die CASK, sondern über einen noch nicht identifizierten Signalweg und zeigt keinen positiven Effekt auf die Herunterregulierung des RyR2. Zudem lassen die Ergebnisse weiterhin die Frage offen, ob die kurzzeitige  $\beta$ -adrenerge Stimulation auf zellulärer Ebene eine ausreichend starke Stressreaktion auf die Kardiomyozyten ausübt, sodass Exenatid im kurzzeitigen Setting keinen Vorteil bietet.

Im murinen TAC-Modell mit einer erhöhten Nachlast hingegen zeigt sich eine erhöhte systolische Kalziumtransientenamplitude im Vergleich zum Sham-Modell. Durch die erhöhte CaMKII-Aktivität im TAC-Modell kommt es zu einer Phosphorylierung der RyR2, die die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 und demnach das diastolische Kalziumleck aus dem SR erhöht, sodass es zu einer verminderten Kalziumtransientenamplitude kommen sollte. Meine Ergebnisse zeigen, dass die Zellkultur mit Exenatid in der Lage ist, diese Effekte unter pathophysiologischen Stressbedingungen, wie etwa bei einer Herzinsuffizienz oder einer erhöhten CaMKII-

Aktivität, zu kompensieren. Dadurch steigt die systolische Kalziumfreisetzung im TAC-Modell.

Dies ist zurückzuführen auf eine signifikant verminderte T286-Phosphorylierung im TAC-Modell nach Zellkultur mit Exenatid, die eine verminderte CaMKII-Aktivität zeigt, resultierend in einem reduzierten Kalziumleck durch eine verminderte RyR2-Phosphorylierung (Mustroph et al., 2021). Zudem zeigen weitere Arbeiten, dass Exenatid direkt die Phosphorylierung der RyR2 reduzieren kann und somit das Kalziumleck reduziert. Dies ist vor allem im herzinsuffizienten Infarkt-Modell nachzuweisen (Chen et al., 2017). Zudem wurde gezeigt, dass Exenatid die Phosphorylierung der CaMKII als auch der Phosphorylierungsstelle der CaMKII der RyR2 an Serin2814 signifikant reduziert, ohne dass Exenatid positive Wirkung auf die Proteinlevel der RyR2 hat. Da die Ergebnisse in der CASK-Kontrollgruppe identisch waren, könnte die Regulation der CaMKII-Aktivität und die damit verbundene reduzierte Phosphorylierung der RyR2 über die vermehrte CASK-Expression der entscheidende Signalweg sein.

#### **4.4 Einfluss von Exenatid auf den Kalziumgehalt im sarkoplasmatischen Retikulum**

In der CASK-Kontrollgruppe konnte in der Zellkultur mit exenatidhaltigem Medium sowohl basal als auch nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation durch Superfusion mit Isoprenalin eine Steigerung des SR-Kalziumgehalts im Vergleich zum CASK-KO nachgewiesen werden. Dies kann sowohl auf ein reduziertes Kalziumleck aus dem SR als auch auf eine vermehrte Kalziumaufnahme in das SR zurückzuführen sein.

Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin weisen isolierte Kardiomyozyten aus CASK-KO Mäusen eine erhöhte CaMKII-Aktivität auf, einhergehend mit einer gesteigerten Phosphorylierung der RyR2 (Mustroph et al., 2021). Eine vermehrte Öffnungswahrscheinlichkeit durch phosphorylierte RyR2 erhöht das diastolische Kalziumleck aus dem SR, sodass der Kalziumgehalt im SR durch spontane Kalziumfreisetzungen reduziert wird. Dies führt zu einer verminderten systolischen Kalziumfreisetzung und einem insgesamt geringeren Kalziumgehalt im SR. In Kardiomyozyten der CASK-Kontrollgruppe findet eine verminderte Phosphorylierung der RyR2 aufgrund der verminderten CaMKII-Aktivität statt, sodass unter  $\beta$ -adrenerger

Stimulation ein erhöhter Kalziumgehalt im sarkoplasmatischen Retikulum nach Zellkultur mit Exenatid im Vergleich zur Vehikellösung zu finden ist. Diese Ergebnisse korrelieren jedoch mit der fehlenden Steigerung der systolischen Kalziumfreisetzung nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation in der CASK-Kontrollgruppe nach Zellkultur mit Exenatid. Mustroph et al. (2021) konnten in der CASK-Kontrollgruppe nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation ein signifikant vermindertes diastolisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck aus dem SR nachweisen. Die Zellkultur mit Exenatid kann dieses diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck durch eine CASK-vermittelte verminderte RyR2 Phosphorylierung reduzieren und dadurch den Kalziumgehalt im SR erhöhen. Eine signifikante Steigerung der systolischen Kalziumfreisetzung aus dem SR wurde jedoch nicht beobachtet.

Daten aus dem TAC-Modell bestätigen diesen Mechanismus. Eine vermehrte Aktivität der CaMKII in Kardiomyozyten im TAC-Modell wurde bereits gezeigt. *In vitro* Experimente mit Kardiomyozyten im TAC-Modell, die mit dem GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid behandelt wurden, zeigten eine signifikant verminderte Autophosphorylierung an Threonin 286 der CaMKII, einhergehend mit einer verminderten Aktivität (Mustroph et al., 2021). Diese verminderte Aktivität lässt sich mit meinen Ergebnissen vereinbaren. Unter dem Einfluss von Exenatid wird das Kalziumleck aus dem SR signifikant reduziert, was prognostische Relevanz haben und die Progredienz der Herzinsuffizienz beeinflussen könnte. Exenatid ist in der Lage, die diastolischen Kalziumverhältnisse aufrechtzuerhalten.

#### **4.5 Exenatid als möglicher Ansatz bei der Therapie der Herzinsuffizienz**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Inkretinimetikum Exenatid, welches bereits in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt wird, auf molekularer Ebene einen Effekt auf die Kalziumhomöostase der murinen ventrikulären Kardiomyozyten hat.

Patienten, die an einem Diabetes mellitus leiden, weisen ein erhöhtes Risiko auf, kardiovaskulären Erkrankungen zu entwickeln. Die Substanzgruppe der GLP-1-Rezeptoragonisten hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Ihre Kardioprotektion mit einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse ist unabhängig von einem bestehenden Diabetes mellitus in klinischen Studien bestätigt worden.

Zhu et al. haben bereits 2014 gezeigt, dass Exenatid über die Stimulation des GLP-1-Rezeptors die Expression der CASK in pankreatischem Gewebe steigert. Diesen Effekt konnten wir erstmals in murinen Kardiomyozyten nachweisen. Des Weiteren konnte über die Steigerung der CASK-Expression nach Exposition mit Exenatid über einen Zeitraum von 24 h die Aktivität der CaMKII in Kardiomyozyten signifikant reduziert werden. Auf diese Weise bietet Exenatid einen Ansatz die Aktivität der CaMKII zu reduzieren und einer kontraktile Dysfunktion sowie einer erhöhten Arrhythmieneigung vorzubeugen.

Exenatid wird als Medikament im klinischen Alltag bereits eingesetzt, jedoch ist es hinsichtlich des Auftretens von MACE-Ereignissen den anderen GLP-1-Rezeptoragonisten in klinischen Studien unterlegen. Hier bleibt die Frage, ob das Patientenkollektiv dieser klinischen Studien (LEADER, SELECT und EXSCEL) miteinander direkt zu vergleichen ist und es Untergruppen bzw. Individuen gibt, die von einer zusätzlichen Therapie mit Exenatid profitieren würden.

Daher wäre es von Relevanz, die molekularen Mechanismen weiter zu erforschen, um Möglichkeiten zu schaffen, die Progression der Herzinsuffizienz zu begrenzen.

#### **4.6 Limitationen dieser Arbeit**

Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass der GLP-1-Rezeptoragonist Exenatid Einfluss auf die CaMKII-Aktivität aufweist. Klinische Daten zeigten teils kardioprotektive Eigenschaften durch die Therapie mit Exenatid, die jedoch nicht vollständig und volumnäßig eine Signifikanz aufweisen und nicht auf molekularer Ebene erklärt werden können.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Exenatid die CaMKII-Aktivität moduliert. Diese Modulation ist abhängig von der CASK-Expression in Kardiomyozyten. Insgesamt zeigte jedoch die Zellkultur deutliche Unterschiede in der Qualität und Quantität der Kardiomyozyten unabhängig, ob diese mit der Exenatidlösung oder mit der Vehikellösung kontrolliert wurden, sodass teils nur geringe n-Zahlen möglich waren. Zudem zeigen meine Daten zwar, dass die Exenatid-Exposition einen positiven Effekt auf die Kalziumhomöostase hat, jedoch fehlen noch weitere Daten, die den genauen Signalweg über die CASK identifizieren, als auch die direkten Protein-Protein Interaktionen der CASK auf die Zielproteine der CaMKII wie Phospholamban, RyR2 als auch die SERCA. Hierfür wäre eine Co-Immunpräzipitation notwendig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen Ansatz für die kardiovaskulären Endpunkte in klinischen Studien. Diese beziehen sich jedoch nur auf *in vitro* Daten und sind daher nur begrenzt einsetzbar, für weitere Erkenntnisse werden Experimente mit *in vivo* Daten nötig sein. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Stressoren eine nicht ausreichende Wirkung auf die Kardiomyozyten zeigten, sodass die Zellkultur mit Exenatid keine signifikante Wirkung erzielen konnte.

#### **4.7 Zusammenfassung**

GLP-1-Rezeptoragonisten erlangen, unabhängig von der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2, zunehmend an Aufmerksamkeit. Dies ist zurückzuführen auf ihre, in klinischen Studien gezeigte, kardiovaskuläre Sicherheit und ihre kardioprotektiven Eigenschaften unabhängig der diabetischen Stoffwechsellage.

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals die Wirkung des GLP-1-Rezeptoragonisten Exenatid auf das MAGUK-Protein CASK in isolierten murinen ventrikulären Kardiomyozyten und den Einfluss auf die CaMKII, welche als Schlüsselenzym für die Entwicklung und die Progression der Herzinsuffizienz gilt. Es konnten wesentliche Details zu deren Rolle in der Regulation des intrazellulären Kalziumhaushaltes ermittelt werden.

Die CaMKII nimmt eine wichtige Rolle im Kalziumhaushalt der Kardiomyozyten ein. Durch die Phosphorylierung verschiedener regulatorischer Proteine, darunter der L-Typ-Kalziumkanal, der Ryanodinrezeptor und Phospholamban beeinflusst sie die Kalziumfreisetzung, -aufnahme und -speicherung.

Im Rahmen der Herzinsuffizienz wird die CaMKII hochreguliert und vermehrt aktiviert, sodass es zu Veränderungen im Kalziumhaushalt kommt, welche schlussendlich zu einer Verringerung der systolischen Kalziumfreisetzung aus dem SR in Folge von einem vermehrten Auftreten von Kalziumsparks führt, als auch mit einem verringerten Kalziumgehalt im SR einhergeht.

Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass die CASK regulatorische Eigenschaften auf die CaMKII aufweist. Zudem wurde nachgewiesen, dass CASK unter Exenatid-Exposition nicht-kardialem Gewebe vermehrt exprimiert wird.

Gegenstand dieser Arbeit war demnach die Wirkung von Exenatid auf die CASK in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten zu untersuchen und dessen Einfluss auf die Regulation der CaMKII-Aktivität zu identifizieren. Nach meiner Hypothese führt eine

Exposition von Exenatid in Kardiomyozyten, die die CASK exprimieren, zu einer Steigerung der systolischen Kalziumtransientenamplitude, einer Steigerung des SR-Kalziumgehalts sowie einer Verbesserung der diastolischen Relaxation in Kardiomyozyten.

Die Exposition mit Exenatid konnte CASK-abhängig eine Steigerung der systolischen Kalziumtransientenamplitude als auch im sarkoplasmatischen Retikulum einen erhöhten Kalziumgehalt hervorrufen. Dies ist zurückzuführen auf eine CASK-abhängige Reduktion des Kalziumlecks. Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin als auch im Modell der artifiziellen Nachlasterhöhung (TAC-Modell) in murinen Kardiomyozyten konnte dies ebenfalls nachgewiesen werden. Weiter zeigt sich ein signifikant gesteigerter SR-Kalziumgehalt in Kardiomyozyten der CASK-Kontrollgruppe, welches im CASK-KO nicht dargestellt werden kann.

Interessanterweise zeigt die Exposition mit Exenatid keine Verbesserung auf die diastolische Kalziumelimination der Kardiomyozyten.

Zusammenfassend fügt sich die vorliegende Arbeit in die bereits bestehenden Kenntnisse einer kardioprotektiven Wirkung der GLP-1-Rezeptoragonisten ein. Exenatid zeigt positive Effekte auf die Kalziumhomöostase in Kardiomyozyten. Insgesamt gibt diese Arbeit Hinweise auf eine CASK-abhängige Regulation der CaMKII-Aktivität, die durch Exposition mit Exenatid positiv beeinflusst wird. Diese Ergebnisse eröffnen neue Möglichkeiten für die Entwicklung gezielter Therapien der Herzinsuffizienz, die auf einer verbesserten Kalziumhomöostase und einer Reduktion der CaMKII-Aktivität basieren.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ackerman, M. J., & Clapham, D. E. (1997). Ion Channels-basic science and clinical disease. *The New England Journal of Medicine*, 336(22), 1575–1586.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199705293362207>
- Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M., & Pogwizd, S. M. (2005). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circulation Research*, 97(12), 1314–1322.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000194329.41863.89>
- Anderson, J. M. (1996). Cell signalling: MAGUK magic. *Current Biology : CB*, 6(4), 382–384. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00501-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00501-8)
- Anderson, M. E., Braun, A. P., Schulman, H., & Premack, B. A. (1994). Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca<sup>2+</sup>-induced enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup>-current in rabbit ventricular myocytes. *Circulation Research*, 75(5), 854–861. <https://doi.org/10.1161/01.RES.75.5.854>
- Atasoy, D., Schoch, S., Ho, A., Nadasy, K. A., Liu, X., Zhang, W., Mukherjee, K., Nosyreva, E. D., Fernandez-Chacon, R., Missler, M., Kavalali, E. T., & Südhof, T. C. (2007). Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2525–2530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611003104>
- Backs, J., Backs, T., Neef, S., Kreusser, M. M., Lehmann, L. H., Patrick, D. M., Grueter, C. E., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J. A., Katus, H. A., Bassel-Duby, R., Maier, L. S., & Olson, E. N. (2009). The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2342–2347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813013106>
- Baier, M. J., Klatt, S., Hammer, K. P., Maier, L. S., & Rokita, A. G. (2020). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is essential in hyperacute pressure overload. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 138, 212–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.12.002>
- Beckendorf, J., van den Hoogenhof, M. M. G., & Backs, J. (2018). Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart. *Basic Research in Cardiology*, 113(4), 29. <https://doi.org/10.1007/s00395-018-0688-8>

- Bers, D. M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force (Second Edition)*.
- Bers, D. M., & Bridge, J. H. (1989). Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity. *Circulation Research*, 65(2), 334–342.  
<https://doi.org/10.1161/01.res.65.2.334>
- Chen, J., Wang, D., Wang, F., Shi, S., Chen, Y., Yang, B., Tang, Y., & Huang, C. (2017). Exendin-4 inhibits structural remodeling and improves Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rats with heart failure via the GLP-1 receptor through the eNOS/cGMP/PKG pathway. *Peptides*, 90, 69–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.02.008>
- Chen, J., Xu, S., Zhou, W., Wu, L., Wang, L., & Li, W. (2020). Exendin-4 Reduces Ventricular Arrhythmia Activity and Calcium-Sparks-Mediated Sarcoplasmic Reticulum Ca-Leak in Rats with Heart Failure. *International Heart Journal*, 61(1), 145–152. <https://doi.org/10.1536/ihj.19-327>
- Dawber, T. R. (1980). *The Framingham Study*. Harvard University Press.  
<https://doi.org/10.4159/harvard.9780674492097>
- Dineen, S. L., McKenney, M. L., Bell, L. N., Fullenkamp, A. M., Schultz, K. A., Alloosh, M., Chalasani, N., & Sturek, M. (2015). Metabolic Syndrome Abolishes Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonist Stimulation of SERCA in Coronary Smooth Muscle. *Diabetes*, 64(9), 3321–3327. <https://doi.org/10.2337/db14-1790>
- Dzhura, I., Wu, Y., Colbran, R. J., Balser, J. R., & Anderson, M. E. (2000). Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nature Cell Biology*, 2(3), 173–177. <https://doi.org/10.1038/35004052>
- Edman, C. F., & Schulman, H. (1994). Identification and Characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1221(1), 89–101. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90221-6](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90221-6)
- Eichel, C. A., Beurriot, A., Chevalier, M. Y. E., Rougier, J.-S., Louault, F., Dilanian, G., Amour, J., Coulombe, A., Abriel, H., Hatem, S. N., & Balse, E. (2016). Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates NaV1.5 Channel in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 119(4), 544–556.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309254>

- Erickson, J. R. (2014). Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Frontiers in Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00059>
- Erickson, J. R., Joiner, M. A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C. V., Bartlett, R. K., Lowe, J. S., O'Donnell, S. E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M. C., Zimmerman, K., Ham, A.-J. L., Weiss, R. M., Spitz, D. R., Shea, M. A., Colbran, R. J., Mohler, P. J., & Anderson, M. E. (2008). A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*, 133(3), 462–474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.048>
- Erickson, J. R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., Copeland, R. J., Despa, F., Hart, G. W., Ripplinger, C. M., & Bers, D. M. (2013). Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*, 502(7471), 372–376. <https://doi.org/10.1038/nature12537>
- European Medicines Agency. (2012). *Byetta : EPAR - Summary for the public*.
- Fabiato, A., & Fabiato, F. (1975). Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *The Journal of Physiology*, 249(3), 469–495.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1975.sp011026>
- Francis, G. S., McDonald, K. M., & Cohn, J. N. (1993). Neurohumoral activation in preclinical heart failure. Remodeling and the potential for intervention. *Circulation*, 87(5 Suppl), IV90-6.
- Franzini-Armstrong, C., Kenney, L. J., & Varriano-Marston, E. (1987). The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *The Journal of Cell Biology*, 105(1), 49–56. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.1.49>
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W.-N. U., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium*, 27(2), 97–106. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0095>
- Haghghi, K., Kolokathis, F., Pater, L., Lynch, R. A., Asahi, M., Gramolini, A. O., Fan, G.-C., Tsipras, D., Hahn, H. S., Adamopoulos, S., Liggett, S. B., Dorn, G. W., MacLennan, D. H., Kremastinos, D. T., & Kranias, E. G. (2003). Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 869–876. <https://doi.org/10.1172/JCI17892>
- Hasenfuss, G., Reinecke, H., Studer, R., Meyer, M., Pieske, B., Holtz, J., Holubarsch, C., Posival, H., Just, H., & Drexler, H. (1994). Relation between myocardial

- function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation Research*, 75(3), 434–442.  
<https://doi.org/10.1161/01.res.75.3.434>
- Hata, Y., Butz, S., & Südhof, T. C. (1996). CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(8), 2488–2494.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02488.1996>
- Heerspink, H. J. L., Stefánsson, B. V., Correa-Rotter, R., Chertow, G. M., Greene, T., Hou, F.-F., Mann, J. F. E., McMurray, J. J. V., Lindberg, M., Rossing, P., Sjöström, C. D., Toto, R. D., Langkilde, A.-M., Wheeler, D. C., & DAPA-CKD Trial Committees and Investigators. (2020). Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *The New England Journal of Medicine*, 383(15), 1436–1446. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024816>
- Herold, G. (2019). *Innere Medizin*. Herold, G.
- Hodge, J. J. L., Mullaseril, P., & Griffith, L. C. (2006). Activity-Dependent Gating of CaMKII Autonomous Activity by Drosophila CASK. *Neuron*, 51(3), 327–337.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.020>
- Holman, R. R., Bethel, M. A., Mentz, R. J., Thompson, V. P., Lokhnygina, Y., Buse, J. B., Chan, J. C., Choi, J., Gustavson, S. M., Iqbal, N., Maggioni, A. P., Marso, S. P., Öhman, P., Pagidipati, N. J., Poulter, N., Ramachandran, A., Zinman, B., & Hernandez, A. F. (2017). Effects of Once-Weekly Exenatide on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 377(13), 1228–1239. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1612917>
- Hori, Y., Gu, X., Xie, X., & Kim, S. K. (2005). Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. *PLoS Medicine*, 2(4), e103.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020103>
- Hsueh, Y.-P. (2006). The Role of the MAGUK Protein CASK in Neural Development and Synaptic Function. *Current Medicinal Chemistry*, 13(16), 1915–1927.  
<https://doi.org/10.2174/092986706777585040>
- Huang, J.-H., Chen, Y.-C., Lee, T.-I., Kao, Y.-H., Chazo, T.-F., Chen, S.-A., & Chen, Y.-J. (2016). Glucagon-like peptide-1 regulates calcium homeostasis and electrophysiological activities of HL-1 cardiomyocytes. *Peptides*, 78, 91–98.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.02.007>

- Huang, T., Chang, H., & Hsueh, Y. (2010). CASK phosphorylation by PKA regulates the protein–protein interactions of CASK and expression of the NMDAR2b gene. *Journal of Neurochemistry*, 112(6), 1562–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06569.x>
- Hudmon, A., & Schulman, H. (2002). Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Biochemical Journal*, 364(Pt 3), 593–611. <https://doi.org/10.1042/BJ20020228>
- Kannel, W. B., Hjortland, M., & Castelli, W. P. (1974). Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. *The American Journal of Cardiology*, 34(1), 29–34. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(74\)90089-7](https://doi.org/10.1016/0002-9149(74)90089-7)
- Kao, J. P., Harootunian, A. T., & Tsien, R. Y. (1989). Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by Fluo-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 8179–8184.
- Kirchhefer, U., Schmitz, W., Scholz, H., & Neumann, J. (1999). Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovascular Research*, 42(1), 254–261. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00296-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00296-x)
- Kong, H., Jones, P. P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H. J., & Chen, S. R. W. (2008). Caffeine induces Ca<sup>2+</sup> release by reducing the threshold for luminal Ca<sup>2+</sup> activation of the ryanodine receptor. *Biochemical Journal*, 414(3), 441–452. <https://doi.org/10.1042/BJ20080489>
- Kosiborod, M. N., Abildstrøm, S. Z., Borlaug, B. A., Butler, J., Rasmussen, S., Davies, M., Hovingh, G. K., Kitzman, D. W., Lindegaard, M. L., Møller, D. V., Shah, S. J., Treppendahl, M. B., Verma, S., Abhayaratna, W., Ahmed, F. Z., Chopra, V., Ezekowitz, J., Fu, M., Ito, H., ... Petrie, M. C. (2023). Semaglutide in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction and Obesity. *New England Journal of Medicine*, 389(12), 1069–1084. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2306963>
- Kranias, E. G., & Di Salvo, J. (1986). A phospholamban protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(22), 10029–10032.
- Lai, Y., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1986). Autophosphorylation reversibly regulates the Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependence of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent

- protein kinase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), 4253–4257. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4253>
- Le Peuch, C. J., Haiech, J., & Demaille, J. G. (1979). Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium–calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry*, 18(23), 5150–5157. <https://doi.org/10.1021/bi00590a019>
- Leonoudakis, D., Conti, L. R., Radeke, C. M., McGuire, L. M. M., & Vandenberg, C. A. (2004). A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 19051–19063.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M400284200>
- Lincoff, A. M., Brown-Frandsen, K., Colhoun, H. M., Deanfield, J., Emerson, S. S., Esbjerg, S., Hardt-Lindberg, S., Hovingh, G. K., Kahn, S. E., Kushner, R. F., Lingvay, I., Oral, T. K., Michelsen, M. M., Plutzky, J., Tornøe, C. W., & Ryan, D. H. (2023). Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Obesity without Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 389(24), 2221–2232.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2307563>
- Maier, L. S., & Bers, D. M. (2002). Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(8), 919–939. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2038>
- Maier, L. S., Zhang, T., Chen, L., DeSantiago, J., Brown, J. H., & Bers, D. M. (2003). Transgenic CaMKII $\delta$  Overexpression Uniquely Alters Cardiac Myocyte Ca<sup>2+</sup>-Handling. *Circulation Research*, 92(8), 904–911.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000069685.20258.F1>
- Malik, & Hodge. (2014). CASK and CaMKII function in Drosophila memory. *Frontiers in Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00178>
- Marso, S., Baeres, F. M. M. , Bain, S. C. , Goldman, B., Husain, M., Nauck, M. A. , Poulter, N. R. , Pratley, R. E. , Thomsen, A. B., Buse, J. B. , & et al. (2020). Effects of Liraglutide on Cardiovascular Outcomes in Patients With Diabetes With or Without Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 75(10), 1128–1141. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.12.063>
- Marso S, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JF, Nauck MA, Nissen SE, Pocock S, Poulter NR, Ravn LS, Steinberg WM, Stockner M, Zinman B, Bergenfelz RM, Buse JB, & et al. (2016). Liraglutide and cardiovascular

- outcomes in type 2 diabetes. In *Drug and Therapeutics Bulletin* (Vol. 54, Issue 9, p. 101). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1603827>
- Mattiazzi, A., & Kranias, E. G. (2014). The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. In *Frontiers in Pharmacology: Vol. 5 JAN*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00005>
- Maximov, A., & Bezprozvanny, I. (2002). Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(16), 6939–6952. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-16-06939.2002>
- McMurray, J. J. V., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M. A., Jaarsma, T., Køber, L., Lip, G. Y. H., Maggioni, A. Pietro, Parkhomenko, A., Pieske, B. M., Popescu, B. A., Rønnevik, P. K., Rutten, F. H., ... ESC Committee for Practice Guidelines. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*, 33(14), 1787–1847. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs104>
- Mitchell, R. D., Simmerman, H. K., & Jones, L. R. (1988). Ca<sup>2+</sup> binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(3), 1376–1381.
- Mukherjee, K., Sharma, M., Urlaub, H., Bourenkov, G. P., Jahn, R., Südhof, T. C., & Wahl, M. C. (2008). CASK functions as a Mg<sup>2+</sup>-independent neurexin kinase. *Cell*, 133(2), 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.036>
- Mustroph, J., Sag, C. M., Bähr, F., Schmidtmann, A.-L., Gupta, S. N., Dietz, A., Islam, M. M. T., Lücht, C., Beuthner, B. E., Pabel, S., Baier, M. J., El-Armouche, A., Sossalla, S., Anderson, M. E., Möllmann, J., Lehrke, M., Marx, N., Mohler, P. J., Bers, D. M., ... Wagner, S. (2021). Loss of CASK Accelerates Heart Failure Development. *Circulation Research*, 128(8), 1139–1155. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.318170>
- Nathanson, D., Ullman, B., Löfström, U., Hedman, A., Frick, M., Sjöholm, A., & Nyström, T. (2012). Effects of intravenous Exenatide in type 2 diabetic patients with congestive heart failure: a double-blind, randomised controlled clinical trial

- of efficacy and safety. *Diabetologia*, 55(4), 926–935.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-011-2440-x>
- Nauck, M. A., Quast, D. R., Wefers, J., & Meier, J. J. (2021). GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes - state-of-the-art. *Molecular Metabolism*, 46, 101102. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101102>
- Onouchi, T., Sueyoshi, N., Ishida, A., & Kameshita, I. (2012). Phosphorylation and activation of nuclear Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP-N/PPM1E) by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I (CaMKI). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(4), 703–709.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.062>
- Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., & Yue, D. T. (1999). Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> Sensor for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-Type Calcium Channels. *Neuron*, 22(3), 549–558. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80709-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80709-6)
- Pogwizd, S. M., Qi, M., Yuan, W., Samarel, A. M., & Bers, D. M. (1999). Upregulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger Expression and Function in an Arrhythmogenic Rabbit Model of Heart Failure. *Circulation Research*, 85(11), 1009–1019.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.85.11.1009>
- Ravassa, S., Zudaire, A., & Díez, J. (2012). GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. *Cardiovascular Research*, 94(2), 316–323.  
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvs123>
- Rellos, P., Pike, A. C. W., Niesen, F. H., Salah, E., Lee, W. H., von Delft, F., & Knapp, S. (2010). Structure of the CaMKII delta/Calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biology*, 8(7), e1000426. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000426>
- Riddle, M. C., Henry, R. R., Poon, T. H., Zhang, B., Mac, S. M., Holcombe, J. H., Kim, D. D., & Maggs, D. G. (2006). Exenatide elicits sustained glycaemic control and progressive reduction of body weight in patients with type 2 diabetes inadequately controlled by sulphonylureas with or without metformin. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 22(6), 483–491.  
<https://doi.org/10.1002/dmrr.646>
- Rockman, H. A., Ross, R. S., Harris, A. N., Knowlton, K. U., Steinhelper, M. E., Field, L. J., Ross, J., & Chien, K. R. (1991). Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 88(18), 8277–8281.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8277>
- Sauer, B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(6), 2087–2096. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.6.2087-2096.1987>
- Seferović, P. M., Petrie, M. C., Filippatos, G. S., Anker, S. D., Rosano, G., Bauersachs, J., Paulus, W. J., Komajda, M., Cosentino, F., de Boer, R. A., Farmakis, D., Doehner, W., Lambrinou, E., Lopatin, Y., Piepoli, M. F., Theodorakis, M. J., Wiggers, H., Lekakis, J., Mebazaa, A., ... McMurray, J. J. V. (2018). Type 2 diabetes mellitus and heart failure: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure*, 20(5), 853–872. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1170>
- Shah, K. S., Xu, H., Matsouaka, R. A., Bhatt, D. L., Heidenreich, P. A., Hernandez, A. F., Devore, A. D., Yancy, C. W., & Fonarow, G. C. (2017). Heart Failure With Preserved, Borderline, and Reduced Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(20), 2476–2486.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.08.074>
- Shattock, M. J., Ottolia, M., Bers, D. M., Blaustein, M. P., Boguslavskyi, A., Bossuyt, J., Bridge, J. H. B., Chen-Izu, Y., Clancy, C. E., Edwards, A., Goldhaber, J., Kaplan, J., Lingrel, J. B., Pavlovic, D., Philipson, K., Sipido, K. R., & Xie, Z.-J. (2015). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the heart. *The Journal of Physiology*, 593(6), 1361–1382. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282319>
- Simmerman, H. K., Collins, J. H., Theibert, J. L., Wegener, A. D., & Jones, L. R. (1986). Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(28), 13333–13341.
- Suckow, A. T., Comoletti, D., Waldrop, M. A., Mosedale, M., Egodage, S., Taylor, P., & Chessler, S. D. (2008). Expression of neurexin, neuroligin, and their cytoplasmic binding partners in the pancreatic beta-cells and the involvement of neuroligin in insulin secretion. *Endocrinology*, 149(12), 6006–6017.  
<https://doi.org/10.1210/en.2008-0274>
- Tada, M., Kirchberger, M. A., & Katz, A. M. (1975). Phosphorylation of a 22,000-Dalton Component of the Cardiac Sarcoplasmic Reticulum by Adenosine 3' : S-

- Monophosphate-dependent Protein Kinase\*. In *Tam JOURNAL OF BIOLO~ICALCEE~~I/WRY* (Vol. 250, Issue 7).
- Tobimatsu, T., & Fujisawa, H. (1989). Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(30), 17907–17912.
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E. C. L., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S. K. G., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J. H., Bers, D. M., & Maier, L. S. (2006). Ca<sub>2+</sub>/Calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup>-channels. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3127–3138.  
<https://doi.org/10.1172/JCI26620>
- Wang, D., Luo, P., Wang, Y., Li, W., Wang, C., Sun, D., Zhang, R., Su, T., Ma, X., Zeng, C., Wang, H., Ren, J., & Cao, F. (2013). Glucagon-like peptide-1 protects against cardiac microvascular injury in diabetes via a cAMP/PKA/Rho-dependent mechanism. *Diabetes*, 62(5), 1697–1708. <https://doi.org/10.2337/db12-1025>
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2004). Ca<sub>2+</sub>/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation Research*, 94(6).  
<https://doi.org/10.1161/01.res.0000125626.33738.e2>
- Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C., & Jones, L. R. (1991). Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 11144–11152.
- World Health Organisation. (1999). *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its complications*.
- Yamauchi, T. (2005). Neuronal Ca<sub>2+</sub>/Calmodulin-dependent protein kinase II-discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(8), 1342–1354.  
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.1342>
- Zhang, T., Johnson, E. N., Gu, Y., Morissette, M. R., Sah, V. P., Gigena, M. S., Belke, D. D., Dillmann, W. H., Rogers, T. B., Schulman, H., Ross, J., & Brown, J. H. (2002a). The cardiac-specific nuclear delta B isoform of Ca<sub>2+</sub>/Calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1261–1267.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M108525200>

- Zhang, T., Johnson, E. N., Gu, Y., Morissette, M. R., Sah, V. P., Gigena, M. S., Belke, D. D., Dillmann, W. H., Rogers, T. B., Schulman, H., Ross, J., & Brown, J. H. (2002b). The cardiac-specific nuclear  $\delta$ B isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1261–1267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108525200>
- Zhang, T., Maier, L. S., Dalton, N. D., Miyamoto, S., Ross, J., Bers, D. M., & Brown, J. H. (2003). The  $\delta$ C Isoform of CaMKII Is Activated in Cardiac Hypertrophy and Induces Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circulation Research*, 92(8), 912–919. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000069686.31472.C5>
- Zhang, Z., Li, W., Yang, G., Lu, X., Qi, X., Wang, S., Cao, C., Zhang, P., Ren, J., Zhao, J., Zhang, J., Hong, S., Tan, Y., Burchfield, J., Yu, Y., Xu, T., Yao, X., James, D., Feng, W., & Chen, Z. (2020). CASK modulates the assembly and function of the Mint1/Munc18-1 complex to regulate insulin secretion. *Cell Discovery*, 6(1), 92. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00216-3>
- Zheng, C.-Y., Seabold, G. K., Horak, M., & Petralia, R. S. (2011). MAGUKs, synaptic development, and synaptic plasticity. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 17(5), 493–512. <https://doi.org/10.1177/1073858410386384>
- Zhu, Z.-Q., Wang, D., Xiang, D., Yuan, Y.-X., & Wang, Y. (2014). Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase is involved in exendin-4-induced insulin secretion in INS-1 cells. *Metabolism*, 63(1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.09.009>

## **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 die 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.

## **Danksagung**

Ich möchte mich von Herzen bei denjenigen Personen bedanken, ohne deren Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht verwirklicht werden konnte.

Zunächst gilt mein Dank Herrn. Prof. Dr. Lars Maier für die Überlassung des Themas, welches es mir ermöglichte, an seiner Klinik zu forschen und zu promovieren. Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Stefan Wagner. Auf dessen besondere Expertise und kontinuierliche Unterstützung mit der Durchführung und der Korrektur dieser Arbeit ich vollumfänglich zählen konnte. Ich danke Herrn PD Dr. med. Julian Mustroph, dem wissenschaftlichen Betreuer meiner Arbeit.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Thomas Sowa und Felicia Radtke. Durch ihre umfassende Hilfe und Unterstützung konnte ich wichtige grundlagenwissenschaftliche Fähigkeiten ausarbeiten und durchführen.

Ebenso gilt mein Dank dem Forschungsrat der Fakultät für Medizin für die Verleihung des Promotionsstipendiums zur Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Für die unermüdliche Unterstützung und Liebe auf allen Lebenswegen bin ich meinen Eltern und meinen beiden Brüdern, Christian und David, sehr dankbar. Ich kann mich glücklich schätzen, Teil dieser Familie zu sein.

Zutiefst dankbar bin ich Daniel, der immer für mich da ist. Für sein Verständnis, seine Hilfe und die bedingungslose Liebe, die er mir gibt.

## **Publikationsliste**

### Journalpublikationen als Co-Autorin

Mustroph J, Sag CM, Bähr F, Schmidtmann AL, Gupta SN, Dietz A, Islam MMT, **Lücht C**, Beuthner BE, Pabel S, Baier MJ, El-Armouche A, Sossalla S, Anderson ME, Möllmann J, Lehrke M, Marx N, Mohler PJ, Bers DM, Unsöld B, He T, Dewenter M, Backs J, Maier LS, Wagner S.: **Loss of CASK Accelerates Heart Failure Development**, 2021.

Mustroph J, **Lücht CM**, Wagemann O, Sowa T, Hammer KP, Sag CM, Tarnowski D, Holzamer A, Pabel S, Beuthner BE, Sossalla S, Maier LS, Wagner S.: **Empagliflozin enhances human and murine cardiomyocyte glucose uptake by increased expression of GLUT1**, 2019.

Mustroph J, Wagemann O, **Lücht CM**, Trum M, Hammer KP, Sag CM, Lebek S, Tarnowski D, Reinders J, Perbellini F, Terracciano C, Schmid C, Schopka S, Hilker M, Zausig Y, Pabel S, Sossalla ST, Schweda F, Maier LS, Wagner S.: **Empagliflozin reduces Ca/CaM-modulin-dependent kinase II activity in isolated ventricular cardiomyocytes**, 2018.

Lebek S, Plößl A, Baier M, Mustroph J, Tarnowski D, **Lücht CM**, Schopka S, Flörchinger B, Schmid C, Zausig Y, Pagratis N, Marchand B, Koltun DO, Hung WK, Ahmadyar S, Belardinelli L, Maier LS, Wagner S.: **The novel CaMKII inhibitor GS-680 reduces diastolic SR Ca leak and prevents CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity**, 2018.

### Vortragspräsentationen

**C.-M. Lücht**, J. Mustroph, L. Schöberl, L. S. Maier, S. Wagner: **Exenatide increases CASK-expression in ventricular cardiomyocytes leading to decreased Calcium/calmodulin kinase II activity and sarcoplasmic reticulum Ca-leak**, DGK Jahrestagung 2018