

Veränderungen im myozytären Kalzium- kreislauf und in der Sarkomerfunktion im nicht-ischämischen Gewebe nach Myokardinfarkt

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annette Kronenbitter

aus Heidelberg

Düsseldorf, Juni 2018

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Joachim P. Schmitt
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz
Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2018

Meiner Familie

„Der Fortschritt lebt vom Austausch des Wissens.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Akuter Myokardinfarkt	1
1.2 Zeitraum nach einem Myokardinfarkt	2
1.3 Ischämisches Gebiet, Randzone und nicht-ischämisches Gebiet	3
1.3.1 Ischämisches Gebiet.....	4
1.3.2 Randzone	5
1.3.3 Nicht-ischämisches Gebiet (<i>remote</i> Gebiet)	6
1.3.4 Ischämiephase.....	7
1.4 Versuchsmodelle für I/R	7
1.4.1 Permanente Ligatur	7
1.4.2 Ischämieinduktion bei offenem Thorax.....	8
1.4.3 Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax	8
1.5 Myozytärer Ca²⁺-Kreislauf	10
1.5.1 Regulatoren des Ca ²⁺ -Kreislaufes	12
1.6 Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten	15
1.6.1 Sarkomerfunktion nach I/R.....	17
1.7 Diabetes mellitus	18
1.7.1 Diabetes mellitus Typ II als Risikofaktor für Myokardinfarkt.....	19
1.7.2 Mausmodell für Diabetes mellitus Typ II.....	19
1.8 Fragestellung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Tierversuche	23
2.1.1 Verwendete Tiere.....	23
2.1.1.1 Gewicht- und Glukosebestimmung der db/db-Mäuse	23
2.1.2 Einleitung des Myokardinfarktes	23
2.1.2.1 Voroperation.....	24
2.1.2.2 Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax	25
2.1.2.3 Überprüfung der LAD-Okklusion mittels EKG	26
2.1.3 Probenentnahme und Aufarbeitung.....	27
2.1.4 Histologie.....	27
2.1.4.1 WGA Färbung	27
2.2 Messungen an isolierten Kardiomyozyten	28
2.2.1 Isolation von Kardiomyozyten aus dem nicht-ischämischen Gebiet mittels retrograder Perfusion	28
2.2.2 Messung des myozytären Ca ²⁺ -Kreislaufes.....	30
2.2.2.1 Fluoreszenzindikator Fura-2 Acetoxymethylester	30
2.2.2.2 Probenvorbereitung	31
2.2.2.3 Versuchsaufbau	32
2.2.2.4 Messung der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentrationen	32

2.2.2.5	Messung der Gesamtmenge Ca^{2+} im SR durch Stimulation mit Koffein.....	33
2.2.2.6	Messung des SR- Ca^{2+} <i>leaks</i>	34
2.2.3	Messung der Sarkomerlänge	35
2.2.4	Auswertung der Ca^{2+} -Transienten und der Sarkomerfunktion	36
2.2.4.1	Ermittlung der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs im Zytosol.....	37
2.2.4.2	Ermittlung der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol	37
2.2.4.3	Ermittlung der Kontraktionsgeschwindigkeit der Sarkomere	38
2.2.4.4	Ermittlung der Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere	39
2.3	Proteinanalyse	40
2.3.1	<i>Western blotting</i> : Arbeitsschritte.....	40
2.3.1.1	Herstellung der Herzlysate	40
2.3.1.2	Membranpräparationen	40
2.3.1.3	Quantitative Erfassung der Proteinmenge mit der BCA-Methode	41
2.3.1.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.3.1.5	Western blot	41
2.3.1.6	Film	43
2.3.2	PKA-Aktivitätsbestimmung	43
2.3.2.1	Herstellung der Herzlysate	43
2.3.2.2	Quantitative Erfassung der Proteinmenge mit der BCA-Methode	43
2.3.2.3	ELISA.....	43
2.4	Statistik	45
3	Ergebnisse	46
3.1	24 Stunden nach I/R	46
3.1.1	Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme	47
3.1.1.1	Amplitude	48
3.1.1.2	Koffein-induzierte Amplitude.....	49
3.1.1.3	Untersuchungen des Ca^{2+} <i>leaks</i>	50
3.1.1.4	Koffein-induzierte Amplitude mit und ohne Tetracain.....	51
3.1.1.5	Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs.....	52
3.1.1.6	Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination.....	53
3.1.1.7	Koffein-induzierte Ca^{2+} -Elimination	54
3.1.2	Sarkomerfunktion.....	55
3.1.2.1	Kontraktile Amplitude.....	56
3.1.2.2	Kontraktionsgeschwindigkeit	57
3.1.2.3	Relaxationsgeschwindigkeit	58
3.1.3	Proteinexpression von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes.....	59
3.1.4	Aktivitätsmessung von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes.....	60
3.1.5	PKA-Aktivität und Expression.....	63
3.1.6	Phosphatase-Aktivität im <i>remote</i> Myokard	64
3.2	10 Tage nach I/R	65
3.2.1	Größe und Geschwindigkeiten intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme	66
3.2.1.1	Amplitude	67
3.2.1.2	Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs.....	68
3.2.1.3	Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination.....	69
3.2.2	Sarkomerfunktion.....	70
3.2.2.1	Kontraktile Amplitude.....	70
3.2.2.2	Kontraktionsgeschwindigkeit	71
3.2.2.3	Relaxationsgeschwindigkeit	72
3.2.3	Proteinexpression von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes.....	73
3.2.4	Aktivitätsmessung von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes.....	75
3.2.5	Phosphorylierung von Troponin I	78

3.3 Diabetes mellitus Typ II	79
3.3.1 Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca ²⁺ -Ströme	80
3.3.1.1 Amplitude	81
3.3.1.2 Geschwindigkeit des Ca ²⁺ -Anstiegs.....	82
3.3.1.3 Geschwindigkeit der Ca ²⁺ -Elimination.....	83
3.3.2 Sarkomerfunktion.....	84
3.3.2.1 Kontraktile Amplitude.....	84
3.3.2.2 Kontraktionsgeschwindigkeit	85
3.3.2.3 Relaxationsgeschwindigkeit	86
3.4 I/R und Diabetes mellitus Typ II	87
3.4.1 Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca ²⁺ -Ströme	88
3.4.1.1 Amplitude	89
3.4.1.2 Geschwindigkeit des Ca ²⁺ -Anstiegs.....	90
3.4.1.3 Geschwindigkeit der Ca ²⁺ -Elimination.....	91
3.4.2 Sarkomerfunktion.....	92
3.4.2.1 Kontraktile Amplitude.....	93
3.4.2.2 Kontraktionsgeschwindigkeit	94
3.4.2.3 Relaxationsgeschwindigkeit	95
4 Diskussion	97
4.1 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	97
4.2 24 Stunden nach I/R	97
4.2.1 Bedeutung und Funktion Ca ²⁺ -regulierender Proteine nach MI	98
4.2.2 Normalisierung der verlangsamten intrazellulären Ca ²⁺ -Ströme durch β-adrenerge Stimulation.....	101
4.2.3 Beeinträchtigte Sarkomerfunktion im <i>remote</i> Myokard	102
4.2.4 Unveränderte Proteinexpression von Regulatoren des myozytären Ca ²⁺ -Kreislaufes.....	104
4.2.5 Verminderte PLN-Phosphorylierung im <i>remote</i> Myokard.....	104
4.3 10 Tage nach I/R	106
4.3.1 Verlangsamte intrazelluläre Ca ²⁺ -Ströme 10 Tage nach I/R in <i>remote</i> Kardiomyozyten	107
4.3.2 Keine Normalisierung der verlangsamten Ca ²⁺ -Ströme durch β-adrenerge Stimulation	109
4.3.3 Unveränderte Sarkomerfunktion in <i>remote</i> Kardiomyozyten.....	109
4.3.4 Unveränderte Proteinexpressionen von Regulatoren des Ca ²⁺ -Kreislaufes..	110
4.3.5 Unveränderte Aktivität von Regulatoren des Ca ²⁺ -Kreislaufes.....	111
4.4 Diabetes mellitus Typ II	112
4.4.1 Verlangsamte Ca ²⁺ -Ströme in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoff- wechsellage	112
4.4.2 Normale Sarkomerfunktion in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage.....	114
4.5 I/R in Kombination mit Diabetes mellitus Typ II	115
4.5.1 Verlangsamte intrazelluläre Ca ²⁺ -Ströme in <i>remote</i> Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage 24 Stunden nach I/R.....	115
4.5.2 Beeinträchtigte Sarkomerfunktion in <i>remote</i> Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage 24 Stunden nach I/R.....	116
4.6 Ausblick	116
5 Zusammenfassung	119
6 Summary	120

Tabellen	121
Literaturverzeichnis	128
Originalarbeiten	138
Kongressbeiträge	139
Lebenslauf	140
Danksagung	141
Eidesstattliche Versicherung	142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die 10 häufigsten Todesursachen 2015	2
Abbildung 2: Schematische Einteilung des Herzens in remote Gebiet, Randzonengebiet und ischämisches Gebiet.....	4
Abbildung 3: Färbung eines Herzschnittes aus dem ischämischen Gebiet 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion (I/R)	5
Abbildung 4: Färbung eines Herzschnittes aus der nicht-ischämischen (remote) Region 24 Stunden nach I/R.....	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes in einer ventrikulären Kardiomyozyte.....	10
Abbildung 6: Freisetzung des Ca^{2+} aus dem SR ins Zytosol über RyR2.....	13
Abbildung 7: Darstellung der SERCA2a und des PLN-Monomers mit den Bindungspartnern HAX-1 und S100A1	14
Abbildung 8: Repräsentative Sarkomereinheit, schematische Darstellung	16
Abbildung 9: Myofilamente während Diastole und Systole	17
Abbildung 10: Zeitverlauf der Durchführung des Myokardinfarktes.....	24
Abbildung 11: Darstellung der LAD Ligatur modifiziert nach Nossuli et al.[34].....	26
Abbildung 12: Ausschnitt eines Maus-Elektrokardiogramms (EKG)	27
Abbildung 13: Kanüliertes Herz.....	29
Abbildung 14: Fluoreszenzanregungsspektren von Fura-2 bei verschiedenen Ca^{2+} - Konzentrationen	31
Abbildung 15: Repräsentativer Ca^{2+} -Transient	33
Abbildung 16: Repräsentativer Ca^{2+} -Transient nach Stimulation mit Koffein.....	34
Abbildung 17: Messung des SR Ca^{2+} leaks.....	35
Abbildung 18: Auswahl der Kardiomyozyte und der Sarkomere für die Messung der Ca^{2+} -Transienten und der Sarkomerfunktion	36
Abbildung 19: Repräsentative Sarkomerfunktion.....	36
Abbildung 20: Bestimmung der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs	37
Abbildung 21: Bestimmung der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination	38
Abbildung 22: Bestimmung der Kontraktionsgeschwindigkeit aus der Sarkomerfunktion ..	38
Abbildung 23: Bestimmung der Relaxationsgeschwindigkeit aus der Sarkomerfunktion....	39
Abbildung 24: Schematischer Aufbau des Transferstapels.....	42
Abbildung 25: ELISA Verfahrensschritte	44
Abbildung 26: Repräsentative Darstellung für die Ca^{2+} -Transienten einer Kontroll- Kardiomyozyte und einer remote Kardiomyozyte 24 Stunden nach I/R während eines kontraktiven Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0)	47
Abbildung 27: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R.....	48
Abbildung 28: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach Koffeinstimulation 24 Stunden nach I/R.....	49

Abbildung 29: Differenz basale Ca^{2+} -Konzentration mit und ohne Tetracain	50
Abbildung 30: Koffein-induzierte Amplitude, mit und ohne Tetracain	51
Abbildung 31: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R	52
Abbildung 32: Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R	53
Abbildung 33: Koffein-induzierte Ca^{2+} -Elimination 24 Stunden nach I/R	54
Abbildung 34: Repräsentative Aufzeichnung für die Sarkomerlänge einer remote Kardiomyozyte 24 Stunden nach I/R (rot) und einer Kontroll-Kardiomyozyte (schwarz) unter Basalbedingungen während eines kontraktile Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0)	55
Abbildung 35: Kontraktile Amplitude nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R	56
Abbildung 36: Kontraktionsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R	57
Abbildung 37: Relaxationsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R	58
Abbildung 38: Expressionen von Regulatoren des Ca^{2+} -Kreislaufes 24 Stunden nach I/R	59
Abbildung 39: Proteinexpression von HAX-1 und S100A1 24 Stunden nach I/R	60
Abbildung 40: Phosphorylierung der PLN Monomere an Ser16 24 Stunden nach I/R	61
Abbildung 41: Phosphorylierung des RyR2 an Ser2808 und Phosphorylierung des cTnl an Ser23/24 24 Stunden nach I/R	62
Abbildung 42: Phosphorylierung des PLN an Thr17 und Phosphorylierung des RyR2 an Ser2814 24 Stunden nach I/R	63
Abbildung 43: PKA-Aktivität und Expression (PKA katalytische Untereinheit α) 24 Stunden nach I/R	64
Abbildung 44: Repräsentative Aufzeichnung eines Ca^{2+} -Transienten einer remote Kardiomyozyte 10 Tage nach I/R (rot) und einer Kontroll-Kardiomyozyte (schwarz) unter Basalbedingungen während eines kontraktile Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0)	66
Abbildung 45: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation sowie nach Koffeinstimulation, 10 Tage nach I/R	67
Abbildung 46: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R	68
Abbildung 47: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R	69
Abbildung 48: Kontraktile Amplitude nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R	70
Abbildung 49: Kontraktionsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R	71
Abbildung 50: Relaxationsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R	72
Abbildung 51: Expressionen von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes 10 Tage nach I/R	73

Abbildung 52: Das Verhältnis SERCA2a zu PLN-Monomeren 10 Tage nach I/R	74
Abbildung 53: Proteinexpression von HAX-1 und S100A1 10 Tage nach I/R	75
Abbildung 54: Phosphorylierung der PLN-Monomere an Ser16 und Thr17 10 Tage nach I/R.....	76
Abbildung 55: Phosphorylierung des RyR2 an Ser2808 und an Ser2814 10 Tage nach I/R	77
Abbildung 56: Expression von cTnI und Phosphorylierung des cTnI an Ser23/24 10 Tage nach I/R.....	78
Abbildung 57: Blutzuckerkonzentration und Gewicht der (db/db) Mäuse mit diabetischer Stoffwechsellaage im Vergleich mit (db/+) Wurfgeschwister-tieren ohne diabetische Stoffwechsellaage.....	79
Abbildung 58: Repräsentative Aufzeichnung für die Ca^{2+} -Transienten einer Kardiomyozyte mit diabetischer Stoffwechsellaage (rot) und einer Kardiomyozyte ohne diabetische Stoffwechsellaage (schwarz) unter Basalbedingungen während eines kontraktile Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0).....	80
Abbildung 59: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation der Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage (db/db) im Vergleich zu Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage (db/+).....	81
Abbildung 60: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage (db/db) und von Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage (db/+).....	82
Abbildung 61: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage (db/db) und von Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage (db/+).....	83
Abbildung 62: Kontraktile Amplitude nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage (db/db) und ohne diabetische Stoffwechsellaage (db/+)	84
Abbildung 63: Kontraktionsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer (db/db) und nicht diabetischer (db/+) Kardiomyozyten.....	85
Abbildung 64: Relaxationsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer (db/db) und Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage (db/+).....	86
Abbildung 65: Blutzuckerkonzentration und Gewicht der Tiere mit diabetischer Stoffwechsellaage (db/db) im Vergleich mit den Wurfgeschwistertieren ohne diabetische Stoffwechsellaage (db/+) 24 Stunden nach I/R.....	87
Abbildung 66: Repräsentative Darstellung eines Ca^{2+} -Transienten einer remote Kardiomyozyte mit diabetischer Stoffwechsellaage 24 Stunden nach I/R (rot) und einer remote Kardiomyozyte ohne diabetische Stoffwechsellaage (schwarz) unter Basalbedingungen während eines kontraktile Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0).....	88
Abbildung 67: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von remote Kardiomyozyten mit diabetischer	

Stoffwechsellage (db/db) und ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+) 24 Stunden nach I/R.....	89
Abbildung 68: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von remote Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (db/db) und von remote Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+) 24 Stunden nach I/R.....	90
Abbildung 69: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (db/db) und von remote Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+) 24 Stunden nach I/R.....	91
Abbildung 70: Repräsentative Darstellung für die Sarkomerlänge einer remote Kardiomyozyte mit diabetischer Stoffwechsellage 24 Stunden nach I/R (rot) und einer remote Kardiomyozyte ohne diabetische Stoffwechsellage 24 Stunden nach I/R (schwarz) während eines kontraktile Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0).....	92
Abbildung 71: Kontraktile Amplitude nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von remote Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (db/db) und von remote Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+) 24 Stunden nach I/R.....	93
Abbildung 72: Kontraktionsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von remote Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (db/db) und von remote Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+) 24 Stunden nach I/R.....	94
Abbildung 73: Relaxationsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von remote Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (db/db) und von remote Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+) 24 Stunden nach I/R.....	95
Abbildung 74: PKA-abhängige Phosphorylierung des PLN an Ser16 durch Stimulation einer ventrikulären remote Kardiomyozyte mit Isoproterenol 24 Stunden nach I/R.....	102
Abbildung 75: SERCA2a/PLN-Komplex in einer Kontroll-Kardiomyozyte (links) und in einer remote Kardiomyozyte 24 Stunden nach I/R (rechts). Im Vergleich zu der Kontroll-Kardiomyozyte ist in der remote Kardiomyozyte die PLN-Phosphorylierung durch eine höhere PP-Aktivität vermindert, die SERCA2a-Aktivität sinkt und weniger Ca^{2+} gelangt in das SR.....	106
Abbildung 76: Erhöhte PP-Aktivität 24 Stunden nach I/R und unveränderte PKA-abhängige PLN-Monomer-Phosphorylierung 10 Tage nach I/R im remote Myokard	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Puffer in der Histologie (WGA Färbung).....	121
Tabelle 2: Puffer und Lösungen, die bei der Messung an isolierten Kardiomyozyten (Isolation von Kardiomyozyten) verwendet wurden	121
Tabelle 3: Verwendete Puffer bei der Messung des Ca^{2+} <i>leaks</i>	123
Tabelle 4: Verwendete Puffer in der Proteinanalyse (Herstellung der Herzlysate)	124
Tabelle 5: Verwendete Puffer bei der Proteinanalyse (Herstellung von Membranpräparationen).....	124
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Gele bei der Proteinanalyse (Gelelektrophorese).....	125
Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen bei der Proteinanalyse (Western blot).....	125
Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper bei der Proteinanalyse	126
Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper in der Proteinanalyse	127
Tabelle 10: Verwendeter Puffer bei Proteinanalysen (PKA Aktivitätsbestimmung ELISA)	127

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
AMI	akuter Myokardinfarkt
ATP	Adenosintriphosphat
β -AR	β -adrenerger Rezeptor
Ca^{2+}	Kalzium
CaMKII	Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cTnl	kardiales Troponin I
<i>db/db</i>	Leptinrezeptor defiziente homozygote Maus
<i>db/+</i>	Leptinrezeptor defiziente heterozygote Maus
DdH ₂ O	Millipore-Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ELISA	Enzymimmunoassay
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G _s	G _s -Protein gekoppelter Rezeptor
H ₂ O	Wasser
HAX-1	HS-1 assoziiertes Protein X-1
I-1	Inhibitor-1
I/R	Ischämie/Reperfusion
LAD	linke vordere Koronararterie
MI	Myokardinfarkt
MyBPC	Myosin-bindendes Protein C
ms	Millisekunden
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
Na ⁺	Natrium
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NRG-1	Neuregulin-1
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLN	Phospholamban
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMCA	sarkolemmale Kalzium-ATPase
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2a	Proteinphosphatase 2a
rhNRG-1	rekombinant humanes Neuregulin-1
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodin-Rezeptor

SEM	Standardfehler
SERCA2a	<i>sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a</i>
Ser16	Serin16
Ser2808	Serin2808
Ser2814	Serin2814
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
T1DM	Diabetes mellitus Typ I
T2DM	Diabetes mellitus Typ II
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta1</i>
Thr17	Threonin17
Thr35	Threonin35
Tm	Tropomyosin
TnC	Troponin C
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TnT	Troponin T
WGA	<i>wheat-germ-agglutinin</i>

1 Einleitung

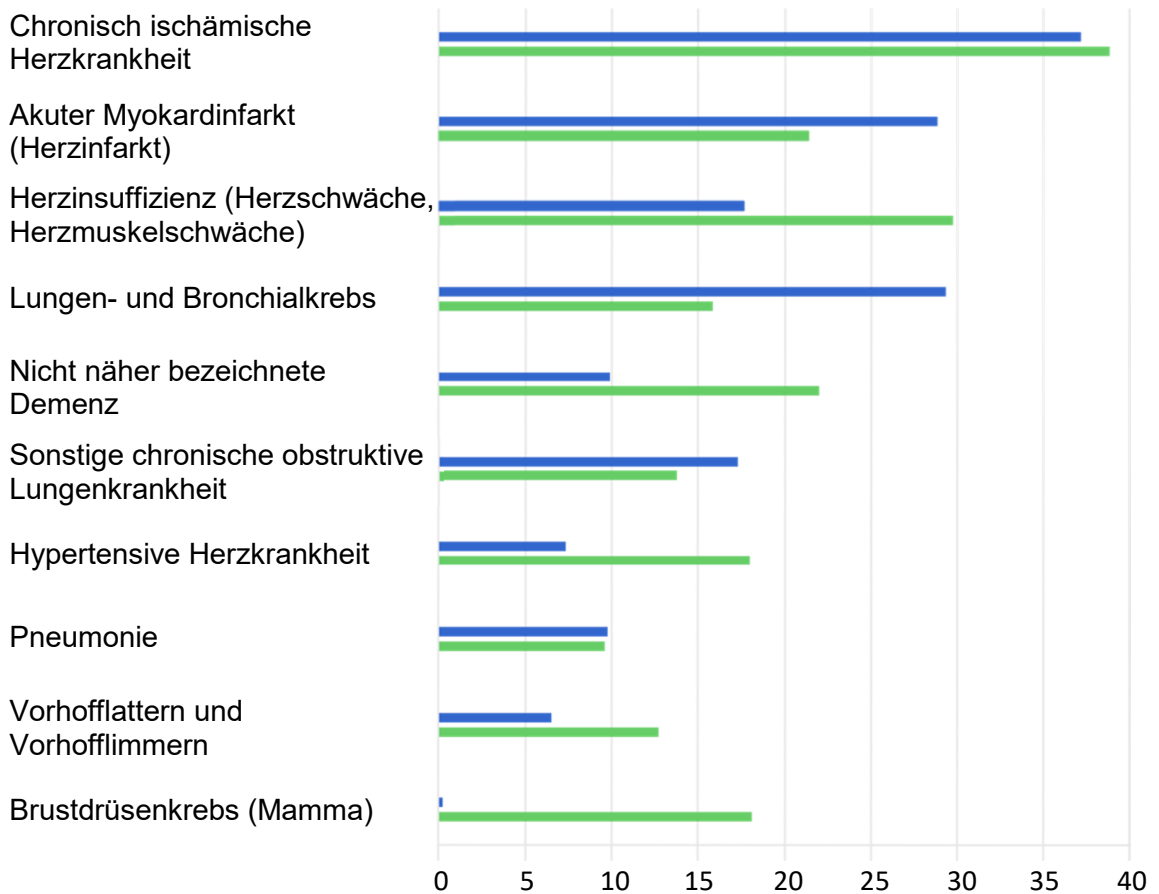
1.1 Akuter Myokardinfarkt

Ein Myokardinfarkt (Herzinfarkt) ist eine irreversible Verletzung des Myokards (Herzgewebe), die durch anhaltende Ischämie und Hypoxie verursacht wird [1]. Er äußert sich meist durch starke Brustschmerzen, Schwitzen oder Atembeschwerden. Risikofaktoren sind Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus, Übergewicht sowie ungesunde Ernährung und Rauchen. Während eines Myokardinfarktes (MI) kommt es zum Verschluss eines Blutgefäßes, meist ausgelöst durch einen atherosklerotischen Plaque [2]. Atherosklerose ist eine sich über die Jahre entwickelnde Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems, die zur Instabilität der Gefäßwände führt. Ein erhöhter Cholesterinspiegel führt zur Ansammlung von Lipiden in den Gefäßwänden mit der Folge von Entzündungsreaktionen. In der Regel entsteht ein MI durch Plaqueruptur. Hier entsteht dann durch Thrombozytenaktivierung ein Thrombus, der das Gefäß entweder am Ort des Plaques verschließt oder weiter distal, wenn der Thrombus aufgebrochen ist und rupturiert hat. Ein Bericht des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2017 gibt als häufigste Todesursache in Deutschland für das Jahr 2015 die chronisch ischämische Herzkrankheit an, dicht gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (AMI) und der Herzinsuffizienz (Abbildung 1) [3].

Nach einem Bericht der *European Society of Cardiology* aus dem Jahr 2012 stirbt jeder sechste Europäer und jede siebte Europäerin an einem Myokardinfarkt (MI) [4].

Ein Grund für die hohe Sterblichkeit nach MI ist, dass meist zu viel Zeit vergeht, bis die Patienten behandelt werden. Derzeit ist keine Regeneration von abgestorbenem Herzgewebe durch Zellteilung möglich. Daher muss es das Ziel sein, möglichst schnell eine Reperfusion des unterversorgten Myokards zu gewährleisten.

■ Männlich ■ Weiblich



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017

Abbildung 1: Die 10 häufigsten Todesursachen 2015

1.2 Zeitraum nach einem Myokardinfarkt

Sobald das unterversorgte Gewebe nach Eröffnung des Koronararterienverschlusses wieder reperfundiert wird, kommt es durch Sauerstoffradikale, die während der Ischämie entstanden sind, zur weiteren Schädigung des Myokards [5]. Eine Reperfusion des Gewebes ist jedoch notwendig. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Infarkt-schaden ohne Wiederherstellung der Reperfusion höher ausfällt als mit Reperfusion [6]. Die Zeit während der Reperfusion nach einem MI kann in drei Phasen unterteilt werden.

- *Entzündliche Phase:* 3 bis 72 Stunden nach einem MI beginnt die entzündliche Phase [7]. Die meisten Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) sterben bereits während der ischämischen Phase und kurz danach, also innerhalb der ersten Minuten nach Beginn der Reperfusion. Defekte oder sterbende Kardiomyozyten schütten reaktive Sauerstoffspezies aus [8]. Dadurch werden Entzündungsmediatoren aktiviert, die wiederum neutrophile Zellen rekrutieren, die in das infarzierte Gewebe einwandern [7]. Leukozyten

säubern das infarzierte Gewebe von toten Zellen, beispielsweise von Kardiomyozyten und Überresten der Matrix. Zusätzlich setzt der Tumornekrosefaktor α (TNF α) in Kardiomyozyten apoptotische und nekrotische Prozesse in Gang. Circa 48 bis 72 Stunden nach Reperfusion des ischämischen Gewebes erreicht der durch Nekrose und Apoptose beeinflusste Zelltod sein Maximum und steigt nicht weiter an [8]. Zwei Tage nach MI kommt es zu einer erhöhten Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und zu einer Aktivierung der Myofibroblasten [7]. Außerdem findet eine Degradierung von Typ I- und Typ III-Kollagen statt [9]. Über das weiter entfernt liegende nicht-ischämische Gewebe, auch *remote* Gebiet genannt, und das Verhalten der dort angesiedelten Kardiomyozyten ist in dieser Phase wenig bekannt.

- *Proliferative Phase*: Während der proliferativen Phase, circa 72 Stunden bis 7 Tage nach einem MI, wird die Synthese von Entzündungsmediatoren eingestellt [7]. Während dieses Heilungsprozesses produzieren aktivierte Myofibroblasten vermehrt Kollagen I und III, die für den Erhalt der extrazellulären Matrix sorgen. Tote Kardiomyozyten werden durch Kollagen ersetzt.
- *Reifephase*: 28 Tage nach MI ist das aus apoptotischen Kardiomyozyten und Fibroblasten bestehende nekrotische Gewebe komplett durch fibröses Gewebe ersetzt [7]. Es kommt zur Narbenbildung. Die Kardiomyozyten des benachbarten, dem ischämischen Gebiet direkt anliegenden Gewebes und des nicht-ischämischen Gebietes verändern sich in ihrer Form [10]. Sie wachsen in die Länge und hypertrophieren. Im Laufe der Zeit kommt es beim kardialen Wiederaufbau zur Verdickung der Herzwand [11]. Das Herz wird steifer. Die Folgen sind Hypertrophie und/oder Dilatation bis zur chronischen Herzinsuffizienz [12].

1.3 Ischämisches Gebiet, Randzone und nicht-ischämisches Gebiet

Nach erfolgter Ischämie und eingeleiteter Reperfusion wird das Herz in drei Regionen unterteilt: in das ischämische Gebiet, in die Randzonen und in das weiter entfernt liegende, nicht-ischämische Gebiet. Im Folgenden werden diese drei Regionen kurz charakterisiert (Abbildung 2).

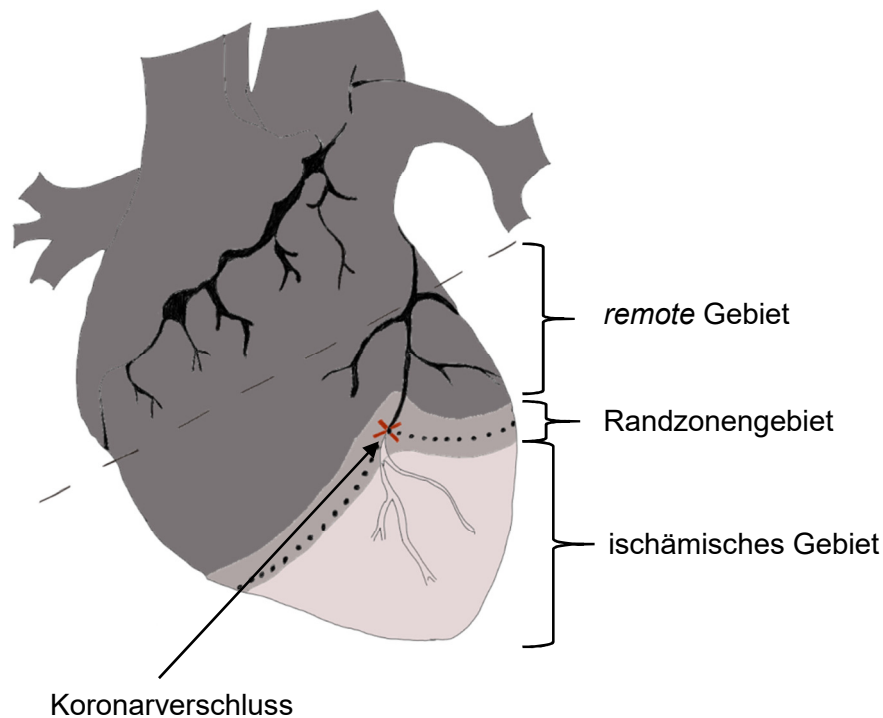


Abbildung 2: Schematische Einteilung des Herzens in *remote* Gebiet, Randzonengebiet und ischämisches Gebiet

1.3.1 Ischämisches Gebiet

Während der Okklusion der linken vorderen Koronararterie (LAD) ist der Blutfluss zum ischämischen Gewebe gestoppt. Zellen in dieser Gegend, zum Beispiel Kardiomyozyten, gehen in einen anaeroben Zustand über. Es kommt zu Nekrose und Apoptose der Kardiomyozyten im ischämischen Gebiet.

Nach erfolgter Ischämie ist es wichtig, dass das Gewebe möglichst schnell wieder reperfundiert und dadurch oxygeniert wird, um die Infarktgröße zu reduzieren, die kontraktile Funktion zu erhalten und hohen Zellverlust abzuwenden [13]. Natrium- und Wasserstoff-Ionen, die sich während der ischämischen Phase in der Kardiomyozyte angesammelt haben, werden beseitigt. Dadurch normalisiert sich auch der pH-Wert wieder. Durch die vorausgegangene Azidose und Hypoxie wird das Komplementsystem aktiviert. Es kommt zur Stimulation von Leukozyten und Endothelzellen [14]. Aktivierte Leukozyten setzen im ischämischen Myokard Interleukine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei. Beispielsweise produzieren Leukozyten vermehrt Stickstoffmonoxid (NO). Dieses reagiert mit Superoxid zu Peroxynitrit, einem stark toxischen Oxidans [14]. Der Anstieg von ROS und Wasserstoffperoxid während der Reperfusionsphase führt zur Peroxidation von Lipiden und Oxidation von Sulfhydrylgruppen [15]. ROS reagieren beispielsweise mit Phospholipiden der Membranen, was zur Instabilität dieser Membranen führt. Es kommt zum Einströmen von Wasser ins Zellinnere. Die Zellen schwellen an. Die Folge ist eine Ruptur

der Zellmembran. Zudem kommt es zur mechanischen Instabilität und zu einer Hyperkontraktur der Kardiomyozyten (näheres hierzu unter Kapitel 1.6) [16]. ROS interagieren vor allem mit Tyrosinresten und verändern die Aktivitäten wichtiger Proteine und Enzyme [15, 17].

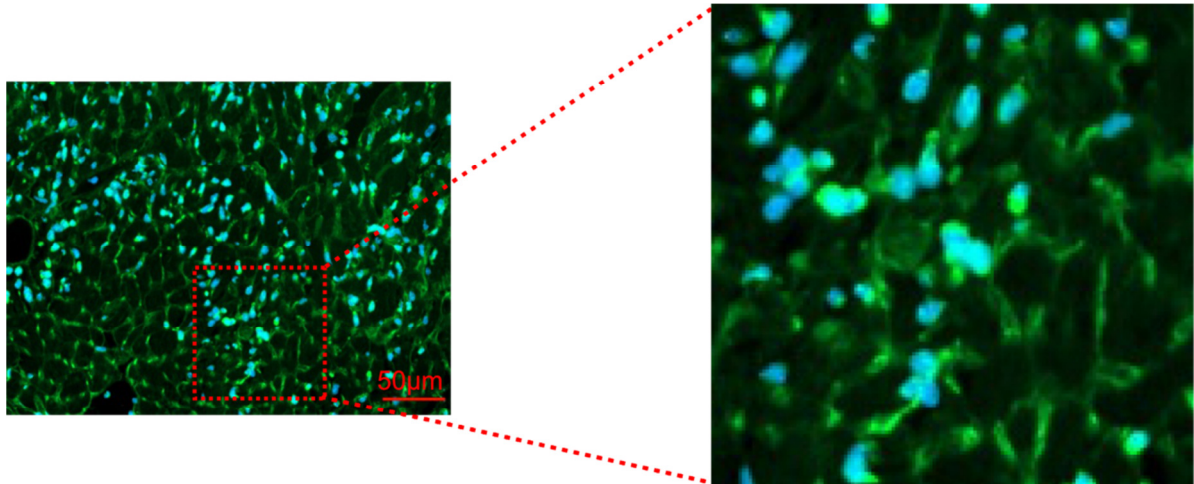


Abbildung 3: Färbung eines Herzschnittes aus dem ischämischen Gebiet 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion (I/R)

Die Zellmembran der Kardiomyozyten ist grün und der Zellkern ist blau gefärbt (2.1.4.1).

Histologisch betrachtet kommt es im ischämischen Areal zum Absterben der Kardiomyozyten, wobei sich die Zellkerne verdichten und schließlich auflösen (Abbildung 3). Die Zellmembran der Kardiomyozyten, hier grün gefärbt, wird insbesondere durch Sauerstoffradikale instabil, durch Wassereinstrom schwillt die Zelle an und die Zellmembran löst sich teilweise auf [16].

Ischämie verursacht auch Veränderungen der kontraktilen Funktion [18]. Während das schlagende Herz sich im ischämischen Zustand befindet, fällt die Kraftentwicklung drastisch ab. Bei länger als 20 Minuten andauerndem ischämischen Zustand kommt es zur kontraktilen Dysfunktion. Der Muskelschaden kann durch eine darauffolgende Reperfusion nicht mehr vollständig behoben werden [19].

1.3.2 Randzone

Das Randzonengewebe grenzt sowohl an das nicht-kontraktile ischämische Myokard als auch an das kontraktile nicht-ischämische Myokard [20]. Während im ischämischen Gewebe der koronare Blutfluss unterbrochen ist, ist dies in der Randzone nicht der Fall. Diese Geweberegion ist von der Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung nicht betroffen. Kardiomyozyten in dieser Region sind jedoch über Zellkontakte mit nekrotischen Zellen des Infarktgebietes verbunden. Sie erfahren somit auch oxidativen und nitrosativen Stress. Somit sind auch im Randzonengewebe apoptotische Kardiomyozyten zu finden. Es kommt

auch hier zum Funktionsverlust, Kardiomyozyten hypertrophieren und eine mechanische Dysfunktion im Randzonengebiet ist die Folge.

1.3.3 Nicht-ischämisches Gebiet (*remote* Gebiet)

Das nicht-ischämische Gebiet, häufig auch als *remote* Gebiet bezeichnet, ist das Gewebe, welches nicht von der Ischämie betroffen ist [11, 21]. Es wird weiterhin mit Blut und Nährstoffen versorgt. Es handelt sich nicht um das direkt an das Infarktgebiet angrenzende Gewebe, sondern es ist durch das Randzonengebiet von dem ischämischen Gebiet getrennt (Abbildung 2).

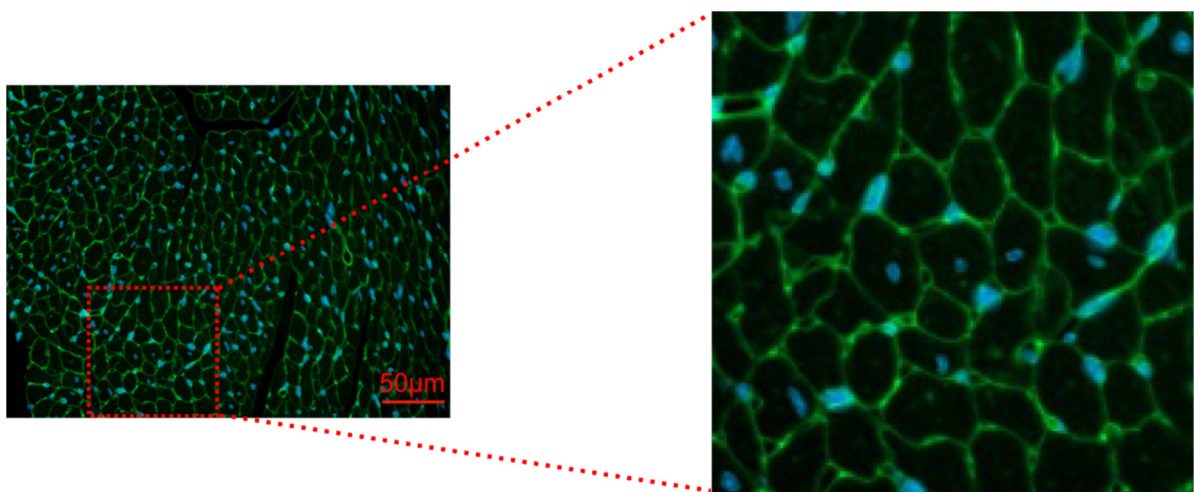


Abbildung 4: Färbung eines Herzschnittes aus der nicht-ischämischen (*remote*) Region 24 Stunden nach I/R

Die Zellmembran der Kardiomyozyten ist grün und der Zellkern ist blau gefärbt (2.1.4.1).

Die Zellkerne der Kardiomyozyten im ischämischen Gebiet sind verdichtet und es kommt zur Auflösung des Zellkerns (Abbildung 3) [6]. Das nicht-ischämische Gewebe dagegen ist von gesundem Myokard morphologisch nicht zu unterscheiden, die Zellwände sind nicht beschädigt und die Zellkerne haben sich nicht aufgelöst (Abbildung 4).

Durch die möglichst zügig nach Ischämie eingeleitete Reperfusion des unterversorgten ischämischen Gewebes werden jedoch Prozesse in Gang gesetzt, die bisher nicht-betroffenen Bereiche des Herzens schädigen können [22]. Aus dem ischämischen Gebiet freigesetzte Metabolite oder freie Sauerstoffradikale können über den Blutfluss auch entfernter liegende, gesunde Gebiete des Herzens erreichen und dort zu Veränderungen führen. Reaktive Sauerstoffspezies können beispielsweise mit Proteinen, Lipiden oder Zuckermolekülen interagieren und somit zu Einschränkungen in Zellen führen. Daher ist auch das *remote* Gewebe dem oxidativen und nitrosativen Stress ausgesetzt. Außerdem verändert sich durch den Funktionsverlust in den ischämischen Herzarealen die mechanische

Belastung des *remote* Myokards [20]. Langfristig verändern sich Kardiomyozyten in ihrer Größe und Form. Kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz nach MI sind die Folgen.

1.3.4 Ischämiephase

Nach einem 30 bis 45-minütigen Verschluss der Koronararterien beginnt der Zelluntergang in den Herzinnenschichten und breitet sich im weiteren Verlauf auf die äußeren Herzschichten aus [5]. Durch den Verschluss der Koronararterien wird die koronare Durchblutung unterbrochen und die betroffenen Teile des Herzens werden nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Die aerobe Energiegewinnung durch die Mitochondrien in den Kardiomyozyten ist eingeschränkt. Die Kardiomyozyten werden mit Na^+ und Ca^{2+} überflutet. Aktivierte Proteasen führen zur Zerstörung der Zellmembran, schließlich kommt es zum Zelltod [23]. Die Ursachen für diesen Tod auf zellulärer und subzellulärer Ebene sind jedoch bis heute nicht vollkommen geklärt.

1.4 Versuchsmodelle für I/R

Um die pathophysiologischen Mechanismen nach MI zu verstehen und daraus neue therapeutische Interventionen abzuleiten, gibt es Tierversuchsmodelle, mit denen die Ischämie/Reperfusion (I/R) am Tier möglichst realitätsgetreu zu dem MI des Menschen nachgestellt werden kann [24]. Im Folgenden werden drei dieser Versuchsmodelle kurz erläutert und die bekannten Vor- und Nachteile dargestellt.

1.4.1 Permanente Ligatur

Bei der permanenten Ligatur wird das Versuchstier narkotisiert und sediert [25]. Es erfolgt eine Thorakotomie. Die linke vordere Koronararterie (LAD) wird abgebunden und eine Ischämie ausgelöst. Es erfolgt keine Reperfusion der LAD. Nachteil der permanenten Ligatur ist, dass dieses Modell am weitesten vom Klinikalltag entfernt ist, denn die *European Society of Cardiology* empfiehlt in ihren Richtlinien von 2017, bei Patienten mit akutem Koronararterienverschluss sofort eine Reperfusionstherapie einzuleiten [26]. Bei der permanenten Ligatur bleibt die LAD verschlossen, eine Reperfusion unterbleibt [25]. Das Modell der permanenten Ligatur unterscheidet sich somit grundsätzlich von den Ischämie-/Reperfusionsmodellen. Es wird hauptsächlich zur Erforschung der Herzfunktion und des ventrikulären Umbaus nach MI verwendet. Das Infarktgebiet ist 24 Stunden nach permanenter Ligatur klar definierbar und die Entzündungsprozesse sind gut einzuordnen. Die Herzfunktion wird durch die Ausbreitung des infarzierten Gebietes, die darauffolgenden Heilungsprozesse und die Narbenbildung nach MI beeinflusst. Es kommt zu

linksventrikulärer Dilatation, zu kardialer Hypertrophie und zum ventrikulären *remodeling* des Herzgewebes [25, 27].

1.4.2 Ischämieinduktion bei offenem Thorax

Die Durchführung der Ischämieinduktion beinhaltet das Narkotisieren und Sedieren der Tiere, die Eröffnung des Thorax und die Okklusion der LAD [28]. Nach einem frei wählbaren Zeitintervall wird die LAD wieder reperfundiert. Die Ischämieinduktion bei offenem Thorax ist ein etabliertes Modell, das den direkten Zugang zum Herzen bietet sowie gut geeignet ist, um die kardiale Physiologie zu erforschen und morphologische Veränderungen zu beobachten [1]. Im Vergleich zur Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax (1.4.3) bietet diese Methode den Vorteil der direkten Kontrolle der Ischämieinduktion [1, 29, 30]. Der korrekte und über die gesamte Zeit kontrollierbare Verschluss der LAD ist visuell am Erblassen des Gewebes unterhalb der Arterie wahrnehmbar.

Wie die permanente Ligatur hat auch diese Methode den Nachteil, dass beim Menschen ein akuter Myokardinfarkt in der Regel nicht künstlich ausgelöst wird [1]. Nachteilig ist auch, dass die Versuchstiere ein Operationstrauma erleben, sodass sie anfälliger für Entzündungsreaktionen sind [29]. Dies führt zu einer erhöhten Mortalitätsrate. Ein weiterer Nachteil der LAD-Okklusion bei offenem Thorax ist, dass es zur Abkühlung und Austrocknung an der Herzoberfläche kommen kann. Duncker *et al.* haben gezeigt, dass bei einem Temperaturanstieg von nur 1 °C während der Ischämieinduktion bei geöffnetem Thorax die Infarktgröße um 20 % zunimmt [31]. Die Temperatur hat demzufolge einen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße und sollte während der Ischämie permanent kontrolliert und konstant gehalten werden [31-33].

1.4.3 Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax

Die Methode der Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax umfasst folgende Schritte: Narkotisieren und Sedieren des Versuchstiers, Thorakotomie mit Anlage der LAD-Ligatur und Rekonvaleszenz von mehreren Tagen [34]. Nach der Rekonvaleszenz von mehreren Tagen wird die Ischämie bei geschlossenem Thorax unter Narkose ausgelöst. Dazu werden die Fäden in einer unter der Haut liegenden Gewebetasche freipräpariert. Werden die Fäden gespannt, kommt es zur Okklusion der LAD, ohne dass der Thorax geöffnet werden muss. Die Methode der Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax wird in Kapitel 2.1.2 ausführlicher beschrieben.

Die Methode der Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax an der Maus wurde zuerst von Nossuli *et al.* beschrieben [34]. Ein Grund für die Entwicklung dieser Methode war die

Beobachtung, dass die Ischämieinduktion bei offenem Thorax nicht nur bei den ischämischen und reperfundierten Tieren zu einem Anstieg der Entzündungsreaktion führte, sondern auch bei den scheinoperierten Tieren.

Da während eines MI beim Menschen der Thorax nicht geöffnet ist und es daher nicht zu einem Operationstrauma kommen kann, wurde eine Lösung gesucht, dies im Tierversuch nachzustellen. Deshalb wird die Ischämie und die darauffolgende Reperfusion erst einige Tage später durchgeführt, wenn der Anstieg der Entzündungsmediatoren wieder abgeebbt ist [24]. Nach drei Tagen kommt es zu einem Rückgang der Entzündungsfaktoren, weshalb eine entsprechende Rekonvaleszenz empfohlen wird, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen [34, 35]. Klare Vorteile dieser Methode sind daher die geringe Wahrscheinlichkeit eines Operationstraumas und eher selten vorkommende Infektionen, was zudem die Mortalitätsrate senkt [1, 34]. Die Ischämie und Reperfusion kann jederzeit durchgeführt werden und ist gut reproduzierbar. Die Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax ist klinisch relevanter als die in Kapitel 1.4.1 und 1.4.2 beschriebenen Methoden [1]. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass keine direkte visuelle Kontrolle der Ischämie möglich ist. Der Verschluss der Koronararterie ist nur mit Elektrokardiographie zu kontrollieren.

Nachteilig bei allen Tierversuchsmodellen ist, dass der MI beim Tier nicht spontan eintritt, sondern zu einem bestimmten Zeitpunkt künstlich erzeugt wird [24]. Beim Menschen dagegen tritt er meist spontan auf und wird hauptsächlich durch eine zum Teil jahrelang vorausgegangene ungesunde Ernährung, durch zu wenig Bewegung oder durch andere Faktoren begünstigt. Dies ist im Versuchstier schwer nachzustellen. Es wurden zwar Modelle etabliert, bei denen Tiere beispielsweise mit cholesterinreicher Nahrung gefüttert wurden. Da der Verschluss der Koronararterien hier ebenfalls spontan und zeitlich unvorhersehbar auftritt, sind diese Modelle für Forschungsprojekte weniger geeignet.

Der Vorteil der LAD-Ligatur beim Versuchstier ist, dass alle Tiere zu einem definierten Zeitpunkt den Infarkt haben, die Lokalisation des koronaren Verschlusses gleich ist und somit vergleichbar große Infarktgrößen entstehen [24]. Dadurch können besser reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung des I/R das Ischämieinduktionsmodell bei geschlossenem Thorax gewählt. Bei diesem Modell wird eine mögliche postoperative Infektion, welche die Ischämie-/Reperfusionsphase beeinflussen könnte, verhindert. Zudem wird im Gegensatz zu der Ischämieinduktion bei geöffnetem Thorax sowohl eine Abkühlung als auch eine Austrocknung der Herzoberfläche vermieden, was wiederum ähnlich große Infarktgrößen gewährleistet.

1.5 Myozytärer Ca^{2+} -Kreislauf

Ca^{2+} ist ein intrazellulärer sekundärer Botenstoff, der bei vielen funktionellen Regulationsprozessen beteiligt ist [36]. Vor allem im Muskel ist Ca^{2+} für die elektrische Signalweitergabe und Kontraktion wichtig. In Kardiomyozyten regelt Ca^{2+} die elektromechanische Kopplung von Erregung und Kontraktion [37]. Steigt die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol an, führt dies zur Kontraktion des Herzmuskels. Ein Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration leitet die Relaxation ein.

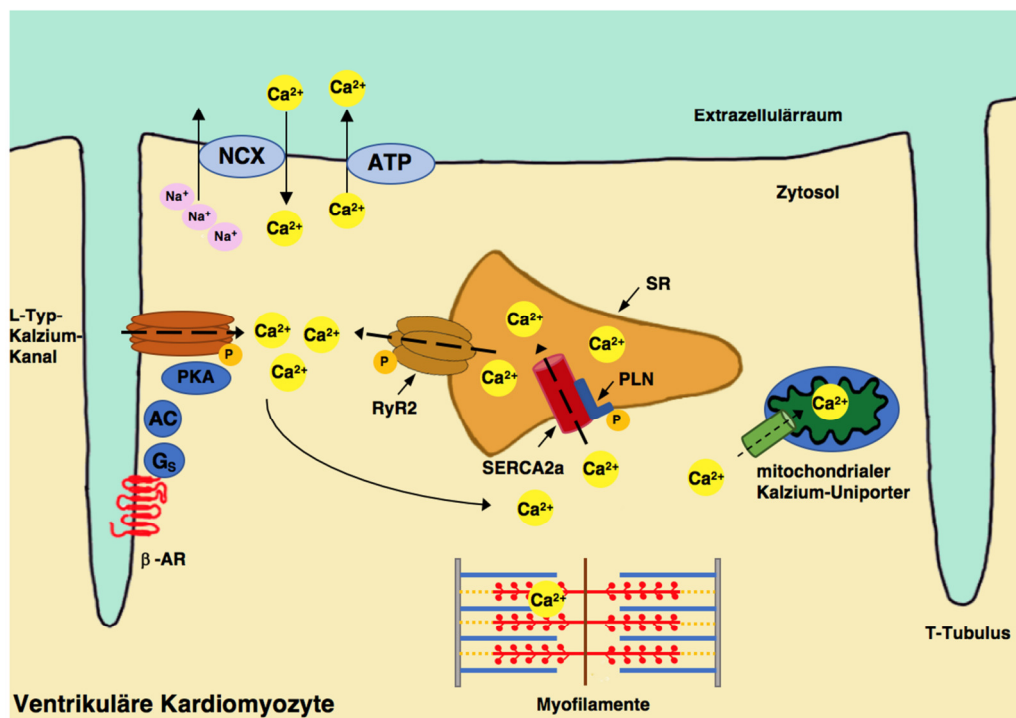


Abbildung 5: Schematische Darstellung des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes in einer ventrikulären Kardiomyozyte

AC = Adenylatzyklase; ATP = Adenosintriphosphat; β -AR = beta-adrenerger Rezeptor; Ca^{2+} = Kalziumion; G_s = G_s -Protein gekoppelter Rezeptor; Na^+ = Natrium; NCX = Natrium-Kalzium-Austauscher; P = Phosphat; PKA = Proteinkinase A; PLN = Phospholamban; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; SERCA2a = sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a; SR = sarkoplasmatisches Retikulum

Die elektrophysiologische Signalübertragung mittels Ca^{2+} in ventrikulären Kardiomyozyten ist in Abbildung 5 dargestellt und läuft folgendermaßen ab: Während der Systole wird Ca^{2+} durch die Depolarisation der Sarkolemma über spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ins Zytosol der Kardiomyozyten eingeschleust [38, 39]. L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle bilden mit den Ryanodin-Rezeptoren 2 (RyR2) funktionelle Einheiten. Einströmendes Ca^{2+} bindet an den RyR2 und bewirkt dadurch eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem intrazellulären Depot des SR [40]. Durch diesen Ca^{2+} -Einstrom, der die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-7} auf 10^{-5} mol/l erhöht, werden wiederum die Myofilamente aktiviert. Ca^{2+} bindet an den N-Terminus von Troponin C (TnC) und bewirkt damit, dass TnC an den C-Terminus von Troponin I (TnI) bindet und somit TnI von seiner Bindungsstelle an Aktin weggezogen

wird. Tropomyosin (Tm) und Troponin T (TnT) bilden zusammen einen Komplex und rutschen in die Spalte zwischen Myosin und Aktin, was dazu führt, dass der Myosinkopf an Aktin bindet [36]. Es kommt zur Kontraktion der Sarkomere (Abbildung 9).

Während der Diastole wird der größte Anteil an intrazellulärem Ca^{2+} über die Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums SERCA2a (*sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) wieder in das SR zurücktransportiert [41]. Eine minimale Menge an Ca^{2+} wird dabei auch über den sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX), die sarkolemmale Kalzium-ATPase (PMCA) und den mitochondrialen Kalzium-Uniporter aus der Zelle entlassen [41]. Bers *et al.* haben gezeigt, dass in humanen Kardiomyozyten die SERCA2a etwa 70 % des zytosolischen Ca^{2+} in das SR zurückpumpt [41]. Über das Sarkolemma verlassen 28 % mittels des Natrium-Kalzium-Austauschers die Zelle. Der mitochondriale Kalzium-Uniporter sowie die PMCA befördern dagegen nur etwa 2 %.

Bei Ratten und Mäusen sieht das Verhältnis des Ca^{2+} -Transports demgegenüber anders aus. Hier pumpt die SERCA2a bis zu 92 % des Ca^{2+} aus dem Zytosol zurück in das SR. Nur 7 % werden durch den NCX eliminiert und 1 % wird über die PMCA aus der Zelle heraus und über den mitochondrialen Kalzium-Uniporter in die Mitochondrien transportiert [42]. Sobald das zytosolische Ca^{2+} seine basale Ausgangskonzentration erreicht hat, kann es zur erneuten Erregung und somit zur Kontraktion und Ca^{2+} -Ausschüttung kommen [43]. Generell korreliert die Menge des in das Zytosol einströmenden Ca^{2+} mit der Kontraktionskraft.

Doch ist noch zu klären, wie die Ischämie-/Reperfusionphase den myozytären Ca^{2+} -Kreislauf beeinflusst. Im ischämischen Zustand ist die Kardiomyozyte auf anaerobe Energiegewinnung angewiesen [22, 44]. Glykolyse und die vermehrte Bildung von Laktat und Protonen senken den zytosolischen pH-Wert. Anhaltender Sauerstoffmangel und zunehmende Azidose führen zur Einstellung der anaeroben ATP-Produktion, sodass auch ATP-abhängige Prozesse beendet werden. Natriumionen, die über die Zellmembran einströmen, können nicht mehr aktiv aus der Zelle transportiert werden. Letztlich aktiviert die erhöhte zytosolische Natriumkonzentration den NCX in die umgekehrte Richtung. Natriumionen verlassen die Kardiomyozyte, im Gegenzug strömt Ca^{2+} ein. Außerdem ist die Aktivität der SERCA2a im ischämischen Bereich vermindert, weshalb weniger zytosolisches Ca^{2+} in dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gespeichert werden kann [45, 46]. Darüber hinaus kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol. Dieser bedeutende Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Kardiomyozyte aktiviert Signalkaskaden, z. B. Ca^{2+} -abhängige Proteasen wie Calpain und vermittelt so während der Ischämie schwere und bis zum Zelltod führen könnende Zellschäden.

Im humanen Vorhofmyokard ist die Ca^{2+} -Aufnahme während der Reperfusionsphase nach Ischämie verlangsamt [47]. Es wird vermutet, dass hier die SERCA2a-Aktivität durch den Ischämieschaden weiterhin vermindert ist. Tierversuche haben gezeigt, dass auch im ventrikulären Myokard die zytosolische Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR geringer ist [48]. Außerdem ist bekannt, dass nach Ischämie im humanen Myokard während der Reperfusion eine verminderte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR ins Zytosol stattfindet [49]. Dafür ist vermutlich die verminderte Anzahl an Ryanodin-Rezeptoren (RyR) verantwortlich [48, 50]. Da weniger Ca^{2+} aufgenommen wird, ist die im SR gespeicherte Ca^{2+} -Menge verringert und die Kontraktilität verlangsamt [45]. Außerdem ist die Aktivität des Natrium-Kalzium-Austauschers (NCX) vermindert, sodass weniger Ca^{2+} aus der Zelle transportiert werden kann [51]. Deshalb kommt es im Zytosol auch während der Reperfusionsphase zu einer Überladung von Ca^{2+} [13].

1.5.1 Regulatoren des Ca^{2+} -Kreislaufes

Der Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) ist ein im SR verankerter Homotetramer (Abbildung 6) [52]. Seine Aktivierung findet hauptsächlich über Ca^{2+} statt, wodurch es wiederum durch Öffnung des Rezeptors zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR kommt (Abbildung 6). Der RyR2 besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, über die seine Öffnungswahrscheinlichkeit reguliert wird. Nach β -adrenerger Stimulation phosphoryliert die Proteinkinase A (PKA) den RyR2 an Serin2808 (Ser2808). Die Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) kann den RyR2 auch an Ser2808 phosphorylieren, darüber hinaus besitzt sie ihre eigene Phosphorylierungsstelle an Ser2814.

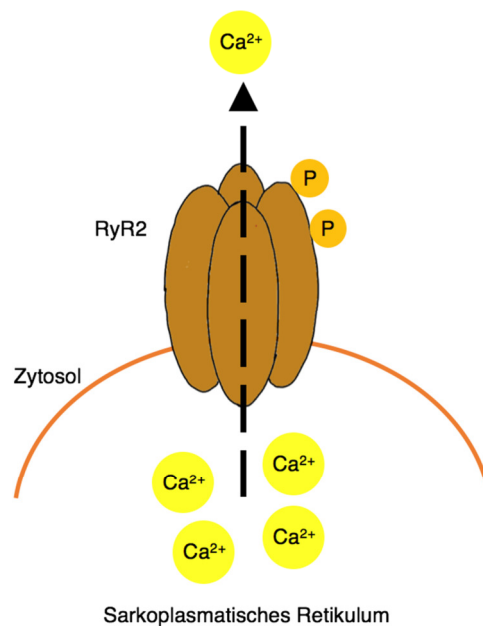


Abbildung 6: Freisetzung des Ca^{2+} aus dem SR ins Zytosol über RyR2
 Ca^{2+} = Kalziumion; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; P = Phosphat

In Kardiomyozyten ist die SERCA2a neben dem RyR2 einer der wichtigsten Regulatoren des Ca^{2+} -Kreislaufes [53]. Sie ist in der Membran des SR verankert und pumpt Ca^{2+} mithilfe von Adenosintriphosphat (ATP) aus dem Zytosol zurück in das SR. Die Aktivität der SERCA2a wird über Phospholamban (PLN) reguliert. PLN besteht aus einem dynamischen Pentamer-Monomer-Äquilibrium [54]. Das Pentamer wiederum besteht aus fünf identischen Untereinheiten, den Monomeren, wobei das PLN-Monomer im unphosphorylierten Zustand reversibel die SERCA2a inhibiert, indem es die Affinität der SERCA2a zu Ca^{2+} herabsetzt [55, 56]. Dabei bindet das PLN-Monomer an eine Bindetasche der SERCA2a. Wenn Ca^{2+} dort gebunden ist, ist die Tasche geschlossen. Dies erklärt die Fähigkeit einer hohen Ca^{2+} -Konzentration zur Aufhebung der Bindung zwischen SERCA2a und PLN [57]. SERCA2a und PLN-Monomere sind beide im SR verankert [58]. Wird PLN nach β -adrenerger Stimulation über die PKA phosphoryliert, geht seine inhibitorische Wirkung verloren, weil die Verbindung zur SERCA2a getrennt wird [59]. Mehr Ca^{2+} kann über die SERCA2a aus dem Zytosol wieder in das SR aufgenommen werden [60]. Es kommt zur Relaxation der Kardiomyozyte [36].

Die PLN-Phosphorylierung kann aber nicht nur PKA abhängig über β -adrenerge Stimulation ablaufen. Bei erhöhter Ca^{2+} -Konzentration wird PLN auch über die CaMKII phosphoryliert [59, 61]. CaMKII wird bei erhöhter Ca^{2+} -Konzentration aktiv und phosphoryliert PLN an der Phosphorylierungsstelle Threonin17 (Thr17) [59]. PLN wird über eine weitere Phosphorylierungsstelle durch die Proteinkinase C (PKC) an Serin10 (Ser10)

phosphoryliert [54]. Diese Phosphorylierung hat jedoch physiologisch keine bekannten Auswirkungen.

Bei der β -adrenergen Stimulation wird die Adenylatzyklase (AC) durch eine Aktivierung des G_s -Protein gekoppelten Rezeptors aktiv. Das führt zu einer vermehrten Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch die PKA PLN an seiner Phosphorylierungsstelle Ser16 phosphoryliert [62, 63]. Die Phosphorylierung von PLN wird über die Proteinphosphatase 1 (PP1) wieder aufgehoben. Die PP1 ist eine der wichtigsten Phosphatasen im SR [64]. Ihre Aktivität wiederum wird über den Inhibitor-1 (I-1) reguliert. Phosphorylierung der PP1 an Threonin35 (Thr35) steigert die Aktivität des I-1, während sie nach PKC-abhängiger Ser67-Phosphorylierung sinkt. I-1 inaktiviert die PP1 und erhöht dadurch den Phosphorylierungszustand des PLN [65]. Aber nicht nur die PP1 dephosphoryliert PLN an Serin16 (Ser16), sondern auch die Proteinphosphatase 2a (PP2a). Weitere Ca^{2+} -Regulatoren, die an die SERCA2a oder PLN binden, sind das HS-1 assoziierte Protein X-1 (HAX-1) und S100A1 (Abbildung 7) [66, 67].

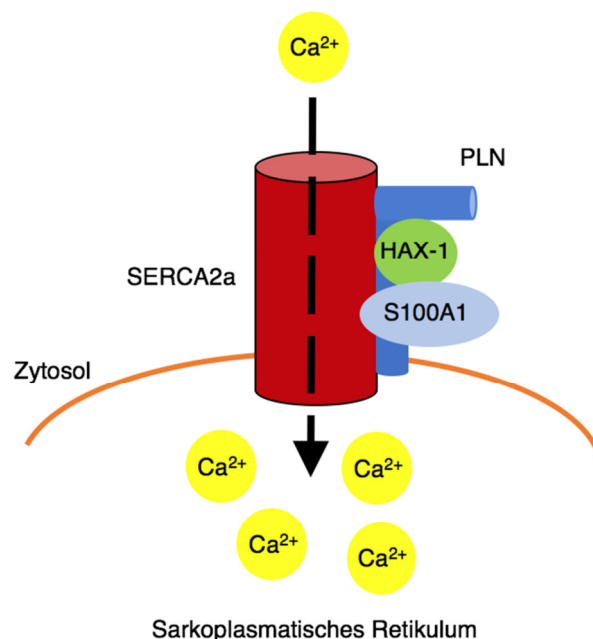


Abbildung 7: Darstellung der SERCA2a und des PLN-Monomers mit den Bindungspartnern HAX-1 und S100A1

Ca^{2+} = Kalziumion; SERCA2a = sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a; PLN = Phospholamban Monomer; HAX-1 = HS-1 assoziiertes Protein X-1

Diese Ca^{2+} -Regulatoren sind erst seit wenigen Jahren bekannt und ihre regulatorische Wirkung auf die SERCA-Aktivität ist weitaus schwächer als die des PLN. S100A1 liegt im humanen Myokard hoch exprimiert vor und ist im SR, in den Myofilamenten und in den Mitochondrien vorzufinden. Es wurde gezeigt, dass S100A1 mit der SERCA2a und PLN interagiert [67]. Außerdem wird vermutet, dass es die Kopplung von Erregung und

Kontraktion beeinflusst. S100A1 hat positiv inotrope Effekte auf die Herzfunktion. Most *et al.* zeigten, dass sich die Kontraktilität des Herzens verbessert, wenn S100A1 in Kardiomyozyten überexprimiert vorliegt [68].

Ein weiteres nicht zu vernachlässigendes Protein, das die Ca^{2+} -Kinetik zumindest nach bisherigem Kenntnisstand indirekt reguliert, ist das HS-1-assoziierte Protein X-1 (HAX-1) [69]. Es ist ein mitochondriales Protein, das ubiquitär exprimiert wird. Eine indirekte Regulation könnte eventuell erfolgen, da bekannt ist, dass HAX-1 spezifisch mit PLN interagiert. Dabei zeigten Vafiadaki *et al.*, dass es sowohl mit dem PLN-Monomer als auch mit dem Pentamer interagiert [70]. Zudem beobachteten sie, dass PLN gleichzeitig mit SERCA2a und mit HAX-1 eine Interaktion ausüben kann. Liegt PLN jedoch nach β -adrenerger Stimulation phosphoryliert vor, ist die Bindung zu HAX-1 geschwächt. Dies könnte daran liegen, dass HAX-1 an den beiden Phosphorylierungsstellen Ser16 und Thr17 bindet. Es wird vermutet, dass HAX-1 dadurch die Aktivität und Konformation von PLN reguliert und somit die Ca^{2+} -Kinetik indirekt beeinflusst. Auch wenn die Ca^{2+} -Konzentration erhöht ist, schwächt dies die Interaktion von PLN zu HAX-1. Es wird diskutiert, dass die PLN-HAX-1-Interaktion das Überleben der Kardiomyozyten erhöht [70]. HAX-1 wird ein anti-apoptotischer Mechanismus zugesprochen und nach PLN-HAX-1-Bindung soll der protektive Effekt erhöht sein. Außerdem wurde eine direkte Interaktion von HAX-1 und SERCA2a gezeigt, wobei HAX-1 die Proteinexpression von SERCA2a kontrolliert und somit ebenfalls anti-apoptotisch wirkt [71].

1.6 Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten

Ein Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit des Muskels [72]. Jedes Sarkomer besteht hauptsächlich aus drei kleineren kontraktile Proteinen, die sich aus Myofilamenten zusammensetzen. Die wichtigsten kontraktile Proteine sind Aktin und Myosin. Regulatorische Proteine sind Troponin und Tropomyosin. Zudem sind zwei Arten von Filamenten zu unterscheiden, und zwar das dünne und das dicke Filament. Die dünnen Filamente, auch Aktinfilamente genannt, sind mit der Z-Scheibe verankert. Sie bestehen aus Aktin, Tropomyosin und Troponin. Die dicken Filamente bestehen hauptsächlich aus Myosin. Am Ende ist Myosin über das Myosin-bindende Protein C mit Titin verbunden, das eine elastische Verbindung zur nächsten Z-Scheibe darstellt. Titin ist circa 1 μm lang und reicht von der Z- bis zur M-Bande. Ein Sarkomer wiederum reicht von einer Z-Scheibe bis zur nächsten. Insgesamt ist ein Sarkomer circa 2 bis 2,2 μm lang, während der Kontraktion verkürzt es sich um etwa 0,4 μm . Die dicken Filamente überlappen in der A-Bande des Sarkomers mit den dünnen Aktinfilamenten. Die M-Bande befindet sich in der Mitte des Sarkomers (Abbildung 8).

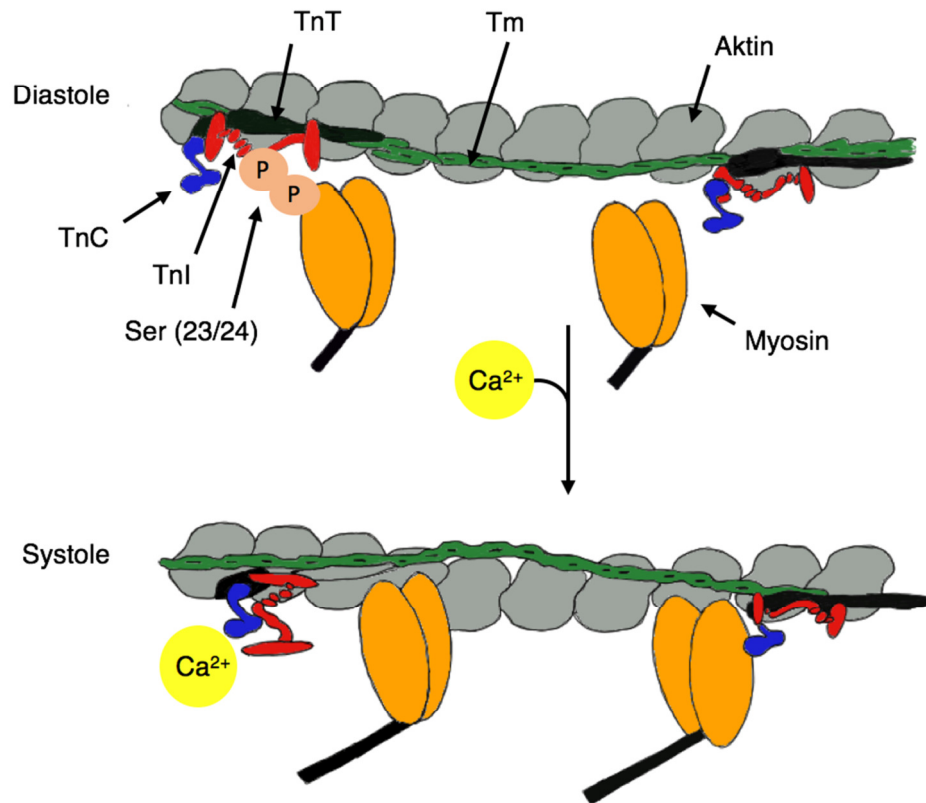


Abbildung 9: Myofilamente während Diastole und Systole

Ca^{2+} = Kalziumion; TnC = Troponin C; TnI = Troponin I; Tm = Tropomyosin; TnT = Troponin T

1.6.1 Sarkomerfunktion nach I/R

Die Sarkomerfunktion verändert sich während der Ischämie-/Reperfusionphase [73-75]. Eine wichtige Rolle dafür spielt die in Kapitel 1.5 beschriebene Überladung des Zytosols der Kardiomyozyten mit Ca^{2+} während der Ischämie. Dies müsste eine Überkontraktion der Sarkomere zur Folge haben. Diese Überkontraktion bleibt jedoch aufgrund der vorherrschenden Azidose und des ATP-Mangels aus. Stattdessen kommt es durch einen ausgeprägten Rigor der Querbrücken zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Querbrückenbildung zwischen Aktin- und Myosinfilamenten mit der Folge einer Verkürzung der Kardiomyozyten, ohne dass eine Überkontraktion des kontraktile Apparates eintritt.

Durch Einleiten der Reperfusion kommt es zu einer raschen Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes von ungefähr 7,40. Die Kardiomyozyten werden wieder mit Sauerstoff versorgt. Die ATP-Produktion wird wieder aufgenommen. Die Zelle versucht der Ca^{2+} -Überladung entgegenzuwirken, indem Ca^{2+} über die SERCA2a in das SR transportiert wird. Sobald das Fassungsvermögen des Ca^{2+} -Speichers erreicht ist, wird Ca^{2+} in das Zytosol freigesetzt [76]. Durch diese schnell hintereinander stattfindende mehrmalige Ca^{2+} -Aufnahme in das SR und Ca^{2+} -Abgabe in das Zytosol entstehen Ca^{2+} -Oszillationen

[77]. Diese Ca^{2+} -Oszillationen finden in den ersten Minuten nach Einleitung der Reperfusion statt. Sie haben zur Folge, dass auch die kontraktile Apparatur übermäßig aktiviert wird. Es kommt zur Hyperkontraktur der Sarkomere. Die Zelle verkürzt sich unter Verlust der Querstreifung [78]. Morphologisch betrachtet kommt es zu Strangbrüchen der Sarkomere. Diese betreffen nicht nur die Zellen des ischämischen Gebietes, sondern breiten sich auch auf die benachbarten Zellen der Randzone aus [79]. Letztendlich kann die Hyperkontraktur bis zum Zelltod führen [80].

Durch die erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen werden Abbauprozesse in den Proteinen des Zytoskeletts ausgelöst, was eine kontraktile Dysfunktion zur Folge haben kann [81-83]. Es kommt zudem zur verstärkten Modifizierung des Sarkomerproteins Titin, wodurch die myozytäre Steifigkeit ansteigt [25].

Auch im nicht-ischämischen Gebiet zeigen sich bereits 30 Minuten nach Ischämie funktionelle Auffälligkeiten [21]. Einerseits wird als Ursache für die eingeschränkte systolische Funktion des *remote* Myokards die erhöhte mechanische Belastung des *remote* Myokards diskutiert [84]. Außerdem wird vermutet, dass das benachbarte Muskelareal durch nicht-synchrone Kontraktion des ischämischen Myokards funktionell beeinträchtigt wird [85]. Eine Asynergie im *remote* Gebiet konnte im humanen Herzen vier Tage nach MI mithilfe der Echokardiographie gezeigt werden. Eine Kompensation der reduzierten Kontraktilität ischämischer Muskelfasern wird dadurch erschwert [21, 86, 87].

1.7 Diabetes mellitus

Beim Diabetes mellitus wird zwischen Typ I und II unterschieden. Etwa 10 % der an Diabetes mellitus Erkrankten leiden unter dem Typ I (T1DM), auch juveniler Diabetes genannt [88]. Durch eine immunvermittelte Zerstörung der Betazellen im Pankreas kommt es zum Insulinmangel und schließlich zur Hyperglykämie [89].

Typ-II-Diabetes (T2DM), auch Altersdiabetes genannt, betrifft etwa 90 % aller an Diabetes Erkrankten [88]. Die Kombination Insulinresistenz und Funktionseinschränkungen der Betazellen führt zur Störung der Glukose-Homöostase [90]. Ausgelöst wird der Typ-II-Diabetes häufig durch einen ungesunden Lebensstil, insbesondere durch fehlende körperliche Bewegung und ungesunde Ernährung, aber auch durch Erbanlagen [91, 92]. Pro Jahr wird die Diagnose T2DM bei circa 500 000 Menschen in Deutschland gestellt [93]. Die Erkrankung Diabetes mellitus weist generell eine steigende Prävalenz auf. Sie stieg von 8,9 % im Jahr 2009 auf 9,8 % im Jahr 2015. Die *World Health Organization* (WHO) prognostiziert, dass im Jahre 2030 weltweit 350 Millionen Menschen an Diabetes mellitus Typ II erkrankt sein werden, danach wären dann doppelt so viel Menschen erkrankt wie im Jahr 2003 [94].

1.7.1 Diabetes mellitus Typ II als Risikofaktor für Myokardinfarkt

Die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus ist ein Risikofaktor für das Auftreten eines Myokardinfarktes [95]. Durch eine sich früh beim Diabetiker entwickelnde verschlechterte Stoffwechsellage ist der kardiale Metabolismus verändert. Je länger dieser Zeitraum andauert, desto weiter schreitet die Schädigung des Myokards voran. Eine veränderte Gefäßpathologie, Mikro- und Makroangiopathien, myokardiale Fibrose, Überladung der Herzzellen mit Ca^{2+} sowie Einschränkungen der Elektrophysiologie sind nur einige Beispiele dafür, wie Diabetes mellitus eine negative Veränderung des Myokards bewirkt. Nur circa 10 % der an Diabetes erkrankten Patienten wiesen laut „Gesundheit in Deutschland aktuell“ (GEDA) im Jahre 2009 keine Begleiterkrankungen auf, die auf den Diabetes bezogen wurden [96]. Circa 35 % der über 50-jährigen untersuchten Patienten dagegen wiesen neben ihrer Diabeteserkrankung eine Organerkrankung auf, die sich in einer Herz-Kreislaufkrankung, Niereninsuffizienz oder Augenerkrankung äußerte.

Schon lange ist bekannt, dass sowohl Typ-I- als auch Typ-II-Diabetiker häufiger einen MI erleiden [97-100]. Zudem ist die Mortalität bei Diabetikern nach einem MI doppelt so hoch wie bei Patienten ohne Diabetes-Vorerkrankung [101, 102]. Es wäre daher wichtig, die Ursachen und zugrunde liegenden Mechanismen zu kennen, um der hohen Letalität der Diabetiker nach MI durch gezielte Therapiemaßnahmen entgegenwirken zu können.

Hinsichtlich des intrazellulären Ca^{2+} -Kreislaufes in Kardiomyozyten ist bekannt, dass in Mausmodellen mit Diabetes mellitus Typ II sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion des Herzens eingeschränkt ist [103, 104]. Eine mögliche Ursache stellt die verminderte SERCA2a-Aktivität dar mit der Folge, dass auch die Beladung des SR mit Ca^{2+} geringer ist. Ein wichtiger Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Frage, ob nach I/R der Ca^{2+} -Kreislauf noch stärker beeinträchtigt ist und welchen Einfluss die Kombination von Diabetes mellitus und I/R auf die Expression, Aktivität und Funktion der an der Ca^{2+} -Regulation beteiligten Proteine hat.

1.7.2 Mausmodell für Diabetes mellitus Typ II

Als Mausmodell für den Diabetes mellitus Typ II wurde die *db/db*-Maus gewählt. Dieser Mauslinie fehlt der Rezeptor für das Sättigungshormon Leptin [105]. Im Gegensatz zu der Leptin-defizienten *ob/ob*-Maus sind *db/db*-Mäuse nicht nur übergewichtig, sondern entwickeln auch eine ausgeprägt diabetische Stoffwechsellage, die die Lebensdauer der Tiere verkürzt. Das *ob/ob*-Mausmodell ist ein deutlich milderer Diabetesmodell [105].

Die homozygote *db/db*-Maus weist ein dem Menschen ähnliches hyperglykämisches Syndrom auf [106, 107]. Im Alter von vier Wochen entwickelt sie durch erhöhte Nahrungs-

aufnahme ein höheres Körpergewicht und im Vergleich mit homoglykanen heterozygoten *db/+*-Mäusen eine höhere Plasmainsulinkonzentration. Nach sieben Wochen sind sie insulinresistent und die Blutglukosekonzentration ist signifikant erhöht.

1.8 Fragestellung

Der akute MI ist sowohl in Deutschland als auch weltweit eine der häufigsten Todesursachen [3, 26, 108]. Vor allem in den ersten Stunden bis Tagen nach MI ist die Mortalitätsrate sehr hoch [108]. Während dieser frühen Phase steigt in den Kardiomyozyten des infarzierten Areals die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration an und löst apoptotische und nekrotische Prozesse aus [109]. Auch die Kinetik des intrazellulären Ca^{2+} -Transports ist beeinträchtigt, unter anderem aufgrund einer verminderten Aktivität der SERCA2a, die zytosolisches Ca^{2+} in die intrazellulären Speicher transportiert [46-49]. Da die lokalen Ca^{2+} -Konzentrationen in den Herzmuskelzellen die Aktivität der kontraktilen Einheiten koordinieren, trägt diese Störung zur reduzierten Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels nach MI bei [45]. Diese Prozesse im ischämischen Myokard können nur durch eine möglichst frühzeitige Reperfusion des Gewebes nachhaltig verhindert werden [110].

Auch im nicht-ischämischen *remote* Myokard kommt es in der akuten und subakuten Phase nach MI zu kardiomyozytären Funktionseinschränkungen. Die während der Ischämie- und Reperusionsphasen im *remote* Myokard ablaufenden Mechanismen sind jedoch zum großen Teil noch nicht geklärt. Eine genaue Kenntnis der Bedingungen für Kontraktion und Relaxation des *remote* Myokards in der Akutphase des Infarkts ist jedoch von großem klinischem Interesse, da diese Herzteile den Funktionsverlust des infarzierten Myokards kompensieren müssen, um ein ausreichendes Herzzeitvolumen zu gewährleisten.

Patienten mit Diabetes mellitus Typ II als Begleiterkrankung haben eine erhöhte Mortalität und eine schlechte Prognose nach MI [111]. Wichtig ist in diesem Fall zu wissen, wie diese Krankheit die Adaptionsprozesse im Herzen nach MI beeinflusst.

Es wird die Hypothese vertreten, dass auch im *remote* Myokard Störungen des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes vorliegen, wodurch die Kontraktion und die Relaxation der Herzmuskelzellen beeinflusst werden. Es sollen der Ca^{2+} -Kreislauf und die Sarkomerfunktion in Kardiomyozyten untersucht werden, die aus Mäuserzen nach 60-minütiger Ischämie und anschließender Reperfusion isoliert werden. Dabei werden Kardiomyozyten verwendet, die aus dem nicht-ischämischen *remote* Bereich in der Frühphase, 24 Stunden nach I/R, sowie gegen Ende der proliferativen Phase, 10 Tage nach I/R, entnommen werden.

Mit der Untersuchung und dem Vergleich dieser zwei Zeitpunkte soll zwischen zwei unterschiedlichen Phasen des myokardialen *remodeling* nach MI unterschieden werden. Während der Frühphase nach MI werden Chemokine und Zytokine aktiviert mit der Folge einer Anreicherung von neutrophilen Granulozyten im Infarktgebiet. Nach dieser

entzündlichen Phase (3 bis 72 Stunden nach MI) beginnt die sogenannte adaptive beziehungsweise proliferative Phase (72 Stunden bis 7 Tage nach MI), während der aktivierte Myofibroblasten Proteine der extrazellulären Matrix produzieren, um eine Heilung des Ischämie-induzierten Gewebeschadens herbeizuführen.

Die Arbeit sucht Antworten auf folgende Fragen:

1. Verändert sich im *remote* Myokard die myozytäre Ca^{2+} -Kinetik? Wenn ja, welche molekularen Mechanismen liegen dieser Veränderung zugrunde?
2. Welche Störungen der Sarkomerfunktion finden sich in Kardiomyozyten des *remote* Myokards?
3. Welchen Einfluss hat Diabetes mellitus Typ II auf den Ca^{2+} -Haushalt und auf die Sarkomerfunktion des *remote* Myokards nach I/R?

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Als Modellorganismus wurde die Maus gewählt, weil es sich um ein Wirbeltier handelt und sie als Modell für Myokardinfarkt gut etabliert ist. Zudem existieren gut charakterisierte genetische Modelle für T2DM wie die Leptin-Rezeptor-defiziente *db/db*-Maus.

Die tierexperimentellen Versuche wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) vorab genehmigt (Az. 84-02.04.2013.A122). Die Zucht und Haltung der Tiere fand unter standardisierten Bedingungen statt und erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland.

2.1.1 Verwendete Tiere

Für die Untersuchungen nach I/R wurden C57BL/6J männliche Mäuse im Alter von 10 bis 12 Wochen verwendet. Diese Tiere wurden direkt von der Firma Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Für die Untersuchung der Kombination Diabetes mellitus Typ II und I/R wurden männliche Leptinrezeptor-defiziente, *db/db*-Mäuse im Alter von 11 bis 13 Wochen untersucht. Diese Mäuse stammten aus der Zucht der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.W. Fischer aus dem Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.1.1.1 Gewicht- und Glukosebestimmung der db/db-Mäuse

Zur Sicherstellung, dass die verwendeten *db/db*-Mäuse im Alter zwischen 11 und 13 Wochen tatsächlich eine diabetische Stoffwechsellage aufwiesen, wurde kurz vor der Herzentnahme neben dem Körpergewicht (EMB 500-1, Kern & Sohn GmbH, Balingen) die Glukosekonzentration im Blut mit dem GlucoSmart® Swing Glukometers (MSP bodmann, Bobingen, Deutschland) gemessen.

2.1.2 Einleitung des Myokardinfarktes

Der zeitliche Ablauf der Versuchsdurchführung ist in Abbildung 10 skizziert. Drei Tage vor der Induktion der Ischämie erfolgte die Voroperation der LAD-Ligatur (Kapitel 2.1.2.1). Nach einer Rekonvaleszenz der Mäuse von drei Tagen wurde am Tag 0 die Ischämie 60 Minuten lang induziert (Kapitel 2.1.2.2). Nach Reperfusion von 1 bzw. 10 Tagen wurde

das Herz entnommen und zur Analyse verschiedener Fragestellungen verwendet, siehe Kapitel 2.1.3 - 2.3.2.

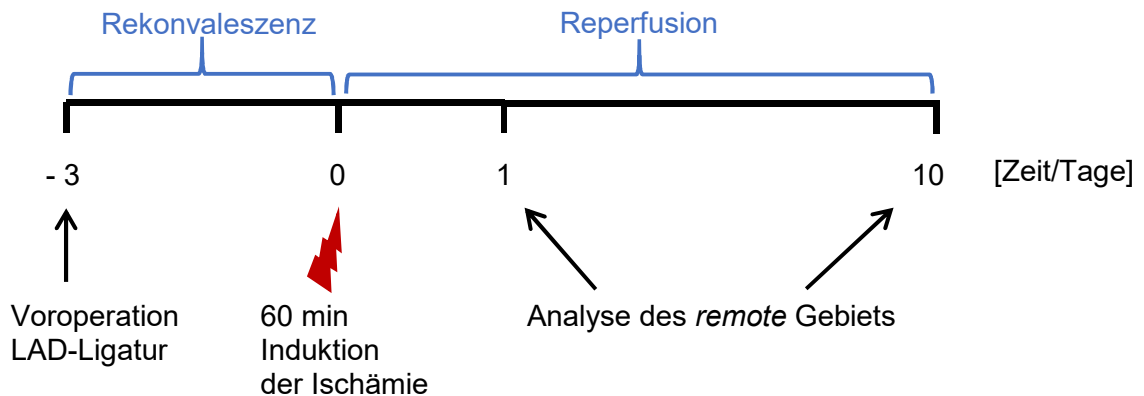


Abbildung 10: Zeitverlauf der Durchführung des Myokardinfarktes
LAD = linke vordere Koronararterie; min = Minuten

2.1.2.1 Voroperation

Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion mit Ketamin (60 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Die Wirksamkeit der Narkose wurde durch Drücken der Pfoten und der Schwanzwurzel der Mäuse überprüft. Die Mäuse wurden in Rückenlage auf eine beheizte Wärmeplatte gelegt (37 °C). Dann wurden sie intubiert und an ein Beatmungsgerät angeschlossen (Minivent Microventilator, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatur GmbH, March-Hugstetten, Deutschland). Die Beatmung erfolgte mit einem Hubvolumen von etwa 250 µl bei einer Beatmungsfrequenz von 140 Atemzügen pro Minute mit einer Mischung aus 2/3 Raumluft und 1/3 Sauerstoff.

Bei der Voroperation wird eine Fadenschlinge um die LAD gelegt, die später durch Zug unter Spannung gebracht das Gefäß verschließt. Es wurde ein Leica-Stereomikroskop MZ9.5 (Meyer Instruments, Houston, Texas, USA) benutzt. Nach erfolgter Thorakotomie zwischen der 3. und 4. Rippe wurde das Perikardium zerschnitten. Ein 7-0-Faden (7-0 Prolene™, Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) wurde 1 mm entfernt von der Spitze des linken Herzhohrs vorsichtig unter die LAD geführt. Der Faden wurde von der Nadel abgeschnitten und beide Enden durch einen 1 mm dicken Polyethylenring (PE-10) gefädelt, sodass eine lose Schlaufe um die LAD entstand. Der Thorax wurde mit einem Faden (4-0 Prolene™, Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und die Enden der Fadenschlinge um die LAD wurden dann links und rechts neben dem Verschlussknoten aus dem Thorax herausgeführt. Die beiden Enden wurden verknotet und unter der Haut auf der rechten Seite des Thorax subkutan platziert. Schließlich wurde die Haut mit einem Faden (5-0 Prolene™, Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) zusammengenäht und verschlossen. Nachdem die Maus wieder wach war,

wurde die Beatmung abgestellt. Zur Schmerzlinderung wurden die Mäuse in den darauffolgenden 2 Tagen alle 8 Stunden mit Buprenorphin (0,05-1 mg/kg) subkutan behandelt.¹

2.1.2.2 *Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax*

Vor der Ischämieinduktion wurden die Mäuse mit einer Maske, durch die Isofluran (Fluovac, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) geflutet wurde, narkotisiert. Dabei wurden die Schnauzen der Mäuse in die Maske gehalten und mit einem aus 1/3 Sauerstoff und 2/3 Raumluft bestehendem Gemisch sowie einem Isofluran-Gehalt von 5 Vol.-% beatmet. Die Absaugung des Isoflurans erfolgte mit einem Veterinary Fluosorber (Fluovac Harvard Apparatur, Edenbridge, Kent, UK).

Nachdem die Tiere narkotisiert waren, wurden sie auf dem Rücken liegend auf dem Operationstisch platziert und fixiert. Hierbei wurden die Pfoten auf der Wärmeplatte mit Klebeband fixiert. Die Körpertemperatur der Mäuse wurde während der gesamten Dauer der Ischämie auf 37 bis 37,5 °C gehalten und mit einer endorektal eingeführten Sonde überwacht. Zur Okklusionskontrolle der linken vorderen Koronararterie (LAD) wurden die Mäuse während der gesamten Ischämieinduktion an ein Elektrokardiogramm (EKG) (Hugo Sachs Harvard-Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen. Die EKG Nadeln wurden an den Pfoten befestigt.

Bevor die Knoten der Hautnaht vorsichtig aufgeschnitten wurden, wurde die Isoflurankonzentration auf 2 Vol.-% gesenkt. Nach dem Öffnen der Haut wurden die Ligaturfäden sorgfältig aus der Hauttasche freipräpariert, ohne Zugspannung auszuüben. Die Fäden wurden dann jeweils zur linken und zur rechten Seite weggeführt und an einem Magnethalter mit Klebestreifen befestigt (Abbildung 11). Unter ständiger EKG Kontrolle wurde die Fadenspannung vorsichtig solange durch Auseinanderführen der Magnethalter auf dem OP-Tisch erhöht, bis das EKG eine ST-Streckenhebung zeigte (siehe Kapitel 2.1.2.3). Um eine 60-minütige Okklusion der LAD sicherzustellen, wurde die Zugspannung der Fäden mindestens alle 10 Minuten kontrolliert. Zur Desinfektion und zur Vermeidung einer Verkrustung während der Okklusion wurde die Wunde mit Betaisodona® Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) behandelt und mit isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) feucht gehalten.

Nach 60 Minuten dauernder Ischämie wurden beide Fäden möglichst nah am Thorax durchgeschnitten und die Reperfusion eingeleitet. Im Anschluss wurde die Haut mit einem

¹ Die Voroperationen wurden von Prof. Dr. J.P. Schmitt durchgeführt. Die Voroperationen der *db/db*-Mäuse wurden von Herrn Dominik Semmler durchgeführt.

Prolenfaden (5-0 Prolene™, Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Narkotisierung der Mäuse wurde kurz danach beendet.

Bis auf die Induktion der Ischämie durchliefen die Tiere der Kontrollgruppe die gleiche Prozedur. Anstelle der Ischämieinduktion wurden sie für eine Stunde in Narkose versetzt.

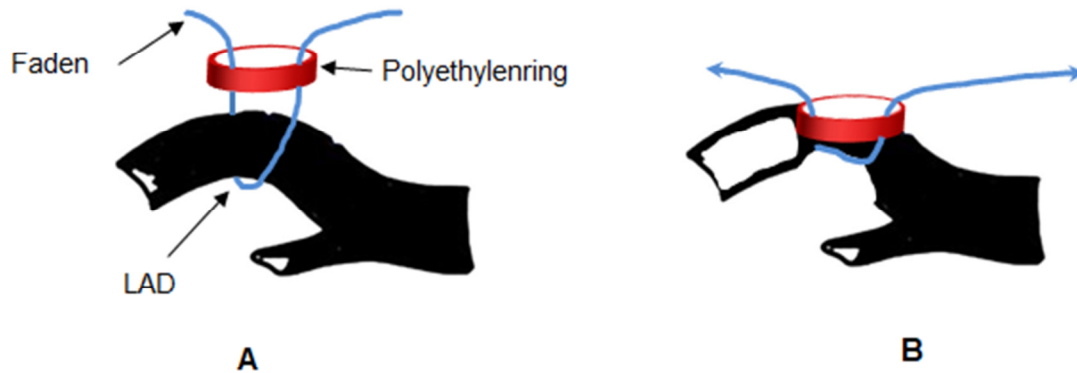


Abbildung 11: Darstellung der LAD Ligatur modifiziert nach Nossuli *et al.* [34]

A: Zustand bei der Voroperation. Der Fadenschlinge wird um die linke vordere Koronararterie gelegt, aber es wird noch keine Spannung auf die Fäden ausgeübt. Die Ligatur hat noch nicht stattgefunden. B: Wenn der Faden an beiden Enden gespannt wird, bewegt sich der Polyethylenring nach unten und stoppt an dieser Stelle den Blutfluss durch die LAD.

2.1.2.3 Überprüfung der LAD-Okklusion mittels EKG

Die Okklusion der LAD und somit die Induktion der I/R, wurde mittels EKG 1 Stunde lang überwacht. Zu Beginn, bevor der um die LAD gelegte Faden zugezogen wurde, wurde das basale EKG mit der *Basic Data Acquisition Software* (BDAS; Harvard Apparatus, Holliston Massachusetts, USA) aufgenommen. Abbildung 12 A zeigt die Ableitung eines normalen Maus-EKG. Die Okklusion der LAD wurde durch die ST-Hebung im EKG nachgewiesen (Abbildung 12 B). Nach Wiedereröffnung der LAD setzte die Reperfusion des ischämischen Gewebes ein. Dies zeigte sich einige Minuten danach durch leichten Abfall der ST-Hebung im EKG (Abbildung 12 C).

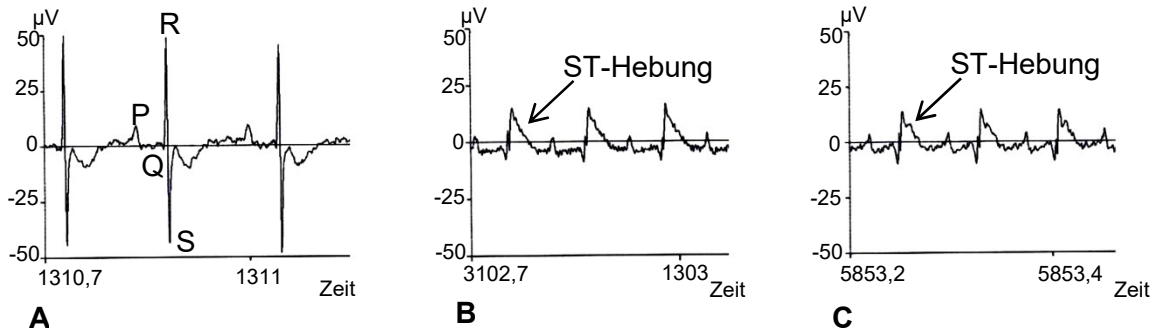


Abbildung 12: Ausschnitt eines Maus-Elektrokardiogramms (EKG)

A: basales EKG vor der Ischämieinduktion; B: EKG mit ST-Hebung nach Ischämieinduktion; C: EKG nach Wiedereröffnung der LAD und Beginn der Reperfusion

2.1.3 Probenentnahme und Aufarbeitung

Vor Entnahme der Herzen 24 Stunden bzw. 10 Tage nach der einstündigen Ischämie wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnen des Thorax wurde mit einer Einmal-Injektions-Kanüle Sterican® (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland) in die rechte Herzkammer gestochen. Das Herz wurde dann mit 4 %igem Formalin perfundiert und fixiert. Anschließend wurden die Proben mit Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert, dann entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom RM 2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte geschnitten.²

2.1.4 Histologie

Die Fixierung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern erfolgte durch Hitze-fixierung für circa 1 Stunde bei 60 °C. Zum Entparaffinieren der Gewebeschnitte wurden diese bei Raumtemperatur für dreimal 15 Minuten in Roticlear® (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) belassen und anschließend jeweils 2 Minuten lang in absolutes Ethanol, 95 % Ethanol und 75 % Ethanol getaucht. Danach wurden sie zweimal für 5 Minuten mit PBS gespült.

2.1.4.1 WGA Färbung

Für die *Wheat-germ-agglutinin*-Färbung (WGA) wurden die ausgewählten Schnitte in 0,1 M Zitratpuffer (Tabelle 1) eingetaucht und 8 Minuten in einer Mikrowelle bei maximaler Leistung zum Kochen gebracht. Nach kurzem Abkühlen wurden die Schnitte nochmals 4 Minuten gekocht, dieser Vorgang wurde nach weiterem Abkühlen zweimal wiederholt.

² Die Probenentnahme erfolgte zusammen mit Prof. Dr. J.P. Schmitt.

Danach wurde zweimal mit PBS gespült. Darauffolgend wurde auf jeden Schnitt Pure-Link™-RNase A-Lösung (20 mg/ml; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; 0,5 µl in 100 ml PBS) pipettiert, die Schnitte mit Parafilm abgedeckt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein dreimaliges fünfminütiges Spülen mit PBS.

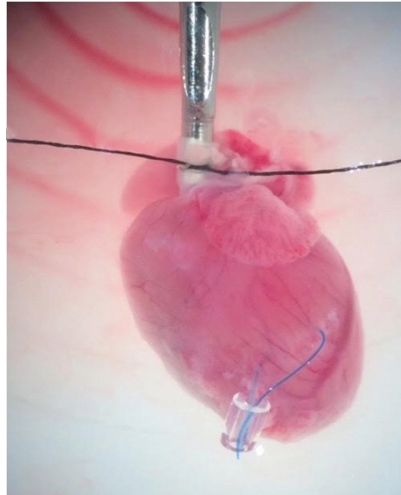
Zur Zellmembranfärbung wurden schließlich 50 µl WGA-Lösung (20 µl WGA in 980 µl PBS) (Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor™ 488 Conjugate, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) auf jeden Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden für 30 Minuten in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS folgte die Kernfärbung. Hierzu wurde ein Tropfen Roti®-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitten belassen. Schließlich wurden die Proben dreimal mit PBS gespült. Abschließend wurden die trockenen Schnitte mit Vectashield® H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mit einem Deckglas eingedeckt.

Die Bilder wurden mit Axio Images.M2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) aufgenommen und mit der Zeiss Mikroskop Software ZEN (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) analysiert. Die Herzschnitte aus dem ischämischen Gebiet (siehe Abbildung 3) und aus dem *remote* Gebiet (siehe Abbildung 4) sind Beispiele solcher Bilder.

2.2 Messungen an isolierten Kardiomyozyten

2.2.1 Isolation von Kardiomyozyten aus dem nicht-ischämischen Gebiet mittels retrograder Perfusion

Die Mausherzen wurden nach einstündiger Ischämie und 24 Stunden bzw. 10 Tage Reperfusion entnommen. Vor der Entnahme der Herzen wurden die Mäuse mit 400 U Heparin-Natrium 25 000 (I.E./ 5 ml) (ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) intraperitoneal heparinisiert. Dies erfolgte circa 5 bis 10 Minuten vor der Tötung der Maus durch zervikale Dislokation. Danach wurde innerhalb von 5 Minuten das Herz dem Thorax entnommen und die Aorta an eine Kanüle gehängt (Abbildung 13). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Aortenklappe nicht verletzt wurde. Die Kanüle durfte nicht zu tief platziert werden, da sonst die Aortenklappe durchstoßen und die Koronararterien verlegt würden und die globale Perfusion des Gewebes über die Koronargefäße nicht gewährleistet wäre. An die Kanüle wurde eine mit PBS gefüllte Spritze angeschlossen und das Blut vorsichtig aus dem Herzen gespült. Über die Kanüle wurde das Herz dann an ein Schlauchsystem angeschlossen, das mit Ca²⁺-freiem Puffer II befüllt war, um das verbliebene Blut aus dem Herzen zu spülen.

**Abbildung 13: Kanüliertes Herz**

Das Herz ist an der Aorta mit dem schwarzen Faden an der Kanüle befestigt. Der blaue Faden mit dem PE-Ring wurde zur Ischämieinduktion an der Ligaturstelle angebracht

Danach folgte eine sechsminütige Perfusion (2,8 ml/min) mit einer Kollagenaselösung, die konstant auf einer Temperatur von 37 °C gehalten wurde. Anschließend wurde das Herz in eine mit Waschpuffer I gefüllte Petrischale gelegt. Die Vorhöfe wurden wie die infarzierte Herzspitze abgetrennt und verworfen.

Das Abtrennen des infarzierten Apex wurde deutlich oberhalb der Einstichstelle der Fadenschlinge, die durch den Polyethylenring und den Faden noch sichtbar war, gewählt. Damit war sichergestellt, dass später nur Kardiomyozyten aus dem nicht infarzierten Herzgewebe isoliert wurden. Das *remote* Myokard kam zusammen mit dem Waschpuffer I in ein 50 ml Reaktionsgefäß und wurde 10 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Herzgewebe wieder in eine Petrischale überführt. Mithilfe einer feinen Schere wurde das verdaute Gewebe zerkleinert. Die Gewebestückchen wurden dann mit einer Plastikpasteurpipette aufgesaugt und vorsichtig wieder herausgeblasen. Dabei wurden die Kardiomyozyten aus dem Gewebe gelöst und in Lösung gebracht. Das Gewebslysat wurde durch ein Nylonnetz (150 µm Porengröße) filtriert und die übriggebliebenen Gewebestücke wurden von den gelösten Zellen getrennt. Um eine reinere Kardiomyozytenfraktion zu erhalten, wurde die filtrierte Lösung dreimal gewaschen. Nach zehnmütigem Sedimentieren der Zellen bildete sich ein Pellet. Der Überstand wurde abgenommen und Waschpuffer auf das sedimentierte Zellpellet gegeben. Dabei wurden die Zellen zuerst mit Waschpuffer I, dann mit Waschpuffer II und schließlich mit Waschpuffer III gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden die Zellen durch Invertieren vorsichtig resuspendiert. Die in 2.2.1 verwendeten Puffer sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

2.2.2 Messung des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes

2.2.2.1 Fluoreszenzindikator Fura-2 Acetoxymethylester

Ca^{2+} ist ein dynamischer sekundärer Botenstoff [112]. Er fluktuiert so schnell wie kein anderer intrazellulärer Signalstoff. Um den intrazellulären Ca^{2+} -Kreislauf darzustellen, wurde der von Tsien *et al.* entwickelte Fluoreszenzindikator Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet [113]. Durch die vier Acetoxymethylestergruppen ist er membranpermeabel und gelangt ungehindert über die Zellmembran in das Zellinnere der intakten Kardiomyozyte [112-114]. Innerhalb dieser wird Fura-2 AM von Esterasen zu Fura-2 gespalten. An die frei gewordenen Carboxylgruppen bindet Ca^{2+} .

Fura-2 ist ein ratiometrischer Indikator [112]. Je nachdem, wieviel Ca^{2+} an Fura-2 gebunden ist, verschiebt sich die Wellenlänge, bei der anregendes Licht eine maximale Fluoreszenzantwort induziert. Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration liegt das Fluoreszenzmaximum bei einer Anregungswellenlänge von 340 bis 350 nm. Wird die Ca^{2+} -Konzentration so weit reduziert, bis kein Ca^{2+} mehr in der Lösung vorhanden ist, verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum von Fura-2 zu höheren Wellenlängen und liegt dann bei 380 bis 390 nm (Abbildung 14).

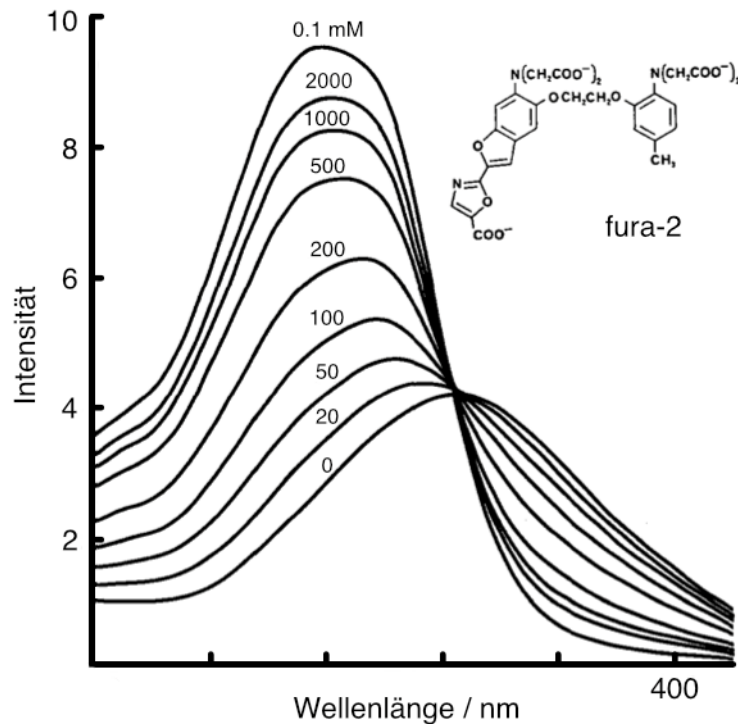


Abbildung 14: Fluoreszenzanregungsspektren von Fura-2 bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen
Rechts oben Strukturformel von Fura-2

2.2.2.2 Probenvorbereitung

Zur Messung des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufs wurden die isolierten und mit Fura-2 beladenen Kardiomyozyten in eine kleine Messkammer mit Perfusionspuffer pipettiert. Pro Messung wurden jeweils circa 3 Tropfen der Zellsuspension mit einer Pasteurpipette vorsichtig in dieses Bad überführt. Dort wurden die Kardiomyozyten ständig mit frischem, auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmtem Puffer umspült. Der frische Puffer wurde mithilfe einer Rollerpumpe (Ismatec Reglo Digital Peristaltic Pump; 4-Channels, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) in das Bad gepumpt. Im Zulauf der Pufferlösungen regelte ein Heizer (micro-Temperature Controller (mTCII, IonOptix, Milton, MA, USA) die Puffertemperatur und hielt sie konstant auf dem eingestellten Wert. Die Pufferlösung wurde an einem Überlauf mit einer weiteren Rollerpumpe wieder abgesaugt. Zu- und Ablauf erfolgten jeweils bei konstantem Druck und konstanter Fließgeschwindigkeit (1 ml/min).

Folgende Perfusionspuffer wurden verwendet:

- bei basaler Stimulation: Perfusionspuffer, siehe Tabelle 2;
- bei β -adrenerger Stimulation: Isoproterenol Hydrochloride (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst in Perfusionspuffer (10^{-7} M);
- bei Koffein-Stimulation: Caffeine, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA gelöst in Perfusionspuffer (10 mM).

2.2.2.3 Versuchsaufbau

An den Seiten des Kardiomyozytenbads befanden sich rechts und links Elektroden (MyoPacer EP Field Stimulator, IonOptix, Milton, MA, USA). Nach Aktivierung der elektrischen Stimulation mit 10 V bei 0,5 Hz kontrahierten die Kardiomyozyten im Takt. Die Kontraktion der Zellen wurde mit einem Mikroskop (Myocyte Fluorescence Microscope, MoticAE31 & Olympus UApo/340 Objective, IonOptix, Milton, MA, USA) verfolgt.

Bei aktivierter elektrischer Stimulation wurde über das Mikroskop eine geeignete Zelle ausgewählt. Mit einer Mikroskopkamera (MyoCam-STM, IonOptix, Milton, MA, USA) wurde über einen Monitor eine Feinjustierung durchgeführt, sodass die ausgewählte Kardiomyozyte den Messbereich voll ausfüllte. Nachdem die ausgewählte Kardiomyozyte in dem Fenster richtig platziert war, wurde die Messung gestartet und bei aktivierter elektrischer Stimulation die zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen sowie die Verkürzung der Sarkomere parallel erfasst. Die Messung der Sarkomerfunktion wird in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

2.2.2.4 Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen

Die Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde über Fluoreszenzaufnahmen detektiert (HyperSwitch Myocyte System, IonOptix, Corporation, Milton, MA, USA). Wenn Fura-2 an Ca^{2+} gebunden ist, liegt das Fluoreszenzmaximum bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm. Ungebundenes Fura-2 hat das Fluoreszenzmaximum bei 380 nm (Abbildung 14). Durch diese ratiometrische Messung wird der Einfluss von Photobleichung, von Ungleichheiten in der Beladung der Kardiomyozyten mit Fura-2 sowie von Unterschieden in den Zelldicken auf die Messwerte minimiert.

Während der Messung wurde mit einer Frequenz von 500 Hz zwischen den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm gewechselt. Pro Sekunde wurden somit an je 250 Messpunkten F_1 bei 340 nm und F_0 bei 380 nm erfasst und das Verhältnis F_1/F_0 berechnet, um eine hohe zeitliche Auflösung der Ca^{2+} -Kinetik zu gewährleisten.

Mit der elektrischen Stimulation werden spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle der ventrikulären Kardiomyozyte stimuliert, es kommt zur Depolarisation der Sarkolemma und Ca^{2+} strömt in die Zelle ein, wobei der RyR2 angeregt wird und sich für wenige Millisekunden öffnet [36, 40]. Ca^{2+} wird nun zusätzlich aus dem SR ins Zytosol freigesetzt und bindet dort an Fura-2. Nach elektrischer Stimulation zum Zeitpunkt t_0 kommt es im Ca^{2+} -Transienten (Abbildung 15) zu einem steilen Anstieg von F_1/F_0 . Dieser Anstieg repräsentiert die Geschwindigkeit, mit der Ca^{2+} aus dem SR über den RyR2 freigesetzt wird. Seine Amplitude ist proportional zu der freigesetzten Ca^{2+} -Menge.

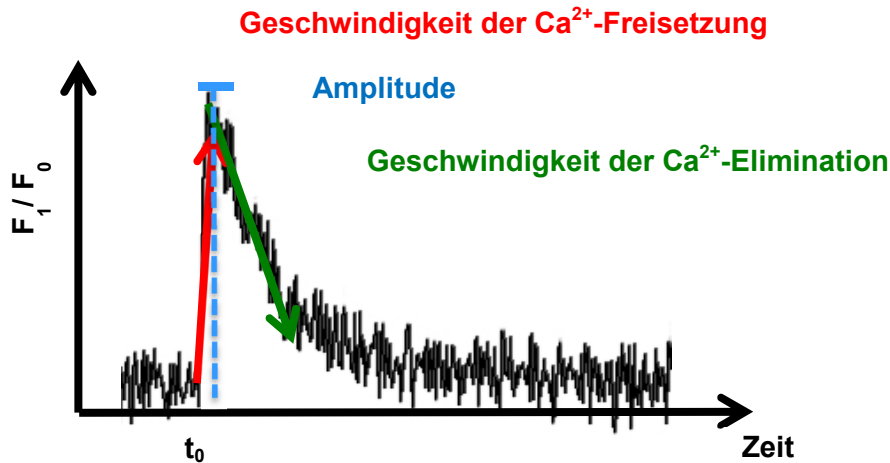


Abbildung 15: Repräsentativer Ca^{2+} -Transient

Ca^{2+} = Kalziumion; t_0 = Zeitpunkt der elektrischen Stimulation

Nach dem schnellen Ca^{2+} -Anstieg im Zytosol wird die Diastole eingeleitet und das zytosolische Ca^{2+} wird über die SERCA2a wieder in das SR zurück gepumpt. Ein kleiner Teil verlässt die Zelle über den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX), den PMCA und den mitochondrialen Uniporter. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nimmt ab, Fura-2 liegt nun vermehrt ungebunden vor. Aus der Abnahme von F_1/F_0 im Ca^{2+} -Transienten kann bestimmt werden, wie schnell Ca^{2+} aus dem Zytosol in das SR über die SERCA2a aufgenommen wird. Ab Beginn der elektrischen Stimulation dauert die Messung an den isolierten Kardiomyozyten höchstens 15 Minuten. Danach wurden die Kardiomyozyten aus dem Bad abgesaugt und frische resuspendierte Kardiomyozyten in die Messkammer pipettiert.

2.2.2.5 Messung der Gesamtmenge Ca^{2+} im SR durch Stimulation mit Koffein

Nach elektrischer Stimulation der Kardiomyozyten oder nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol wird nie das gesamte im SR vorhandene Ca^{2+} freigesetzt. Nach einem Koffeinbolus wird jedoch die gesamte Menge an Ca^{2+} aus dem SR ins Zytosol freigesetzt [43]. Er eignet sich daher zur Messung der Gesamtmenge an Ca^{2+} , die sich im SR der isolierten Kardiomyozyte befindet.

Dazu wurde die Kardiomyozyte zunächst für einige Sekunden elektrisch stimuliert und anschließend die elektrische Stimulation für circa 5 Sekunden ausgeschaltet. Die Zelle wurde in dieser Zeit weiter mit Perfusionspuffer perfundiert. Nach 5 Sekunden erfolgte die Stimulation der Kardiomyozyte durch schnellen Zulauf eines Koffeinbolus. Es kam zu einer einmaligen langen Kontraktion der Zelle, während der das im SR gespeicherte Ca^{2+} ausgeschüttet wurde. Gemessen wurde ein einzelner großer Ca^{2+} -Transient, dessen Amplitude als Maß für die Menge des im SR gespeicherten Ca^{2+} verwendet wurde (Abbildung 16).

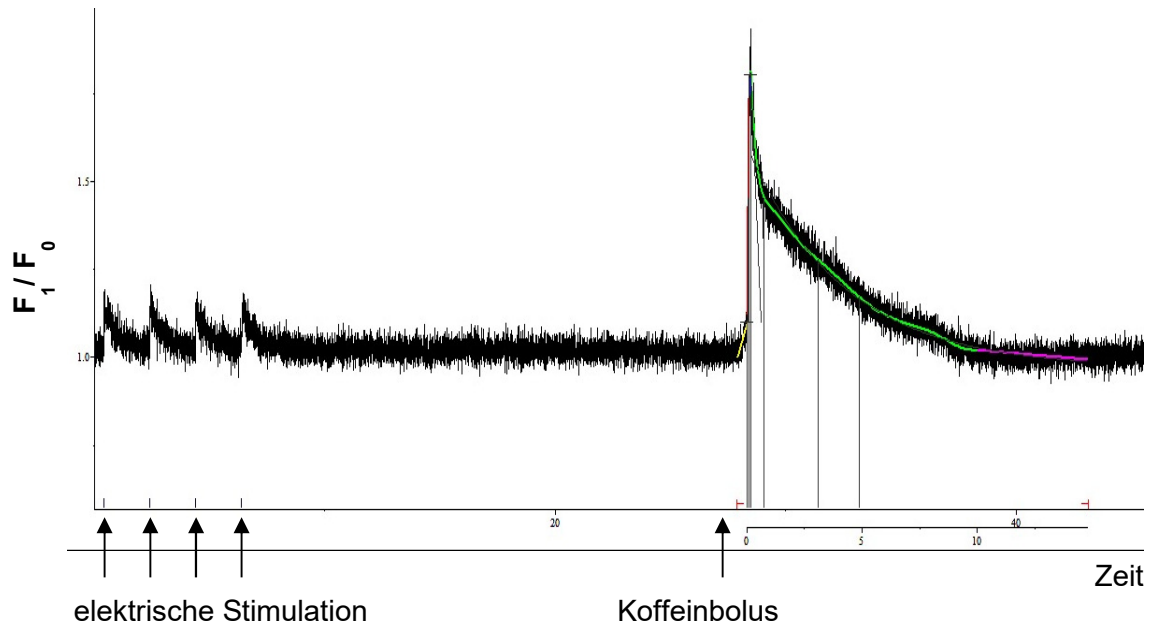


Abbildung 16: Repräsentativer Ca^{2+} -Transient nach Stimulation mit Koffein

2.2.2.6 Messung des SR- Ca^{2+} leaks

Es ist bekannt, dass selbst gesunde Kardiomyozyten im Ruhezustand Ca^{2+} über den RyR2 aus dem SR spontan ins Zytosol freisetzen, das sogenannte Ca^{2+} leak. Dabei handelt es sich jedoch um vernachlässigbar geringe Mengen an Ca^{2+} , die in der Regel keine Kontraktion auslösen [115]. Um zu prüfen, ob nach I/R die *remote* Kardiomyozyten im Ruhezustand spontan mehr Ca^{2+} über den RyR2 verlieren als die Kontroll-Kardiomyozyten, wurden diese jeweils mit bzw. ohne 1 mmol/l Tetracain Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) einer natrium- und Ca^{2+} -freien Lösung ausgesetzt. Tetracain blockiert den RyR2, sodass spontan kein Ca^{2+} mehr freigesetzt werden kann.

Hierzu wurden die Kardiomyozyten, wie unter Kapitel 2.2.1 beschrieben, isoliert und mit Fura 2 beladen (Kapitel 2.2.2.2). Im ersten Schritt wurden die Zellen zunächst etwa 20-mal in Perfusionspuffer I (Tabelle 3) bei 0,5 Hz elektrisch stimuliert, um den Ca^{2+} -Gehalt der Kardiomyozyten in ein Gleichgewicht zu bringen.

Es wurden zwei Versuchsreihen mit je 10 Zellen pro Herz durchgeführt. Bei einer der Versuchsreihen wurden die Kardiomyozyten nach Abschalten der elektrischen Stimulation mit tetracainversetztem Perfusionspuffer II 3 Minuten lang perfundiert und anschließend 1 Minute mit tetracainfreiem Perfusionspuffer II perfundiert. Der Perfusionspuffer II war dabei natrium- und Ca^{2+} -frei. Damit blieb der NCX inaktiv und Ca^{2+} konnte weder aus der noch in die Zelle gelangen. Darauf folgte, wie in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben, die Stimulation mit einem Koffeinbolus.

Bei der zweiten Versuchsreihe wurden die Kardiomyozyten nach Abschalten der elektrischen Stimulation 3 Minuten lang mit tetracainfreiem Perfusionspuffer II perfundiert

und anschließend mit einem Koffeinbolus stimuliert. Ausgewertet wurden jeweils die basale Ca^{2+} -Konzentration, der Koffein-induzierte zytosolische Ca^{2+} -Anstieg und die Koffein-induzierte zytosolische Ca^{2+} -Elimination von:

- *remote* Kardiomyozyten mit bzw. ohne tetracainversetztem Perfusionspuffer II
- Kontroll-Kardiomyozyten mit bzw. ohne tetracainversetztem Perfusionspuffer II.

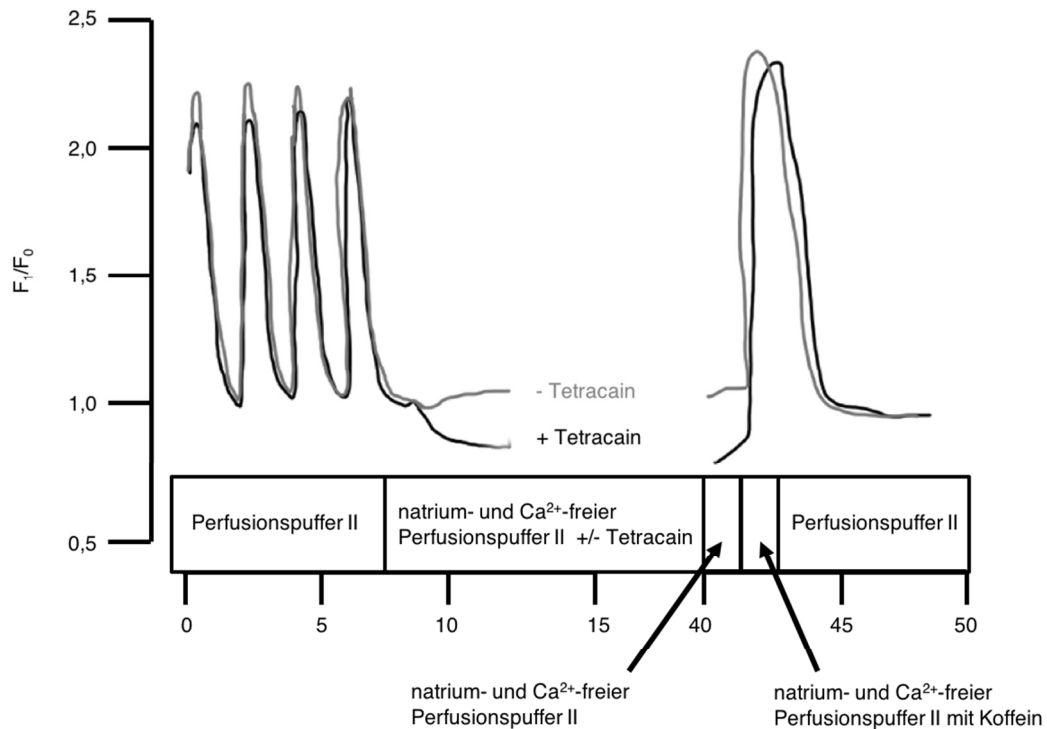


Abbildung 17: Messung des SR Ca^{2+} leaks

2.2.3 Messung der Sarkomerlänge

Wie bereits bei der Messung des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes (Kapitel 2.2.2) beschrieben, misst das IonOptix-Programm (HyperSwitch Myocyte System, IonOptix, Milton, MA, USA) bei jeder elektrischen Stimulation parallel den Ca^{2+} -Kreislauf und die Sarkomerfunktion [116]. Die Veränderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration werden hierbei über Fluoreszenzaufnahmen erfasst. Die kontraktile Amplitude sowie die Kontraktion und Relaxation der Sarkomere wird über Videoaufnahmen analysiert (MyoCam-S™, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA). Zu Beginn muss ein kleiner Ausschnitt der Sarkomere auf dem Bildschirm ausgewählt werden, in dem eine *region of interest* (ROI) definiert wird (Abbildung 18). Ideal ist ein Bereich, in dem das gestreifte Muster der Sarkomere gut und klar erkennbar ist. Die ROI wird bei jeder Zelle neu platziert und kann in der Größe verändert werden.

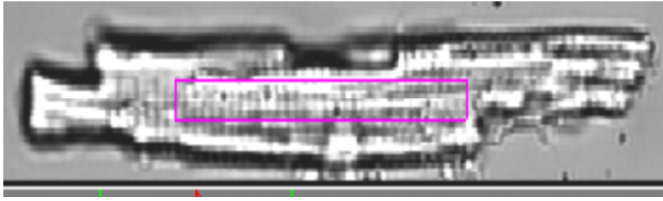


Abbildung 18: Auswahl der Kardiomyozyte und der Sarkomere für die Messung der Ca^{2+} -Transienten und der Sarkomerfunktion

Das Programm erkennt das Streifenmuster, das sich in der ROI befindet und die Sarkomere darstellt (Abbildung 18). Es misst die Abstände zwischen den Streifen, wobei 1000 Datenpunkte pro Sekunde erfasst werden. Mittels schneller Fouriertransformation wird die Sarkomerfunktion berechnet (Abbildung 19). Die Verkürzung der kontraktile Amplitude beginnt zum Zeitpunkt t_0 , wenn die basale Ruhephase endet und die elektrische Stimulation erfolgt. Sie wird maximal am Kurvenminimum. Die Kontraktionsgeschwindigkeit bestimmt, wie schnell das Minimum der Funktion nach der Stimulation erreicht wird. Die Relaxationsgeschwindigkeit dagegen ist ein Maß dafür, wie schnell die vor der elektrischen Stimulation vorliegende Sarkomerlänge wieder erreicht wird.

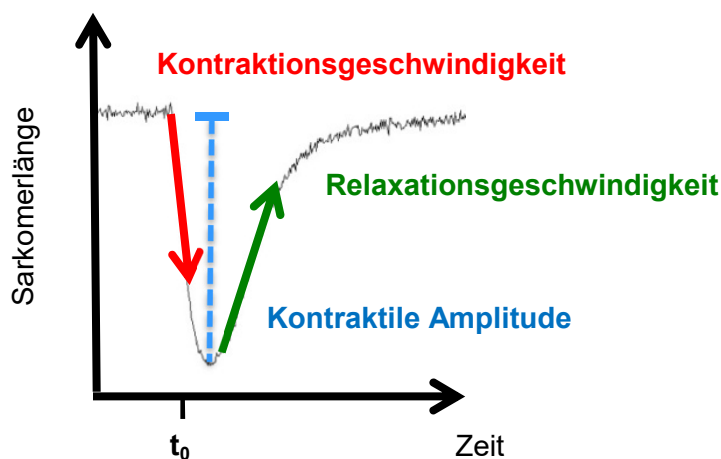


Abbildung 19: Repräsentative Sarkomerfunktion
 t_0 = Zeitpunkt an dem die elektrische Stimulation erfolgt

2.2.4 Auswertung der Ca^{2+} -Transienten und der Sarkomerfunktion

Die von jeder Kardiomyozyte aufgenommenen Ca^{2+} -Transienten sowie die parallel dazu berechneten Sarkomerfunktionen wurden dahingehend beurteilt, ob sie für eine weitergehende Auswertung geeignet waren. Auswahlkriterien waren: Die Amplitude des Ca^{2+} -Transienten und der Sarkomerfunktion musste größer als $0,03 \mu\text{m}$ sein und der Anstieg des Ca^{2+} -Transienten musste ohne Nebenmaxima in das Maximum übergehen. Zur Bestimmung der Sarkomerfunktion einer Kardiomyozyte musste ein deutliches Streifenmuster erkennbar und eine Kontraktion der Zelle vorhanden sein. Von jeder

gemessenen Kardiomyozyte wurden mindestens zehn Ca^{2+} -Transienten und mindestens zehn Sarkomerfunktionen für die weitere Auswertung ausgewählt.

Ausgewertet wurden die Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerfunktionen mit der IonWizard Software (Version 6.4, IonOptix, Milton, MA, USA). Dabei wurden die 10 Transienten bzw. Sarkomerfunktionen einer Kardiomyozyte aufaddiert und gemittelt. Aus diesem gemittelten Transienten bzw. aus der gemittelten Sarkomerfunktion wurden dann Kenngrößen berechnet, z. B. Amplitude, Anstieg und Abfall der Ca^{2+} -Konzentration. Aus den jeweils 10 gemittelten Kenngrößen der 10 Kardiomyozyten eines Mäuseherzens wurde der arithmetische Mittelwert berechnet. Damit lagen dann für jedes Mäuseherz gemittelte Kenngrößen vor.

2.2.4.1 Ermittlung der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs im Zytosol

Wie schnell Ca^{2+} aus dem SR ins Zytosol freigesetzt wird, lässt sich dem Anstieg des Ca^{2+} -Transienten nach der Stimulation entnehmen. Der Ca^{2+} -Transient steigt direkt nach der Stimulation nahezu linear an, weshalb zur Ermittlung der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs (v_{Anstieg}) die Zeit $t_{P75\%}$ ausgewertet wurde, nach der 75 % der maximalen Amplitude erreicht waren (Abbildung 20).

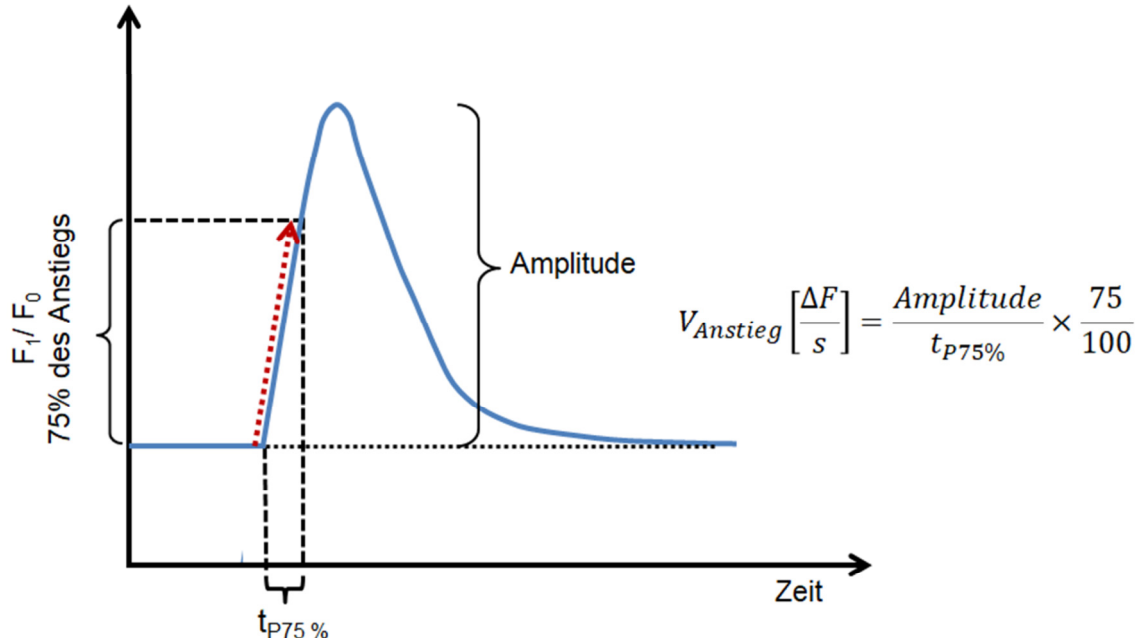


Abbildung 20: Bestimmung der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs

2.2.4.2 Ermittlung der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol

Wie schnell Ca^{2+} aus dem Zytosol eliminiert und wieder in das SR aufgenommen wird, lässt sich dem Abfall des Ca^{2+} -Transienten nach Durchlaufen des Maximums entnehmen. Nach Erreichen des Maximums fällt der Ca^{2+} -Transient nahezu linear ab. Die

Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination ($v_{\text{Elimination}}$) wurde deshalb anhand der Zeit $T_{\text{bl}75\%}$ berechnet, nach der die Amplitude um 75 % abgefallen war (Abbildung 21).

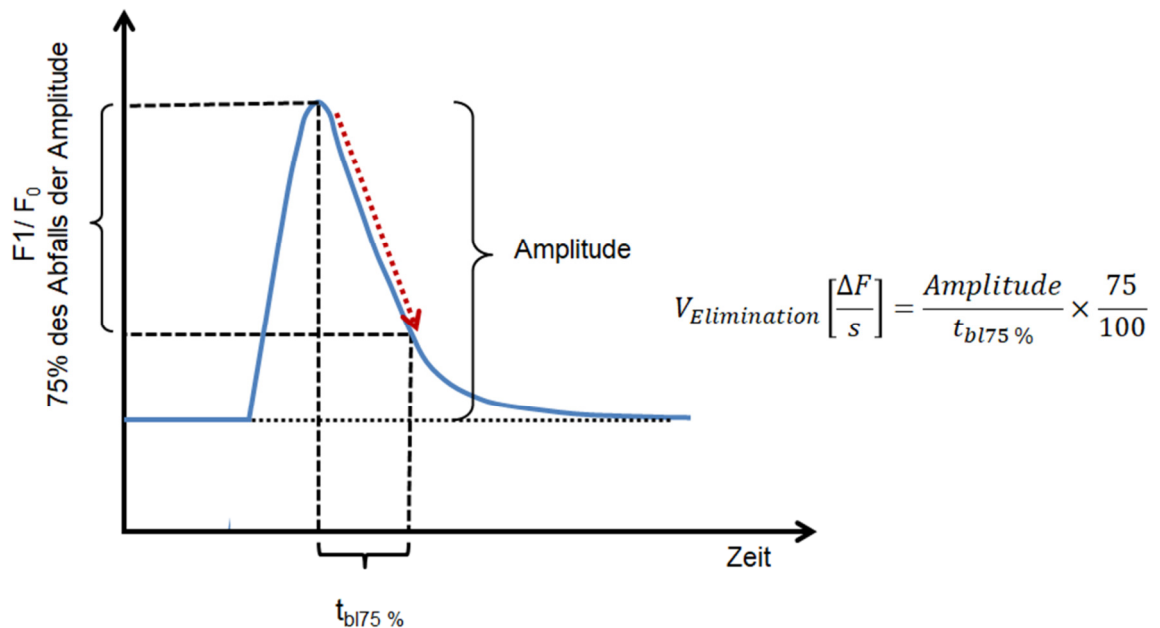


Abbildung 21: Bestimmung der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination

2.2.4.3 Ermittlung der Kontraktionsgeschwindigkeit der Sarkomere

Die Sarkomerfunktion fällt direkt nach der Stimulation nahezu linear ab. Zur Ermittlung der Kontraktionsgeschwindigkeit ($v_{\text{Kontraktion}}$) wurde deshalb die Zeit $T_{\text{K}75\%}$ ausgewertet, nach der die kontraktile Amplitude um 75 % verkürzt war (Abbildung 22).

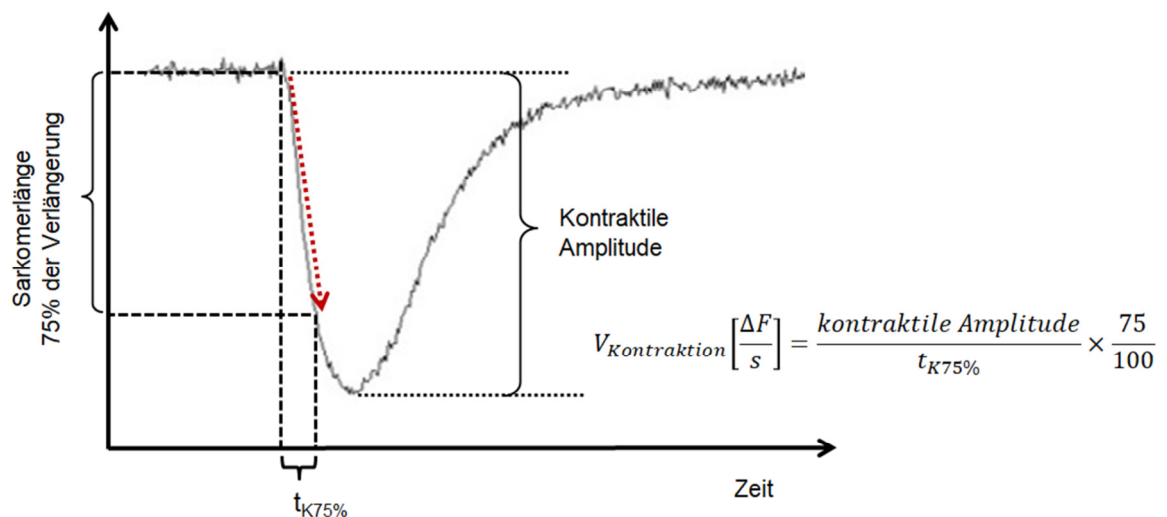


Abbildung 22: Bestimmung der Kontraktionsgeschwindigkeit aus der Sarkomerfunktion

2.2.4.4 Ermittlung der Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere

Nachdem die Sarkomerfunktion das Minimum durchlaufen hat, steigt sie in der ersten Phase wieder nahezu linear an. Um die Relaxationsgeschwindigkeit ($v_{\text{Relaxation}}$) zu ermitteln, wurde deshalb die Zeit $t_{R75\%}$ ausgewertet, nach der die Sarkomerfunktion wieder auf 75 % angestiegen war (Abbildung 23).

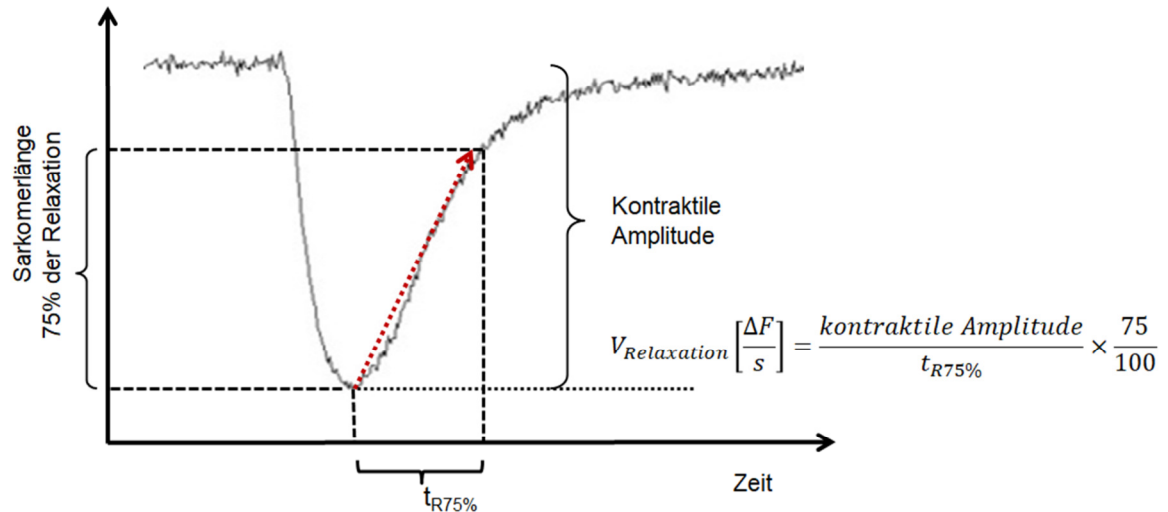


Abbildung 23: Bestimmung der Relaxationsgeschwindigkeit aus der Sarkomerfunktion

2.3 Proteinanalyse

2.3.1 *Western blotting*: Arbeitsschritte

Western blot ist ein Verfahren, mit dem Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden und anschließend ein Protein der Wahl identifiziert und quantitativ ausgewertet werden kann. Die dazu erforderlichen Präparationsschritte werden in den folgenden Unterkapiteln beschrieben.

Die *Western-blot*-Analysen 24 Stunden nach I/R wurden von dem Kollegen Florian Funk durchgeführt. Die *Western-blot*-Analysen 10 Tage nach I/R wurden anfangs gemeinsam und nach Einarbeitung, selbstständig von der Promovendin durchgeführt.

2.3.1.1 *Herstellung der Herzlysate*

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und das Herz entnommen. Die Vorhöfe wurden abgetrennt und verworfen. Ebenso wurde die infarzierte Herzspitze vom nicht-infarzierten Gewebe abgetrennt. Zwischen dem Infarktgebiet und dem nicht-ischämischen Gewebe wurde der mittlere Teil großzügig verworfen, um sicherzustellen, dass im *remote* Gewebe weder infarziertes Gewebe noch Gewebe der Randzonen des Infarkts vorhanden war. Die *remote* Gewebeproben wurden zum Ausspülen von Blut kurz in 0,9%ige NaCl-Lösung gelegt. Danach wurden sie sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung der Herzlysate wurden die gefrorenen Herzgewebe in jeweils 600 µl Präparationspuffer gegeben und auf Eis gekühlt. Zur Homogenisierung der Herzgewebeproben wurde ein Ultra Turrax IKA®T10 basic (IKA® Works, Inc., Wilmington USA) verwendet. Jede Gewebeprobe wurde in drei aufeinanderfolgenden Intervallen 10 Sekunden unter Kühlung mit Eis homogenisiert, wobei zwischen den Intervallen jeweils 10 Sekunden gewartet wurde. Die Herzlysate wurden anschließend aliquotiert und einige der Aliquotes 1:2 mit Lämmli-puffer (Tabelle 4) versetzt.

2.3.1.2 *Membranpräparationen*

Zur Präparation der Membranen wurde das Herz wie bei der Herstellung der Herzlysate entnommen, die Vorhöfe entfernt, das *remote* Myokard isoliert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und pulverisiert. Danach wurde es in 800 µl kalten Präparationspuffer (Tabelle 5) aufgenommen und 3 x 30 Sekunden mit einem Ultra Turrax IKA®T10 basic (IKA® Works, Inc., Wilmington USA) homogenisiert.

Das Homogenat wurde in einem ersten Schritt durch 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C mit einer Beschleunigung von 8000 g aufgetrennt, der Überstand anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C mit 100000 g 30 Minuten lang zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde danach in 150 µl Aufbewahrungspuffer aufgenommen.

Für die Proteinbestimmung mittels BCA-Methode wurde ein Teil der gewonnenen Probe 1:10 mit DdH₂O verdünnt und bei -80 °C eingefroren. Der Rest wurde mit Lämmli-puffer versetzt und in Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.1.3 Quantitative Erfassung der Proteinmenge mit der BCA-Methode

Zur Bestimmung der Proteinmenge der Herzlysate sowie der Membranen wurden diese 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und mit einem Reagenz, bestehend aus Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B und Pierce® BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Scientific, Rockford, USA) (Zusammensetzung 1:50) im Verhältnis 1:8 vermischt. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe (Bovine-Serum-Albumin). Die Proteinmenge wurde anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem Synergy™ Mx Microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) ausgewertet.

2.3.1.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Dazu wurde ein aus einem Sammelgel und einem 15%igen Trenngel bestehendes Polyacrylamidgel (Tabelle 6) gegossen. Es wurde darauf geachtet, dass jede Geltasche mit der gleichen Proteinmenge beladen wurde. Zusätzlich wurde ein Marker (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgetragen. Bis zum Erreichen des Trenngels wurden die Proteine für circa 20 Minuten bei einer elektrischen Spannung von 80 V (PowerPac™ Basic Power Supply, Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) aufgetrennt. Danach wurde die Spannung eine Stunde lang auf 150 V erhöht.

Zur Ermittlung der RyR2-Expression und der Phosphorylierungsstellen pRyR2(Ser2808) und pRyR2(Ser2814), sowie der HAX-1 Expression wurden Membranen anstelle von Herzlysaten verwendet. Dabei wurde ein 6 %iges Trenngel gegossen. Die Proteinauftrennung wurde zunächst 20 Minuten lang bei 80 V und danach 40 Minuten lang bei 150 V durchgeführt.

2.3.1.5 Western blot

Der Transferstapel wurde als Schichtstruktur aufgebaut (Abbildung 24). Gel und Transfermembran (Immobilon®-P Transfer Membrane, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden direkt aufeinander gelegt und zwischen je drei Lagen Whatman®

Chromatographie-Papier (Whatman® 3 mm Chr *Chromatography Paper*, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Großbritannien) gepackt. Bevor die Membran auf das Gel gelegt wurde, wurde sie 30 Sekunden mit 100 % Methanol aktiviert und anschließend mit *Western-blot*-Puffer gespült.

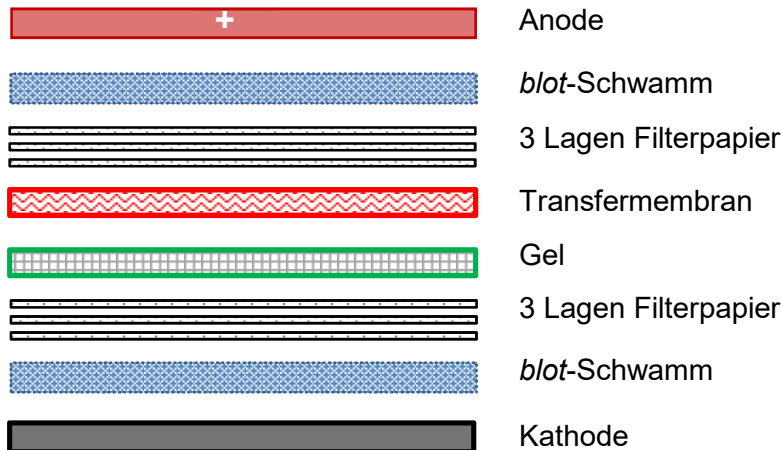


Abbildung 24: Schematischer Aufbau des Transferstapels

Abgeschlossen wurde der Stapel auf beiden Seiten mit einem *blot*-Schwamm. Der Transferstapel wurde daraufhin so in die *blot*-Kammer gesetzt, dass die Membran gegenüber der Anode und das Gel gegenüber der Kathode lagen. Nach Anlegen der Spannung war das elektrische Feld senkrecht zu Membran und Gel gerichtet. Die Kammer wurde mit *Western-blot*-Puffer nahezu vollständig aufgefüllt.

Bei den Herzlysaten wurde 1 Stunde mit einer Spannung von 100 V gearbeitet. Zur Detektion der Expression des RyR2 sowie dessen Phosphorylierung wurde das *Blotting* 15 Stunden bei 30 V durchgeführt.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran im SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zweimal mit 0,5%iger Blockmilch (siehe Tabelle 8) blockiert und danach über Nacht in einer gekühlten Petrischale aus Glas mit einem der Primärantikörper aus Tabelle 8, der in einer 5%igen Blockmilch gelöst war, geschwenkt und inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung aus Blockmilch und Primärantikörper aus der Petrischale abgezogen und bei -20°C eingefroren. Insgesamt wurden die Primärantikörper höchstens fünfmal verwendet. Die über Nacht im Primärantikörper inkubierte Membran wurde viermal mit je 30 ml TBST-Puffer im SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System gewaschen. Dann wurde für 10 Minuten der entsprechende Sekundärantikörper aus Tabelle 9 auf die Membran gegeben. Danach erfolgte erneut ein viermaliger Waschschrift mit TBST-Puffer und schließlich wurde die Membran in eine mit TBST-Puffer gefüllte

Petrischale überführt. Die Sekundärantikörper wurden in einer 0,5%igen Blockmilch gelöst und ebenfalls bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.1.6 *Film*

Nach Entfernen der überschüssigen Antikörper wurde die *Western-blot*-Membran in der Dunkelkammer in 6 ml Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) circa 5 Minuten geschwenkt und dadurch aktiviert. Anschließend wurde sie, geschützt durch zwei Klarsichtfolien, in die Entwicklungskassette gelegt und der Röntgenfilm (Fuji medical X-Ray Film 100NIF 18x24, Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan) wurde durch Chemilumineszenz belichtet. Nach der Belichtung wurde der Film mit Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher (Sigma-Aldrich, NY, US) entwickelt und mit Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer/replenisher (Sigma-Aldrich, NY, USA) fixiert. Zur Auswertung wurden die *Western-blot*-Bilder eingescannt und mit der Software Image Studio™ (Lite LI-Core® Biotechnology, Nebraska, USA) ausgewertet.

2.3.2 PKA-Aktivitätsbestimmung

2.3.2.1 *Herstellung der Herzlysate*

Die Herzgewebestücke für die Bestimmung der PKA-Aktivität wurden auf dieselbe Weise gewonnen wie bei Herstellung der Herzlysate (Kapitel 2.3.1.1). Die in Stickstoff eingefrorenen Herzgewebe aus dem *remote* Gebiet mit und ohne I/R wurden in Lysepuffer (Tabelle 10) überführt und mithilfe eines Ultra Turrax IKA®T10 basic (IKA® Works, Inc., Wilmington USA) bei 10 000 rpm dreimal nacheinander 20 Sekunden homogenisiert. Danach wurden die Homogenate bei 30 000 rpm 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

2.3.2.2 *Quantitative Erfassung der Proteinmenge mit der BCA-Methode*

Für die Bestimmung der PKA-Aktivität wurde die Proteinmenge wie in Kapitel 2.3.1.3 beschrieben erfasst.

2.3.2.3 *ELISA*

Die globale PKA-Aktivität des *remote* Gebietes wurde mithilfe eines Enzymimmunoassays (ELISA; ADI-EKS-390A, Enzo-Life Science, Farmingdale, NY, USA) bestimmt [117]. Die einzelnen Verfahrensschritte sind in Abbildung 25 skizziert.

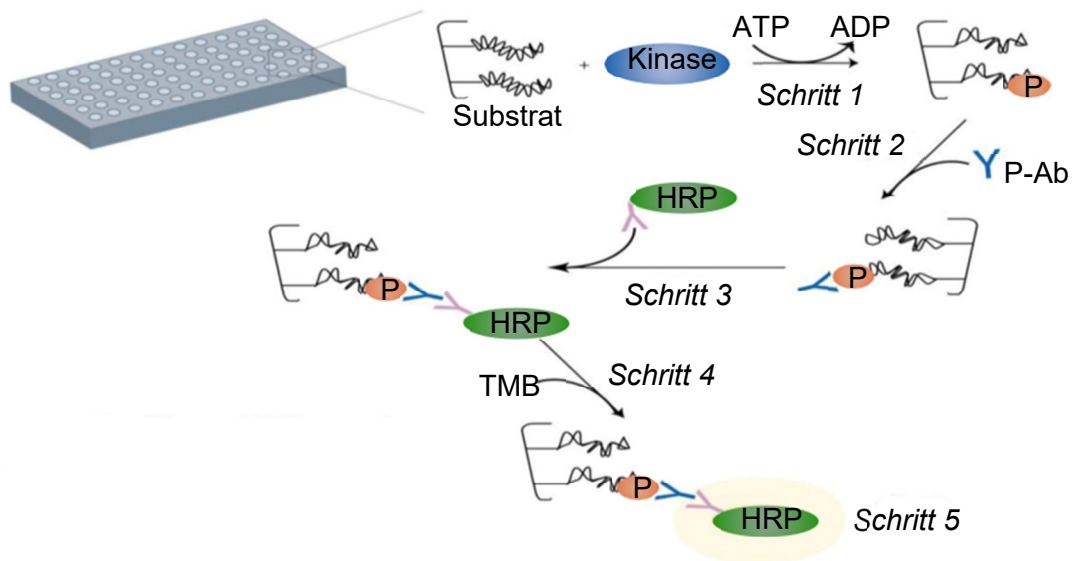


Abbildung 25: ELISA Verfahrensschritte

- Schritt 1: Zugabe der Kinase und des ATPs; Kinasereaktion
- Schritt 2: Zugabe des phosphatspezifischen Antikörpers (P-Ab)
- Schritt 3: Zugabe des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers (HRP)
- Schritt 4: Zugabe des Tetramethylbenzidin (TMB) Substrates
- Schritt 5: Absorptionsmessung bei 450 nm

Die *wells* der zur Bestimmung der PKA-Aktivität verwendeten Mikrotiterplatte waren bereits mit einem Substrat vorbeschichtet. Dieses Substrat wurde durch Zugabe von 50 μl Kinasepufferlösung pro *well* befeuchtet und bei Raumtemperatur 10 Minuten eingeweicht. Danach wurde die Pufferlösung wieder vorsichtig aus den *wells* abgesaugt. Die entsprechend Kapitel 2.3.2.1 präparierten Homogenate wurden 1:100 verdünnt und davon jeweils 30 μl als Dubletten in die *wells* pipettiert.

Zusätzlich wurde eine Standardreihe aufgetragen. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 10 μl gelöstem ATP pro Probe ausgelöst. Die Inkubation dauerte 90 Minuten bei 30 °C. Danach wurde die Lösung aus den *wells* abgesaugt, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Mit der ATP-Zugabe wurden die vorliegenden Substrate durch die aktive - in der Probe vorhandene PKA - phosphoryliert. Zur Bindung der phosphatspezifischen Antikörper an die phosphorylierten Substrate wurden 40 μl des phosphatspezifischen Antikörpers (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) zu jeder Probe gegeben und bei Raumtemperatur 60 Minuten lang inkubiert. Darauf folgten vier Waschschrte mit je 100 μl Waschpuffer.

Die Bindung des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers an den bereits gebundenen Primärantikörper erfolgte durch Zugabe von 40 μl Meerrettichperoxidase konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin G (1 mg/ml) zu jeder Probe. Nach 30-minütiger Inkubation folgten wiederum vier Waschschrte mit je 100 μl Waschpuffer. Jedem *well* wurden 60 μl des Farbstoffes Tetramethylbenzidin hinzugefügt. Tetramethylbenzidin ist ein Chromogen und dient als Nachweis für die Meerrettichperoxidase. Nach der Aktivierung

durch die Peroxidase verfärbte sich Tetramethylbenzidin blau. Nach 90 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 20 µl saurer Lösung gestoppt. Es erfolgte ein Farbumschlag und das nicht umgesetzte, blaue Tetramethylbenzidin verfärbte sich gelb.

Die Intensität der jetzt noch vorhandenen Blaufärbung war proportional zur vorliegenden PKA-Aktivität und wurde bei 450 nm mit dem Synergy™ Mx Microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) ausgewertet. Durch Vergleich mit der Standardreihe und unter Berücksichtigung des entsprechenden Leerwertes wurde die jeweilige PKA-Aktivität der Proben quantitativ bestimmt.³

2.4 Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla–San Diego, CA, USA). Für Vergleiche von zwei Datensätzen wurde der ungepaarte Student's-*t*-Test genutzt. Als statistisch signifikant wurde ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ betrachtet. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aus *n* unabhängigen Experimenten angezeigt. Ausreißer wurden über den *Grubbs*-Test identifiziert.

³ Die Bestimmung der PKA-Aktivität wurde zusammen mit Frau Irmhild Rüter durchgeführt.

3 Ergebnisse

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Ca^{2+} -Kinetik und die mechanischen Eigenschaften im nicht-ischämischen Teil des Herzens in der frühen Phase 24 Stunden nach I/R analysiert. In dieser frühen Phase ist die Mortalität besonders hoch [108]. Vergleichend wurde zudem der Zeitpunkt 10 Tage nach I/R untersucht. In beiden Fällen war das *remote* Myokard von besonderem Interesse, da es nach Myokardinfarkt durch den Verlust des ischämischen Myokards erhöhten mechanischen Belastungen ausgesetzt ist und den Funktionsverlust des Herzens kompensieren muss, um den Organismus noch ausreichend zu durchbluten.

Bisher ist bekannt, dass das *remote* Myokard in der akuten Phase nach I/R eine kontraktile Dysfunktion aufweist [21]. Ob dabei Störungen im myozytären Ca^{2+} -Kreislauf eine Rolle spielen, ist bislang nicht bekannt. Die Kenntnis der ursächlichen Mechanismen stellt eine Voraussetzung dar, um durch gezielte therapeutische Interventionen den Funktionsverlust nach I/R zu minimieren und den Kreislauf stabil zu halten.

3.1 24 Stunden nach I/R

Zunächst wurde die Frühphase 24 Stunden nach I/R betrachtet und untersucht, ob im nicht-ischämischen Gewebe Veränderungen am Ca^{2+} -Kreislauf auftreten. Die *Western-blot*-Daten (siehe Kapitel 3.1.3 – 3.1.5) für die Analyse der Proteinexpression 24 Stunden nach I/R wurden von Florian Funk erhoben.

3.1.1 Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme

Die Messung der Ca^{2+} -Kinetik (Kapitel 2.2.2.4) wurde an Kardiomyozyten durchgeführt, die aus dem *remote* Myokard von 10 operierten Herzen und 11 scheinoperierten Herzen (Kontrollgruppe) isoliert wurden. Von den ursprünglich 11 operierten Herzen wurde ein Herz verworfen, das im EKG keine signifikante ST-Hebung aufwies und daher eine einstündige Ischämie nicht sichergestellt werden konnte. Die Auswertung der Ca^{2+} -Transienten erfolgte entsprechend dem in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Vorgehen.

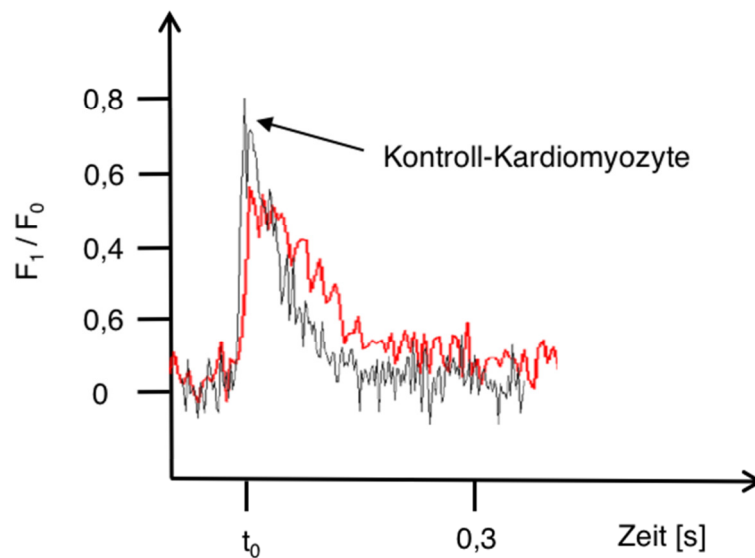


Abbildung 26: Repräsentative Darstellung für die Ca^{2+} -Transienten einer Kontroll-Kardiomyozyte (schwarz) und einer *remote* Kardiomyozyte (rot) 24 Stunden nach I/R während eines kontraktiven Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0)

3.1.1.1 Amplitude

Abbildung 27 stellt die Amplitude der gemessenen Ca^{2+} -Transienten dar. Für jedes Herz wurden 10 Zellen gemessen, wobei jeweils die Amplitude aus 10 Ca^{2+} -Transienten gemittelt worden war. Die Amplitude ist proportional zu der Menge an Ca^{2+} , die nach elektrischem Stimulus zum Zeitpunkt t_0 aus dem SR ins Zytosol freigesetzt wird. Die 24 Stunden nach I/R mit jeder elektrischen Stimulation ins Zytosol freigesetzte Menge an Ca^{2+} war signifikant ($P < 0,01$) um 19 ± 4 % geringer als in Kardiomyozyten ohne Ischämie /Reperfusionsschaden. Nach Stimulation mit Isoproterenol (10^{-7} M) war die Amplitude der *remote* Kardiomyozyten wieder genauso hoch wie in den Kontroll-Kardiomyozyten ($P = 0,92$; Abbildung 27). Durch β -adrenerge Stimulation war es somit möglich, die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol vor jeder Zellkontraktion wieder zu normalisieren.

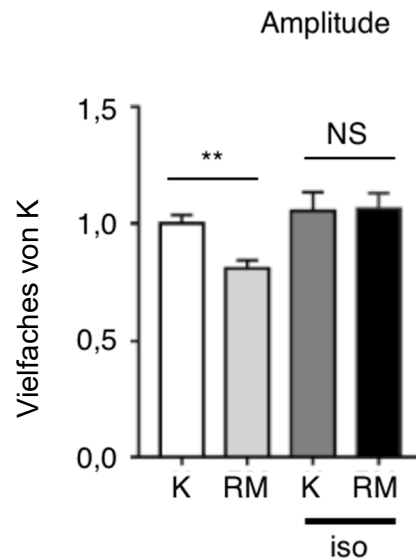


Abbildung 27: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Amplituden von Ca^{2+} -Transienten \pm SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $N = 10/11$ Herzen. ** $P < 0,01$; Ca^{2+} = Kalziumion; iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; NS = nicht signifikant; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Amplituden sind normiert auf die gemittelte Amplitude der Kontrollgruppe nach basaler Stimulation.

3.1.1.2 Koffein-induzierte Amplitude

Aufgrund der geringeren Menge an Ca^{2+} , die mit jeder Stimulation unter Basalbedingungen aus dem SR ins Zytosol freigesetzt wurde, stellte sich die Frage, ob in den *remote* Kardiomyozyten generell weniger Ca^{2+} im SR gespeichert war. Daher erfolgte zusätzlich die Messung der Gesamtmenge Ca^{2+} im SR (Kapitel 2.2.2.5) durch Koffeinstimulation.

Die Stimulation der Kardiomyozyten mit einem Koffeinbolus zeigte, dass die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten von *remote* Kardiomyozyten nach I/R signifikant ($P < 0,05$) um $12 \pm 7\%$ geringer war als die der Kardiomyozyten aus scheinoperiertem Myokard. Daraus lässt sich schließen, dass in den *remote* Kardiomyozyten nach I/R weniger Ca^{2+} im SR gespeichert war (Abbildung 28).

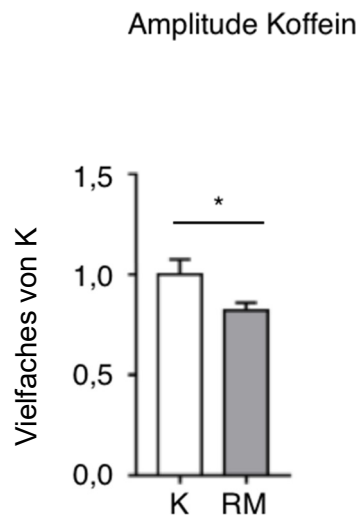


Abbildung 28: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach Koffeinstimulation 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Amplituden von Ca^{2+} -Transienten \pm SEM. Gemessen wurden $N = 12$ Kontroll-Kardiomyozyten und 15 *remote* Kardiomyozyten aus insgesamt 3 verschiedenen Herzen. * $P < 0,05$; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Werte sind normiert auf die gemittelte Amplitude der Kontrollgruppe.

3.1.1.3 Untersuchungen des Ca^{2+} leaks

Zur Untersuchung des Ca^{2+} leaks wurden die Kardiomyozyten in natrium- und Ca^{2+} -freiem Milieu ohne elektrischen Stimulus sowohl mit als auch ohne Tetracain perfundiert und schließlich mit Koffein stimuliert (siehe 2.2.2.6). Durch das natrium- und Ca^{2+} -freie Milieu bleibt der NCX inaktiv und es findet kein Ca^{2+} -Austausch statt [118]. Anhand der basalen Ca^{2+} -Konzentration wurden *remote* Kardiomyozyten und Kontroll-Kardiomyozyten verglichen. Im Ruhezustand ohne elektrische Stimulation tritt Ca^{2+} spontan und in geringen Mengen über den RyR2 aus dem SR in das Zytosol aus. Dabei ist die Ca^{2+} -Menge so gering, dass es nicht zur Kontraktion der Sarkomere kommt. Tetracain jedoch unterdrückt die spontane Freisetzung von Ca^{2+} über den RyR2. Während der Perfusion der Kardiomyozyten mit dem Perfusionspuffer II, der mit 1 mmol/l Tetracain versetzt war, sank die basale Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur basalen Ca^{2+} -Konzentration, die bei der Perfusion der Kardiomyozyten mit Perfusionspuffer II ohne Tetracain gemessen wurde. Im Vergleich der *remote* Kardiomyozyten und der Kontroll-Kardiomyozyten ergab sich bei der basalen Ca^{2+} -Konzentration mit bzw. ohne Tetracain kein signifikanter Unterschied ($P = 0,57$). In den *remote* Kardiomyozyten liegt demzufolge kein erhöhter Ausstrom von Ca^{2+} im Ruhezustand vor (Abbildung 29).

Δ Basale Ca^{2+} -Konzentration nach Tetracain

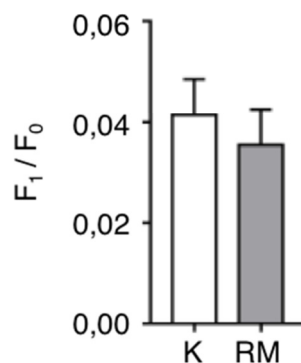


Abbildung 29: Differenz basale Ca^{2+} -Konzentration mit und ohne Tetracain

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der basalen Ca^{2+} -Konzentration nach Tetracain \pm SEM. Gemessen wurden $N = 15$ Kontroll-Kardiomyozyten und $N = 12$ *remote* Kardiomyozyten aus insgesamt 3 verschiedenen Herzen. K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte

3.1.1.4 Koffein-induzierte Amplitude mit und ohne Tetracain

Bei der Koffein-induzierten Amplitude zeigte sich sowohl mit ($P = 0,22$) als auch ohne Tetracainperfusion ($P = 0,11$) kein Unterschied zwischen den *remote* Kardiomyozyten und den Kontroll-Kardiomyozyten (Abbildung 30). Dies bestätigt die vorherige Aussage, dass die spontane Ca^{2+} -Freisetzung in den *remote* Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontroll-Kardiomyozyten nicht erhöht ist (Abbildung 29).

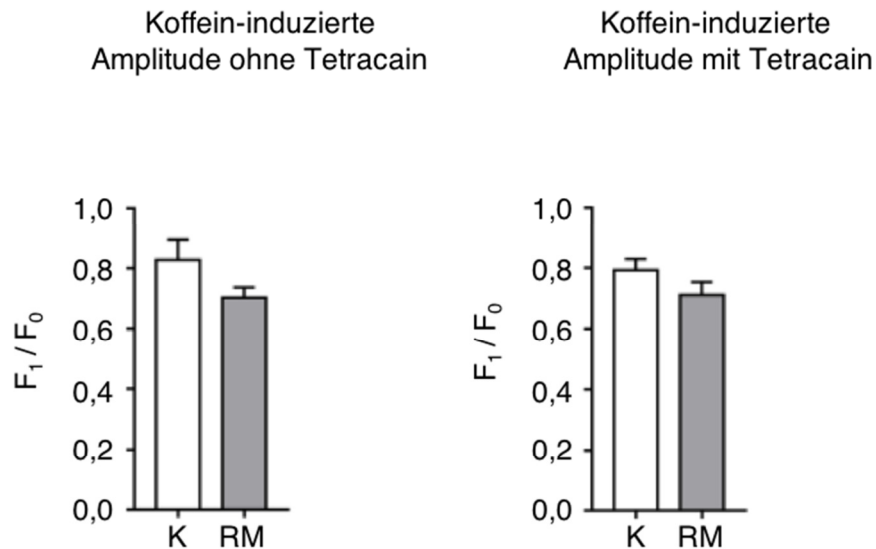


Abbildung 30: Koffein-induzierte Amplitude, mit und ohne Tetracain

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Koffein-induzierten Amplitude links ohne Tetracain und rechts mit Tetracain \pm SEM. Gemessen wurden $N = 9$ Kontroll-Kardiomyozyten und $N = 16$ *remote* Kardiomyozyten aus insgesamt 3 verschiedenen Herzen. K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte

3.1.1.5 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs

Die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs (v_{Anstieg}) im Zytosol war nach basaler Stimulation in den *remote* Kardiomyozyten verglichen mit den Kardiomyozyten, die keinem Ischämie-/Reperfusionsschaden unterlagen, um $17 \pm 6\%$ verlangsamt ($P < 0,05$). Nach Stimulation der Kardiomyozyten mit dem β -Sympathomimetikum Isoproterenol zeigte sich in der Freisetzungsgeschwindigkeit kein signifikanter Unterschied mehr ($P = 0,17$; Abbildung 31).

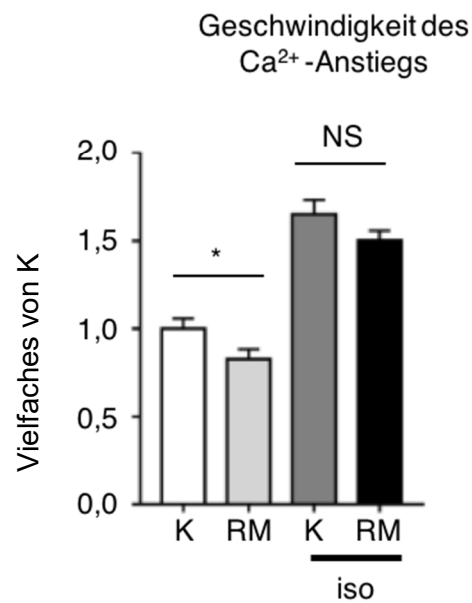


Abbildung 31: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Ca^{2+} -Geschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $N = 10/11$ Herzen. * $P < 0,05$; Ca^{2+} = Kalziumion; iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; NS = nicht signifikant; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der Kontrollgruppe nach basaler Stimulation.

3.1.1.6 Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination

Die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination ($v_{\text{Elimination}}$) war in den *remote* Kardiomyozyten 24 Stunden nach I/R signifikant ($P < 0,05$) um $24 \pm 9\%$ verlangsamt.

Die unveränderte NCX-Aktivität deutet auf eine verminderte SERCA2a-Aktivität hin. Nach Stimulation mit Isoproterenol war die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination bei den *remote* Kardiomyozyten wieder genauso hoch wie bei den Kontroll-Kardiomyozyten ($P = 0,92$; Abbildung 32).

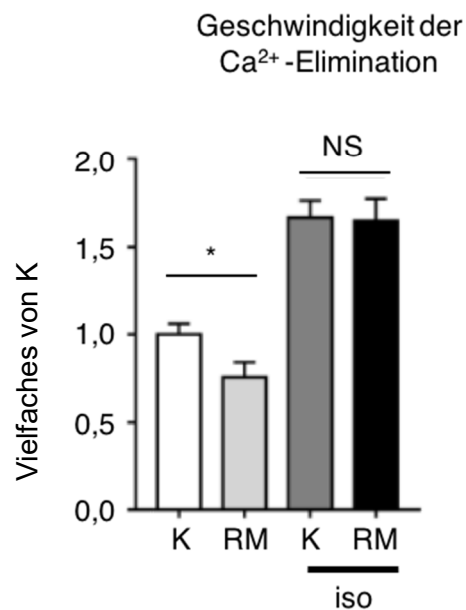


Abbildung 32: Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Ca^{2+} -Geschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $N = 10/11$ Herzen. * $P < 0,05$; Ca^{2+} = Kalziumion; iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; NS = nicht signifikant; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der Kontrollgruppe nach basaler Stimulation.

In *remote* Kardiomyozyten wird Ca^{2+} verlangsamt aus dem Zytosol eliminiert. Zytosolisches Ca^{2+} wird in Mauskardiomyozyten zu 92 % von der SERCA2a in das SR gepumpt und zu 7 % über den NCX aus der Zelle eliminiert [41]. Um zu überprüfen, ob die verlangsamte Ca^{2+} -Elimination ausschließlich durch eine verminderte SERCA2a-Aktivität verursacht wurde und nicht auch eine verminderte NCX-Aktivität vorlag, wurde die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination nach Koffeinstimulation bestimmt. Die Geschwindigkeit des Koffein-induzierten Abfalls des Ca^{2+} -Transients in der natrium- und Ca^{2+} -freien Lösung spiegelt die Aktivität des NCX wider. Koffein öffnet die RyR2 und die SERCA2a kann unabhängig von ihrer Aktivität kein zytosolisches Ca^{2+} mehr eliminieren.

3.1.1.7 Koffein-induzierte Ca^{2+} -Elimination

Die NCX-Aktivität wurde aus der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination der Koffein-Transienten bestimmt. Durch den Koffeinbolus wird der RyR2 offen gehalten und die zytosolische Ca^{2+} -Elimination geschieht unabhängig von der SERCA2a-Aktivität. Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination nach Koffeinstimulation in den *remote* Kardiomyozyten im Vergleich mit den Kontroll-Kardiomyozyten nicht verändert war (Abbildung 33). Folglich ist die basal gemessene verlangsamte Ca^{2+} -Elimination der *remote* Kardiomyozyten (Abbildung 32) auf eine reduzierte SERCA2a-Aktivität zurückzuführen.

Koffein-induzierte
 Ca^{2+} -Elimination

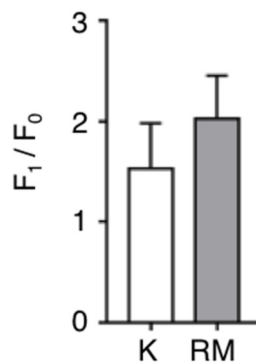


Abbildung 33: Koffein-induzierte Ca^{2+} -Elimination 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der basalen Ca^{2+} -Konzentration nach Koffeinstimulation \pm SEM. Gemessen wurden $N = 9$ Kontroll-Kardiomyozyten und $N = 16$ *remote* Kardiomyozyten aus insgesamt 3 verschiedenen Herzen. K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ca^{2+} -Kinetik 24 Stunden nach I/R bei den *remote* Kardiomyozyten langsamer verlief als bei den Kardiomyozyten aus dem scheinoperierten Myokard. Wie in Abbildung 26 dargestellt, war die Amplitude der *remote* Kardiomyozyten kleiner, die zytosolische Ca^{2+} -Freisetzung sowie die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR waren verlangsamt. Nach β -adrenerger Stimulation war die Ca^{2+} -Kinetik der *remote* Kardiomyozyten nach I/R auf dem gleichen Stand wie bei den Kardiomyozyten aus dem scheinoperierten Gewebe ohne I/R.

3.1.2 Sarkomerfunktion

Die Messung der Sarkomerfunktion (2.2.3) erfolgte parallel zu der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Messung der myozytären Ca^{2+} -Kinetik. Die Sarkomerfunktion wurde entsprechend dem in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Vorgehen ausgewertet.

Die Sarkomerfunktion wurde nur bei solchen Herzen ausgewertet, bei denen sie eindeutig erfasst worden war. Die kontraktile Amplitude der Sarkomerfunktion musste größer als $0,03 \mu\text{m}$ sein. An der Kardiomyozyte musste sowohl ein deutliches Streifenmuster erkennbar als auch eine Kontraktion der Zelle vorhanden sein. Dadurch verkleinerte sich die Anzahl der gemessenen Herzen in der Kontrollgruppe auf 9 und nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol in den *remote* Herzen auf 8. Das β -Sympathomimetikum Isoprenalin beschleunigte Kontraktion und Relaxation der Zellen. Es sollte hiermit die Frage beantwortet werden, ob nach β -adrenerger Stimulation die *remote* Kardiomyozyten genauso schnell wie die Kontroll-Kardiomyozyten kontrahieren und relaxieren (Methode siehe 2.2.3).

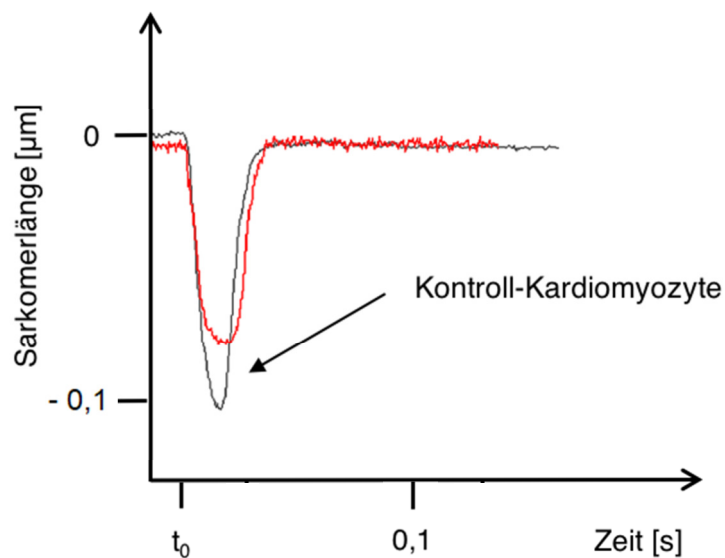


Abbildung 34: Repräsentative Aufzeichnung für die Sarkomerlänge einer *remote* Kardiomyozyte 24 Stunden nach I/R (rot) und einer Kontroll-Kardiomyozyte (schwarz) unter Basalbedingungen während eines kontraktiven Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0)

3.1.2.1 Kontraktile Amplitude

Die kontraktile Amplitude war bei den *remote* Kardiomyozyten nach einer Stunde Ischämie und 24 Stunden Reperfusion um $22 \pm 6 \%$ signifikant ($P < 0,05$) kürzer als in den Kardiomyozyten ohne Ischämie und Reperfusion. Nach β -adrenerger Stimulation war ein Trend zu einer kleineren kontraktile Amplitude zu erkennen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($P = 0,09$; Abbildung 35).

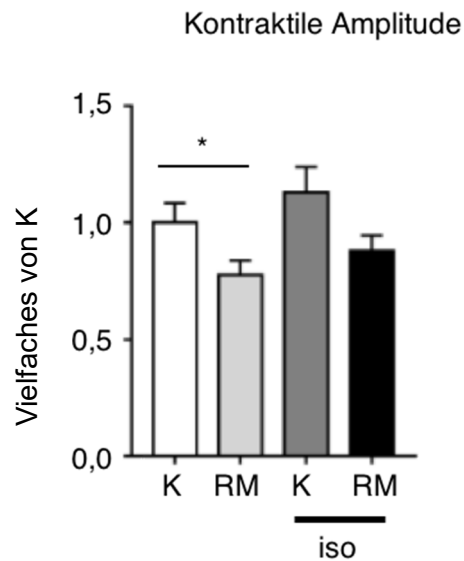


Abbildung 35: Kontraktile Amplitude nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der kontraktile Amplitude \pm SEM. Nach basaler Stimulation wurden Kardiomyozyten aus $N = 9$ Kontroll-Herzen und $N = 10$ *remote* Herzen ausgewertet, nach Isoproterenol Stimulation wurden $N = 9$ Kontroll-Herzen und $N = 8$ *remote* Herzen ausgewertet; * $P < 0,05$; iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte.

3.1.2.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Kontraktionsgeschwindigkeit $v_{\text{Kontraktion}}$ war nach I/R nicht signifikant verändert ($P = 0,40$). Auch nach Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den *remote* Kardiomyozyten ($P = 0,61$; Abbildung 36). Es war jedoch ein Trend zu einer verminderten Kontraktionsgeschwindigkeit erkennbar.

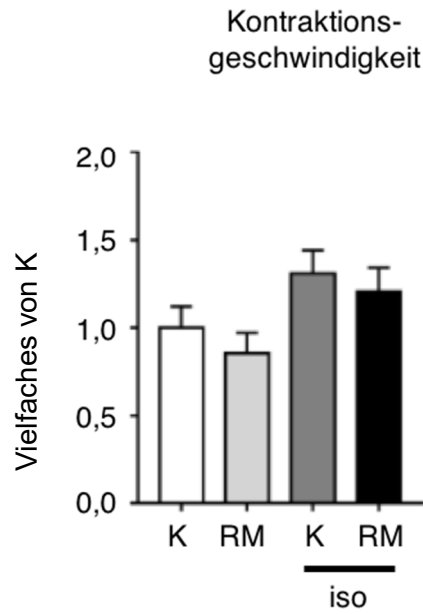


Abbildung 36: Kontraktionsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Kontraktionsgeschwindigkeit \pm SEM. Nach basaler Stimulation wurden Kardiomyozyten aus $N = 9$ Kontroll-Herzen und $N = 10$ *remote* Herzen ausgewertet, nach Isoproterenol Stimulation wurden $N = 9$ Kontroll-Herzen und $N = 8$ *remote* Herzen ausgewertet. iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der Kontrollgruppe nach basaler Stimulation.

3.1.2.3 Relaxationsgeschwindigkeit

Wie die Kontraktionsgeschwindigkeit änderte sich auch die Relaxationsgeschwindigkeit $v_{\text{Relaxation}}$ bei den *remote* Kardiomyozyten sowohl nach basaler Stimulation ($P = 0,24$) als auch nach β -adrenerger Rezeptor Aktivierung nicht signifikant ($P < 0,47$; Abbildung 37). Ein Trend zu einer langsameren Relaxationsgeschwindigkeit war jedoch zu erkennen.

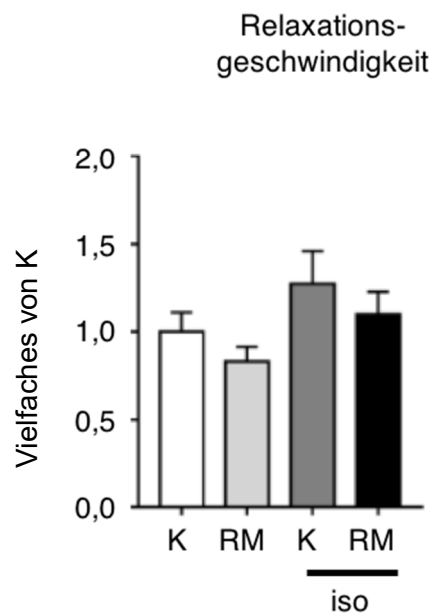


Abbildung 37: Relaxationsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Relaxationsgeschwindigkeit \pm SEM. Nach basaler Stimulation wurden Kardiomyozyten aus $N = 9$ Kontroll-Herzen und $N = 10$ *remote* Herzen ausgewertet, nach Isoproterenol Stimulation wurden $N = 9$ Kontroll-Herzen und $N = 8$ *remote* Herzen ausgewertet. iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der Kontrollgruppe nach basaler Stimulation.

Die mechanischen Eigenschaften der Sarkomere lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Kardiomyozyten des *remote* Myokards nach I/R zeigten im Vergleich mit den Kontroll-Kardiomyozyten eine verminderte kontraktile Amplitude (Abbildung 34). Nach I/R tendierten sie zu verminderter, jedoch nicht signifikant veränderter Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Nach β -adrenerger Stimulation bleibt ein Trend bestehen, der jedoch für keinen der untersuchten Parameter signifikant ist.

3.1.3 Proteinexpression von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes

Bei den unter 3.1.3 und 3.1.4 beschriebenen Experimenten wurde die Ischämieinduktion von der Promovendin und die *Western blot*-Analysen von Herrn Florian Funk (aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.P. Schmitt) durchgeführt. Aufgrund der verlangsamten intrazellulären Ca^{2+} -Kinetik und der verminderten Ca^{2+} -Beladung des SR im *remote* Myokard nach einstündiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion (siehe Kapitel 3.1.1) wurde die Proteinexpression wichtiger Ca^{2+} -Regulatoren untersucht. Die Expression der SERCA2a, des RyR2 und der PLN-Monomere wurde mit der *Western-blot*-Methode gemessen. Um gleiche Proteinmengen im Gel aufzutragen, wurden diese mittels der BCA-Methode (siehe Kapitel 2.3.1.2) ermittelt. Die ermittelten SERCA2a-, RyR2- und Phospholamban (PLN)-Monomer-Expressionen wurden auf die Expressionsstärke des kardialen Troponin I (cTnI) normalisiert. Es wurden zunächst Expressionsanalysen von PLN-Monomeren, SERCA2a und RyR2 durchgeführt.

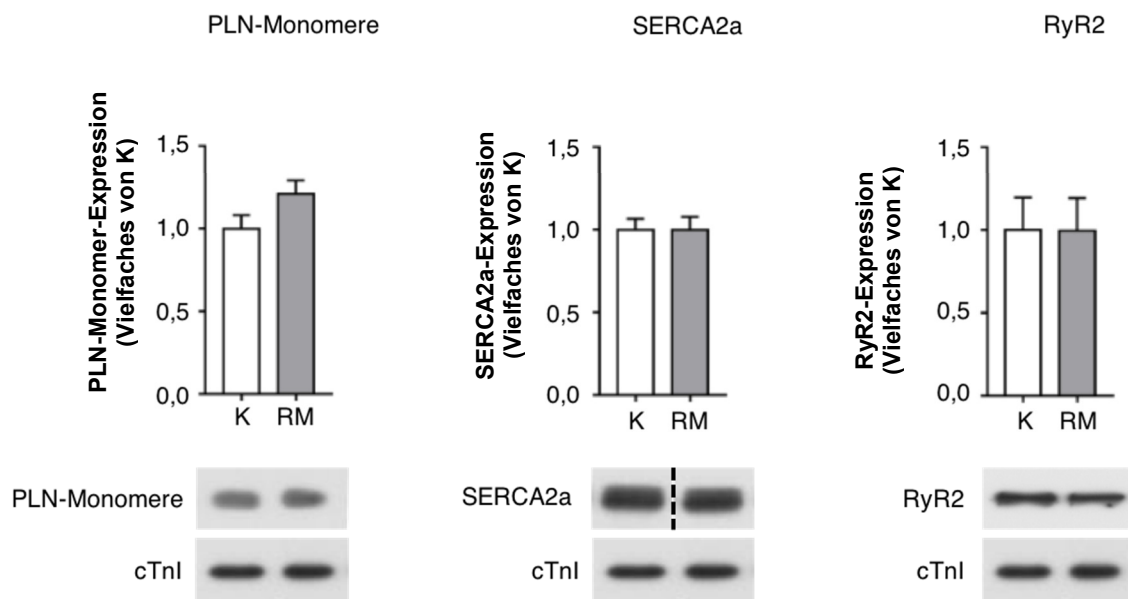


Abbildung 38: Expressionen von Regulatoren des Ca^{2+} -Kreislaufes 24 Stunden nach I/R

Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Expression \pm SEM) aus $N = 7 - 12$ Kontroll- bzw. *remote* Myokard. cTnI = kardiales Troponin I; K = Kontroll-Myokard; PLN = Phospholamban; RM = *remote* Myokard; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; SERCA2a = sarco/endoplasmatic calcium ATPase 2a

Die Expressionsanalyse der PLN-Monomere ($P = 0,086$), der SERCA2a ($P = 0,98$) und des RyR2 ($P = 0,99$) zeigten 24 Stunden nach I/R keine Unterschiede im *remote* Myokard im Vergleich zum Kontroll-Myokard (Abbildung 38). Des Weiteren wurde überprüft, ob sich 24 Stunden nach I/R im *remote* Myokard die Expression von Proteinen, insbesondere von HS1 assoziierten Protein X-1 (HAX-1) und S100A1, die mit SERCA2a und PLN interagieren und diese regulieren, veränderte [67, 70, 71].

Die Expression beider Proteine unterschied sich 24 Stunden nach I/R in ihrer Proteinexpression nicht von den analogen Gewebearealen aus scheinoperierten Kontrollherzen ($P = 0,98$ bzw. $P = 0,75$; Abbildung 39).

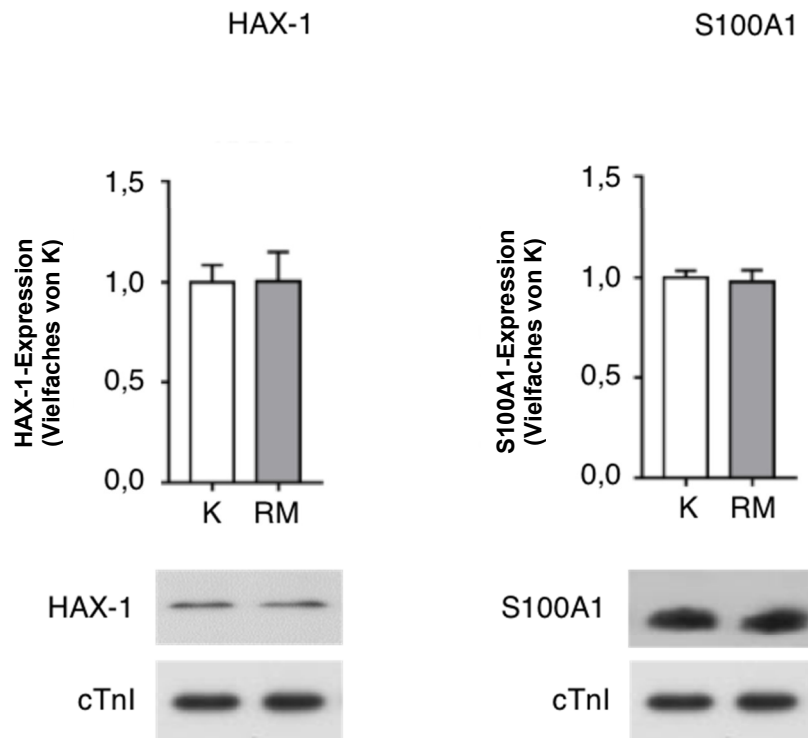


Abbildung 39: Proteinexpression von HAX-1 und S100A1 24 Stunden nach I/R

Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Proteinexpression \pm SEM) aus $N = 6$ Kontroll- bzw. *remote* Herzen. cTnI = kardiales Troponin I; HAX-1 = HS assoziiertes Protein X-1; K = Kontroll-Myokard; RM = *remote* Myokard.

3.1.4 Aktivitätsmessung von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes

Aufgrund der Beobachtung, dass die Ca^{2+} -Kinetik nach basaler Stimulation verlangsamt war und nach β -adrenerger Stimulation wieder normalisiert werden konnte (siehe Kapitel 3.1.1), liegt die Vermutung nahe, dass 24 Stunden nach I/R im *remote* Myokard eine basal verminderte Aktivität der Ca^{2+} -regulatorischen Proteine vorliegt, weil deren Expression unverändert ist und durch β -adrenerge Stimulation ihre Aktivität auf das Aktivitätsniveau von wt-Tieren nach I/R angehoben werden kann. Da β -adrenerge Agonisten die Funktion der Ca^{2+} -Regulatoren durch PKA-abhängige Phosphorylierung erhöhen, wurde in dieser Arbeit der Phosphorylierungszustand dieser Phosphorylierungsstellen ermittelt. Deshalb wurden zunächst die PKA-abhängigen Phosphorylierungsstellen, PLN an Ser16, RyR2 an Ser(2808) und cTnI an Ser(23/24) untersucht. Da bekannt ist, dass das PLN überwiegend als Pentamer vorliegt, aber nur das PLN-Monomer mit der SERCA2a durch direkte Interaktoren inhibiert und diese Inhibition dann besonders stark ist,

wenn das PLN-Monomer unphosphoryliert vorliegt, wurde zunächst der Phosphorylierungsstatus von PLN an Serin16 mittels *Western blot* im *remote* bzw. Kontroll-Myokard analysiert [55].

Ausgewertet wurden jeweils 8 Herzen pro Gruppe. Die in jeder Probe ermittelte Phosphorylierung wurde auf die jeweilige Gesamtmenge von PLN normiert. Die Phosphorylierung der PLN-Monomere an Ser16 war im *remote* Myokard gegenüber dem Kontroll-Myokard um das $2,9 \pm 0,4$ -Fache signifikant vermindert ($P < 0,001$; Abbildung 40). Zusätzlich wurde die PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle des RyR2 an Ser2808 untersucht. Bei der Phosphorylierung des RyR2 an Ser2808 ($P = 0,82$) im *remote* Myokard zeigten sich keine Veränderungen (Abbildung 41).

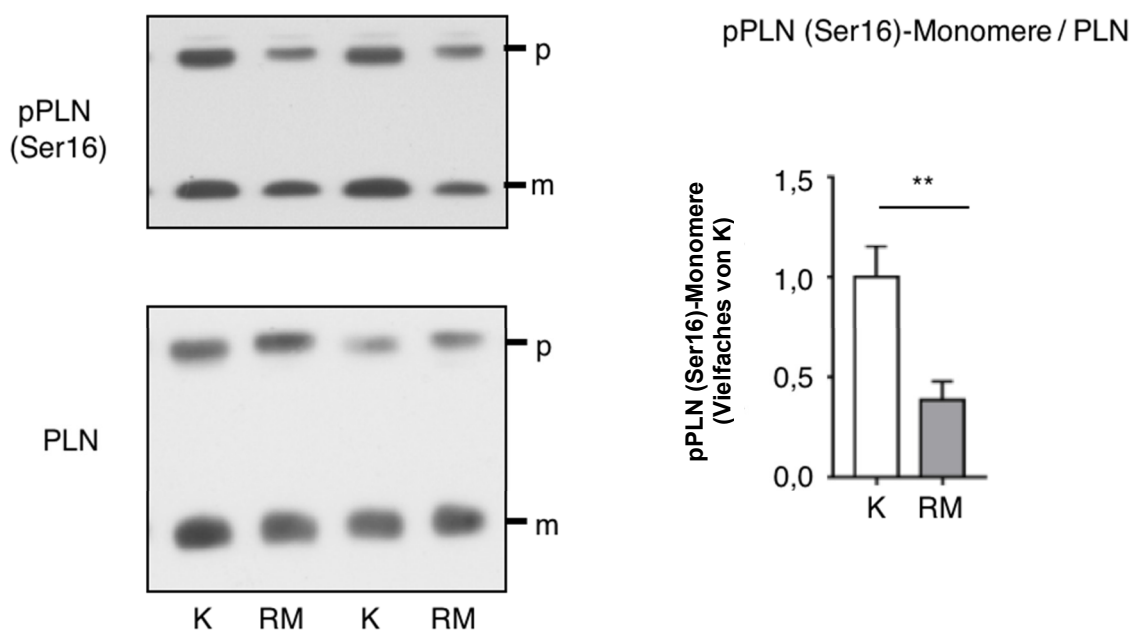


Abbildung 40: Phosphorylierung der PLN Monomere an Ser16 24 Stunden nach I/R

Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Phosphorylierung des PLN (Ser16) \pm SEM) aus $N = 8$ Kontroll- bzw. $N = 7$ *remote* Herzen. ** $P < 0,01$; K = Kontroll-Myokard; m = PLN-Monomer; p = PLN-Pentamer; PLN = Phospholamban; RM = *remote* Myokard; Ser16 = Serin 16.

Das kardiale Troponin I (cTnI) wird über die PKA an seiner Phosphorylierungsstelle Serin23/24 phosphoryliert [119]. Es ist kein direkter Ca^{2+} -Regulator, jedoch wurde wegen seiner Funktion als Ca^{2+} -Sensitizer an den Myofilamenten und die verminderte kontraktile Amplitude, die 24 Stunden nach I/R an den isolierten *remote* Kardiomyozyten vorlag, der Phosphorylierungszustand von cTnI untersucht. Die Phosphorylierung des kardialen Troponin I (cTnI) an Ser23/24 wurde auf die Gesamtmenge des cTnI normalisiert. Die Phosphorylierung von cTnI an Ser23/24 war im nicht-ischämischen Myokard verglichen mit dem Kontroll-Myokard unverändert ($P = 0,81$; Abbildung 41).

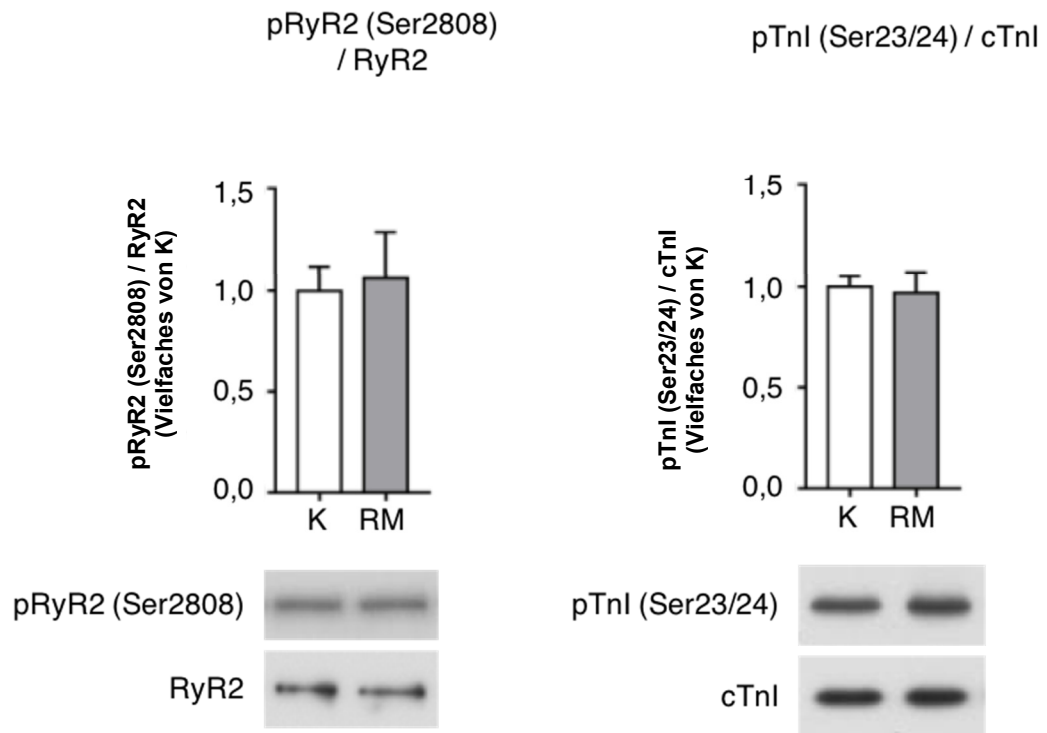


Abbildung 41: Phosphorylierung des RyR2 an Ser2808 und Phosphorylierung des cTnI an Ser23/24 24 Stunden nach I/R

Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Phosphorylierung von cTnI \pm SEM) aus insgesamt $N = 8$ Kontroll- bzw. *remote* Herzen. cTnI = kardiales Troponin I; K = Kontroll-Myokard; pRyR2 (Ser2808) = phospho Ryanodin-Rezeptor 2 (Serin2808); pTnI (Ser23/24) = phospho Troponin I (Serin23/24); RM = *remote* Myokard; RyR2 = Ryanodin Rezeptor 2; Ser23/24 = Serin23/24

Da die PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle der PLN-Monomere an Ser16 eine Veränderung zeigte, wurden im nächsten Schritt zusätzlich noch die CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstellen von PLN an Threonin17 (Thr17) und von dem RyR2 an Serin2814 überprüft. Die Phosphorylierung der PLN-Monomere an Thr17 wurde auf die Gesamtmenge von PLN und die Phosphorylierung des RyR2 an Ser2814 auf die Gesamtmenge von RyR2 normiert.

Nach I/R war im *remote* Myokard die CaMKII-abhängige Phosphorylierung der PLN-Monomere an Thr17 ($P = 0,50$) und die des RyR2 an Ser2814 ($P = 0,48$) im Vergleich zum Kontroll-Myokard unverändert (Abbildung 42).

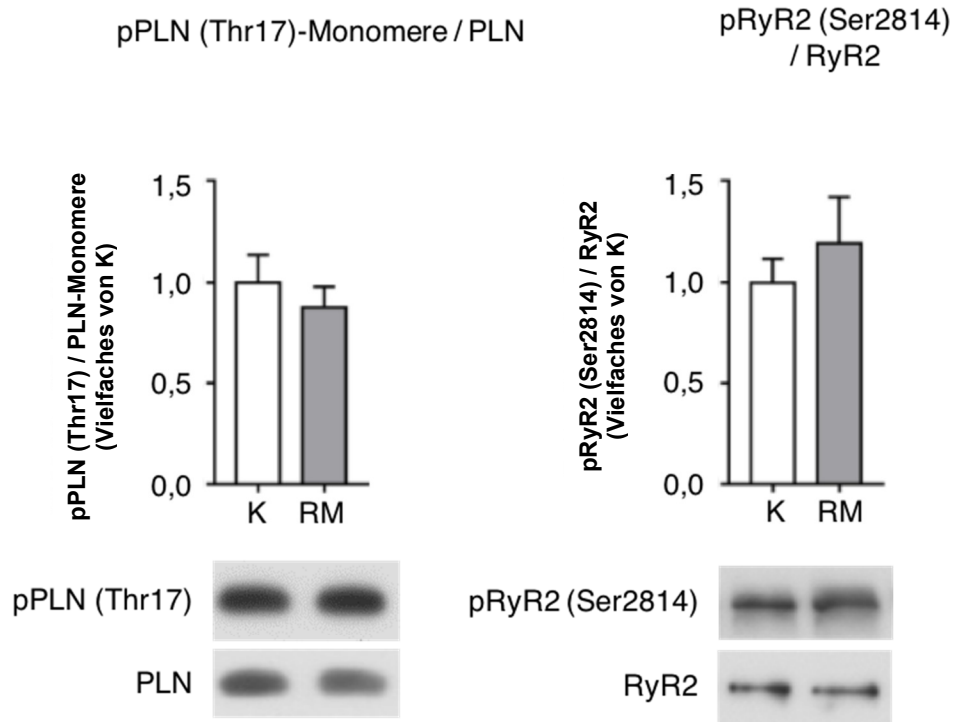


Abbildung 42: Phosphorylierung des PLN an Thr17 und Phosphorylierung des RyR2 an Ser2814 24 Stunden nach I/R

Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Phosphorylierung des RyR2 \pm SEM) aus $N = 6 - 7$ Kontroll- bzw. $N = 8$ *remote* Herzen. K = Kontroll-Myokard; PLN = Phospholamban; pPLN (Thr17) = phospho Phospholamban (Threonin 17); pRyR2 (Ser2814) = phospho Ryanodin-Rezeptor 2 (Serin2814); RM = *remote* Myokard; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; Thr17 = Threonin17

3.1.5 PKA-Aktivität und Expression

Die Aktivitätsmessungen an Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes zeigten, dass im *remote* Myokard nur die PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle der PLN-Monomere an Ser16 signifikant verringert phosphoryliert war. Als mögliche Ursache kam eine verminderte PKA-Aktivität, beispielsweise aufgrund einer verringerten PKA-Proteinexpression, infrage. Es wurde deshalb die Aktivität der PKA im *remote* Myokard an 5 Herzen pro Gruppe in einem ELISA assay gemessen. Hierfür wurden die Lysate - wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben - gewonnen. Mithilfe des ELISA assay wurde die Menge an aktiver PKA, die in den Herzlysaten vorhanden war, bestimmt. Dabei wurde die Enzymaktivität photometrisch registriert und mittels einer Standardkurve ermittelt. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt und jeweils der Mittelwert errechnet. Die Messungen ergaben, dass die globale PKA-Aktivität im *remote* Myokard unverändert ist ($P = 0,62$; Abbildung 43).

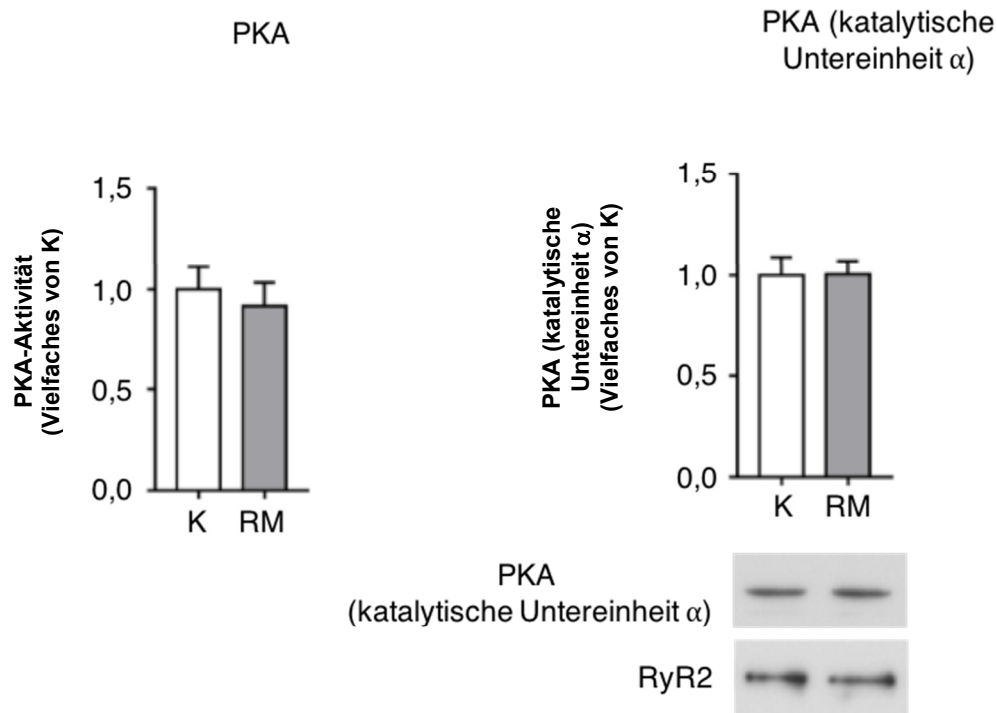


Abbildung 43: PKA-Aktivität und Expression (PKA katalytische Untereinheit α) 24 Stunden nach I/R
 Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der PKA-Aktivität und Expression \pm SEM) aus $N = 5 - 7$ Kontroll- bzw. *remote* Herzen. K = Kontroll-Myokard; RM = *remote* Myokard; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; PKA = Proteinkinase A

Um auszuschließen, dass die PKA im *remote* Myokard generell vermindert exprimiert vorlag, und dies der Grund für eine verminderte Ser16-Phosphorylierung der PLN-Monomere war, wurde zusätzlich die Expression der katalytischen Untereinheit der PKA ermittelt. Zur Bestimmung der PKA-Expression wurden *Western-blot*-Analysen mit 7 Herzen pro Gruppe durchgeführt. Die Expression der PKA katalytischen Untereinheit α war im *remote* Myokard unverändert ($P = 0,96$).

3.1.6 Phosphatase-Aktivität im *remote* Myokard

Im *remote* Myokard wurde 24 Stunden nach I/R eine verlangsamte Geschwindigkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme sowie eine verminderte Ca^{2+} -Menge festgestellt, die nach β -adrenerger Stimulation wieder normalisiert werden konnte. Zudem wurde im *remote* Myokard eine verringerte PKA-abhängige Phosphorylierung der PLN-Monomere an Ser16 beobachtet. Da die PKA-Expression und die PKA-Aktivität im *remote* Myokard jedoch unverändert waren, könnte eine erhöhte Aktivität der Proteinphosphatasen die Ursache für die verringerte PLN-Monomer-Phosphorylierung sein. PLN wird an Ser16 über die Proteinphosphatase 1 (PP1) und Proteinphosphatase 2a (PP2a) dephosphoryliert.

In Kooperation mit PD Dr. Boknik aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster wurde die Phosphataseaktivität gemessen. Im *remote* Myokard wurde 24 Stunden nach I/R eine signifikant erhöhte Phosphataseaktivität

festgestellt ($P < 0,05$). Insbesondere die PP2a zeigte eine um das 1,3-Fache erhöhte Aktivität im nicht-ischämischen Myokard verglichen mit dem Kontroll-Myokard ($P < 0,005$). Dieser Befund stellt eine mögliche Erklärung für die im *remote* Myokard vermindert vorliegende Phosphorylierung des PLN an Ser16 dar.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse 24 Stunden nach I/R (Kapitel 3.1) wurden 2018 im *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* veröffentlicht unter dem Titel: „*Impaired Ca²⁺ cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction.*“ (J. Mol. Cell. Cardiol, 2018. **119**: p. 28-39)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.04.004>

3.2 10 Tage nach I/R

Das *remote* Myokard wurde auch 10 Tage nach I/R während der proliferativen Phase der Infarktheilung analysiert. Es wurde untersucht, ob und gegebenenfalls welche Veränderungen gegenüber der frühen Phase 24 Stunden nach I/R aufgetreten sind. 10 Tage nach I/R kommt es zum ventrikulären *remodeling* des Herzgewebes. Im Vergleich zur frühen Phase 24 Stunden nach I/R ist die Infarktgröße klar definiert, die Entzündungsprozesse sind weitgehend abgeklungen. Das *remote* Myokard kompensiert den Funktionsverlust des ischämischen Myokards. Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca²⁺-Ströme waren daher auch 10 Tage nach I/R von großem Interesse.

3.2.1 Größe und Geschwindigkeiten intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme

Die Messung der Ca^{2+} -Kinetik (Kapitel 2.2.2.4) wurde an Kardiomyozyten durchgeführt, die 10 Tage nach einstündiger Ischämie aus dem *remote* Myokard von 11 operierten Herzen und 11 scheinoperierten Herzen (Kontrollgruppe) isoliert wurden. Die Ca^{2+} -Transienten wurden wie in Kapitel 2.2.4 erläutert, ermittelt und ausgewertet.

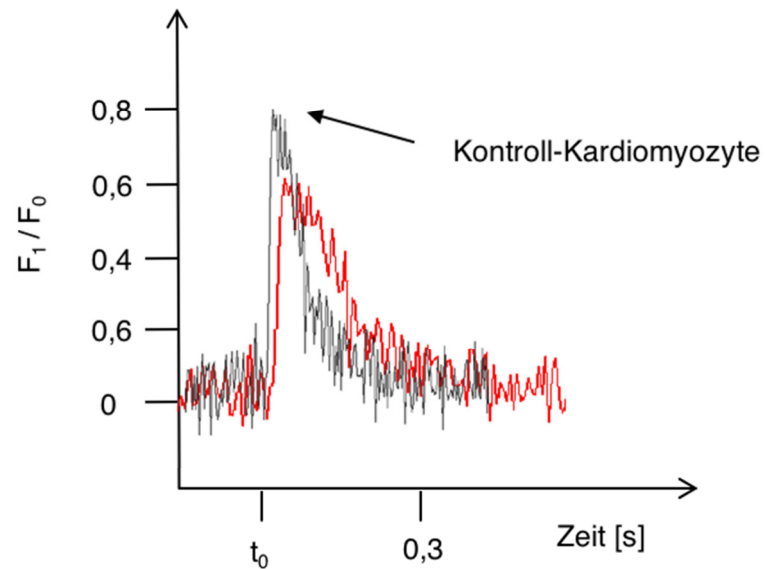


Abbildung 44: Repräsentative Aufzeichnung eines Ca^{2+} -Transienten einer *remote* Kardiomyozyte 10 Tage nach I/R (rot) und einer Kontroll-Kardiomyozyte (schwarz) unter Basalbedingungen während eines kontraktiven Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0)

3.2.1.1 Amplitude

10 Tage nach I/R war der zytosolische Ca^{2+} -Anstieg $26 \pm 9\%$ signifikant ($P < 0,01$) geringer als in den Kardiomyozyten ohne Ischämie-/Reperfusionsschaden. Nach β -adrenerger Stimulation war die Amplitude weiterhin verringert, jedoch nicht signifikant ($P = 0,16$; Abbildung 45). Durch PKA-Stimulation wurde die Menge des nach elektrischer Stimulation freigesetzten Ca^{2+} deshalb nicht vollständig normalisiert. Aufgrund der reduzierten Amplitude der *remote* Kardiomyozyten nach basaler Stimulation stellte sich wieder die Frage, ob das sarkoplasmatische Retikulum der *remote* Kardiomyozyten generell weniger Ca^{2+} gespeichert hatte. Daher erfolgte die Abschätzung der Gesamtmenge Ca^{2+} im SR (Kapitel 2.2.2.5) durch Koffeinstimulation. Abbildung 45 zeigt, dass 10 Tage nach I/R bei den *remote* Kardiomyozyten im Vergleich mit den Kontroll-Kardiomyozyten kein Unterschied in der Beladung des SR zu sehen war ($P = 0,17$).

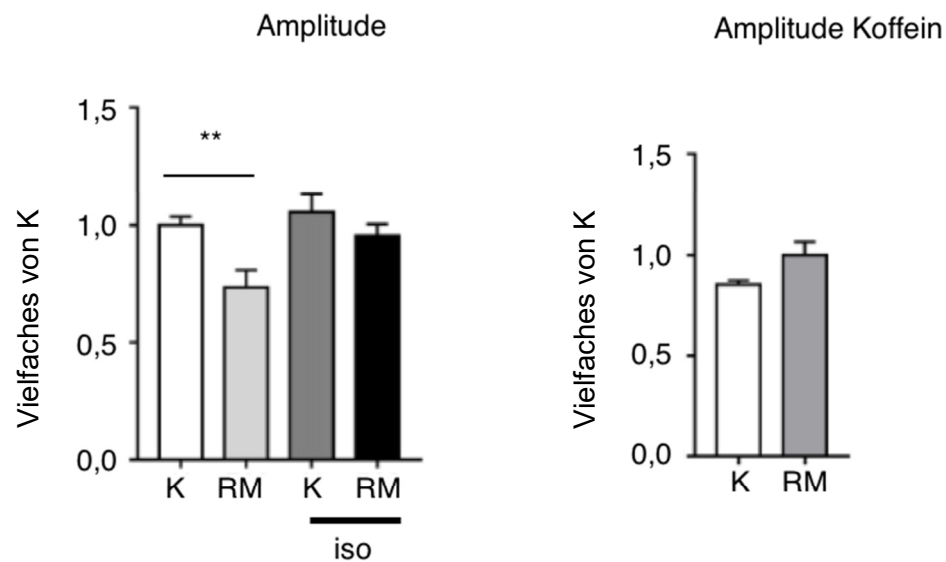


Abbildung 45: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation sowie nach Koffeinstimulation, 10 Tage nach I/R

Die Säulendiagramme zeigen Mittelwerte der Amplituden von Ca^{2+} -Transienten \pm SEM. Für die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol wurden $N = 11$ Herzen gemessen. Zur Messung der Amplitude nach Koffeinbolus wurden $N = 16$ Kontroll-Kardiomyozyten und $N = 18$ *remote* Kardiomyozyten aus $N = 2$ Herzen gemessen. ** $P < 0,01$; Ca^{2+} = Kalzium; iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Amplituden sind normiert auf die gemittelte Amplitude der Kontrollgruppe.

3.2.1.2 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs

Wie die Amplitude war auch die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs im Zytosol (v_{Anstieg}) in den nicht-ischämischen Kardiomyozyten um $36 \pm 2\%$ verringert ($P < 0,001$). Nach Isoproterenol Stimulation zeigte sich ein deutlicher Trend hin zu einem verlangsamten Ca^{2+} -Anstieg im *remote* Myokard ($P = 0,089$; Abbildung 46), der jedoch nicht signifikant war.

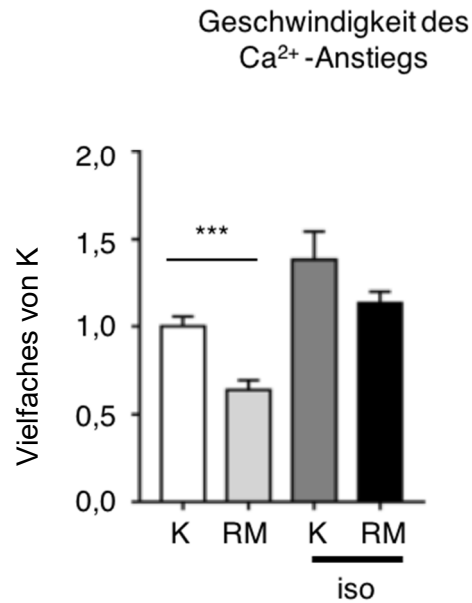


Abbildung 46: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Ca^{2+} -Geschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus jeweils $N = 11$ Herzen. *** $P < 0,001$; Ca^{2+} = Kalziumion; iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit nach basaler Stimulation der Kontrollgruppe.

3.2.1.3 Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination

Die Geschwindigkeit der zytosolischen Ca^{2+} -Elimination ($v_{\text{Elimination}}$) war in den *remote* Kardiomyozyten 10 Tage nach I/R um $19 \pm 5\%$ signifikant verlangsamt ($P < 0,01$). Nach β -adrenerger Stimulation zeigte sich ein Trend, jedoch kein signifikanter Unterschied, hin zu einer verlangsamt zytosolischen Ca^{2+} -Elimination im *remote* Myokard ($P = 0,20$; Abbildung 47).

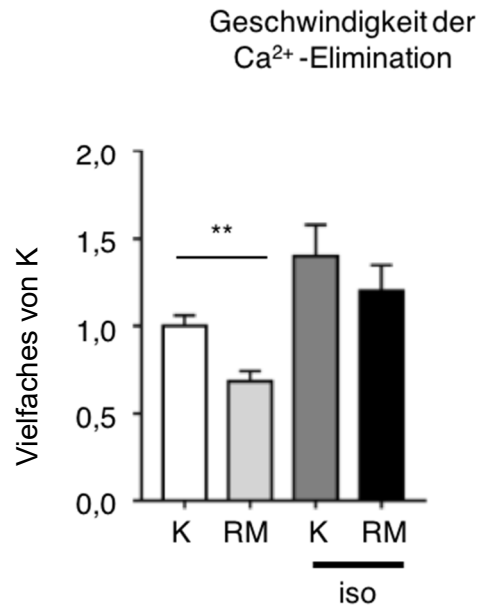


Abbildung 47: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R

Das Säulendiagramm beschreibt Mittelwerte der Ca^{2+} -Geschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus jeweils $N = 11$ Herzen. $** P < 0,01$; Ca^{2+} = Kalziumion; iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit nach basaler Stimulation der Kontrollgruppe.

Festzuhalten bleibt, dass 10 Tage nach I/R im Vergleich zum Kontroll-Myokard eine signifikant verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik im *remote* Myokard gemessen wurde (Abbildung 44). Im Gegensatz zur frühen Phase 24 Stunden nach I/R konnte weder die reduzierte Geschwindigkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme noch die Ca^{2+} -Menge durch β -adrenerge Stimulation vollständig normalisiert werden.

3.2.2 Sarkomerfunktion

Die Sarkomerfunktion (Kapitel 2.2.3) wurde parallel zur Ca^{2+} -Kinetik an isolierten Kardiomyozyten 10 Tage nach I/R gemessen. Die Auswertung der Sarkomerfunktion erfolgte wie auch schon 24 Stunden nach I/R gemäß dem in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Vorgehen.

Die Auswahl der analysierten bzw. ausgewerteten Zellen erfolgte nach folgenden Kriterien: Die Sarkomerfunktion einer Kardiomyozyte wurde gemessen, wenn ein eindeutiges Streifenmuster erkennbar war und sich die Kardiomyozyte elektrisch stimulieren ließ (0,5 Hz). Kriterien für eine ausreichende elektrische Stimulation war eine kontraktile Amplitude größer 0,03 μm . Die Rohwerte ergaben sich für jede Zelle als Mittel von mindestens 10 kontraktilem Zyklen. Insgesamt wurden 10 *remote* Herzen und 11 Kontroll- Herzen ausgewertet.

3.2.2.1 Kontraktile Amplitude

Die kontraktile Amplitude war 10 Tage nach I/R sowohl nach basaler Stimulation ($P = 0,46$) als auch nach β -adrenerger Stimulation in Kardiomyozyten des *remote* Myokards nicht signifikant gegenüber Kontroll-Zellen verändert ($P = 0,71$; Abbildung 48).

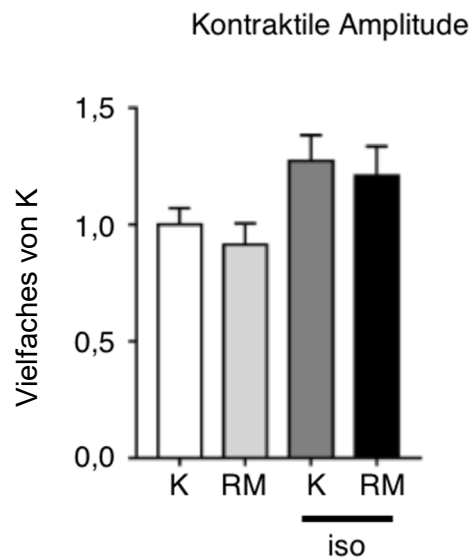


Abbildung 48: Kontraktile Amplitude nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der kontraktilem Amplitude \pm SEM. Nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol wurden Kardiomyozyten von $N = 10/11$ Herzen pro Gruppe ausgewertet. Ca^{2+} = Kalziumion; iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte

3.2.2.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Kontraktionsgeschwindigkeit ($v_{\text{Kontraktion}}$) zeigte nach basaler Stimulation keinen Unterschied zwischen Kontroll-Kardiomyozyten und *remote* Kardiomyozyten ($P = 0,79$). Bei den *remote* Kardiomyozyten wurde nach Isoproterenol-Stimulation ein leichter Trend ohne Signifikanz zu einer höheren Kontraktionsgeschwindigkeit beobachtet ($P = 0,38$; Abbildung 49).

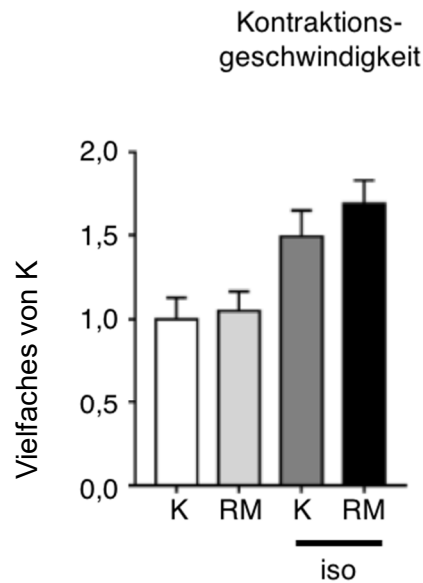


Abbildung 49: Kontraktionsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Kontraktionsgeschwindigkeit \pm SEM. Nach basaler Stimulation, sowie nach Stimulation mit Isoproterenol wurden Kardiomyozyten aus $N = 10/11$ Kontroll-Herzen bzw. *remote* Herzen ausgewertet. iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit nach basaler Stimulation der Kontrollgruppe.

3.2.2.3 Relaxationsgeschwindigkeit

Wie bei der Kontraktionsgeschwindigkeit zeigten sich in *remote* Kardiomyozyten 10 Tage nach I/R auch bei der Relaxationsgeschwindigkeit ($v_{\text{Relaxation}}$) keine Unterschiede zu den Kontroll-Kardiomyozyten, weder nach basaler Stimulation ($P = 0,67$) noch nach β -adrenerger Stimulation ($P = 0,50$; Abbildung 50).

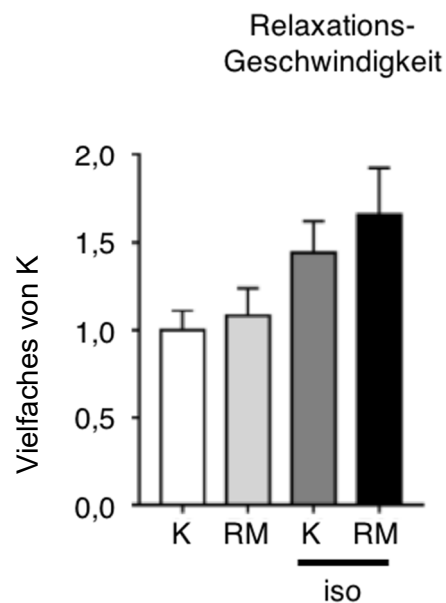


Abbildung 50: Relaxationsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation 10 Tage nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Relaxationsgeschwindigkeit \pm SEM. Nach basaler Stimulation, sowie nach Stimulation mit Isoproterenol wurden Kardiomyozyten aus $N = 10/11$ Kontroll-Herzen bzw. *remote* Herzen ausgewertet. iso = Isoproterenol; K = Kontroll-Kardiomyozyte; RM = *remote* Kardiomyozyte. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit nach basaler Stimulation der Kontrollgruppe.

Die Messungen der Sarkomerlängen an intakten isolierten Primärzellen mit und ohne I/R zeigten, dass sowohl 24 Stunden als auch 10 Tage nach I/R die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und des Ca^{2+} -Abfalls in *remote* Kardiomyozyten signifikant verlangsamt ist. Während 24 Stunden nach I/R eine kontraktile Dysfunktion der Sarkomerfunktion festgestellt wurde, war dies 10 Tage nach I/R nicht der Fall. Die Sarkomerfunktion war in den *remote* Kardiomyozyten 10 Tage nach I/R nicht beeinträchtigt.

3.2.3 Proteinexpression von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes

Alle Daten zur Proteinexpression 10 Tage nach I/R wurden von der Promovendin eigenständig erhoben. Die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und des Ca^{2+} -Abfalls im Zytosol sowie die zytosolische Ca^{2+} -Menge war 10 Tage nach I/R vermindert (siehe Kapitel 3.2.1). Diese konnte durch Stimulation mit Isoproterenol nicht normalisiert werden. Zur Ursachenanalyse wurden am *remote* Myokard die Proteinexpressionen wichtiger Ca^{2+} -Regulatoren untersucht. *Western-blot*-Analysen wurden zunächst von SERCA2a, RyR2 und von PLN-Monomeren durchgeführt. Dabei wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt gemäß der vorher mit der BCA-Methode (Kapitel 2.3.1.3) ermittelten Ergebnisse. Die Bandenintensitäten wurden mit Hilfe der Software Image Studio™ quantifiziert und auf die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

Bei den Expressionsanalysen der PLN-Monomere, der SERCA2a und des RyR2 wurden pro Gruppe 8 Herzen untersucht. Die Analyse der Proteinexpression wichtiger Ca^{2+} -Regulatoren im nicht-ischämischen Gewebe 10 Tage nach I/R ergab keine Unterschiede bei der Expression von SERCA2a ($P = 0,14$) und bei den PLN-Monomeren ($P = 0,29$). Die Expression des RyR2 im *remote* Myokard zeigte im Vergleich mit dem Kontroll-Myokard ebenfalls keine Änderung ($P = 0,71$; Abbildung 51).

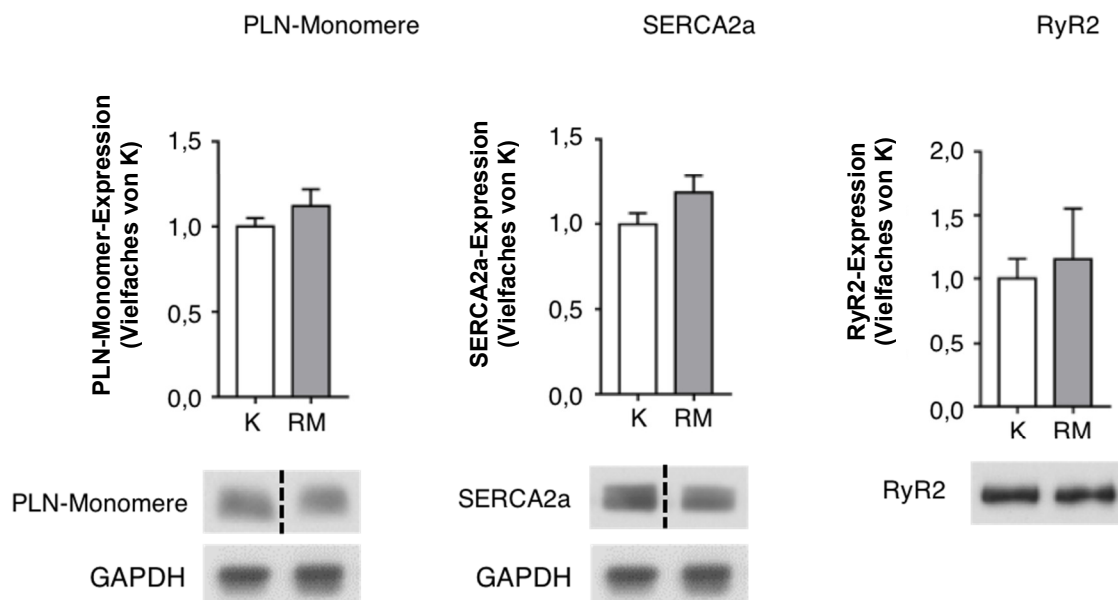


Abbildung 51: Expressionen von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes 10 Tage nach I/R
 Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Expression \pm SEM) aus $N = 8$ Kontroll- bzw. *remote* Herzen. * $P < 0,05$; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; K = Kontroll-Myokard; PLN = Phospholamban; RM = *remote* Myokard; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; SERCA2a = sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a. Die RyR2-Expression wurde auf die Gesamtproteinmenge normalisiert.

Im *remote* Myokard war das Verhältnis der exprimiert vorliegenden SERCA2a zu den exprimierten PLN-Monomeren gegenüber dem Kontroll-Myokard unverändert (Abbildung 52).

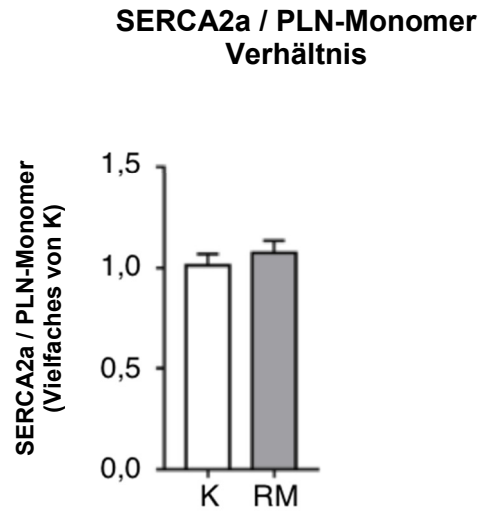


Abbildung 52: Das Verhältnis SERCA2a zu PLN-Monomeren 10 Tage nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte des Verhältnisses SERCA2a zu PLN-Monomeren \pm SEM aus $N = 8$ Kontroll- bzw. *remote* Herzen. K = Kontroll-Myokard; PLN = Phospholamban; RM = *remote* Myokard; SERCA2a = sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a

Des Weiteren wurde überprüft, ob sich die Proteinexpression von Interaktoren der SERCA2a und des PLN, z. B. das HS1-assoziierte Protein X-1 (HAX-1) und das S100A1, im *remote* Myokard 10 Tage nach I/R veränderte [67, 70, 71].

Die Expression der S100A1 wurde hierbei an 8 Herzlysaten pro Gruppe untersucht und auf GAPDH normalisiert. Die des HAX-1 wurde an 4 Membranpräparationen pro Gruppe auf RyR2 normalisiert. Das HS1-assoziierte Protein X-1 (HAX-1; $P = 0,67$) und S100A1 ($P = 0,31$) waren 10 Tage nach I/R in ihrer Proteinexpression unverändert (Abbildung 53).

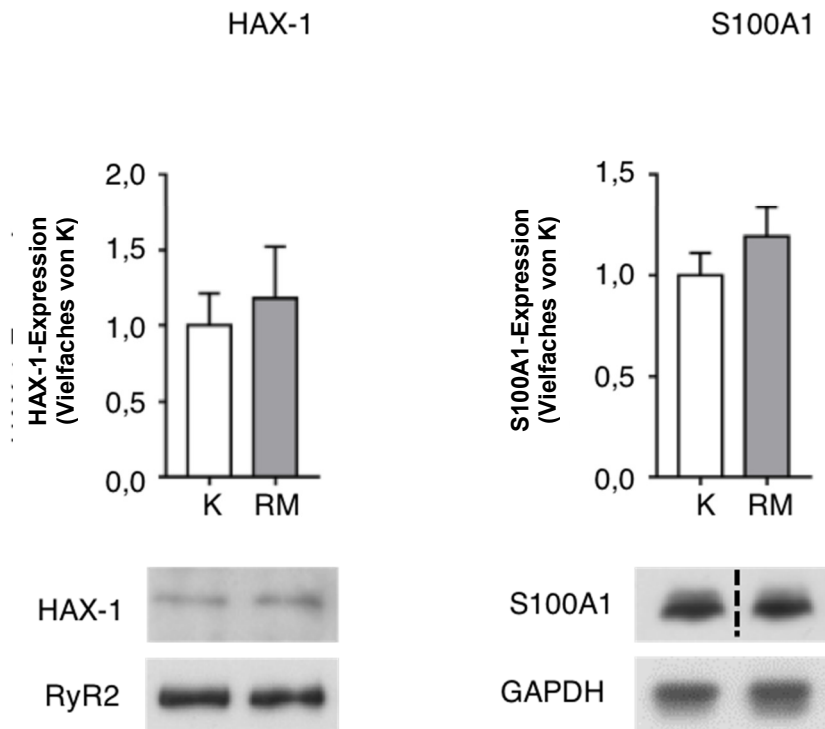


Abbildung 53: Proteinexpression von HAX-1 und S100A1 10 Tage nach I/R

Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Proteinexpression \pm SEM) aus $N = 4/8$ Kontroll- bzw. *remote* Herzen. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase HAX-1 = HS1 assoziiertes Protein X-1; K = Kontroll-Myokard; RM = *remote* Myokard

3.2.4 Aktivitätsmessung von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes

Außer der Proteinexpression der Ca^{2+} -Regulatoren wurde auch deren Phosphorylierungsstatus und somit deren Aktivität gemessen. Damit sollte überprüft werden, ob die 24 Stunden nach I/R beobachteten Veränderungen auch noch 10 Tage nach I/R nachweisbar sind. Hierzu wurde zunächst der Phosphorylierungszustand der PLN-Monomere untersucht, die im *remote* Myokard 24 Stunden nach I/R an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle Ser16 signifikant vermindert phosphoryliert waren. Außerdem wurde die CaMKII-abhängige Phosphorylierungsstelle an Threonin17 untersucht.

Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach I/R waren im *remote* Myokard die PLN-Monomere an der Phosphorylierungsstelle Ser16 verstärkt dephosphoryliert. Auch 10 Tage nach I/R war diese Dephosphorylierung im *remote* Myokard nicht signifikant verändert ($P = 0,18$). Die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an Thr17 der PLN-Monomere änderte sich 10 Tage nach I/R im Vergleich mit dem Kontroll-Myokard ebenfalls nicht ($P = 0,22$; Abbildung 54).

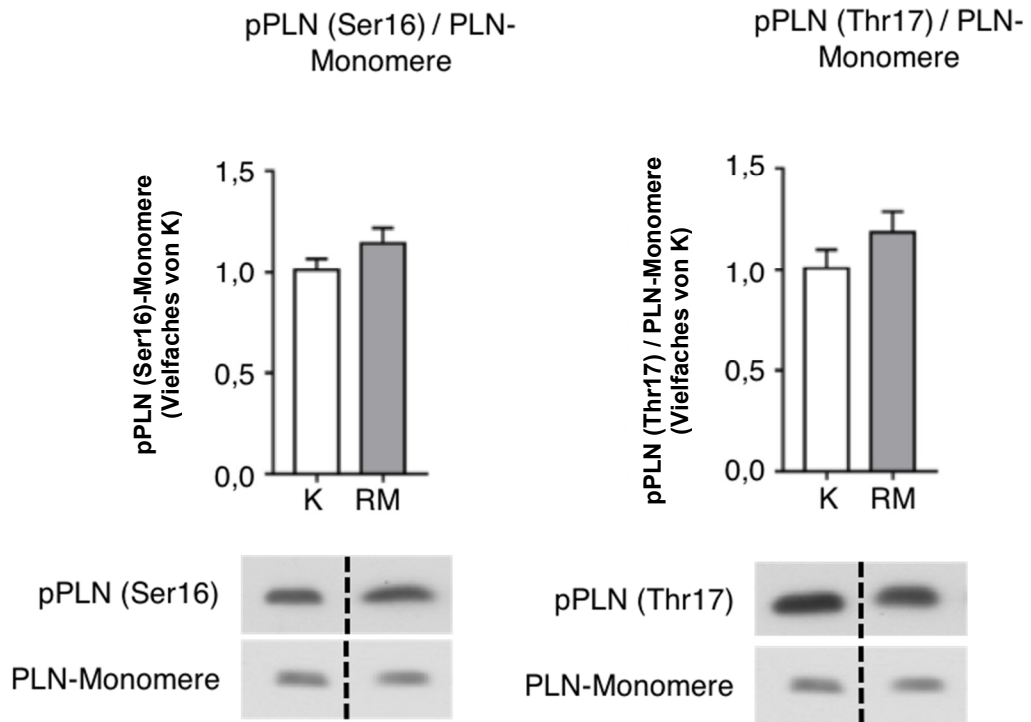


Abbildung 54: Phosphorylierung der PLN-Monomere an Ser16 und Thr17 10 Tage nach I/R

Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Phosphorylierung der PLN-Monomere \pm SEM) aus $N = 8$ Kontroll- bzw. *remote* Herzen pro Gruppe. K = Kontroll-Myokard; PLN = Phospholamban; pPLN (Ser16) = phospho-Phospholamban (Serin16); pPLN (Thr17) = phospho-Phospholamban (Thr17); RM = *remote* Myokard

Zusätzlich wurde die Phosphorylierung des RyR2 an den Phosphorylierungsstellen Ser2808 und Ser2814 untersucht. Dabei wurden die Membranpräparationen von insgesamt 8 Herzen pro Gruppe analysiert. Die Phosphorylierung des RyR2 an Ser2808 ($P = 0,16$) und Ser2814 ($P = 0,58$) war im *remote* Myokard 10 Tage nach I/R im Vergleich mit dem Kontroll-Myokard unverändert (Abbildung 55).

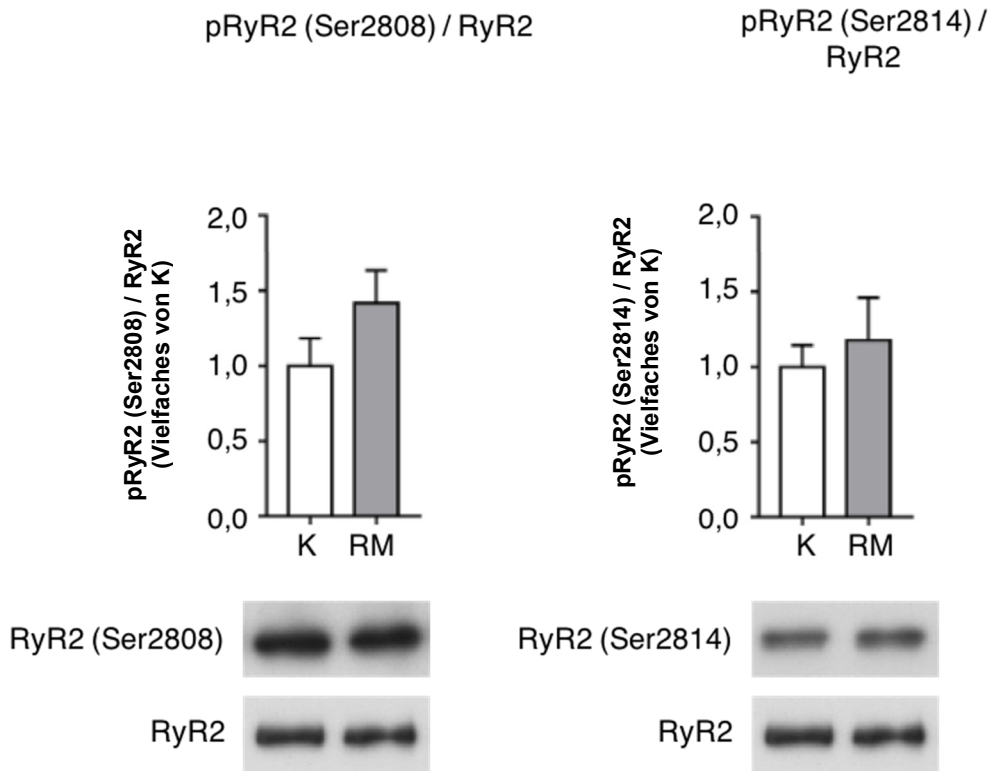


Abbildung 55: Phosphorylierung des RyR2 an Ser2808 und an Ser2814 10 Tage nach I/R

Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Phosphorylierung des RyR2 \pm SEM) aus $N = 8$ Kontroll- bzw. *remote* Herzen pro Gruppe. K = Kontroll-Myokard; pRyR2 (Ser2808) = phospho-Ryanodin-Rezeptor 2 (Serin2808); pRyR2 (Ser2814) = phospho-Ryanodin-Rezeptor 2 (Serin2814); RM = *remote* Myokard; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2.

Insgesamt wurde 10 Tage nach I/R unter Basalbedingungen eine verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik im *remote* Myokard festgestellt, die im Gegensatz zum 1-Tages-Zeitpunkt nach β -adrenerger Stimulation bestehen blieb. In Übereinstimmung mit diesen funktionellen Daten war die PKA-abhängige Phosphorylierung Ca^{2+} -regulierender Proteine unter Basalbedingungen unverändert.

3.2.5 Phosphorylierung von Troponin I

10 Tage nach I/R war die Sarkomerfunktion nicht verändert, obwohl der intrazelluläre Ca^{2+} -Transport beeinträchtigt und verlangsamt war. Eine mögliche Erklärung für die kontinuierlich hohe kontraktile Funktion wäre eine höhere Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente, so dass sie trotz reduziertem und verzögertem Ca^{2+} -Transport innerhalb der Zelle intensiv stimuliert würden. Zur Abklärung dieser Hypothese wurde die Phosphorylierung des kardialen Troponin I (cTnI) an Ser23/24 bestimmt. Das cTnI ist eine wichtige Komponente der Myofilamente und beeinflusst die Ca^{2+} -Sensitivität [119]. Eine Reduktion der PKA-abhängigen Phosphorylierung von cTnI an Ser23/24 erhöht die Ca^{2+} -Sensitivität der Sarkomere. Es wurden insgesamt 8 Herzen pro Gruppe analysiert. Die Phosphorylierung von pTnI der jeweiligen Probe wurde auf die vorgefundene cTnI Proteinmenge der Probe normiert. Die cTnI-Expression ($P = 0,92$) sowie die Phosphorylierung war 10 Tage nach I/R im *remote* Myokard unverändert (Abbildung 56), für die Phosphorylierung von Ser23/24 zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung, es wurde aber ein Trend hin zu einer verminderten TnI(Ser23/24) - Phosphorylierung festgestellt.⁴

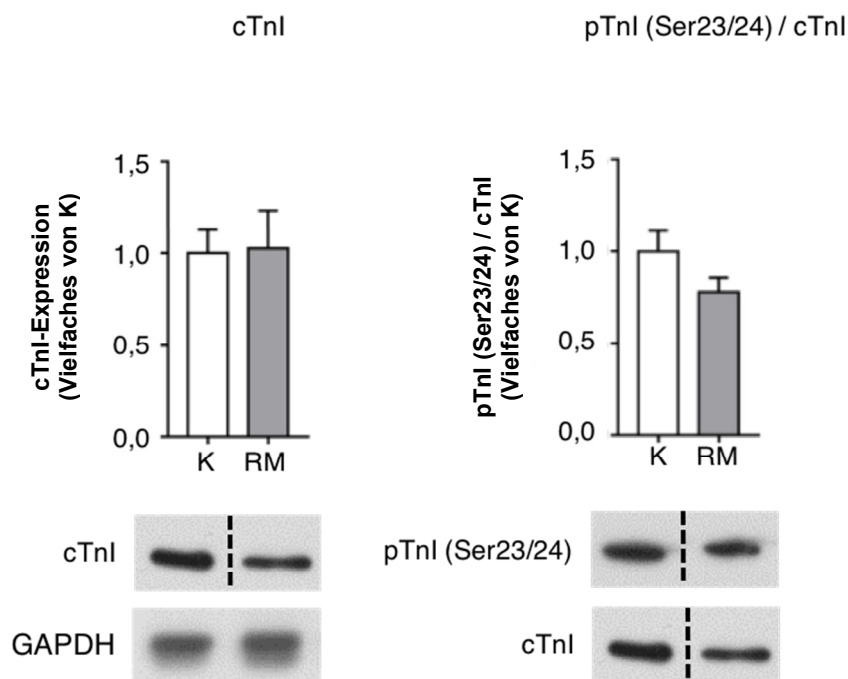


Abbildung 56: Expression von cTnI und Phosphorylierung des cTnI an Ser23/24 10 Tage nach I/R

Repräsentative Gelbilder und Säulendiagramme (Mittelwerte der Expression und Phosphorylierung von cTnI \pm SEM) aus $N = 8$ Kontroll- bzw. *remote* Herzen. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; cTnI = kardiales Troponin I, K = Kontroll-Myokard; pTnI (Ser23/24) = phospho-Troponin I (Serin23/24); RM = *remote* Myokard

⁴ Alle Proteinanalysen 10 Tage nach I/R wurden nach Einarbeitung durch Florian Funk selbstständig von der Promovendin erhoben.

3.3 Diabetes mellitus Typ II

Menschen, die an Diabetes mellitus Typ II erkrankt sind, haben ein erhöhtes Risiko, einen akuten Myokardinfarkt zu erleiden, außerdem ist die Mortalität bei Diabetikern nach MI im Vergleich zu Nicht-Diabetikern nach MI erhöht [111]. Im Folgenden wurde die Hypothese untersucht, ob T2DM Veränderungen im myozytären Ca^{2+} -Haushalt nach I/R eventuell verschärft. Als Modellorganismus wurden Leptinrezeptor-defiziente *db/db*-Mäuse verwendet, die ab einem Alter von 10 Wochen typische Charakteristika eines Diabetes mellitus Typ II aufweisen (näheres hierzu unter Kapitel 1.7.2) [106].

Zunächst wurde untersucht, ob und gegebenenfalls wie sich in Kardiomyozyten aus Mäusen mit diabetischer Stoffwechsellaage (*db/db*) die Geschwindigkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme, die Ca^{2+} -Menge sowie die Sarkomerfunktion im Vergleich zu Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage (*db/+*) verändert. Im Alter von 11 bis 13 Wochen wurde sowohl das Gewicht als auch die Blutzuckerkonzentration der *db/db*-Mäuse und deren *db/+*-Wurfgeschwister bestimmt. Das Gewicht und die Blutzuckerwerte der *db/db*-Mäuse waren um das 1,7-Fache bzw. das 3,8-Fache signifikant höher, als bei den *db/+*-Wurfgeschwistertieren (Abbildung 57).

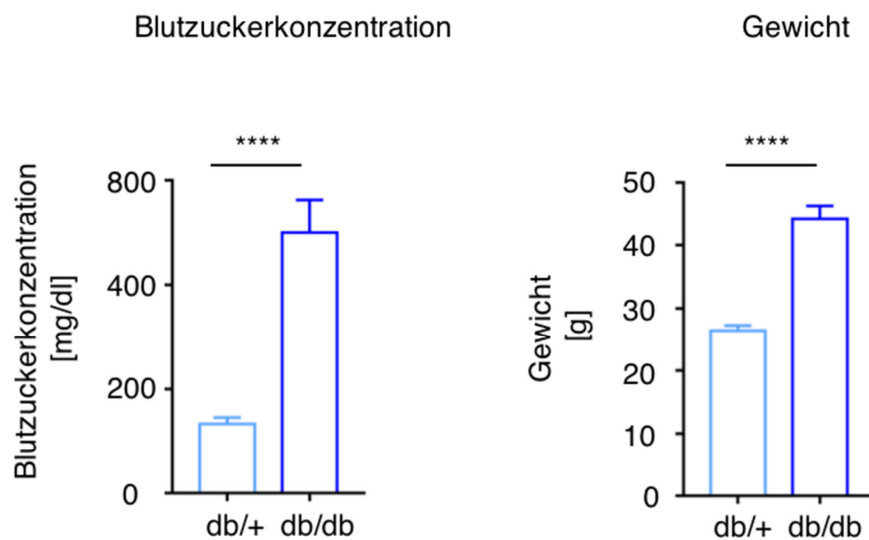


Abbildung 57: Blutzuckerkonzentration und Gewicht der (*db/db*) Mäuse mit diabetischer Stoffwechsellaage im Vergleich mit (*db/+*) Wurfgeschwistertieren ohne diabetische Stoffwechsellaage
Säulendiagramme stellen Mittelwerte der Blutzuckerkonzentration und des Gewichts \pm SEM aus $N = 5$ *db/db*, sowie *db/+* Tieren dar. **** $P < 0,0001$; *db/db* = homozygote Leptinrezeptor defiziente Mäuse mit diabetischer Stoffwechsellaage; *db/+* = heterozygote Wurfgeschwistertiere ohne diabetische Stoffwechsellaage

3.3.1 Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme

Zur Analyse des Ca^{2+} -Kreislaufes wurden aus 7 homozygoten (db/db) Herzen und 6 heterozygoten ($db/+$) Herzen die ventrikulären Kardiomyozyten isoliert und daran die Ca^{2+} -Kinetik gemessen.

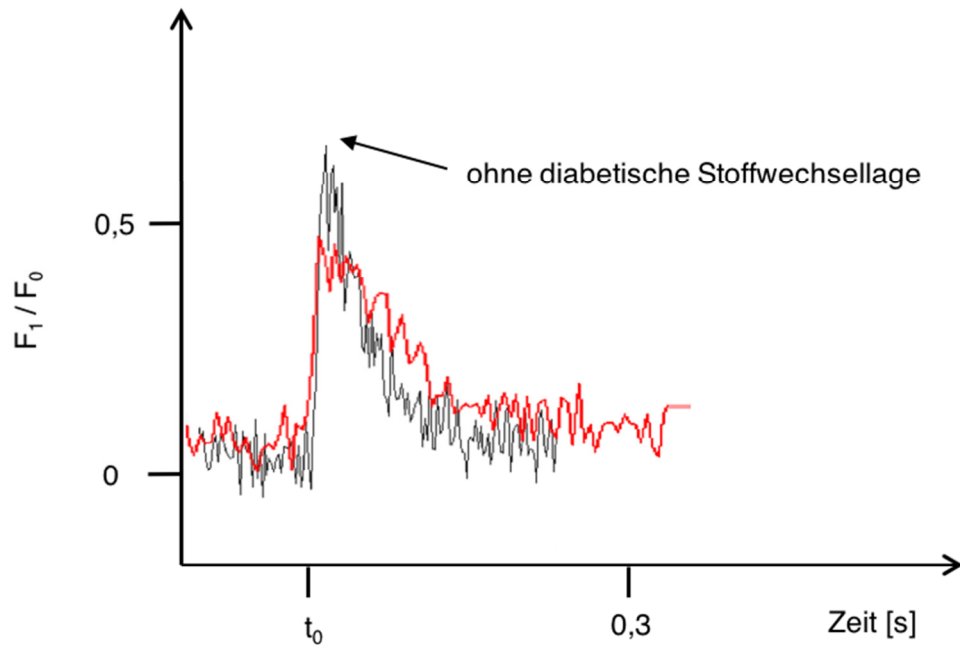


Abbildung 58: Repräsentative Aufzeichnung für die Ca^{2+} -Transienten einer Kardiomyozyte mit diabetischer Stoffwechsellaage (rot) und einer Kardiomyozyte ohne diabetische Stoffwechsellaage (schwarz) unter Basalbedingungen während eines kontraktiven Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0)

3.3.1.1 Amplitude

Die in das Zytosol freigesetzte Menge an Ca^{2+} war in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage um $29 \pm 1\%$ signifikant ($P = 0,01$) geringer als in den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage. Nach Stimulation mit Isoproterenol war die Amplitude der Kardiomyozyten mit und ohne diabetischer Stoffwechsellage nicht signifikant verändert ($P = 0,21$).

Aufgrund der geringeren Menge an Ca^{2+} , die mit jedem Herzschlag aus dem SR ins Zytosol freigesetzt wurde, stellte sich die Frage, ob in den Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage generell weniger Ca^{2+} im SR gespeichert war. Daher erfolgte die Messung der Gesamtmenge Ca^{2+} im SR (Kapitel 2.2.2.5) durch Koffeinstimulation. Nach Stimulation der Kardiomyozyten mit einem Koffeinbolus zeigte sich in der Amplitude des Ca^{2+} -Transienten allerdings kein Unterschied zwischen den Kardiomyozyten mit und ohne diabetischer Stoffwechsellage ($P = 0,50$; Abbildung 59), sodass die reduzierte Amplitude der Transienten möglicherweise auf eine beeinträchtigte Freisetzung des Ca^{2+} aus dem SR zurückzuführen ist.

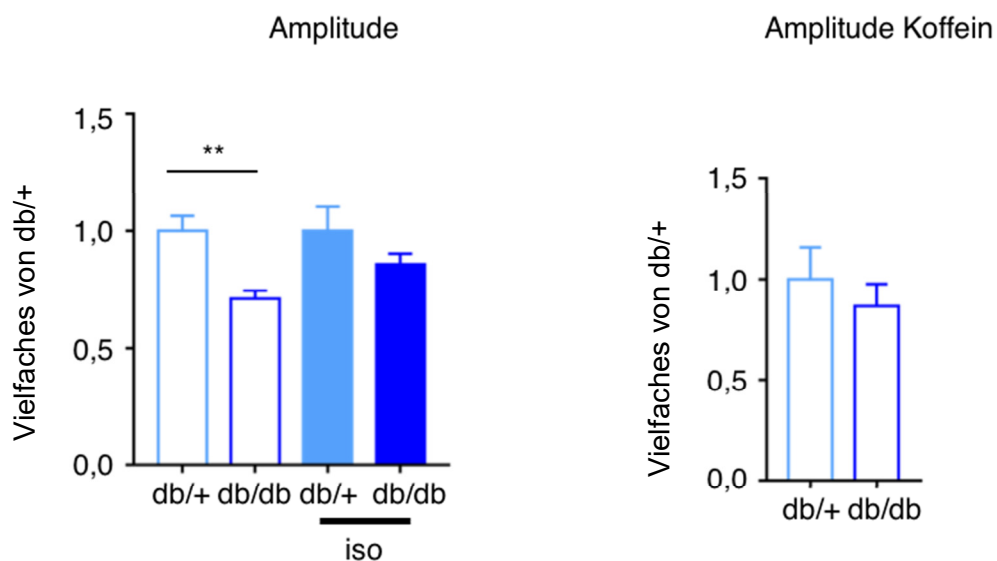


Abbildung 59: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation der Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (db/db) im Vergleich zu Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+)

Das Säulendiagramm (links) zeigt Mittelwerte der Amplitude von Ca^{2+} -Transienten \pm SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $N = 7$ Herzen mit diabetischer Stoffwechsellage (db/db) und $N = 6$ Herzen ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+) nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. Das Säulendiagramm (rechts) zeigt Mittelwerte der Amplitude nach Koffeinbolus \pm SEM. Gemessen wurden 6 Kardiomyozyten aus insgesamt 4 Herzen pro Gruppe. ** $P < 0,01$; Ca^{2+} = Kalziumion; db/db = Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage; db/+ = Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage; iso = Isoproterenol. Die Amplituden sind normiert auf die gemittelte Amplitude der db/+ Gruppe nach basaler Stimulation

3.3.1.2 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs

Die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs (v_{Anstieg}) im Zytosol war nach basaler Stimulation in den Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage verglichen mit den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage signifikant um $37 \pm 3\%$ verlangsamt ($P < 0,05$). Nach Stimulation der Kardiomyozyten mit dem β -Sympathomimetikum Isoproterenol war die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage weiter tendenziell, jedoch nicht signifikant verändert ($P = 0,077$; Abbildung 60).

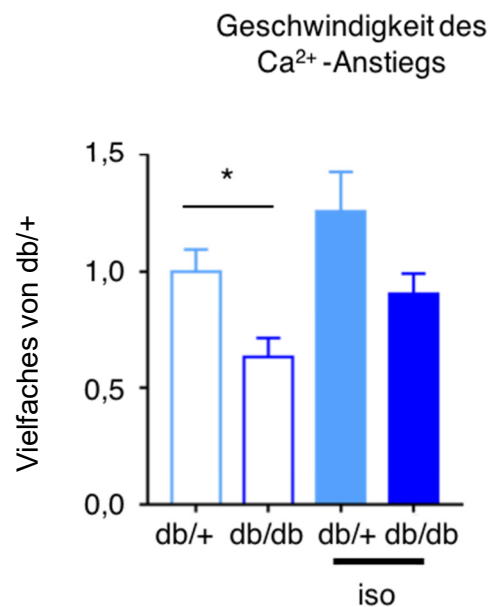


Abbildung 60: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (db/db) und von Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage ($db/+$)

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs \pm SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $N = 6$ Herzen mit diabetischer Stoffwechsellage ($db/+$) und $N = 7$ Herzen ohne diabetische Stoffwechsellage (db/db) nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. $P < 0,05$; Ca^{2+} = Kalziumion; db/db = Kardiomyozyte mit diabetischer Stoffwechsellage; $db/+$ = Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage; iso = Isoproterenol. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der $db/+$ Gruppe nach basaler Stimulation.

3.3.1.3 Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination

Die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination ($v_{\text{Elimination}}$) war in den Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage verglichen mit den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage signifikant um $39 \pm 5\%$ verlangsamt ($P = 0,001$). Dies deutet darauf hin, dass die SERCA2a-Aktivität vermindert war. Nach Stimulation mit Isoproterenol zeigte sich weiterhin ein Trend, aber kein signifikanter Unterschied mehr ($P = 0,17$; Abbildung 61).

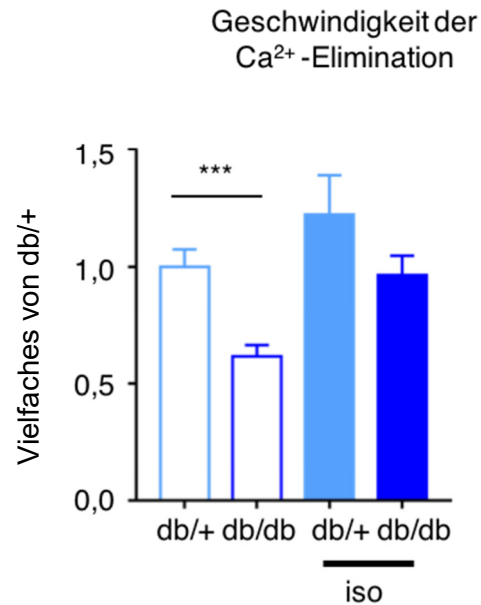


Abbildung 61: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage (db/db) und von Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage ($db/+$)

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Ca^{2+} -Geschwindigkeit \pm SEM- Gemessen wurden Kardiomyozyten aus $N = 6$ Herzen ohne diabetische Stoffwechsellaage ($db/+$) und $N = 7$ Herzen mit diabetischer Stoffwechsellaage (db/db) nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. * $P < 0,05$; Ca^{2+} = Kalziumion; db/db = Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage; $db/+$ = Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage; iso = Isoproterenol. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der $db/+$ Gruppe nach basaler Stimulation.

Damit konnten an dem in dieser Arbeit verwendeten db/db -Mausmodell die von Belke *et al.* publizierten Ergebnisse bestätigt werden, dass die Ca^{2+} -Kinetik in diabetischen db/db -Herzen unter Basalbedingungen im Vergleich mit den $db/+$ -Wurfgeschwistertieren verlangsamt ist (Abbildung 58) [104].

3.3.2 Sarkomerfunktion

Die Messung der Sarkomerfunktion (2.2.3) erfolgte parallel zur in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Messung der myozytären Ca^{2+} -Kinetik. Die Auswertung der Sarkomerfunktion erfolgte entsprechend dem in Kapitel 2.2.4 skizzierten Vorgehen. Ausgewertet wurden 7 (*db/db*) Herzen mit diabetischer Stoffwechsellage und 6 (*db/+*) Herzen ohne diabetische Stoffwechsellage im Alter von 11 bis 13 Wochen.

3.3.2.1 Kontraktile Amplitude

Bei der Analyse der kontraktiven Amplitude wurden weder nach basaler Stimulation noch nach β -adrenerger Stimulation Unterschiede zwischen Kardiomyozyten mit und ohne diabetischer Stoffwechsellage beobachtet (Abbildung 62).

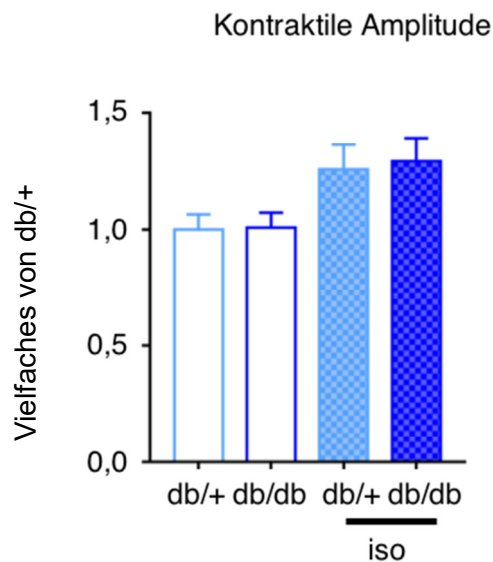


Abbildung 62: Kontraktile Amplitude nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) und ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*)

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der kontraktiven Amplitude \pm SEM. Gemessen wurden Kardiomyozyten aus $N = 6$ Herzen ohne diabetische Stoffwechsellage und $N = 7$ Herzen mit diabetischer Stoffwechsellage nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. *db/db* = Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage; *db/+* = Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage; iso = Isoproterenol

3.3.2.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Kontraktionsgeschwindigkeit ($v_{\text{Kontraktion}}$) zeigte nach basaler Stimulation keinen Unterschied zwischen Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage und Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage ($P = 0,93$). Bei den *db/db*-Kardiomyozyten war nach Isoproterenol-Stimulation ein marginaler Trend zu einer höheren Kontraktionsgeschwindigkeit zu erkennen ($P = 0,82$; Abbildung 63).

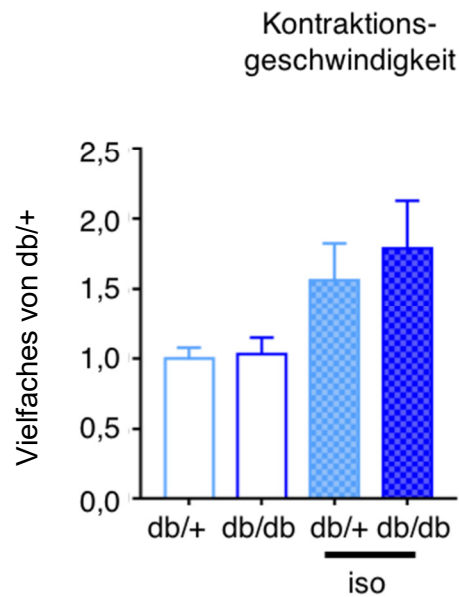


Abbildung 63: Kontraktionsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer (*db/db*) und nicht diabetischer (*db/+*) Kardiomyozyten

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Kontraktionsgeschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden Kardiomyozyten aus insgesamt $N = 6$ nicht diabetischen und $N = 7$ diabetischen Herzen nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. *db/db* = diabetische Kardiomyozyte; *db/+* = nicht diabetische Kardiomyozyte; iso = Isoproterenol. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der *db/+* Gruppe nach basaler Stimulation.

3.3.2.3 Relaxationsgeschwindigkeit

Wie bei der Kontraktionsgeschwindigkeit zeigten sich auch bei der Relaxationsgeschwindigkeit ($v_{\text{Relaxation}}$) der Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage keine Unterschiede im Vergleich zu den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage, und zwar weder nach basaler Stimulation ($P = 0,83$) noch nach β -adrenerger Stimulation ($P = 0,62$; Abbildung 64).

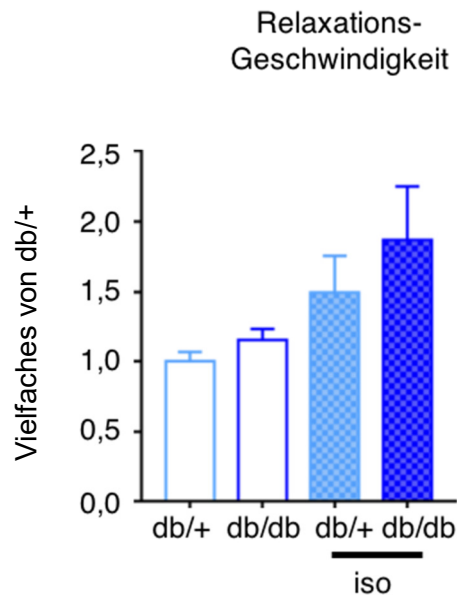


Abbildung 64: Relaxationsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer (db/db) und Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage ($db/+$)

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Relaxationsgeschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden Kardiomyozyten aus insgesamt $N = 6$ Herzen ohne diabetische Stoffwechsellage und $N = 7$ Herzen mit diabetischer Stoffwechsellage nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. db/db = Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage; $db/+$ = Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage; iso = Isoproterenol. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der $db/+$ Gruppe nach basaler Stimulation.

Die Ca^{2+} -Kinetik war in den Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage gegenüber den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage signifikant verlangsamt. Wider Erwarten war jedoch die Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage nicht verändert. Warum dies so ist, konnte bis jetzt noch nicht weiter untersucht werden, da unter anderem zu wenige geeignete Mäuse zur Verfügung standen. Die homozygoten (db/db) Mäuse sind infertil und nur jede achte Maus, die geboren wurde, war gleichzeitig homozygot und männlich.

3.4 I/R und Diabetes mellitus Typ II

Die Mortalität von Diabetikern ist direkt nach MI am höchsten [111]. Daher ist es wichtig, die in diesem frühen Zeitraum ablaufenden Mechanismen einer fehlgeleiteten Adaption des diabetischen Herzens besser zu verstehen. Für die Untersuchung des *remote* Myokards wurde deshalb der Zeitpunkt 24 Stunden nach I/R gewählt.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur männliche Mäuse verwendet, damit war etwa nur jede achte Maus zur Analyse geeignet. Zudem überlebten nur 50 % der homozygoten diabetischen (*db/db*) Mäuse den Zeitpunkt 24 Stunden nach I/R. Die meisten verstarben bereits während der Operation zur Anlage der Ligatur (Kapitel 2.1.2.1). Diese niedrige Überlebensrate ist nicht ungewöhnlich und deckt sich mit Daten aus der Literatur [120]. Die Gruppengröße wurde deshalb auf $N = 7$ untersuchte Mäuse pro Gruppe beschränkt.

Die Mäuse wurden im Alter von 11 bis 13 Wochen analysiert, da in diesem Alter das Gewicht und die Blutzuckerwerte bereits signifikant erhöht waren, die Herzfunktion jedoch noch intakt war. Die *db/db*-Mäuse entwickeln in diesem Alter noch keine Herzinsuffizienz, sie sind jedoch insulinresistent [106, 107, 120]. Auch 24 Stunden nach I/R wurde das Gewicht und die Blutzuckerkonzentration der *db/db*-Mäuse und ihrer *db/+*-Wurfgeschwister nach erfolgter I/R bestimmt.

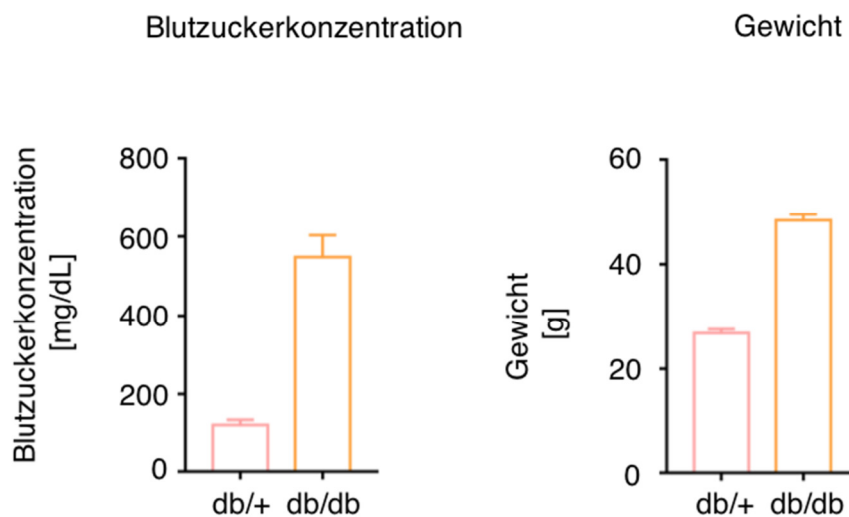


Abbildung 65: Blutzuckerkonzentration und Gewicht der Tiere mit diabetischer Stoffwechsellaage (*db/db*) im Vergleich mit den Wurfgeschwistertieren ohne diabetische Stoffwechsellaage (*db/+*) 24 Stunden nach I/R

Die Säulendiagramme zeigen Mittelwerte der Blutzuckerkonzentration und des Gewichts \pm SEM von $N = 7$ untersuchten Tieren pro Gruppe. **** $P < 0,0001$; *db/db* = homozygote Leptinrezeptor defiziente Maus; *db/+* = heterozygotes Wurfgeschwistertier

Es zeigte sich, dass auch 24 Stunden nach I/R das Gewicht der homozygoten (*db/db*) Mäuse im Vergleich mit den heterozygoten (*db/+*) Mäusen um das 1,8-Fache signifikant erhöht war und die Blutzuckerwerte um das 4,6-Fache höher waren (Abbildung 65).

Zur Analyse der Komorbidität MI und Diabetes mellitus Typ II wurden beide Gruppen, also sowohl die *db/db*-Mäuse als auch die *db/+*-Mäuse, einer einstündigen Ischämie und danach einer 24-stündigen Reperfusion der LAD unterzogen (Durchführung siehe Kapitel 2.1.2). Analysiert wurden an isolierten Kardiomyozyten aus dem *remote* Myokard die Größe und Geschwindigkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme sowie die Sarkomerfunktion.

3.4.1 Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme

Nachdem in den Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage eine signifikant verlangsamte Geschwindigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme und eine reduzierte Ca^{2+} -Menge gegenüber den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage zu sehen war (siehe Kapitel 3.3), wurden die Ca^{2+} -Kinetik und die intrazelluläre Ca^{2+} -Menge der Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage 24 Stunden nach I/R analysiert. Die Messung der Ca^{2+} -Kinetik und der Ca^{2+} -Menge (Kapitel 2.2.2.4) wurde an Kardiomyozyten durchgeführt, die aus dem *remote* Myokard von 7 operierten *db/db*-Herzen und 7 scheinoperierten *db/+*-Herzen isoliert wurden. Die Ca^{2+} -Transienten wurden wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben ausgewertet.

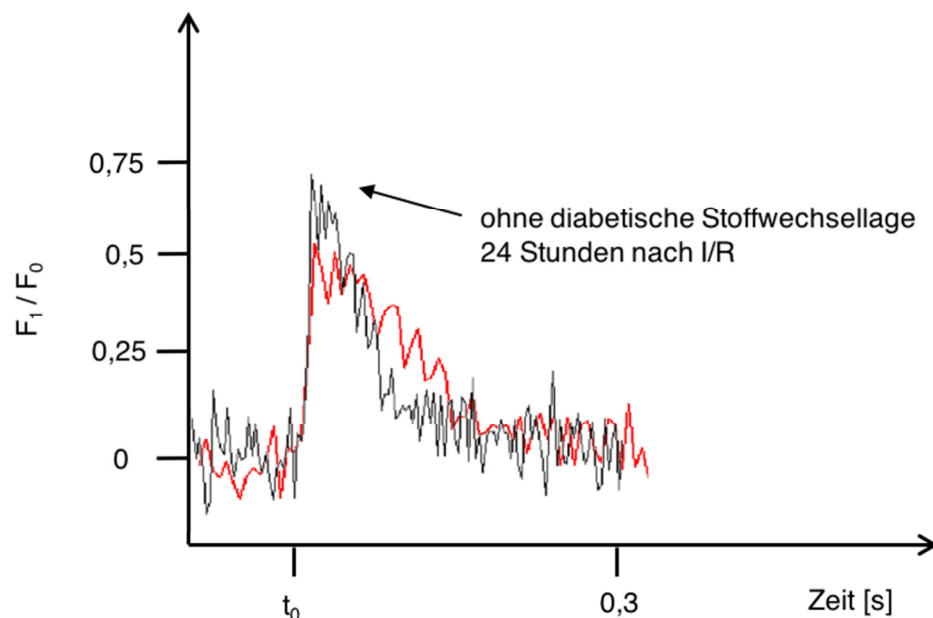


Abbildung 66: Repräsentative Darstellung eines Ca^{2+} -Transienten einer *remote* Kardiomyozyte mit diabetischer Stoffwechsellaage 24 Stunden nach I/R (rot) und einer *remote* Kardiomyozyte ohne diabetische Stoffwechsellaage (schwarz) unter Basalbedingungen während eines kontraktiven Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0)

3.4.1.1 Amplitude

Die Menge an Ca^{2+} , die nach jeder elektrischen Stimulation aus dem SR ins Zytosol freigesetzt wurde, war in den *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage reduziert. Erstaunlicherweise war auch die freigesetzte Menge an Ca^{2+} nach β -adrenerger Stimulation signifikant vermindert (Abbildung 67). Daher stellte sich die Frage, ob auch die Gesamtmenge Ca^{2+} , die im SR gespeichert war, in den *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage geringer war.

Die Messung der Gesamtmenge Ca^{2+} im SR (Kapitel 2.2.2.5) erfolgte durch Koffeinstimulation. Nach Stimulation der Kardiomyozyten mit einem Koffeinbolus zeigte sich jedoch bei der Gesamtmenge Ca^{2+} im SR kein Unterschied zwischen den *remote* Kardiomyozyten mit bzw. ohne diabetischer Stoffwechsellage ($P = 0,82$; Abbildung 67).

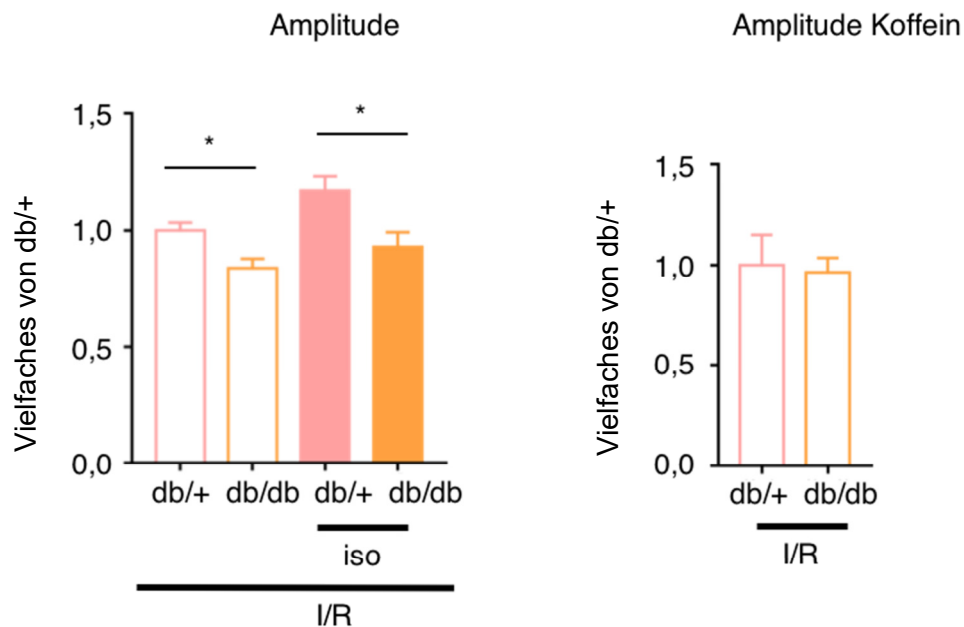


Abbildung 67: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) und ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*) 24 Stunden nach I/R

Das linke Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Amplituden von Ca^{2+} -Transienten \pm SEM. Gemessen wurden *remote* Kardiomyozyten aus $N = 7$ Herzen ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*) und mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. Das rechte Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Amplituden von Ca^{2+} -Transienten nach Koffeinbolus \pm SEM. Gemessen wurden 6 *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage und ohne diabetische Stoffwechsellage aus $N = 3$ Herzen pro Gruppe. * $P < 0,05$; Ca^{2+} = Kalzium; *db/db* = *remote* Kardiomyozyte mit diabetischer Stoffwechsellage; *db/+* = *remote* Kardiomyozyte ohne diabetische Stoffwechsellage, I/R = Ischämie/Reperfusion; iso = Isoproterenol. Die Amplituden sind normiert auf die gemittelte Amplitude der *db/+* Gruppe nach basaler Stimulation.

3.4.1.2 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs

Die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nach basaler Stimulation war in den *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage im Vergleich mit den nicht diabetischen *remote* Kardiomyozyten signifikant um $17 \pm 8\%$ verlangsamt ($P < 0,05$). Nach Stimulation mit dem β -Sympathomimetikum Isoproterenol zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr. Bei den *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage war jedoch ein deutlicher Trend zu einer verlangsamteten Ca^{2+} -Freisetzung erkennbar ($P < 0,021$; Abbildung 68).

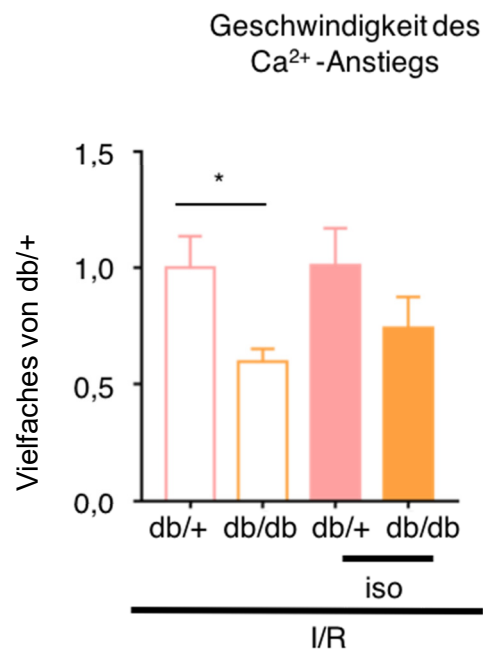


Abbildung 68: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) und von *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*) 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Ca^{2+} Geschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden *remote* Kardiomyozyten aus insgesamt $N = 7$ Herzen mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) und ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*) nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. * $P < 0,05$; Ca^{2+} = Kalziumion; *db/db* = *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage; *db/+* = *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage; I/R = Ischämie/Reperfusion; iso = Isoproterenol. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der *db/+* Gruppe nach basaler Stimulation.

3.4.1.3 Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination

Der Hauptanteil des zytosolischen Ca^{2+} wird während der Diastole über die SERCA2a in das SR zurückgepumpt. Die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination ($v_{\text{Elimination}}$) war in den *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage im Vergleich zu denen ohne diabetische Stoffwechsellage um $41 \pm 9\%$ verlangsamt ($P < 0,05$). Dies lässt auf eine verminderte SERCA2a-Aktivität schließen. Auch die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR nach Stimulation mit Isoproterenol in *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage war um $26 \pm 3\%$ langsamer als bei den *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage ($P < 0,05$; Abbildung 69).

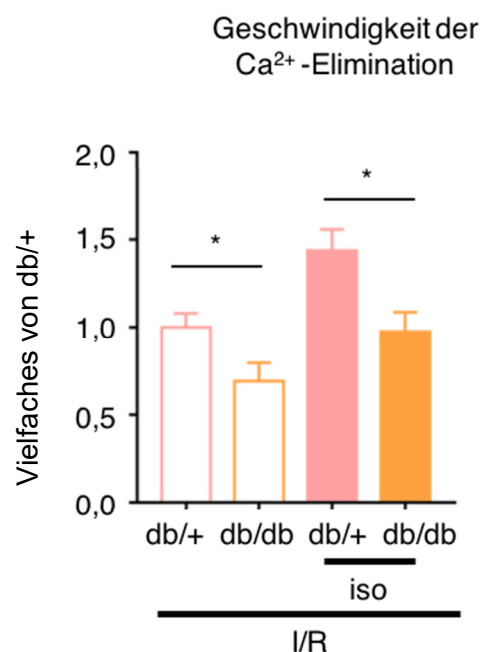


Abbildung 69: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) und von *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*) 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Ca^{2+} -Geschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden *remote* Kardiomyozyten aus insgesamt $N = 7$ Herzen mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) und ohne diabetischer Stoffwechsellage (*db/+*) nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. * $P < 0,05$; Ca^{2+} = Kalziumion; *db/db* = *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage; *db/+* = *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage; I/R = Ischämie/Reperfusion; iso = Isoproterenol. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der *db/+* Gruppe nach basaler Stimulation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ca^{2+} -Kinetik der *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage im Vergleich mit denen ohne diabetische Stoffwechsellage langsamer verlief. Die Amplitude war kleiner, die zytosolische Ca^{2+} -Freisetzung sowie die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR waren verlangsamt (Abbildung 66). Im Gegensatz zu nicht-diabetischen Herzen war nach β -adrenerger Stimulation die Ca^{2+} -Kinetik der *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage im Vergleich zu den *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage immer noch signifikant vermindert.

3.4.2 Sarkomerfunktion

Die Messung der Sarkomerfunktion (2.2.3) erfolgte parallel zur in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Messung der myozytären Ca^{2+} -Kinetik. Die Auswertung der Sarkomerfunktion erfolgte entsprechend dem in Kapitel 2.2.4 skizzierten Vorgehen.

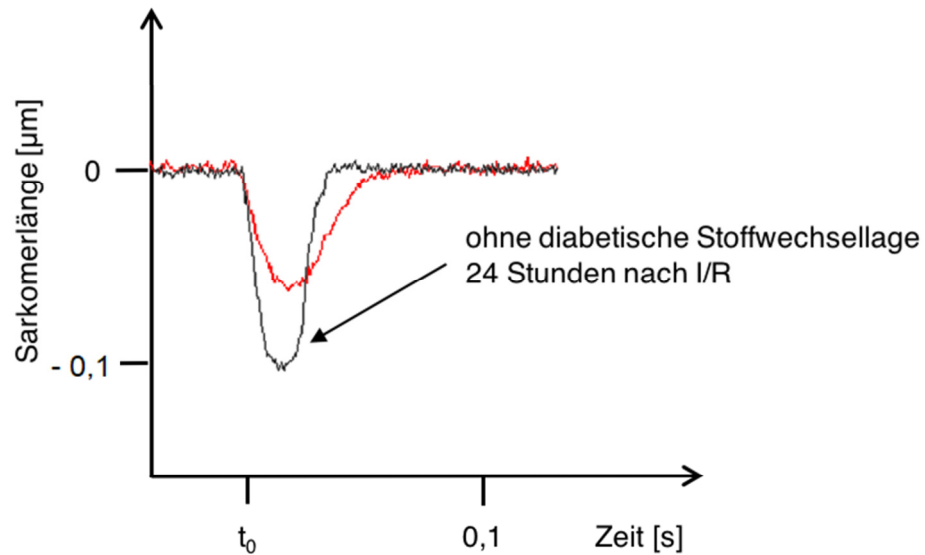


Abbildung 70: Repräsentative Darstellung für die Sarkomerlänge einer *remote* Kardiomyozyte mit diabetischer Stoffwechsellage 24 Stunden nach I/R (rot) und einer *remote* Kardiomyozyte ohne diabetische Stoffwechsellage 24 Stunden nach I/R (schwarz) während eines kontraktiven Zyklus nach elektrischer Stimulation (t_0)

3.4.2.1 Kontraktile Amplitude

Nach einstündiger Ischämie und nach 24 Stunden Reperfusion war die kontraktile Amplitude der *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage um $21 \pm 1\%$ kleiner als die der *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage ($P < 0,05$). Nach β -adrenerger Stimulation war kein signifikanter Unterschied mehr vorhanden ($P = 0,22$) (Abbildung 71).

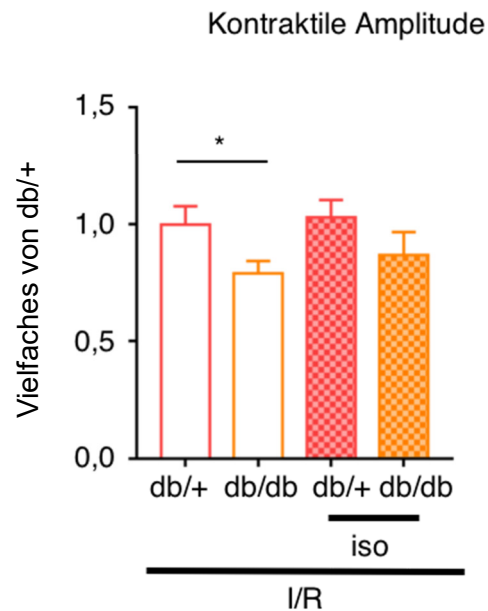


Abbildung 71: Kontraktile Amplitude nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) und von *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*) 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der kontraktiven Amplitude \pm SEM. Gemessen wurden *remote* Kardiomyozyten aus insgesamt $N = 7$ Herzen mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) und ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*) nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. * $P < 0,05$; *db/db* = *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage; *db/+* = *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage; I/R = Ischämie/Reperfusion; iso = Isoproterenol.

3.4.2.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Kontraktionsgeschwindigkeit ($v_{\text{Kontraktion}}$) war nach I/R nicht signifikant verändert ($P = 0,49$). Auch nach Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den *remote* Kardiomyozyten ($P = 0,37$; Abbildung 72). Es war lediglich ein Trend zu einer verminderten Kontraktionsgeschwindigkeit erkennbar.

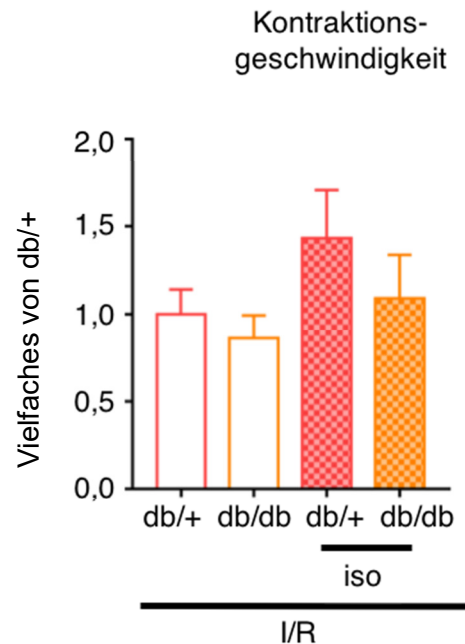


Abbildung 72: Kontraktionsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage (*db/db*) und von *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage (*db/+*) 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Kontraktionsgeschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden *remote* Kardiomyozyten aus insgesamt $N = 7$ Herzen mit diabetischer Stoffwechsellaage (*db/db*) und ohne diabetische Stoffwechsellaage (*db/+*) nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. * $P < 0,05$; *db/db* = *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage; *db/+* = *remote* Kardiomyozyte ohne diabetische Stoffwechsellaage; I/R = Ischämie/Reperfusion; iso = Isoproterenol. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der *db/+* Gruppe nach basaler Stimulation.

3.4.2.3 Relaxationsgeschwindigkeit

Im Gegensatz zur Kontraktionsgeschwindigkeit war die Relaxationsgeschwindigkeit ($V_{\text{Relaxation}}$) der *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage nach basaler Stimulation um $21 \pm 5\%$ verlangsamt ($P < 0,05$). Auch nach Stimulation der Kardiomyozyten mit Isoproterenol war kein signifikanter Unterschied, jedoch ein Trend zu einer verlangsamteten Relaxationsgeschwindigkeit der *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage zu sehen ($P = 0,17$; Abbildung 73).

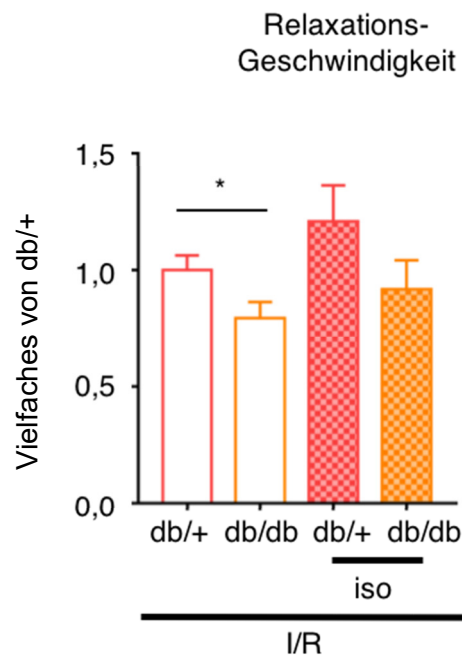


Abbildung 73: Relaxationsgeschwindigkeit nach basaler Stimulation bzw. β -adrenerger Stimulation von *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage (*db/db*) und von *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*) 24 Stunden nach I/R

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Relaxationsgeschwindigkeit \pm SEM. Gemessen wurden *remote* Kardiomyozyten aus insgesamt $N = 7$ Herzen mit diabetische Stoffwechsellage (*db/db*) und ohne diabetische Stoffwechsellage (*db/+*) nach basaler Stimulation und nach Stimulation mit Isoproterenol. * $P < 0,05$; *db/db* = *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage; *db/+* = *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage; I/R = Ischämie/Reperfusion; iso = Isoproterenol. Die Geschwindigkeiten sind normiert auf die gemittelte Geschwindigkeit der *db/+* Gruppe nach basaler Stimulation.

Insgesamt war die Ca^{2+} -Kinetik nach basaler Stimulation in *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage im Vergleich mit denen ohne diabetische Stoffwechsellage nach I/R verlangsamt (Abbildung 66). Durch β -adrenerge Stimulation konnte der verlangsamtete Ca^{2+} -Kreislauf nicht normalisiert werden, er war in den *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage sogar signifikant verlangsamt.

Außerdem war die Sarkomerfunktion in den *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage beeinträchtigt. Die kontraktile Amplitude war verkürzt (Abbildung 70).

Ohne I/R war die Sarkomerfunktion dagegen in den Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage nicht signifikant verändert (Kapitel 3.3.2). Diese Befunde zeigen, dass

sowohl im myozytären Ca^{2+} -Transport als auch in der Sarkomerfunktion *db/db*-Herzen durch I/R stärker beeinträchtigt werden als *db/+*-Herzen. I/R und T2DM scheinen hier also additive Effekte auszuüben.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Im Mausmodell in der frühen Phase 24 Stunden nach I/R war in *remote* Kardiomyozyten der intrazelluläre Ca^{2+} -Transport im Vergleich zu Kontroll-Kardiomyozyten verlangsamt, die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration reduziert und die kontraktile Amplitude verkleinert. *Remote* Kardiomyozyten tendierten zu verminderter, jedoch nicht signifikant veränderter Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Als Ursache wurde eine verminderte Phosphorylierung der PLN-Monomere an Ser16 im *remote* Myokard identifiziert. Dadurch wurde die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase SERCA2a gehemmt. Passend zu diesem Befund war es durch β -adrenerge Stimulation möglich, die PLN-Phosphorylierung und dadurch die Menge und die Kinetik des Ca^{2+} -Transports zu normalisieren. Das *remote* Myokard zeigte außerdem eine erhöhte Phosphatase-Aktivität. Dies stellt eine mögliche Ursache für die verminderte PLN-Phosphorylierung dar.

In der proliferativen Phase 10 Tage nach I/R waren die intrazellulären Ca^{2+} -Ströme in *remote* Kardiomyozyten ebenfalls verlangsamt. Die β -adrenerge Stimulation konnte in dieser Phase die verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik, im Gegensatz zur frühen Phase, nicht normalisieren. Die Sarkomerfunktion zeigte keine Veränderungen. Die Proteinexpression sowie der Phosphorylierungszustand wichtiger Ca^{2+} -Regulatoren war unverändert. Ein Tag und 10 Tage nach I/R wurden somit deutliche Unterschiede in der myozytären Ca^{2+} -Homöostase festgestellt.

Außerdem wurden Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage in Leptin-Rezeptor defizienten Mäusen (*db/db*) untersucht. Während diese Zellen basal eine normale Sarkomerfunktion aufwiesen, zeigten sich deutliche additive Effekte von I/R und T2DM hinsichtlich einer Reduktion und Verlangsamung der gemessenen Ca^{2+} -Transienten sowie der Sarkomerfunktion. Diese Beeinträchtigungen blieben auch nach β -adrenerger Stimulation bestehen.

4.2 24 Stunden nach I/R

Während der frühen Phase nach MI ereignen sich in den ersten Stunden bis Tagen die meisten Todesfälle [108]. Nach einem MI sterben 60 % der Patienten in Deutschland bereits im Krankenhaus [121]. Obwohl die infarzierten Areale des Myokards gut untersucht sind, ist bislang jedoch wenig über die Veränderungen in den nicht-ischämischen Arealen des Herzens, dem *remote* Myokard, nach MI bekannt. Eine genaue Kenntnis der Bedingungen für die Kontraktion und die Relaxation des *remote* Myokards in der

Frühphase des Infarkts ist jedoch von großem klinischem Interesse, da diese Herzteile den Funktionsverlust des infarzierten Myokards kompensieren müssen, um ein ausreichendes Herzzeitvolumen zu gewährleisten.

4.2.1 Bedeutung und Funktion Ca^{2+} -regulierender Proteine nach MI

In der vorliegenden Arbeit wurde 24 Stunden nach I/R in den nicht-ischämischen Kardiomyozyten eine verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik nachgewiesen. Der Ca^{2+} -Anstieg im Zytosol, repräsentiert durch die Amplitude des Ca^{2+} -Transienten, war reduziert und die Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration war verlangsamt.

In der Vergangenheit wurden mehrere Studien mit dem Ziel durchgeführt, nach MI den intrazellulären Ca^{2+} -Kreislauf zu beschleunigen, insbesondere durch Überexpression der SERCA2a. An Ratten wurde eine SERCA2a-Überexpression mittels eines adenoviralen Vektors erzeugt [122]. Nach 30-minütiger Ischämie und 48-stündiger Reperfusion wurde in den ventrikulären Kardiomyozyten, die die SERCA2a überexprimierten, ein beschleunigter Ca^{2+} -Kreislauf beobachtet. Zudem war die Wandbeweglichkeit der Herzen erhöht.

Des Weiteren wurden SERCA1a-überexprimierende transgene Mäuse entwickelt und deren Ca^{2+} -Kinetik nach MI untersucht [123]. Die Isoform SERCA1a ist normalerweise nur im Skelettmuskel exprimiert, weist aber eine erhöhte Immunität gegen oxidativen Stress auf. Die Ca^{2+} -Konzentrationen waren bei den SERCA1-überexprimierenden Herzen nach 24-stündiger Reperfusion höher als in Infarkt Herzen ohne SERCA1a-Überexpression. Diese Studien zeigten die Bedeutung der myozytären Ca^{2+} -Homöostase, insbesondere von SERCA2a, für das *outcome* nach MI und den potentiellen therapeutischen Nutzen einer beschleunigten zytosolischen Ca^{2+} -Elimination.

In der vorliegenden Arbeit war im *remote* Myokard 24 Stunden nach I/R die Expression von SERCA2a und PLN unverändert. Auch indirekte Ca^{2+} -Regulatoren, wie beispielsweise HAX-1 sowie S100A1, die mit der SERCA2a und den PLN-Monomeren interagieren und dadurch deren Funktion beeinflussen, waren unverändert exprimiert [67, 70].

Es mussten daher andere Ursachen für die beobachtete Depression des Ca^{2+} -Kreislaufs im *remote* Myokard vorliegen. Wie die vorliegende Arbeit gezeigt hat, spielt eine verminderte PLN-Phosphorylierung dabei eine entscheidende Rolle.

Die SERCA2a pumpt während der Diastole zytosolisches Ca^{2+} wieder zurück in das SR. Zytosolisches Ca^{2+} wird jedoch nicht nur in das SR transportiert. Über den NCX und die sarkolemmale Kalzium ATPase (PMCA) wird Ca^{2+} aus der Zelle hinaus transportiert. Zudem wird Ca^{2+} über den Kalzium-Uniporter in Mitochondrien aufgenommen. Der Ca^{2+} -Transport

mittels der PMCA und durch den mitochondrialen Kalzium-Uniporter beträgt zusammen nur 2 %. Bedeutsamer ist der NCX, der Ca^{2+} im Austausch gegen Na^+ aus der Zelle befördert.

Der Na^+ -Gehalt ist nach MI im Zytosol erhöht [22]. Es ist bekannt, dass während der Ischämie im ischämischen Myokard durch anhaltenden Sauerstoffmangel und zunehmende Azidose die anaerobe ATP-Produktion unterbunden wird. Durch den dadurch verursachten ATP-Mangel können Na^+ -Ionen, die über die Zellmembran einströmen, nicht mehr aktiv aus der Zelle heraustransportiert werden. Die erhöhte zytosolische Na^+ -Konzentration aktiviert den NCX in umgekehrter Richtung, sodass Na^+ -Ionen die Kardiomyozyte verlassen, wobei im Gegenzug Ca^{2+} einströmt [22, 44]. Während der Reperfusion wird das ischämische Myokard wieder mit Sauerstoff versorgt. Die ATP-abhängigen Prozesse kommen wieder in Gang [109]. Ca^{2+} -Oszillationen sind die Folge, was zu irreversiblen Schädigungen der Kardiomyozyte führen kann [109, 124].

Als eine der Hauptursachen für die Anreicherung von zytosolischem Ca^{2+} wurde die Aktivierung des NCX in die umgekehrte Richtung angesehen [110, 125]. Deshalb wurde zu Beginn der Reperfusion die Aktivität des NCX durch einen Inhibitor zu blockieren versucht. Der Einsatz des NCX-Inhibitors Cariporide wurde in Phase 2 und 3 einer großen klinischen Studie getestet [125]. Es wurden drei verschiedene Dosen (20 mg, 80 mg, 120 mg) verabreicht. Bei 20 mg und 80 mg Cariporide zeigte sich keine Wirkung. Bei 120 mg hatten die Patienten einer Subgruppe ein 10 % geringeres Mortalitätsrisiko. Cariporide zeigte tatsächlich auch eine verminderte Nekrose im ischämischen Myokard. Wenn jedoch die generelle Mortalität betrachtet wird, dann gab es keinen Unterschied zwischen der Placebo- und der Cariporideeinnahme. Die Inhibierung des NCX nach einem MI scheint die Anreicherung von zytosolischem Ca^{2+} nur wenig zu beeinflussen.

Dies könnte daran liegen, dass über den NCX nur ein geringer Teil des myozytären Ca^{2+} transportiert wird. Denn beim Menschen werden nur etwa 28 % über den NCX-Transporter aus der Kardiomyozyte transportiert [41]. Der größte Teil wird über die SERCA2a in das SR gepumpt. Bei Mäusen ist die Leistung der SERCA2a sogar noch höher, es werden über 90 % des zytosolischen Ca^{2+} über die SERCA2a wieder in das SR zurück befördert [42].

Bei der Messung der NCX-Aktivität in der vorliegenden Arbeit wurden die Kardiomyozyten mit Koffein stimuliert. Koffein öffnet die RyR2, sodass Ca^{2+} aus dem SR ausströmt. Die Elimination des Ca^{2+} aus dem Zytosol kann daher in dieser Situation nur durch Ca^{2+} -Transport aus der Zelle heraus, also SERCA2a unabhängig, erfolgen. Die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination ist dann ein Maß für die NCX-Aktivität und die PMCA-Aktivität. Die SERCA2a transportiert zwar zytosolisches Ca^{2+} in das SR, dieses wird aber sofort wieder über den RyR2 freigesetzt. Im Vergleich zu den Kontroll-Kardiomyozyten war in den *remote* Kardiomyozyten nach Koffeinbolus die Geschwindigkeit

der Ca^{2+} -Elimination und damit die NCX-Aktivität und PMCA unverändert (Kapitel 3.1.1). Daraus ist zu schließen, dass 24 Stunden nach I/R die verlangsamte Ca^{2+} -Elimination und die reduzierte Ca^{2+} -Menge im SR nicht durch die NCX-Aktivität, sondern durch eine beeinträchtigte SERCA2a-Aktivität verursacht wurden.

Des Weiteren wurde eine geringere Ca^{2+} -Konzentration im SR der *remote* Kardiomyozyten beobachtet. Zudem war die Geschwindigkeit des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs in den *remote* Kardiomyozyten verlangsamt. Ca^{2+} wird nach jedem Stimulus aus dem SR über den RyR2 in das Zytosol freigesetzt. Die Analyse der Expression des RyR2 ergab keine Unterschiede im Vergleich mit den Kontroll-Kardiomyozyten und auch sein Phosphorylierungszustand, der seine Offen-Wahrscheinlichkeit bestimmt, war 24 Stunden nach I/R im *remote* Myokard unverändert (Daten von Florian Funk). Es ist daher wahrscheinlich, dass die verminderte Füllung des SR mit Ca^{2+} durch die SERCA2a in der Frühphase nach I/R auch für den verminderten und verlangsamten zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg verantwortlich ist, zumal die Ca^{2+} -Konzentration im luminalen SR die treibende Kraft für die SR Ca^{2+} -Freisetzung darstellt [126].

Bekannt ist, dass der RyR2 im Ruhezustand, ohne dass er stimuliert wird, geringe Mengen Ca^{2+} in das Zytosol freisetzt und damit undicht ist (diastolisches Ca^{2+} leak) [127]. Physiologisch betrachtet sind diese spontanen Ca^{2+} -Ströme jedoch so gering, dass es nicht zur Kontraktion der Sarkomere kommt. Zugleich könnte ein ständiger Ca^{2+} -Verlust aus dem SR infolge eines hohen Ca^{2+} leaks in Kardiomyozyten des *remote* Myokards auch dafür mitverantwortlich sein, dass auf Stimulation weniger Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt wird.

Zur Messung des Ca^{2+} leaks im *remote* Myokard wurden *remote* und Kontroll-Kardiomyozyten einer natrium- und Ca^{2+} -freien Lösung ausgesetzt und mit bzw. ohne Tetracain behandelt. Das natrium- und Ca^{2+} -freie Milieu der Kardiomyozyten war notwendig, da in diesem Fall der NCX nicht aktiv wird. Ca^{2+} konnte weder in die Zelle einfließen noch die Zelle verlassen. Ein Anstieg der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol wäre daher unter diesen Bedingungen vorrangig auf ein erhöhtes Ca^{2+} leak zurückzuführen. Wenn durch Tetracain zusätzlich der RyR2 blockiert wurde, konnte durch Messung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen mit und ohne Tetracain das Ca^{2+} leak abgeschätzt werden. Die basale Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol sank nach einer Behandlung mit Tetracain sowohl in *remote* Kardiomyozyten als auch in Kontroll-Kardiomyozyten um das gleiche Maß (Abbildung 29). Daraus lässt sich schließen, dass in den *remote* Kardiomyozyten keine erhöhte Durchlässigkeit des RyR2 vorlag (Kapitel 3.1.1).

Die Veränderung in der Ca^{2+} -Freisetzung des *remote* Myokards wurde daher primär auf die eingeschränkte SERCA2a-Aktivität und die damit verbundene reduzierte Ca^{2+} -Füllung des SR zurückgeführt.

4.2.2 Normalisierung der verlangsamten intrazellulären Ca^{2+} -Ströme durch β -adrenerge Stimulation

In der frühen Phase 24 Stunden nach I/R konnte an *remote* Kardiomyozyten durch Stimulation mit Isoproterenol die verlangsamte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und die verlangsamte zytosolische Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR normalisiert werden. Nach β -adrenerger Stimulation waren die Geschwindigkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme und die Ca^{2+} -Menge der *remote* Kardiomyozyten gegenüber den Kontroll-Kardiomyozyten nicht mehr vermindert (3.1.1).

Isoproterenol ist ein β -Sympathomimetikum, das den G_s -Protein-gekoppelten Rezeptor stimuliert. Über mehrere Zwischenschritte wird die Proteinkinase A (PKA) aktiv [128]. Die PKA phosphoryliert den RyR2 an Ser2808, wodurch vermehrt Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol freigesetzt wird. Zudem phosphoryliert die PKA PLN an Ser16. Dadurch sinkt die inhibitorische Wirkung, die PLN im unphosphorylierten Zustand auf die SERCA2a hat und mehr zytosolisches Ca^{2+} wird über die SERCA2a in das SR transportiert. In der frühen Phase nach I/R konnte die verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik und die zytosolische Ca^{2+} -Menge durch β -adrenerge Stimulation in den *remote* Kardiomyozyten normalisiert werden. Daraus wird geschlossen, dass im *remote* Myokard nach I/R ein regulatorisches, PKA-abhängiges Problem wichtiger Ca^{2+} -Regulatoren vorliegt.

Ob Ca^{2+} -Regulatoren in ihrer Aktivität eingeschränkt sind, lässt sich anhand des Phosphorylierungsstatus des RyR2 und der PLN-Monomere feststellen. Bisher ist bekannt, dass es während der Ischämie im ischämischen Gewebe zu einer erhöhten Phosphorylierung von PLN an Th17 kommt [129]. Die Kardiomyozyten werden nicht mehr mit Sauerstoff versorgt und befinden sich in einem anaeroben Zustand. Phosphatkonzentration und pH-Wert fallen ab. Verschiedene Kinasen werden aktiv und führen vermutlich zu dieser erhöhten Phosphorylierung [130]. Mit Einleiten der Reperfusion normalisieren sich der pH-Wert, die Phosphatkonzentration und die erhöhte PLN Phosphorylierung wieder. Über die Kinase-Aktivität und die PLN-Phosphorylierung im *remote* Myokard war dagegen bis zur vorliegenden Arbeit nichts bekannt.

Das *remote* Gebiet, auf das sich die vorliegende Arbeit konzentriert, wird während der Ischämie weiterhin durchblutet und ist deshalb von diesem Sauerstoffmangel nicht betroffen. Daher erscheint eine stärkere Beschleunigung des Ca^{2+} -Kreislaufes der *remote* Kardiomyozyten nach β -adrenerger Stimulation durch einen reduzierten pH-Wert und

dadurch aktivierte Kinasen als unwahrscheinlich. Außerdem konnte in dieser Arbeit keine erhöhte PKA-Aktivität im *remote* Myokard nachgewiesen werden (3.1.5).

Eine logische Erklärung für die stärkere Beschleunigung und nach Stimulation mit Isoproterenol normalisierte Ca^{2+} -Kinetik und die normalisierte zytosolische Ca^{2+} -Menge ergibt dagegen die im *remote* Myokard unter Basalbedingungen vorliegende verminderte PLN-Phosphorylierung (4.2.5). PLN-Monomere inhibieren im unphosphorylierten Zustand die SERCA2a stärker. Somit wird weniger zytosolisches Ca^{2+} in das SR aufgenommen. Durch die Stimulation der Kardiomyozyten mit Isoproterenol phosphoryliert die PKA die PLN-Monomere. Dieser Vorgang hebt die verminderte PLN-Phosphorylierung, die in den *remote* Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontroll-Kardiomyozyten vorlag, auf (Abbildung 74). Die verlangsamten intrazellulären Ca^{2+} -Ströme werden durch β -adrenerge Stimulation normalisiert.

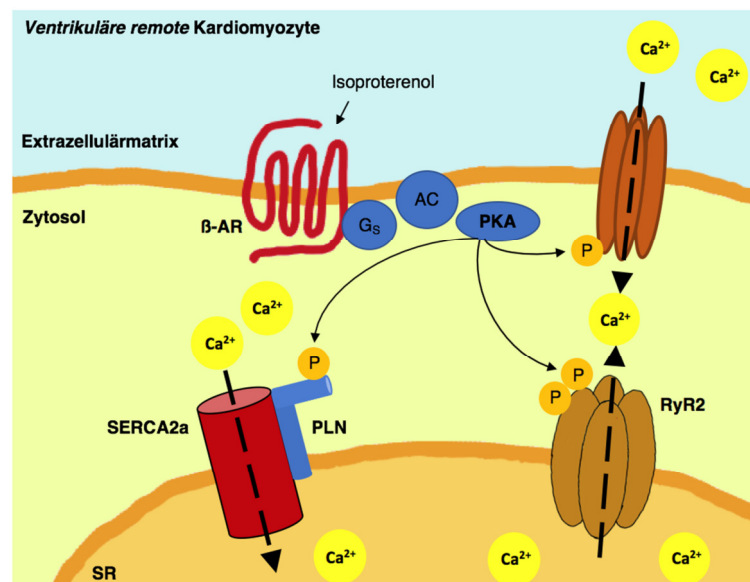


Abbildung 74: PKA-abhängige Phosphorylierung des PLN an Ser16 durch Stimulation einer ventrikulären *remote* Kardiomyozyte mit Isoproterenol 24 Stunden nach I/R

AC = Adenylatzyklase; β -AR = β -adrenerger Rezeptor; Ca^{2+} = Kalziumion; G_s = G_s -Protein gekoppelter Rezeptor; P = Phosphat; PKA = Proteinkinase A; PLN = Phospholamban; PP = Proteinphosphatase; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; SERCA2a = sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a; SR = sarkoplasmatisches Retikulum.

4.2.3 Beeinträchtigte Sarkomerfunktion im *remote* Myokard

Neben einer verlangsamten Ca^{2+} -Kinetik wurde auch eine Beeinträchtigung der Sarkomerfunktion in *remote* Kardiomyozyten nach I/R festgestellt. In nicht-ischämischen Kardiomyozyten war die kontraktile Amplitude nach einstündiger Ischämie und 24 Stunden Reperfusion reduziert. Eine plausible Erklärung dafür ist, dass weniger Ca^{2+} an Troponin C (TnC) binden kann, weil durch die geringere im SR gespeicherte Ca^{2+} -Menge nach jedem

Herzschlag weniger Ca^{2+} ins Zytosol entlassen wird. Bindet Ca^{2+} an Troponin C (TnC), kommt es zu Konformationsänderungen des Troponinkomplexes und die inhibitorische Fähigkeit von cTnI wird gesenkt [131]. Durch den geringeren zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg im *remote* Myokard fällt die Aktin-/Myosin-Interaktion geringer aus und die Sarkomere verkürzen sich nicht mehr so stark. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Veränderungen in der myozytären Ca^{2+} -Homöostase des *remote* Myokards spielen demnach für die Beeinträchtigung der kontraktilen Funktion des Herzens nach I/R eine bedeutende Rolle. Bisherige Untersuchungen zu den Ursachen der funktionellen Schäden der kontraktilen Elemente nach MI fokussieren sich vor allem auf Veränderungen der Sarkomerproteine selbst.

So wurde als Ursache für die Dysfunktion der Myosine eine erhöhte Carbonylierung der terminalen Carboxylgruppe des Myosin-bindenden Protein C (MyBP C) und eine erhöhte Phosphorylierung von Tropomyosin (Tm) festgestellt [132]. Die erhöhte Carbonylierung und die erhöhte Phosphorylierung werden vermutlich durch oxidativen Stress während des kardialen Wiederaufbaus des Myokards ausgelöst. Das MyBP C lag nach MI erhöht carbonyliert vor. Die terminale Carboxylgruppe des MyBP C bindet an Myosin und Titin, wodurch es zur Stabilisierung der dicken Filamente kommt. Eine erhöhte Carbonylierung könnte diese Interaktionen verändern und somit die Funktion beeinträchtigen. Die erhöhte Tm Phosphorylierung könnte kompensatorisch wirken. Die Ca^{2+} -Sensitivität war nach 24 Stunden Reperfusion unverändert [133].

In dieser Arbeit wurde die Ca^{2+} -Sensitivität des *remote* Myokards anhand des Phosphorylierungszustandes von TnI untersucht. Wie oben erwähnt, ist TnI die inhibitorische Einheit des Troponinkomplexes. cTnI wird über die PKA an Ser23/24 phosphoryliert [119]. Diese PKA-abhängige Phosphorylierung senkt die Wahrscheinlichkeit, dass Ca^{2+} an TnC bindet. Es senkt zudem die Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} [134]. cTnI beeinflusst dadurch die kardiale Kontraktion und Relaxation [119, 134].

Die Expression des kardialen Troponin I (cTnI) und die Phosphorylierung von TnI (pTnI) waren in *remote* Kardiomyozyten 24 Stunden nach I/R unverändert (siehe Kapitel 3.1.4).

Als weitere Ursache der kontraktilen Dysfunktion sind in der Literatur Veränderungen am Sarkomerprotein Titin nach MI beschrieben [25]. Titin ist ein wichtiges Strukturprotein der Sarkomere. Es verbindet die Z-Scheibe mit den Myosinfilamenten und überträgt die Kraft der Myosine auf die Z-Scheibe. Es sorgt zudem für die Elastizität und Stabilität der Sarkomere und der gesamten Zelle. Verschiedene Kinasen regeln durch Phosphorylierung der einzelnen Regionen die Steifigkeit des Titins und somit der Sarkomere. Kötter *et al.* zeigten, dass nach drei Tagen permanenter Ligatur die myozytäre Steifigkeit im *remote* Gebiet erhöht war [25]. Vor allem eine erhöhte PKC-Aktivität führte durch Phosphorylierung

des Titins zu dieser erhöhten Steifigkeit. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit 24 Stunden nach I/R im *remote* Myokard eine verminderte PLN-Phosphorylierung an Ser16 beobachtet. Dies geht möglicherweise mit einer erhöhten PKC-Aktivität einher, denn die PKC phosphoryliert den Inhibitor-1 (I-1) [135]. Dieser wird daraufhin inaktiv. Somit kann er die Proteinphosphatase 1 (PP1), welche unter anderem PLN dephosphoryliert, nicht inhibieren. Durch die erhöhte PP1-Aktivität und verminderte PLN-Phosphorylierung würde die SERCA2a-Aktivität vermindert und der myozytäre Ca^{2+} -Kreislauf verlangsamt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sämtliche posttranslationalen Modifikationen, die in der Frühphase nach Infarkt an den Sarkomerproteinen beobachtet wurden, in Richtung einer verschlechterten Sarkomerfunktion wirken.

4.2.4 Unveränderte Proteinexpression von Regulatoren des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufes

Bei der Suche nach den Ursachen für die verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik wurde im *remote* Myokard die Proteinexpression der Ca^{2+} -regulierenden Proteine überprüft. Dafür wurden Herzlysate mit *Western-blot*-Analysen untersucht (Kapitel 2.3.1.5), indem die Bandenstärke des jeweils aufgetragenen Proteins quantifiziert wurde. Auf Proteinebene waren keine veränderten Expressionen der wichtigsten Ca^{2+} -Regulatoren zu finden. Sowohl die RyR2-Expression, die SERCA2a-Expression und die Expression der PLN-Monomere als auch das Verhältnis SERCA2a-/PLN-Monomere waren unverändert. Auch Interaktoren, wie beispielsweise das HS1-assoziierte Protein X-1 (HAX-1) und S100A1, die mit der SERCA2a, PLN oder dem RyR2 interagieren und somit indirekt die Ca^{2+} -Kinetik beeinflussen, zeigten in ihrer Proteinexpression keine Veränderung im *remote* Myokard nach I/R [67, 70, 71]. Insofern wurden keine Hinweise darauf gefunden, dass verminderte Expressionen der untersuchten Ca^{2+} -Regulatoren als Ursache für die verlangsamten intrazellulären Ca^{2+} -Ströme infrage kommen.

4.2.5 Verminderte PLN-Phosphorylierung im *remote* Myokard

In der vorliegenden Arbeit wurde im *remote* Myokard nach einstündiger Ischämie und 24 Stunden Reperfusion eine verringerte PLN-Phosphorylierung an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle Ser16 beobachtet (3.1.4). Dies erklärt die nach I/R im *remote* Myokard verlangsamten intrazellulären Ca^{2+} -Ströme und die verminderte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. PLN-Monomere interagieren mit der SERCA2a und inhibieren diese [60]. Liegt das PLN-Monomer unphosphoryliert vor, ist diese Hemmung stärker ausgeprägt und es wird weniger zytosolisches Ca^{2+} in das SR zurücktransportiert. Nach β -adrenerger Stimulation war sowohl die Ca^{2+} -Kinetik als auch die Menge an zytosolischem Ca^{2+} im *remote* Myokard im Vergleich zum Kontroll-Myokard wieder normalisiert (3.1.1). Durch

β -adrenerge Stimulation wird die PKA aktiviert. Diese phosphoryliert PLN an Ser16. Die verminderte PLN-Phosphorylierung, die nach basaler Stimulation vorlag, wurde somit durch die β -adrenerge Stimulation aufgehoben. Verantwortlich für die im *remote* Myokard verminderte PLN-Phosphorylierung an Ser16 ist entweder eine verringerte PKA-Aktivität, die PKA PLN an Ser16 phosphoryliert, oder eine erhöhte Proteinphosphatase-Aktivität, welche PLN an Ser16 dephosphoryliert [62, 63].

Nach I/R wurden im *remote* Myokard bei der Aktivitätsmessung mittels ELISA keine Änderungen der globalen PKA-Aktivität festgestellt (Kapitel 3.1.5). Auch die Expression der PKA an der katalytischen Untereinheit α wies keinen Unterschied im nicht-ischämischen Gebiet nach I/R auf. Deshalb war es auch nicht überraschend, dass andere PKA-abhängige Phosphorylierungsstellen, wie beispielsweise der RyR2 an Ser2808 oder das kardiale Troponin I an Ser23/24, im *remote* Myokard keinen verminderten Phosphorylierungszustand aufwiesen.

Interessanterweise zeigte sich, dass die Gesamt-Proteinphosphatase-Aktivität im *remote* Myokard 24 Stunden nach I/R erhöht war (Kooperation mit PD Dr. P. Boknik, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster). Die Aktivität der Proteinphosphatase 2a (PP2a) war dabei signifikant erhöht (Abbildung 75). Die Aktivität der Proteinphosphatase 1 (PP1) war nicht signifikant verändert, zeigte jedoch einen starken Trend zu einer erhöhten Aktivität (Kapitel 3.1.5).

PLN wird sowohl durch die PP1 als auch durch die PP2a an Ser16 dephosphoryliert [65]. Im Herzen finden sich verschiedene Phosphatasen mit zahlreichen Untergruppen. Im Herzen wird PLN an Ser16 zu etwa 70 % durch die PP1 und zu etwa 30 % von der PP2a dephosphoryliert [64]. Die Aktivität der PP1 wird von der Proteinphosphatase 2a und 2b beeinflusst [136]. Diese Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen (PP2a/PP2b) dephosphorylieren die PP1 an Ser48 und Ser67, wodurch die PP1 aktiv wird.

Die physiologische Bedeutung einer erhöhten PP2a-Aktivität wurde an transgenen Mäusen untersucht, die PP2a kardial überexprimieren [137]. Die Überexpression der PP2a führte in diesen Mäusen zu einer verstärkten Dephosphorylierung des PLN und einer Reduktion der kontraktile Herzfunktion. Die Expression der SERCA2a und des PLN war hierbei unverändert.

Auch der Einfluss einer erhöhten PP2a-Aktivität wurde in der frühen Phase nach MI untersucht. Es zeigte sich, dass eine erhöhte PP2a-Aktivität in der akuten Phase nach MI von Vorteil zu sein scheint, zwei Tage nach MI war die Überlebensrate der Herzen mit einer erhöhten PP2a-Aktivität verbessert [137, 138]. Nachteilig war jedoch, dass die transgenen Mäuse mit einer erhöhten PP2a-Expression vermehrt an einer dilatativen Kardiomyopathie erkrankten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verringerte PLN-Phosphorylierung an Ser16 im *remote* Myokard am ehesten durch eine erhöhte Phosphatase-Aktivität hervorgerufen wird. Diese führt durch Dephosphorylierung des PLN an Ser16 zu einer verminderten SERCA2a-Aktivität, zu einer verlangsamten Ca^{2+} -Kinetik und zu einer veränderten Sarkomerfunktion (Abbildung 75).

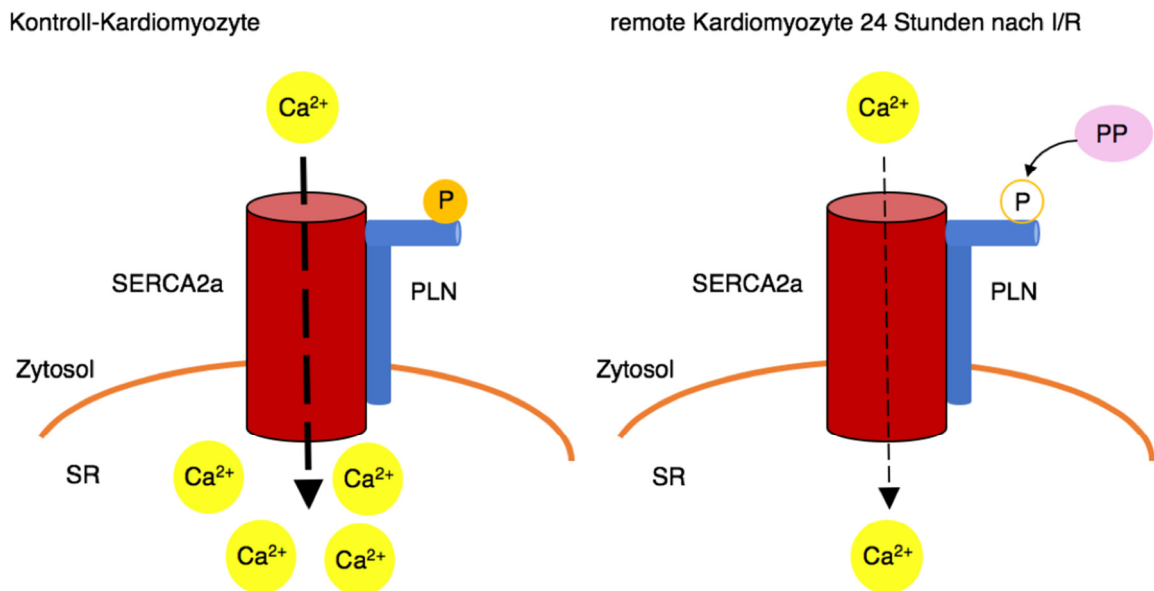


Abbildung 75: SERCA2a/PLN-Komplex in einer Kontroll-Kardiomyozyte (links) und in einer *remote* Kardiomyozyte 24 Stunden nach I/R (rechts). Im Vergleich zu der Kontroll-Kardiomyozyte ist in der *remote* Kardiomyozyte die PLN-Phosphorylierung durch eine höhere PP-Aktivität vermindert, die SERCA2a-Aktivität sinkt und weniger Ca^{2+} gelangt in das SR

Ca^{2+} = Kalziumion; P = Phosphat; PLN = Phospholamban; PP = Proteinphosphatase; SERCA2a = sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a; SR = sarkoplasmatisches Retikulum.

4.3 10 Tage nach I/R

Das *remote* Myokard wurde auch 10 Tage nach I/R analysiert und es wurde untersucht, ob und gegebenenfalls welche Veränderungen gegenüber der frühen Phase 24 Stunden nach I/R aufgetreten sind. Untersuchungen zu diesem späteren Zeitpunkt sind deshalb von Interesse, weil nach MI das kardiale *remodeling* eingesetzt hat [7]. Im ischämischen Myokard findet ein Heilungsprozess statt. Tote Kardiomyozyten werden durch Kollagen ersetzt. Das *remote* Myokard muss den funktionellen Verlust des ischämischen Areals kompensieren.

In der frühen Phase nach I/R wurde eine beeinträchtigte SERCA2a-Aktivität in den *remote* Kardiomyozyten festgestellt, die durch eine verminderte PLN-Phosphorylierung verursacht wird. Es ist nicht ausgeschlossen, dass sich 10 Tage nach I/R der Phosphorylierungszustand des PLN wieder normalisiert hat. Stattdessen könnte es auch zu veränderten Proteinexpressionen wichtiger Ca^{2+} -Regulatoren gekommen sein.

Zunächst wurden die intrazellulären Ca^{2+} -Ströme in *remote* Kardiomyozyten 10 Tage nach I/R analysiert, um potentielle Veränderungen im Ca^{2+} -Kreislauf aufzudecken.

4.3.1 Verlangsamte intrazelluläre Ca^{2+} -Ströme 10 Tage nach I/R in *remote* Kardiomyozyten

Die Ca^{2+} -Kinetik war in *remote* Kardiomyozyten nach einstündiger Ischämie und darauffolgender 10-tägiger Reperfusion verlangsamt (Kapitel 3.2.1). Dies wurde auch in der frühen Phase nach I/R beobachtet (Kapitel 3.1.1). Die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten sowie die Geschwindigkeit des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs und des Ca^{2+} -Abfalls waren in Kardiomyozyten des *remote* Myokards 10 Tage nach I/R reduziert. Dies deutet auf eine eingeschränkte SERCA2a-Aktivität oder auf eine verminderte SERCA2a-Expression hin.

Die Ursachen einer verminderten SERCA2a-Funktion sind am besten in insuffizienten Herzen untersucht. Bei herzinsuffizienten Patienten liegen die SERCA2a-Aktivität und die SERCA2a-Expression reduziert vor [139]. Therapieansätze, die in der Vergangenheit getestet wurden, um im insuffizienten Herzen die intrazellulären Ca^{2+} -Ströme zu verbessern, wurden beispielsweise an PLN-defizienten Mäusen untersucht [140]. Dabei wurde analysiert, ob durch das Fehlen von PLN die Ca^{2+} -Kinetik verbessert werden kann. PLN hemmt die SERCA2a durch Interaktion und bestimmt dadurch deren Aktivität [60]. Cross *et al.* haben gezeigt, dass die PLN-defizienten Mäuse nach I/R zwar eine verbesserte kontraktile Herzfunktion aufwiesen, aber auch empfindlicher gegenüber einem Ischämieschaden waren [140].

Bei weiteren Untersuchungen wurde ein Antikörper gegen PLN eingesetzt, um ein komplettes Fehlen des SERCA2a-Regulators PLN zu vermeiden [141]. Dieser verhinderte die Interaktion zwischen PLN und der SERCA2a. Tatsächlich konnten so der myozytäre Ca^{2+} -Kreislauf und die Kontraktilität der Sarkomere verbessert werden. Die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung und der zytosolischen Ca^{2+} -Elimination war höher als bei unbehandelten Kardiomyozyten. Leider sind hierzu bisher weder Langzeitstudien am Tier noch klinische Studien bekannt, um Aussagen über einen möglichen therapeutischen Nutzen treffen zu können.

Im Zusammenhang mit der Beschleunigung der Ca^{2+} -Kinetik wurde nicht nur PLN, sondern auch SERCA2a getestet. In einer Studie wurde in humanen ventrikulären Kardiomyozyten SERCA2a überexprimiert [142]. Die Kardiomyozyten wurden aus Herzen gewonnen, die bei Herztransplantationen entnommen wurden. Davon stammten 5 Herzen von Patienten, die einen MI hatten und danach eine Herzinsuffizienz entwickelten, und 5 von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie. Eine Überexpression der SERCA2a verbesserte den intrazellulären Ca^{2+} -Kreislauf. Die Kardiomyozyten kontrahierten und relaxierten schneller

als die Kardiomyozyten ohne SERCA2a-Überexpression. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurden klinische Studien der Phasen 1 und 2 an Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium gestartet. Über einen Gentransfer wurde die SERCA2a-Expression im Herzen erhöht [143]. Während Phase 1, die hauptsächlich dazu diente, die Sicherheit, Wirkung und Dosierung zu untersuchen, konnten die Symptome der herzinsuffizienten Patienten verbessert werden. Leider zeigte die Studie in Phase 2, die placebo-kontrolliert, randomisiert und verblindet war, keine verbesserte Hospitalisierung nach der SERCA2a Genterapie bei herzinsuffizienten Patienten.

Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass viele Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, erhöhte Plasmalevel des natriuretischen Peptids vom Typ b (BNP) hatten [144]. BNP wird bei der Dehnung des linken Ventrikels durch Kardiomyozyten und Fibroblasten freigesetzt. Durch erhöhte BNP-Plasmalevel wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System angeregt. Es kommt zur Sympathikusaktivierung. Schließlich führen erhöhte BNP-Level über längere Zeit zur Hypertrophie und zu Fibrosebildung im Herzen. Patienten mit einem hohen BNP-Spiegel zeigten verminderte SERCA2a-, S100A1- und RyR2-Expressionen. Verminderte Ca^{2+} -Transients mit verlangsamter Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und der Ca^{2+} -Elimination waren die Folge. Interessanterweise war die SERCA2a-Expression bei Patienten, die in Phase 2 den Gentransfer erhielten, nur erhöht, wenn ihre BNP-Plasmaspiegel niedrig waren [144]. Es wird vermutet, dass BNP die SERCA2a-Expression inhibiert, indem es den „Calcineurin *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)“-Syntheseweg hemmt. Ob die Annahme stimmt, dass BNP die SERCA2a-Expression inhibiert, werden weitere Studien insbesondere mit Patienten, die einen niedrigen BNP-Plasmaspiegel aufweisen und einen Gentransfer der SERCA2a erhalten, in Zukunft zeigen.

Interessanterweise gibt es auch eine Studie, die im *remote* Myokard die SERCA2a-Überexpression nach MI untersuchte [145]. Eingesetzt wurden transgene Mäuse, die die SERCA2a überexprimierten. Erwartet wurde, dass sich die Überexpression der SERCA2a positiv auf die Ca^{2+} -Kinetik nach MI auswirkt. In den ersten 24 Stunden nach MI wurde jedoch eine erhöhte Mortalitätsrate der transgenen Mäuse festgestellt. Als Ursache werden Arrhythmien in der frühen Phase nach Infarkt vermutet.

In der vorliegenden Arbeit war jedoch weder die Expression der SERCA2a noch die der PLN-Monomere verändert (Kapitel 3.2.3). Eine verminderte SERCA2a-Aktivität würde erklären, weshalb die intrazellulären Ca^{2+} -Ströme verlangsamt sind und die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol geringer ist. Die Phosphorylierung von PLN im *remote* Myokard unterschied sich nicht von der des Kontroll-Myokards (3.2.4). Im Gegensatz zum Zeitpunkt 24 Stunden nach I/R kann somit 10 Tage nach I/R eine verminderte Aktivität der

SERCA2a durch PLN als Ursache der reduzierten SERCA2a-Aktivität ausgeschlossen werden.

Eine weitere mögliche Ursache für eine verminderte SERCA2a-Aktivität stellen posttranslationale Modifikationen der SERCA2a wie zum Beispiel eine verminderte SUMOylierung dar. Die SUMOylierung geschieht durch das SUMO-Protein (*small ubiquitin-related modifier*) [146]. Dieser Vorgang ist wichtig für den Erhalt der Aktivität und der Stabilität der SERCA2a.

Kho *et al.* haben gezeigt, dass nach Überexpression von SUMO1 in isolierten Kardiomyozyten die Ca^{2+} -Kinetik und Kontraktilität verbessert werden konnten [146]. Die Kardiomyozyten stammten dabei sowohl aus humanen als auch aus murinen Herzen. Bei den Mäusen wurde die Herzinsuffizienz mit einem Bluthochdruckmodell ausgelöst [146, 147]. Posttranslationale Proteinmodifikationen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Dies ist jedoch für nachfolgende Untersuchungen vorgesehen.

4.3.2 Keine Normalisierung der verlangsamten Ca^{2+} -Ströme durch β -adrenerge Stimulation

Nach einstündiger Ischämie und darauffolgender 10-tägiger Reperfusion wurde die verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik der *remote* Kardiomyozyten durch β -adrenerge Stimulation nicht vollständig wiederhergestellt. Die Ca^{2+} -Kinetik wurde im *remote* Myokard nicht stärker durch Isoproterenol beschleunigt als in Kontroll-Kardiomyozyten und es war noch ein deutlicher Trend in Richtung eines verlangsamten zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg und zu einer verlangsamten zytosolischen Ca^{2+} -Elimination in das SR erkennbar (Kapitel 3.2.1). Dies lässt darauf schließen, dass hier kein regulatorisches Aktivitätsproblem vorlag, wie es 24 Stunden nach I/R der Fall war (Kapitel 4.2.2). Veränderungen auf Proteinebene könnten dafür verantwortlich sein. Näheres wird hierzu in Kapitel 4.3.4 diskutiert.

4.3.3 Unveränderte Sarkomerfunktion in *remote* Kardiomyozyten

In *remote* Kardiomyozyten war die Ca^{2+} -Kinetik 10 Tage nach I/R verlangsamt (Kapitel 3.2.1). Die Sarkomerfunktion war jedoch nicht verändert (Kapitel 3.2.2). 24 Stunden nach I/R war die kontraktile Amplitude der Sarkomere in *remote* Kardiomyozyten vermindert (Kapitel 3.1.2). Dies ließ sich durch die geringere Menge an zytosolischem Ca^{2+} erklären (Kapitel 3.1.1). Je mehr zytosolisches Ca^{2+} vorliegt, desto stärker fällt die Kontraktion der Sarkomere aus. Allerdings war die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in den *remote* Kardiomyozyten 10 Tage nach I/R auch geringer. Weshalb die kontraktile Amplitude 10 Tage nach I/R trotz veränderter zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration nicht eingeschränkt war, ist bis jetzt nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung wäre eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente. Entsprechende Untersuchungen stehen noch aus. Es

gibt aber Hinweise darauf, dass 10 Tage nach MI in den Sarkomeren adaptive Veränderungen stattgefunden haben, um dem Funktionsverlust des Myokards entgegenzutreten.

So wurden nach MI veränderte Proteinfunktionen an Sarkomeren beobachtet [25]. Untersuchungen des Sarkomerproteins Titin zeigten, dass die Steifigkeit des Titins 3 Tage nach I/R erhöht war. 10 Tage nach I/R war diese erhöhte Steifigkeit wieder herabgesetzt. Eine weitere Möglichkeit könnte eine verbesserte Myosin-ATPase-Aktivität darstellen, die einer kontraktiven Dysfunktion entgegenwirkt [148]. Zur Kontraktion der Sarkomere wird ATP benötigt. An Myosin gebundenes ATP wird zu ADP und Phosphat gespalten. Durch ADP wird Myosin an Aktin gebunden, wodurch es zur Kraftentwicklung kommt. Dazu ist es nötig, dass ATP zu ADP und Phosphat umgewandelt wird, was durch die Myosin-ATPase erfolgt. Ob 10 Tage nach I/R die Myosin-ATPase-Aktivität verbessert ist, müsste ebenfalls in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.3.4 Unveränderte Proteinexpressionen von Regulatoren des Ca^{2+} -Kreislaufes

Zur Abklärung der Ursachen für die Beeinträchtigung der myozytären Ca^{2+} -Homöostase 10 Tage nach I/R wurde die Proteinexpression der Ca^{2+} -Regulatoren SERCA2a, PLN-Monomer und RyR2 im *remote* Myokard untersucht. *Western-blot*-Analysen zeigten keinerlei Hinweise auf Veränderungen (Kapitel 3.2.3).

In der Literatur finden sich nur zu späteren Zeitpunkten nach MI entsprechende Expressionsdaten. Omura *et al.* haben an Ratten mittels mRNA-Analyse gezeigt, dass im *remote* Myokard die Genexpression der SERCA drei Wochen nach MI vermindert war [149]. Im weiteren Verlauf war nach zwei bzw. vier Monaten die Expression der SERCA im insuffizienten Herzen weiter reduziert. Die Autoren vermuteten, dass es bereits in der frühen Phase nach MI zu bisher unbekanntem Veränderungen kommen muss, die diese starke Verminderung der Genexpression auslösen.

In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem indirekte Ca^{2+} -Regulatoren wie HAX-1 und S100A1 untersucht, die mit der SERCA2a und/oder PLN interagieren. Bei den Expressionsanalysen von HAX-1 und S100A1 wurden im *remote* Myokard 10 Tage nach I/R keine Veränderungen beobachtet (Kapitel 3.2.3). Dieses Ergebnis ist wichtig, weil vermutet wird, dass HAX-1 die Aktivität von PLN kontrolliert [70]. Es konnte gezeigt werden, dass HAX-1 an der Region der zwei wichtigsten Phosphorylierungsstellen Ser16 und Thr17 von PLN bindet. Zudem interagiert HAX-1 mit der SERCA2a, wobei es deren Proteinexpression reguliert [71].

Auch von S100A1 ist bekannt, dass es sowohl mit der SERCA2a als auch mit PLN in Verbindung tritt [67]. Darüber hinaus sind Interaktionen mit dem RyR beobachtet worden [150]. Im Endstadium von herzinsuffizienten Patienten wurde beispielsweise eine verminderte S100A1-Proteinexpression festgestellt [151]. Es wird vermutet, dass die verminderte S100A1-Expression zu einer verlangsamten Ca^{2+} -Kinetik führt.

Interessanterweise wurde in einem Ischämie-/Reperusionsmodell nach Behandlung mit S100A1, bei der S100A1 dem *remote* Myokard über einen Adeno-assoziierten Vektor zugeführt wurde, wieder eine normalisierte Ca^{2+} -Kinetik beobachtet [152]. S100A1 konnte dabei das Ca^{2+} -Gleichgewicht in isolierten Kardiomyozyten wiederherstellen.

In dieser Arbeit wurden auch die Expression des kardialen Troponin I (cTnI) und die Phosphorylierung von cTnI an Ser23/24 untersucht. In beiden Fällen zeigten sich im *remote* Myokard 10 Tage nach I/R im Vergleich zum Kontroll-Myokard keine Änderungen und somit gab es keinen Hinweis auf eine veränderte Ca^{2+} -Sensitivität der Sarkomere (3.2.3).

Veränderungen der pTnI (Ser23/24) Phosphorylierung wurden bisher in insuffizienten Herzen sowie nach Hypertrophie beschrieben [153]. Es wird vermutet, dass dies eine diastolische Dysfunktion begünstigt [134].

10 Tage nach I/R konnte im *remote* Myokard keine Einschränkung der Sarkomerfunktion festgestellt werden. Ob dies auch zu einem späteren Zeitpunkt, beispielsweise 28 Tage nach I/R, so ist, könnte von Interesse sein, weil dann eine weitere Phase des Post-Infarkt-*remodeling*, die sogenannte Reifephase, begonnen hat [7]. Es kommt zur Narbenbildung, nekrotisches Gewebe wird komplett durch fibröses Gewebe ersetzt. Es wird vermutet, dass in dieser späten Phase nach MI durch das kardiale *remodeling* viele Signalkaskaden, insbesondere die Signalweitergabe vieler Proteinkinasen und Proteinphosphatasen gestört werden [154]. Es kommt zur Hypertrophie und/oder Dilatation des Herzens und funktionell häufig zu chronischer Herzinsuffizienz [12].

4.3.5 Unveränderte Aktivität von Regulatoren des Ca^{2+} -Kreislaufes

In *remote* Kardiomyozyten waren die intrazellulären Ca^{2+} -Ströme 24 Stunden nach I/R verlangsamt und die Menge an Ca^{2+} war reduziert. Durch β -adrenerge Stimulation konnten Ca^{2+} -Ströme und Ca^{2+} -Menge wieder normalisiert werden. Dies ließ auf eine verminderte SERCA2a-Aktivität schließen, da PLN vermehrt dephosphoryliert vorlag (Abbildung 75).

Im *remote* Myokard waren 10 Tage nach I/R keine Unterschiede in der Phosphorylierung des PLN vorhanden. Auch der RyR2 zeigte keine Unterschiede in der Phosphorylierung (Kapitel 3.2.4). Es scheint sich 10 Tage nach I/R nicht mehr um ein regulatorisches

Problem zu handeln, das die Ca^{2+} -Kinetik beeinflusst (Abbildung 76). Die genauen Ursachen der verlangsamten Ca^{2+} -Ströme müssen noch geklärt werden.

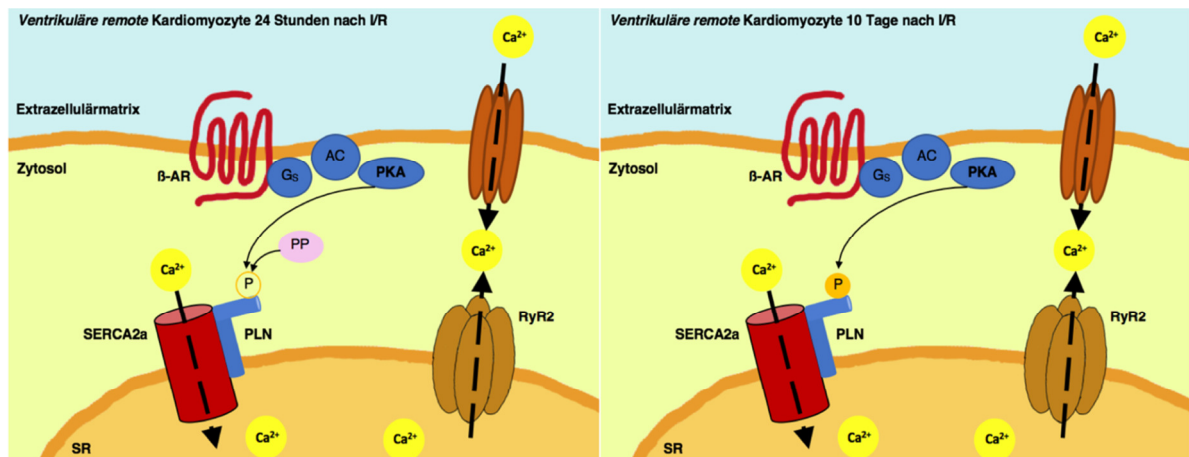


Abbildung 76: Erhöhte PP-Aktivität 24 Stunden nach I/R und unveränderte PKA-abhängige PLN-Monomer-Phosphorylierung 10 Tage nach I/R im remote Myokard

AC = Adenylatzyklase; β -AR = β -adrenerger Rezeptor; Ca^{2+} = Kalziumion; G_s = G_s-Protein gekoppelter Rezeptor; P = Phosphat; PKA = Proteinkinase A; PLN = Phospholamban; PP = Proteinphosphatase; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; SERCA2a = sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a; SR = sarkoplasmatisches Retikulum.

4.4 Diabetes mellitus Typ II

Die Mehrheit der bisher veröffentlichten humanen Langzeitstudien zeigen, dass Typ-I- und Typ-II- Diabetiker ein höheres Risiko für einen MI und durch den sich anschließenden Ischämie-/Reperfusionsschaden eine geringere Überlebenschance haben als Nicht-Diabetiker [155].

4.4.1 Verlangsamte Ca^{2+} -Ströme in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, welchen Einfluss Diabetes mellitus Typ II auf den Ca^{2+} -Haushalt und auf die Sarkomerfunktion des remote Myokards nach I/R hat. Daher wurde zunächst der intrazelluläre Ca^{2+} -Kreislauf im Mausmodell des Diabetes Typ II ohne Einfluss eines I/R, gemessen. Hierzu wurden wie in Kapitel 1.7.2 beschrieben *db/db*-Mäuseherzen mit diabetischer Stoffwechsellage verwendet. In Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage wurde eine verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik beobachtet. Die Menge an Ca^{2+} , die mit jedem elektrischen Stimulus aus dem SR in das Zytosol freigesetzt wurde, war in den Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage vermindert. Außerdem war die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs im Zytosol und die der zytosolischen Ca^{2+} -Elimination in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage verlangsamt (3.3.1). Nach β -adrenerger Stimulation war der Ca^{2+} -Kreislauf nicht mehr signifikant beeinträchtigt, es zeigte sich aber noch ein deutlicher Trend. Die Sarkomerfunk-

tion der Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage war jedoch nicht verändert. Die Ergebnisse zur Ca^{2+} -Homöostase der *db/db*-Kardiomyozyten decken sich mit publizierten Literaturdaten, Belke *et al.* beschrieben allerdings im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit auch eine kontraktile Dysfunktion der *db/db*-Herzen [104]. Auch in anderen Diabetes-Modellen sowohl für Diabetes mellitus Typ I als auch für Diabetes mellitus Typ II wurde bereits gezeigt, dass der intrazelluläre Ca^{2+} -Kreislauf beeinträchtigt ist und eine kontraktile Dysfunktion vorliegt [103, 104, 148, 156-158]. Dies äußerte sich darin, dass die Geschwindigkeit des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs und der zytosolischen Ca^{2+} -Elimination verlangsamt und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration vermindert war. Kontraktion und die Relaxation der Sarkomere waren dadurch eingeschränkt. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass *db/db*-Mäuse in fortgeschrittenem Alter (> 14 Wochen) eine diabetische Kardiomyopathie entwickeln [159]. Es wurden in der vorliegenden Arbeit deshalb ausschließlich Tiere im Alter von 11 bis 13 Wochen verwendet, wenn sich Hyperglykämie und Insulinresistenz bereits ausgebildet haben, aber noch keine Herzinsuffizienz besteht.

Um die Ursachen für die Beeinträchtigung der kontraktilen Apparatur diabetischer Herzen zu verstehen, wurden mehrere Studien mit verschiedenen Diabetes-mellitus-Modellen durchgeführt. Bai *et al.* haben anhand eines durch Streptozotocin Injektionen induzierten Diabetes mellitus und anschließender fett- und zuckerreicher Ernährung gezeigt, dass die Herzen der behandelten Mäuse eine erhöhte Proteinkinase-C-alpha- und PLN-Expression hatten und die SERCA- und RyR-Expression vermindert war [158]. Die Autoren vermuteten, dass diese veränderten Proteinexpressionen wichtiger Ca^{2+} -Regulatoren zur Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme und schließlich zur kardialen Dysfunktion führten. Histologische Untersuchungen der Herzen zeigten zudem geschwollene Mitochondrien und gebrochene Myofibrillen.

An *db/db*-Mäusen untersuchten Belke *et al.* die Expressionen der wichtigsten Ca^{2+} -Regulatoren auf Proteinebene [104]. Dabei stellten sie fest, dass die Expression von PLN signifikant erhöht war und die Expression der SERCA2a und die des RyR einen Trend zu verminderter Proteinexpression aufwies. Das Verhältnis der SERCA2a-/PLN-Expression war in *db/db*-Herzen im Vergleich mit den Kontrollherzen um das 3-Fache erniedrigt. Das vermehrte Vorliegen von PLN, welches die SERCA2a im unphosphorylierten Zustand inhibiert, würde zur verminderten SERCA2a-Aktivität führen, dadurch eine verminderte Aufnahme von Ca^{2+} in das SR und schließlich die verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik der *db/db*-Mäuse erklären.

Des Weiteren wurde eine verminderte FKBP-12.6-Expression in den *db/db*-Mäusen festgestellt. Die Koordination der Öffnung und Schließung des RyR2 wird durch FKBP 12.6

beeinflusst. Eine geringere Expression von FKBP 12.6 stellt eine mögliche Erklärung für ein erhöhtes Ca^{2+} *leak* des SR dar.

Clark *et al.* haben gezeigt, dass in *in vitro* kultivierten Kardiomyozyten, die mit einer erhöhten Glukosekonzentration behandelt worden waren, die Kontraktion eingeschränkt war und zugleich der zelluläre Ca^{2+} -Kreislauf verlangsamt war [156]. Auch hier wurde eine verminderte SERCA2a-Expression gemessen. Als weiterer Grund für die verlangsamte Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR wird eine erhöhte O-GlcNAcylierung diskutiert, durch die die Aktivität der SERCA2a reduziert wird. Vermehrte O-GlcNAcylierung von Proteinen ist bei Diabetes mellitus Folge eines erhöhten Austausches von Glukose im Hexosamin-Stoffwechselweg [160]. Die intrazelluläre Glukose wird zu Glukose-6-Phosphat und dann zu Fruktose-6-Phosphat umgewandelt. Die Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferase wiederum katalysiert die Umwandlung von Letzterem zu Glukosamin-6-Phosphat. Über mehrere Zwischenschritte kommt es zur N-Acetylierung des Glukosamins. N-Acetylglucosamin wiederum kann mit Serin-/Threoninresten von Proteinen interagieren, wodurch es zur O-GlcNAcylierung dieser Proteine kommt. Dieser Vorgang kann zu Instabilität und Funktionsänderung von Proteinen führen.

4.4.2 Normale Sarkomerfunktion in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage

Bei den Versuchen zu vorliegender Arbeit war die Sarkomerfunktion der *db/db*-Mäuse im Alter von 11 bis 13 Wochen nicht signifikant verändert. Die kontraktile Amplitude sowie die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellaage waren im Vergleich zu den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellaage unverändert (3.3.2). Im Gegensatz dazu beschrieben Belke *et al.* anhand linksventrikulärer Druckmessungen eine verlangsamte Kontraktion und Relaxation der *db/db*-Herzen im Vergleich zu den *db/+*-Herzen [104]. Belke *et al.* führten zudem ihre kontraktile Messungen an *ex vivo* perfundierten Herzen und nicht an isolierten Kardiomyozyten durch, was eine isolierte Beurteilung der Sarkomerfunktion unmöglich macht, weil weitere Einflussfaktoren wie z.B. eine veränderte extrazelluläre Matrix, zu berücksichtigen sind.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Ergebnisse dieser Arbeit sind die metabolischen Veränderungen bei der Energiegewinnung diabetischer Herzen. So zeigten *db/db*-Mäuse unter Belastung durch eine operativ durchgeführte Aortenkonstriktion eine erhöhte Kapazität der Mitochondrien zur β -Oxidation freier Fettsäuren [161]. Zugleich war der Energiestatus der *db/db*-Herzen besser als in nicht-diabetischen Herzen, weil der

myokardiale Quotient aus phospho-Kreatin und ATP höher war und die Herzen eine schnellere Kontraktion und Relaxation als *db/+*-Herzen hatten.

4.5 I/R in Kombination mit Diabetes mellitus Typ II

Aufgrund der in Kapitel 3.3 beschriebenen und in Kapitel 4.4 diskutierten Ergebnisse wurde die Ca^{2+} -Kinetik und die Sarkomerfunktion auch in *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage nach I/R untersucht, um mögliche additive Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase der Kardiomyozyten zu beurteilen.

4.5.1 Verlangsamte intrazelluläre Ca^{2+} -Ströme in *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage 24 Stunden nach I/R

Untersucht wurden *db/db*-Mäuse und deren *db/+*-Geschwistertiere, bei denen im Ischämiemodell bei geschlossenem Thorax eine einstündige Ischämie und 24-stündige Reperfusion induziert worden war. Die Ca^{2+} -Kinetik war in *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage aus *db/db*-Mäusen gegenüber den *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage aus *db/+*-Mäusen verlangsamt und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration war reduziert. Dass Diabetiker nach MI häufiger sterben als Patienten ohne Diabetes Vorerkrankung, könnte deshalb daran liegen, dass die bereits verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage nach MI noch stärker verringert wird [101].

Außerdem bleibt die Frage offen, was die Ursachen für die stärkere Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Homöostase von *db/db*-Herzen durch I/R sind. Ursache könnten, wie auch schon an den wt-Tieren 24 Stunden nach I/R beobachtet (3.1.4), eine verminderte PLN-Phosphorylierung an Ser16 sein, oder Expressionsunterschiede wichtiger Ca^{2+} -Regulatoren. Zudem könnten posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Carbonylierungen, S-Glutathionylierungen sowie Oxidationen und Sumoylierungen in *db/db*-Herzen nach I/R vorliegen, die diese Veränderungen herbeiführen [162, 163].

Nach β -adrenerger Stimulation war die Ca^{2+} -Kinetik in *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage im Vergleich zu solchen ohne diabetische Stoffwechsellage verlangsamt. Dies steht im Gegensatz zur frühen Phase 24 Stunden nach I/R (Kapitel 3.1), in der die verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik durch β -adrenerge Stimulation wieder normalisiert werden konnte. In den *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage müssen also andere Bedingungen vorliegen. Eine mögliche Ursache für das verminderte Ansprechen auf Isoproterenol könnte eine verminderte β -adrenerge Rezeptordichte sein. Bekannt ist, dass bei Diabetes-Patienten ein erhöhter Sympathikotonus vorliegt [164]. Publiziert wurde, dass Leptin den Sympathikotonus aktiviert und das kardiovaskuläre

System beeinflusst. Ein chronisch erhöhter Sympathikus könnte somit zu einer Desensitivierung der β -adrenergen Rezeptoren führen. Dies wäre ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

4.5.2 Beeinträchtigte Sarkomerfunktion in *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage 24 Stunden nach I/R

Im Gegensatz zur unveränderten Sarkomerfunktion in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage war die Sarkomerfunktion in *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage nach I/R verändert. Die kontraktile Amplitude war 24 Stunden nach I/R vermindert und die Relaxationsgeschwindigkeit war in *remote* Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage im Vergleich zu *remote* Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage verlangsamt. Diese Ergebnisse zeigen, dass in diabetischen *db/db*-Mäusen I/R die mechanischen Eigenschaften des *remote* Myokards stärker beeinträchtigt als in nicht-diabetischen *db/+*-Mäusen. Das *remote* Myokard muss nach I/R den Funktionsverlust des ischämischen Gebietes kompensieren. Liegt eine diabetische Stoffwechsellage vor wie in *db/db*-Mäusen kann dies eine kontraktile Dysfunktion zusätzlich verstärken. Die genauen Mechanismen, die diese additiven Effekte von Diabetes mellitus verursachen, sind noch unklar. Die Befunde in *db/db*-Tieren stimmen mit humanen Studien überein, denn Diabetes-Patienten haben nach MI eine schlechtere Herzfunktion und eine höhere Sterblichkeit als Nicht-Diabetiker [101]. Die Mortalität liegt bei Diabetes Patienten nach einem MI über 50 % [165]. Gemäß der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse könnten Veränderungen im nicht-ischämischen *remote* Myokard dabei eine wichtige Rolle spielen.

4.6 Ausblick

Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, dass 24 Stunden nach I/R die Ca^{2+} -Kinetik im *remote* Myokard verlangsamt war, PLN stärker dephosphoryliert vorlag und somit weniger Ca^{2+} mit jedem Herzschlag zwischen Zytosol und SR zirkulierte, kann darüber nachgedacht werden, wie therapeutische Eingriffe aussehen könnten und welche Möglichkeiten zur Therapie des *remote* Myokards im Hinblick auf die interzellulären Ca^{2+} -Ströme bestehen. Da in dieser Arbeit bereits nach 1 Stunde Ischämie und 24 Stunden Reperfusion im *remote* Myokard eine verminderte SERCA2a-Aktivität festgestellt wurde, die auch zu einer beeinträchtigten Sarkomerfunktion führte, zeigt dies die Notwendigkeit, möglichst frühzeitig die Einschränkung der SERCA2a-Aktivität zu verhindern.

In der Literatur findet sich mit der Gabe von Neuregulin (NRG-1) ein attraktiver Wirkstoff, der vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf die beschriebene Veränderung 24 Stunden nach I/R bietet [166]. NRG-1 ist ein Wachstumsfaktor des Herzens, der die postnatale und adulte Entwicklung des Herzens beeinflusst [167-170]. In einer klinischen

Studie Phase 2 wurde gezeigt, dass die Gabe von humanem rekombinantem NRG-1 (rhNRG-1) nach MI die Herzfunktion verbesserte [171]. Nachdem rhNRG-1 10 Tage lang täglich intravenös verabreicht wurde, sah man nach drei Monaten eine Verbesserung der Herzfunktion bei herzinsuffizienten Patienten, die eine *New York Heart Association Classification* (NYHA) II-III aufwiesen. Der genaue Mechanismus, wie NRG-1 die Funktion im Herzen verbessert, muss jedoch noch detaillierter untersucht werden.

NRG-1 beeinflusst auch den Ca^{2+} -Kreislauf. Brero *et al.* konnten an isolierten Kardiomyozyten zeigen, dass nach Behandlung mit NRG-1 die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten ansteigt [172]. Außerdem wurde nach Stimulation mit NRG-1 eine erhöhte PLN-Phosphorylierung beobachtet. Der von ihnen vorgeschlagene Wirkmechanismus beinhaltet eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs durch NRG-1, wodurch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) phosphoryliert und deshalb vermehrt Stickstoffmonoxid (NO) gebildet wird. Der Anstieg von NO wiederum stimuliert die Proteinkinase G (PKG), die schließlich PLN phosphoryliert. Es bestehen jedoch Zweifel an diesem vorgeschlagenen Mechanismus, da PLN kein typisches Phosphorylierungsziel der PKG im ventrikulären Myokard ist. Es konnte gezeigt werden, dass die PKG wie auch die PKA PLN an seiner Phosphorylierungsstelle Ser16 *ex vivo* phosphoryliert [173]. Ob dies jedoch auch *in vivo* in ventrikulären Kardiomyozyten stattfindet, ist unklar.

Auch wenn die Mechanismen der NRG-1 Wirkung noch nicht vollständig verstanden sind, so sind die Effekte doch eindeutig. So berichteten Xu *et al.* ebenfalls über eine *in vivo* nach MI verbesserte Ca^{2+} -Kinetik durch vermehrte Phosphorylierung von PLN [166]. Vier Wochen nach LAD Ligatur wurden Ratten eine Woche lang täglich mit rhNRG-1 behandelt. Danach wurden die ventrikulären Kardiomyozyten isoliert. Nach der NRG-1 Behandlung waren SERCA2a- und PLN-Expression signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu war die PP1 signifikant geringer exprimiert. Außerdem wurde eine erhöhte SERCA2a-Aktivität und eine erhöhte kardiale Kontraktilität festgestellt. Die Autoren vermuten, dass NRG-1 die PP1-Expression mit der Konsequenz verringerte, dass PLN weniger dephosphoryliert, die SERCA2a-Aktivität dadurch erhöht, die Ca^{2+} -Kinetik beschleunigt und die Kontraktilität verbessert wurden [166]. Auf welche Weise NRG-1 die PP1 beeinflusst, konnte bisher noch nicht geklärt werden, insbesondere nicht, über welche Zwischenschritte die Reaktion abläuft.

NRG-1 könnte gerade bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II einen interessanten Therapieansatz darstellen, denn *in-vitro*-Versuche zeigten, dass NRG-1 den Glukose-Metabolismus des Herzens beeinflusst. In Kardiomyozyten stimuliert NRG-1 die Aufnahme von Glukose sowie die Expression und die Translokation des Glukosetransporters (Glut-4 Transporter) [174, 175]. Die Glukoseaufnahme wird über den Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg eingeleitet.

Ein weiterer Ansatz zur Weiterführung dieses Projektes könnte darin bestehen, einen PKC-Inhibitor wie beispielsweise Ruboxistaurin 24 Stunden nach I/R zu testen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass 24 Stunden nach I/R eine verlangsamte Ca^{2+} -Kinetik vorlag, die vermutlich durch eine verminderte PLN-Phosphorylierung an Ser16 zustande kam. Da kürzlich gezeigt wurde, dass im *remote* Myokard die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) erhöht ist, wäre es denkbar, dass die PKC über eine Phosphorylierung des Inhibitor 1 für die erhöhte Phosphatase-Aktivität und die reduzierte PLN-Phosphorylierung verantwortlich ist [25]. Klinisch ist ferner bekannt, dass eine erhöhte PKC-Aktivität eine Hypertrophie und dilatative Kardiomyopathie begünstigt [176]. Daher hatte man hier versucht, zu intervenieren und hatte Ruboxistaurin als PKC-Inhibitor getestet [135]. Die Hemmung der PKC-Aktivität durch die Behandlung mit Ruboxistaurin nach I/R zeigte im Schwein eine verbesserte Kontraktilität des Herzens und eine reduzierte Infarktgröße [177]. Interessant wäre, um an die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit anzuknüpfen, zu schauen, ob die *remote* Kardiomyozyten 24 Stunden nach I/R durch Behandlung mit Ruboxistaurin eine verbesserte Ca^{2+} -Kinetik aufweisen und ob eventuell die verminderte PLN-Phosphorylierung dadurch behoben werden könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten eine gute Grundlage, auf der sich weitergehende Untersuchungen aufbauen lassen zum besseren Verständnis der molekularen Ursachen (mal)adaptiver Pathomechanismen in den Herzmuskelzellen nach I/R, die für das schlechte *outcome*, vor allem von Patienten mit Diabetes mellitus, bedeutsam sein können. Insbesondere der Nachweis, dass im *remote* Myokard 24 Stunden nach I/R der Ca^{2+} -Kreislauf verlangsamt ist und PLN an Ser16 verstärkt dephosphoryliert vorliegt, bietet einen Ansatzpunkt für neuartige klinische Interventionen nach MI.

5 Zusammenfassung

Nach Ischämie und Reperfusion (I/R) ist die Herzfunktion nicht nur im ischämischen Gewebe, sondern auch im nicht-ischämischen *remote* Myokard eingeschränkt. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob dabei Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase auftreten, ob diese eine kausale Rolle für die kontraktile Dysfunktion der Herzmuskelzellen spielen, ob sich der myozytäre Ca^{2+} -Haushalt in verschiedenen Phasen des Heilungsprozesses nach I/R unterscheidet und ob er durch Diabetes mellitus Typ II zusätzlich beeinflusst wird.

Messungen der Ca^{2+} -Kinetik und der Sarkomerfunktion im *remote* Myokard von Mäuseherzen ergaben, dass 24 Stunden nach einer einstündigen Koronarligatur die myozytären Ca^{2+} -Transienten kleiner, die Ca^{2+} -Kinetik verlangsamt und die Sarkomerfunktion beeinträchtigt ist. Als Ursache dafür konnte mittels funktioneller und biochemischer Untersuchungen an isolierten Primärzellen und an Herzgewebe eine verringerte PKA-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban (PLN) identifiziert werden. Diese war am ehesten auf eine erhöhte Phosphatase-Aktivität im *remote* Myokard zurückzuführen. Stimulation mit dem β -adrenergen Agonisten Isoproterenol führte zu einer vollständigen Normalisierung der Ca^{2+} -Homöostase der Herzmuskelzellen des *remote* Myokards und zu einer deutlich verbesserten Kontraktion und Relaxation ihrer Sarkomere.

10 Tage nach I/R war die Ca^{2+} -Kinetik des *remote* Myokards ebenfalls verlangsamt und die kontraktile Amplitude der Sarkomere reduziert. Diesen Störungen lagen nun aber andere Pathomechanismen als in der Akutphase 24 Stunden nach I/R zugrunde, denn nun waren der Phosphorylierungszustand und auch die Expression aller wichtigen Ca^{2+} -regulatorischen Proteine normal.

Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage wurden aus Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen isoliert und zeigten eine normale Sarkomerfunktion trotz verlangsamerter Ca^{2+} -Kinetik. I/R induzierte hier jedoch einen stärkeren Einbruch der Sarkomerfunktion als in nicht-diabetischen Zellen und auch die myozytäre Ca^{2+} -Homöostase war deutlicher beeinträchtigt.

Die erhobenen Daten zeigen erstmals, dass der Ca^{2+} -Haushalt in Herzmuskelzellen des nicht-ischämischen Myokards nach I/R gestört ist und dass dies zur Dysfunktion der Sarkomere beiträgt. Während in der Frühphase nach I/R ein regulatorischer Defekt des PLN vorliegt, scheinen sich im weiteren Verlauf konstitutive Schäden an den Ca^{2+} -regulierenden Proteinen zu entwickeln. Die additiven Effekte von I/R und Diabetes mellitus Typ II auf die myozytäre Ca^{2+} -Homöostase könnten für das schlechte *outcome* von Patienten mit Diabetes mellitus nach Myokardinfarkt bedeutsam sein.

6 Summary

Following ischemia and reperfusion (I/R), heart function is impaired not only in the ischemic regions but also in the non-ischemic remote myocardium. The present work sought to clarify if (i) changes in myocyte Ca^{2+} cycling occur in the remote myocardium, (ii) if they play a causal role for contractile dysfunction, (iii) if Ca^{2+} homeostasis of remote cardiomyocytes undergoes specific changes during the different healing phases after I/R, and (iv) if type 2 diabetes mellitus causes additional damage to myocyte Ca^{2+} handling.

Measurements of Ca^{2+} kinetics and sarcomere function in the remote myocardium of mouse hearts demonstrated a reduced peak height of Ca^{2+} transients, slower Ca^{2+} kinetics and impaired sarcomere function after one hour of ischemia and 24 hours of reperfusion. The underlying causes involved a reduced phosphorylation state of the Ca^{2+} regulator phospholamban (PLN) at its PKA-dependent phosphorylation site, as identified by functional and biochemical analyses using isolated primary cells and heart tissue. Reduced PLN phosphorylation was best explained by the observed increase of phosphatase activity in the remote myocardium. Stimulation with the β -adrenergic agonist isoproterenol normalized myocyte Ca^{2+} cycling in the remote myocardium and clearly enhanced sarcomere contraction and relaxation.

10 days after I/R, Ca^{2+} kinetics within the remote myocardium as well as the contractile amplitude of sarcomeres were also reduced. However, these defects were due to different pathomechanisms compared to the acute phase 24 hours after I/R, because they were not normalized by isoproterenol and the phosphorylation state of PLN. Expression levels of all important Ca^{2+} regulatory proteins were also normal.

Cardiomyocytes with a diabetic metabolic state were isolated from leptin-deficient mice and showed normal sarcomere function despite of reduced Ca^{2+} kinetics. However, I/R impaired sarcomere function far more than in non-diabetic cells and also myocyte Ca^{2+} cycling was more depressed.

These data show for the first time that Ca^{2+} cycling of cardiomyocytes from the non-ischemic myocardium is disturbed after I/R and contributes to sarcomere dysfunction. While these changes are caused by a regulatory defect of PLN early after I/R, constitutive alterations of Ca^{2+} regulation seem to develop during later phases of post-I/R remodeling. The additive effects of I/R and type 2 diabetes mellitus on myocyte Ca^{2+} homeostasis provide a possible explanation for the worse clinical outcome of patients with diabetes mellitus that suffer a myocardial infarction.

Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Puffer in der Histologie (WGA Färbung)

Puffer	Zusammensetzung
Zitratpuffer	100 mM Natriumcitrat ($C_6H_5O_7^{3-}$) 100 mM Zitronensäure ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) ad 500 ml dH ₂ O pH 6

Tabelle 2: Puffer und Lösungen, die bei der Messung an isolierten Kardiomyozyten (Isolation von Kardiomyozyten) verwendet wurden

Puffer	Zusammensetzung
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM Natriumchlorid (NaCl) 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl) 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) 8,3 mM di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) pH 7,4
Puffer I	126 mM Natriumchlorid (NaCl) 4,4 mM Kaliumchlorid (KCl) 1,0 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) ad 500 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser) pH 7,3-7,35, sterile Filtration, Filter mit 0,22 µm Porengröße (Filtropur S 0.2, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland)
Puffer II	4 mM Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) 10 mM (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N''-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 30 mM 2,3 Butanedione monoxime (BDM) 11 mM Glucose 50 ml Puffer I 1000 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser) pH 7,3-7,35, sterile Filtration, Filter mit 0,22 µm Porengröße (Filtropur S 0.2, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland)
Puffer III	4 mM Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) 10 mM (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N''-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 11 mM Glucose 50 ml Puffer I ad 1000 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser)
Ladepuffer	137 mM Natriumchlorid (NaCl) 5,4 mM Kaliumchlorid (KCl) 0,5 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) 10 mM (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N''-

Puffer	Zusammensetzung
	<p>[2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 5,5 mM Glucose ad 1000ml DdH₂O (Millipore Wasser) pH 7,3-7,35, sterile Filtration, Filter mit 0,22 µm Porengröße (Filtropur S 0.2, Sarsted Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland) 1 M Kalziumchlorid (CaCl₂) Lösung (frisch dazugegeben 5,0 µl auf 10 ml)</p>
Perfusions- puffer	<p>137 mM Natriumchlorid (NaCl) 5,4 mM Kaliumchlorid (KCl) 1,2 mM Kalziumchlorid (CaCl₂) 0,5 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) 10 mM (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N''- [2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 5,5 mM Glucose 500 µM Probenecid ad 1000ml DdH₂O (Millipore Wasser) pH 7,3-7,4, sterile Filtration, Filter mit 0,22 µm Porengröße (Filtropur S 0.2, Sarsted Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland)</p>
Kollagenase- lösung	<p>0,4 mg/ml Collagenase Typ I (300 U/mg) 20 ml Puffer II 0,1 M Kalziumchlorid (CaCl₂) Lösung (frisch dazu gegeben 5,0 µl auf 20 ml). Die Kollagenaselösung wurde immer frisch angesetzt.</p>
Waschpuffer I	<p>0,4 g (20 mg/ml) Albumin Bovine Serum Fraction V 20 ml Puffer II 1 M Kalziumchlorid (CaCl₂) Lösung (frisch dazugegeben 2,0 µl)</p>
Waschpuffer II	<p>0,2 g (20 mg/ml) Albumin Bovine Serum Fraction V 10 ml Puffer II 1 M Kalziumchlorid (CaCl₂) (frisch dazugegeben 2,0 µl)</p>
Waschpuffer III	<p>0,2 g (20 mg/ml) Albumin Bovine Serum Fraction V 5 ml Puffer II 5 ml Puffer III 1 M Kalziumchlorid (CaCl₂) (frisch dazugegeben 2,0 µl)</p>

Tabelle 3: Verwendete Puffer bei der Messung des Ca²⁺ leaks

Puffer	Zusammensetzung
Perfusionspuffer I	140 mM Natriumchlorid (NaCl) 4 mM Kaliumchlorid (KCl) 2 mM Kalziumchlorid (CaCl ₂) 1 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 5 mM (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N''-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 10 mM Glucose ad 1000ml DdH ₂ O (Millipore Wasser) pH 7,4, sterile Filtration, Filter mit 0,22 µm Porengröße (Filtropur S 0.2, Sarsted Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland)
Perfusionspuffer II (Kalzium und Natrium freier Puffer)	140 mM Lithiumchlorid (LiCl) 4 mM Kaliumchlorid (KCl) 1 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 5 mM (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N''-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 10 mM Glucose 10 mM Ethylene Glycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N'',N'-Tetra-Acetic Acid (EGTA) ad 1000ml DdH ₂ O (Millipore Wasser) pH 7,4, sterile Filtration, Filter mit 0,22 µm Porengröße (Filtropur S 0.2, Sarsted Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Deutschland)

Tabelle 4: Verwendete Puffer in der Proteinanalyse (Herstellung der Herzlysate)

Puffer	Zusammensetzung
Präparationspuffer	10 mM Trishydromethylaminomethan (Tris), pH 8,0 0,5 mM Ethylene Glycol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N'',N''-Tetra-Acetic Acid (EGTA) 0,5 % Triton X-100 0,1 % Desoxycholsäure 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) 140mM Natriumchlorid (NaCl)
Lämmli-puffer	1,5 mg Bromphenolblau 0,6 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 3 ml Glycerol 3,9 ml Trishydromethylaminomethan (Tris) (50 mM), pH 6,8 ad 10 ml dH ₂ O (Millipore Wasser)

Tabelle 5: Verwendete Puffer bei der Proteinanalyse (Herstellung von Membranpräparationen)

Puffer	Zusammensetzung
Präparationspuffer	300 mM Saccharose 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 20 mM Pipes 10 mM Etylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) 50 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) ad 200 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser) pH 7,4
Aufbewahrungspuffer	400 mM Saccharose 5 mM N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N''-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 5 mM Trishydromethylaminomethan (Tris) 10 mM Etylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) 50 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) ad 200 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser pH 7,2)

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Gele bei der Proteinanalyse (Gelelektrophorese)

Puffer bzw. Gel	Zusammensetzung
10 x Laufpuffer	250 mM Trishydromethylaminomethan (Tris) 1,9 mM Glycin 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
1 x Lysepuffer	1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 10 mM Trishydromethylaminomethan (Tris), pH 7,4
Trenngel (15 %)	2,13 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser) 1,97 ml Trenngel Puffer 3,79 ml Acrylamid / Bis-acrylamid (30 %) 3,9 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 51,1 µl Ammoniumpersulfat (APS) (100mg/ml)
Trenngel Puffer	1,5 M Trishydromethylaminomethan (Tris) 0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS) pH 8,8
Sammelgel	2,06 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser) 825 µl Sammelgel Puffer 412,5 µl Acrylamid / Bis-acrylamid 3,3 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 33 µl Ammoniumpersulfat (APS)
Sammelgel Puffer	0,5 M Trishydromethylaminomethan (Tris) 0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS) pH 6,8

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen bei der Proteinanalyse (Western blot)

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Blockmilch	Milchpulver in TBST Puffer (0,5 %; 5 %)
10 x TBS	100 mM Trishydromethylaminomethan Hydrochlorid (Tris / HCl) 1,5 mM Natriumchlorid (NaCl), pH 7,4
1 x TBST	1 x TBS 0,1 % Tween [®] 20 ad 1000 ml dH ₂ O
Western blot Puffer 10x	15,15 g Trishydromethylaminomethan (Tris) 56,25 g Glycin 500 ml Methanol (10 %) ad 500 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser)

Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper bei der Proteinanalyse

Primärantikörper	Hersteller / (Produktnummer)	Konzentration
GAPDH	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, (3134)	1:5000
RyR2 (pSer2808)	Badrilla, Leeds, UK, (A01030)	1:5000
SERCA2a	Badrilla, Leeds, UK, clone Y/1F4	1:5000
RyR2	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, clone 34c	1:5000
HAX-1	BD Transduction Laboratories™, USA, clone 52/HAX-1	1:5000
S100A1	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland, SP5355P	1:5000
PLN	Badrilla, Leeds, UK, clone A1	1:5000
phospho-PLN (S16) AP	Badrilla, Leeds, UK, S16	1:5000
phospho PLN (T17)	Badrilla, Leeds, UK, T17	1:5000
RyR2 (pSer2814)	Badrilla, Leeds, UK, A010-31	1:5000
cardiac Tnl	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, (4002)	1:2000
pTnl (S23/24)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, (4782)	1:2000
PKA cat.	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA, (4782)	1:1000

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper in der Proteinanalyse

Sekundärantikörper	Hersteller
anti-Maus IgG (Ziege)	Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA, USA (610-1302)
anti-Kaninchen IgG (Ziege)	Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA, USA (611-1302)

Tabelle 10: Verwendeter Puffer bei Proteinanalysen (PKA Aktivitätsbestimmung ELISA)

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	20 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)
	50 mM β -Glycerolphosphat
	50 mM Natriumfluorid (NaF)
	1 mM Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)
	5 mM Ethylene Glycol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetra-Acetic Acid (EGTA)
	2 mM Etylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)
	1 % 4-Nonylphenyl-polyethylene glycol (NP-40)
	1 mM Dithiothreitol (DTT)
	1 mM Benzamidin
	1 mM Phenylmethansulphonylfluorid (PMSF)
	10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin
	10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin

Literaturverzeichnis

1. Kumar, M., et al., *Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation*. Regul Toxicol Pharmacol, 2016. **76**: p. 221-30.
2. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
3. Statistisches Bundesamt (Destatis), Gesellschaft & Staat, Gesundheit, 2017. www.destatis.de
4. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST - segment elevation: The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). European Heart Journal, Volume 33, Issue 20, 1.October 2012. 2569-2619
5. Heusch et al., *Kardioprotektive Konditionierung. Schutz des Herzens vor Schaden durch Ischämie und Reperfusion*. Kardiologe 2010, 4: p. 157-162
6. Maroko, P.R., et al., *Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis*. J Clin Invest, 1972. **51**(10): p. 2710-6.
7. Frangogiannis, N.G., *The mechanistic basis of infarct healing*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(11-12): p. 1907-39.
8. Baines, C.P., *How and when do myocytes die during ischemia and reperfusion: the late phase*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(3-4): p. 239-43.
9. Cleutjens, J.P., et al., *Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(6): p. 1281-92.
10. Olivetti, G., et al., *Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats*. Circ Res, 1991. **68**(3): p. 856-69.
11. Kramer, C.M., et al., *Regional differences in function within noninfarcted myocardium during left ventricular remodeling*. Circulation, 1993. **88**(3): p. 1279-88.
12. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
13. Altamirano, F., Z.V. Wang, and J.A. Hill, *Cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation*. J Physiol, 2015. **593**(17): p. 3773-88.
14. Liu, P., et al., *Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats*. Am J Physiol, 1997. **272**(5 Pt 2): p. H2327-36.
15. Bolli, R., et al., *Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(12): p. 4695-9.
16. Piper, H.M. and D. Garcia-Dorado, *Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(5): p. 1913-9.
17. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
18. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1146-9.

19. Lee, J.A. and D.G. Allen, *Mechanisms of acute ischemic contractile failure of the heart. Role of intracellular calcium.* J Clin Invest, 1991. **88**(2): p. 361-7.
20. French, B.A. and C.M. Kramer, *Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling.* Drug Discov Today Dis Mech, 2007. **4**(3): p. 185-196.
21. Wyatt, H.L., et al., *Functional abnormalities in nonoccluded regions of myocardium after experimental coronary occlusion.* Am J Cardiol, 1976. **37**(3): p. 366-72.
22. Kalogeris, T., et al., *Ischemia/Reperfusion.* Compr Physiol, 2016. **7**(1): p. 113-170.
23. Heusch, G., *Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic.* Lancet, 2013. **381**(9861): p. 166-75.
24. Klocke, R., et al., *Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease.* Cardiovasc Res, 2007. **74**(1): p. 29-38.
25. Kotter, S., et al., *Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction.* Circ Res, 2016. **119**(9): p. 1017-1029.
26. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC).* Eur Heart J, 2017.
27. Muthuramu, I., et al., *Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure.* J Vis Exp, 2014(94).
28. Gorressen, S., et al., *Circulating NOS3 modulates left ventricular remodeling following reperfused myocardial infarction.* PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0120961.
29. Mitsos, S., et al., *A critical appraisal of open- and closed-chest models of experimental myocardial ischemia.* Lab Anim (NY), 2009. **38**(5): p. 167-77.
30. Karnabatidis, D., et al., *Transauricular arterial or venous access for cardiovascular experimental protocols in animals.* J Vasc Interv Radiol, 2006. **17**(11 Pt 1): p. 1803-11.
31. Duncker, D.J., et al., *Effect of temperature on myocardial infarction in swine.* Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 2): p. H1189-99.
32. Grund, F., et al., *A new approach to normalize myocardial temperature in the open-chest pig model.* J Appl Physiol (1985), 1998. **84**(6): p. 2190-7.
33. Schwartz, L.M., et al., *Epicardial temperature is a major predictor of myocardial infarct size in dogs.* J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(6): p. 1577-83.
34. Nossuli, T.O., et al., *A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(4): p. H1049-55.
35. Michael, L.H., et al., *Creatine kinase and phosphorylase in cardiac lymph: coronary occlusion and reperfusion.* Am J Physiol, 1985. **248**(3 Pt 2): p. H350-9.
36. Bers, D.M., *Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes.* Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 23-49.
37. Fearnley, C.J., H.L. Roderick, and M.D. Bootman, *Calcium signaling in cardiac myocytes.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(11): p. a004242.
38. Sham, J.S., L. Cleemann, and M. Morad, *Functional coupling of Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(1): p. 121-5.

39. Giannini, G. and V. Sorrentino, *Molecular structure and tissue distribution of ryanodine receptors calcium channels*. Med Res Rev, 1995. **15**(4): p. 313-23.
40. Cannell, M.B. and C. Soeller, *Numerical analysis of ryanodine receptor activation by L-type channel activity in the cardiac muscle diad*. Biophys J, 1997. **73**(1): p. 112-22.
41. Bers, D.M., *Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction*. Circ Res, 2000. **87**(4): p. 275-81.
42. Bassani, J.W., R.A. Bassani, and D.M. Bers, *Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms*. J Physiol, 1994. **476**(2): p. 279-93.
43. Shannon, T.R. and D.M. Bers, *Integrated Ca²⁺ management in cardiac myocytes*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1015**: p. 28-38.
44. Park, C.O., X.H. Xiao, and D.G. Allen, *Changes in intracellular Na⁺ and pH in rat heart during ischemia: role of Na⁺/H⁺ exchanger*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1581-90.
45. Krause, S.M. and D. Rozanski, *Effects of an increase in intracellular free [Mg²⁺] after myocardial stunning on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport*. Circulation, 1991. **84**(3): p. 1378-83.
46. Krause, S. and M.L. Hess, *Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia*. Circ Res, 1984. **55**(2): p. 176-84.
47. Zucchi, R., et al., *Sarcoplasmic reticulum calcium uptake in human myocardium subjected to ischemia and reperfusion during cardiac surgery*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(8): p. 1693-701.
48. Zucchi, R., et al., *Postischemic changes in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channels. A possible mechanism of ischemic preconditioning*. Circ Res, 1995. **76**(6): p. 1049-56.
49. Luciani, G.B., et al., *Effects of ischemia on sarcoplasmic reticulum and contractile myofilament activity in human myocardium*. Am J Physiol, 1993. **265**(4 Pt 2): p. H1334-41.
50. Zucchi, R., et al., *Effect of ischemia and reperfusion on cardiac ryanodine receptors--sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channels*. Circ Res, 1994. **74**(2): p. 271-80.
51. Chen, S. and S. Li, *The Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury*. Med Sci Monit, 2012. **18**(11): p. RA161-5.
52. Van Petegem, F., *Ryanodine receptors: structure and function*. J Biol Chem, 2012. **287**(38): p. 31624-32.
53. Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram, *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease*. Muscle Nerve, 2007. **35**(4): p. 430-42.
54. Kranias, E.G. and R.J. Hajjar, *Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome*. Circ Res, 2012. **110**(12): p. 1646-60.
55. Kimura, Y., et al., *Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization*. J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15061-4.
56. Wegener, A.D. and L.R. Jones, *Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Evidence for a protein structure consisting of multiple identical phosphorylatable subunits*. J Biol Chem, 1984. **259**(3): p. 1834-41.

57. Toyoshima, C., et al., *Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca²⁺ ATPase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(2): p. 467-72.
58. Tada, M., M.A. Kirchberger, and A.M. Katz, *Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1975. **250**(7): p. 2640-7.
59. Wegener, A.D., et al., *Proteolytic cleavage of phospholamban purified from canine cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. Generation of a low resolution model of phospholamban structure*. J Biol Chem, 1986. **261**(11): p. 5154-9.
60. Kimura, Y., et al., *Phospholamban regulates the Ca²⁺-ATPase through intramembrane interactions*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21726-31.
61. Bilezikjian, L.M., et al., *Studies on phosphorylation of canine cardiac sarcoplasmic reticulum by calmodulin-dependent protein kinase*. Circ Res, 1981. **49**(6): p. 1356-62.
62. Tada, M., M.A. Kirchberger, and H.C. Li, *Phosphoprotein phosphatase-catalyzed dephosphorylation of the 22,000 dalton phosphoprotein of cardiac sarcoplasmic reticulum*. J Cyclic Nucleotide Res, 1975. **1**(5): p. 329-38.
63. Kranias, E.G., *Regulation of calcium transport by protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1985. **260**(20): p. 11006-10.
64. MacDougall, L.K., L.R. Jones, and P. Cohen, *Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban*. Eur J Biochem, 1991. **196**(3): p. 725-34.
65. Heijman, J., et al., *Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **64**: p. 90-8.
66. Kato, K. and S. Kimura, *S100ao (alpha alpha) protein is mainly located in the heart and striated muscles*. Biochim Biophys Acta, 1985. **842**(2-3): p. 146-50.
67. Kiewitz, R., et al., *Ca²⁺ -dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase2a and phospholamban in the human heart*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(2): p. 550-7.
68. Most, P., et al., *S100A1: a regulator of myocardial contractility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13889-94.
69. Suzuki, Y., et al., *HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2736-44.
70. Vafiadaki, E., et al., *Phospholamban interacts with HAX-1, a mitochondrial protein with anti-apoptotic function*. J Mol Biol, 2007. **367**(1): p. 65-79.
71. Vafiadaki, E., et al., *The anti-apoptotic protein HAX-1 interacts with SERCA2 and regulates its protein levels to promote cell survival*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): p. 306-18.
72. Aktories, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier Urban & Fischer, 11.Auflage. p. 413-416.
73. Ventura-Clapier, R. and V. Veksler, *Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness*. Circ Res, 1994. **74**(5): p. 920-9.
74. Nichols, C.G. and W.J. Lederer, *The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes*. Can J Physiol Pharmacol, 1990. **68**(2): p. 183-94.

75. Ladilov, Y.V., B. Siegmund, and H.M. Piper, *Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 2): p. H1531-9.
76. Piper, H.M., S. Kasseckert, and Y. Abdallah, *The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 170-3.
77. Siegmund, B., R. Zude, and H.M. Piper, *Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload*. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 2): p. H1262-9.
78. Siegmund, B., et al., *Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes*. Am J Physiol, 1991. **260**(2 Pt 2): p. H426-35.
79. Ganote, C.E., *Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury*. J Mol Cell Cardiol, 1983. **15**(2): p. 67-73.
80. Garcia-Dorado, D., et al., *Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion*. Circulation, 1997. **96**(10): p. 3579-86.
81. Zhang, Z., B.J. Biesiadecki, and J.P. Jin, *Selective deletion of the NH₂-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibril-associated mu-calpain cleavage*. Biochemistry, 2006. **45**(38): p. 11681-94.
82. Martin, G.V., et al., *Intravenous streptokinase for acute myocardial infarction. Effects on global and regional systolic function*. Circulation, 1988. **78**(2): p. 258-66.
83. Jaarsma, W., et al., *Prognostic implications of regional hyperkinesia and remote asynergy of noninfarcted myocardium*. Am J Cardiol, 1986. **58**(6): p. 394-8.
84. Kramer, C.M., et al., *Remote noninfarcted region dysfunction soon after first anterior myocardial infarction. A magnetic resonance tagging study*. Circulation, 1996. **94**(4): p. 660-6.
85. Stamm, R.B., et al., *Echocardiographic detection of infarct-localized asynergy and remote asynergy during acute myocardial infarction: correlation with the extent of angiographic coronary disease*. Circulation, 1983. **67**(1): p. 233-44.
86. Tyberg, J.V., W.W. Parmley, and E.H. Sonnenblick, *In-vitro studies of myocardial asynchrony and regional hypoxia*. Circ Res, 1969. **25**(5): p. 569-79.
87. Streeter, D.D., Jr. and W.T. Hanna, *Engineering mechanics for successive states in canine left ventricular myocardium. II. Fiber angle and sarcomere length*. Circ Res, 1973. **33**(6): p. 656-64.
88. Cefalu, W.T., *Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition*. ILAR J, 2006. **47**(3): p. 186-98.
89. Mylona-Karayanni, C., et al., *Oxidative stress and adhesion molecules in children with type 1 diabetes mellitus: a possible link*. Pediatr Diabetes, 2006. **7**(1): p. 51-9.
90. Jackerott, M., et al., *STAT5 activity in pancreatic beta-cells influences the severity of diabetes in animal models of type 1 and 2 diabetes*. Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2705-12.
91. Leiter, E.H. and P.C. Reifsnyder, *Differential levels of diabetogenic stress in two new mouse models of obesity and type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53** Suppl 1: p. S4-11.
92. Chatzigeorgiou, A., et al., *The use of animal models in the study of diabetes mellitus*. In Vivo, 2009. **23**(2): p. 245-58.

93. Goffrier, B., et al., Administrative Prävalenzen und Inzidenzen des Diabetes mellitus von 2009 bis 2015. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi). Versorgungsatlas-Bericht Nr.17/03. Berlin 2017
94. Screening for Type 2 Diabetes: report of a World Health Organization and International Diabetes Federation Meeting, 2003. www.who.int/diabetes/publications/en/screening_mnc03.pdf
95. Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE-Deutsche Diabetes-Hilfe, Diabetes mellitus und Herzerkrankungen; Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2017, www.diabetesde.org/system/files/documents/gesundheitsbericht_2017.pdf
96. Du, Y., et al., *Prevalence and comorbidity of diabetes mellitus among non-institutionalized older adults in Germany - results of the national telephone health interview survey 'German Health Update (GEDA)' 2009*. BMC Public Health, 2013. **13**: p. 166.
97. Aguilar, D., et al., *Newly diagnosed and previously known diabetes mellitus and 1-year outcomes of acute myocardial infarction: the VALsartan In Acute myocardial iNfarcTion (VALIANT) trial*. Circulation, 2004. **110**(12): p. 1572-8.
98. Stevens, R.J., et al., *Risk factors for myocardial infarction case fatality and stroke case fatality in type 2 diabetes: UKPDS 66*. Diabetes Care, 2004. **27**(1): p. 201-7.
99. Zairis, M.N., et al., *Type 2 diabetes and intravenous thrombolysis outcome in the setting of ST elevation myocardial infarction*. Diabetes Care, 2004. **27**(4): p. 967-71.
100. Ramani, K., et al., *ATP catabolism and adenosine generation during ischemia in the aging heart*. Mech Ageing Dev, 1996. **89**(2): p. 113-24.
101. Kannel, W.B. and D.L. McGee, *Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study*. Diabetes Care, 1979. **2**(2): p. 120-6.
102. Abbott, R.D., et al., *The impact of diabetes on survival following myocardial infarction in men vs women. The Framingham Study*. JAMA, 1988. **260**(23): p. 3456-60.
103. Lacombe, V.A., et al., *Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(5): p. R1787-97.
104. Belke, D.D., E.A. Swanson, and W.H. Dillmann, *Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart*. Diabetes, 2004. **53**(12): p. 3201-8.
105. Coleman, D.L., *A historical perspective on leptin*. Nat Med, 2010. **16**(10): p. 1097-9.
106. Wyse, B.M. and W.E. Dulin, *The influence of age and dietary conditions on diabetes in the db mouse*. Diabetologia, 1970. **6**(3): p. 268-73.
107. Kobayashi, K., et al., *The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding*. Metabolism, 2000. **49**(1): p. 22-31.
108. Chitnis, N., S. Vooturi, and B. Hygriv Rao, *Sudden cardiac death early after ST elevation myocardial infarction with and without severe left ventricular dysfunction*. Indian Heart J, 2014. **66**(6): p. 569-73.
109. Halestrap, A.P., *A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(4): p. 841-60.
110. Murphy, E., H. Cross, and C. Steenbergen, *Sodium regulation during ischemia versus reperfusion and its role in injury*. Circ Res, 1999. **84**(12): p. 1469-70.

111. Haffner, S.M., et al., *Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction*. N Engl J Med, 1998. **339**(4): p. 229-34.
112. Tsien, R.Y., *Fluorescence ratio imaging of dynamic intracellular signals*. Acta Physiol Scand Suppl, 1989. **582**: p. 6.
113. Tsien, R.Y., T.J. Rink, and M. Poenie, *Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths*. Cell Calcium, 1985. **6**(1-2): p. 145-57.
114. Tsien, R.Y., *A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells*. Nature, 1981. **290**(5806): p. 527-8.
115. Bassani, R.A. and D.M. Bers, *Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes*. Biophys J, 1995. **68**(5): p. 2015-22.
116. Myocyte Calcium & Contractility Recording System, IonOptix, Milton, MA, USA, www.ionoptix.com
117. www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ADI-EKS-390A_insert.pdf
118. Bers, D.M., *Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction*. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 107-27.
119. Zakhary, D.R., et al., *Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1999. **99**(4): p. 505-10.
120. Greer, J.J., D.P. Ware, and D.J. Lefer, *Myocardial infarction and heart failure in the db/db diabetic mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H146-53.
121. Zeymer, Krankheitsbild und Epidemiologie des akuten Koronarsyndroms. Institut für Herzinfarktforschung Ludwigshafen, 2015
122. del Monte, F., et al., *Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5622-7.
123. Talukder, M.A., et al., *Expression of SERCA isoform with faster Ca²⁺ transport properties improves postischemic cardiac function and Ca²⁺ handling and decreases myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(4): p. H2418-28.
124. Shen, A.C. and R.B. Jennings, *Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury*. Am J Pathol, 1972. **67**(3): p. 441-52.
125. Theroux, P., et al., *Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators*. Circulation, 2000. **102**(25): p. 3032-8.
126. Ching, L.L., A.J. Williams, and R. Sitsapesan, *Evidence for Ca(2+) activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex*. Circ Res, 2000. **87**(3): p. 201-6.
127. Shannon, T.R., K.S. Ginsburg, and D.M. Bers, *Quantitative assessment of the SR Ca²⁺ leak-load relationship*. Circ Res, 2002. **91**(7): p. 594-600.
128. Wegener, A.D., et al., *Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation*. J Biol Chem, 1989. **264**(19): p. 11468-74.

129. Vittone, L., et al., *Mechanisms involved in the acidosis enhancement of the isoproterenol-induced phosphorylation of phospholamban in the intact heart*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9804-11.
130. Kusuoka, H., et al., *Excitation-contraction coupling in postischemic myocardium. Does failure of activator Ca²⁺ transients underlie stunning?* Circ Res, 1990. **66**(5): p. 1268-76.
131. Hasenfuss, G. and B. Pieske, *Calcium cycling in congestive heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(8): p. 951-69.
132. Canton, M., et al., *Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(3): p. H870-7.
133. Avner, B.S., et al., *Myocardial infarction in mice alters sarcomeric function via post-translational protein modification*. Mol Cell Biochem, 2012. **363**(1-2): p. 203-15.
134. Layland, J., R.J. Solaro, and A.M. Shah, *Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(1): p. 12-21.
135. Liu, Q., et al., *Protein kinase C{alpha}, but not PKC{beta} or PKC{gamma}, regulates contractility and heart failure susceptibility: implications for ruboxistaurin as a novel therapeutic approach*. Circ Res, 2009. **105**(2): p. 194-200.
136. Cohen, P., *The structure and regulation of protein phosphatases*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 453-508.
137. Gergs, U., et al., *Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40827-34.
138. Hoehn, M., et al., *Overexpression of protein phosphatase 2A in a murine model of chronic myocardial infarction leads to increased adverse remodeling but restores the regulation of beta-catenin by glycogen synthase kinase 3beta*. Int J Cardiol, 2015. **183**: p. 39-46.
139. Pieske, B., et al., *Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1169-78.
140. Cross, H.R., et al., *Ablation of PLB exacerbates ischemic injury to a lesser extent in female than male mice: protective role of NO*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(2): p. H683-90.
141. Dieterle, T., et al., *Gene transfer of a phospholamban-targeted antibody improves calcium handling and cardiac function in heart failure*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(4): p. 678-88.
142. del Monte, F., et al., *Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a*. Circulation, 1999. **100**(23): p. 2308-11.
143. Lipskaia, L., et al., *Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure*. Expert Opin Biol Ther, 2010. **10**(1): p. 29-41.
144. Zhai, Y., et al., *New insights into SERCA2a gene therapy in heart failure: pay attention to the negative effects of B-type natriuretic peptides*. J Med Genet, 2018.
145. Chen, Y., et al., *Constitutive cardiac overexpression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase delays myocardial failure after myocardial infarction in rats at a cost of increased acute arrhythmias*. Circulation, 2004. **109**(15): p. 1898-903.
146. Kho, C., et al., *SUMO1-dependent modulation of SERCA2a in heart failure*. Nature, 2011. **477**(7366): p. 601-5.

147. Schwartz, R.J. and E.T. Yeh, *Weighing in on heart failure: the role of SERCA2a SUMOylation*. Circ Res, 2012. **110**(2): p. 198-9.
148. Waddingham, M.T., et al., *Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy*. World J Diabetes, 2015. **6**(7): p. 943-60.
149. Omura, T., et al., *Differences in time course of myocardial mRNA expression in non-infarcted myocardium after myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2000. **95**(4): p. 316-23.
150. Treves, S., et al., *Interaction of S100A1 with the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle*. Biochemistry, 1997. **36**(38): p. 11496-503.
151. Remppis, A., et al., *Altered expression of the Ca(2+)-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1313**(3): p. 253-7.
152. Pleger, S.T., et al., *Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model*. Sci Transl Med, 2011. **3**(92): p. 92ra64.
153. Bodor, G.S., et al., *Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1495-500.
154. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
155. Jaffe, J.R., et al., *Reassessment of cardiovascular risk in diabetes*. Curr Opin Lipidol, 2006. **17**(6): p. 644-52.
156. Clark, R.J., et al., *Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44230-7.
157. Dhalla, N.S., et al., *Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(2): p. 239-47.
158. Bai, S.Z., et al., *Decrease in calcium-sensing receptor in the progress of diabetic cardiomyopathy*. Diabetes Res Clin Pract, 2012. **95**(3): p. 378-85.
159. Aasum, E., et al., *Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 434-41.
160. Marsh, S.A., H.E. Collins, and J.C. Chatham, *Protein O-GlcNAcylation and cardiovascular (patho)physiology*. J Biol Chem, 2014. **289**(50): p. 34449-56.
161. Abdurrachim, D., et al., *Diabetic db/db mice do not develop heart failure upon pressure overload: a longitudinal in vivo PET, MRI, and MRS study on cardiac metabolic, structural, and functional adaptations*. Cardiovasc Res, 2017. **113**(10): p. 1148-1160.
162. Shao, C.H., et al., *Carbonylation induces heterogeneity in cardiac ryanodine receptor function in diabetes mellitus*. Mol Pharmacol, 2012. **82**(3): p. 383-99.
163. Pastore, A. and F. Piemonte, *Protein glutathionylation in cardiovascular diseases*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(10): p. 20845-76.
164. Haynes, W.G., et al., *Sympathetic and cardiorenal actions of leptin*. Hypertension, 1997. **30**(3 Pt 2): p. 619-23.
165. Alabas, O.A., et al., *Long-term excess mortality associated with diabetes following acute myocardial infarction: a population-based cohort study*. J Epidemiol Community Health, 2017. **71**(1): p. 25-32.

166. Xu, Y., et al., *Neuregulin-1/ErbB signaling and chronic heart failure*. Adv Pharmacol, 2010. **59**: p. 31-51.
167. Vasti, C. and C.M. Hertig, *Neuregulin-1/erbB activities with focus on the susceptibility of the heart to anthracyclines*. World J Cardiol, 2014. **6**(7): p. 653-62.
168. Falls, D.L., *Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 14-30.
169. Zhao, Y.Y., et al., *Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10261-9.
170. Odiete, O., M.F. Hill, and D.B. Sawyer, *Neuregulin in cardiovascular development and disease*. Circ Res, 2012. **111**(10): p. 1376-85.
171. Gao, R., et al., *A Phase II, randomized, double-blind, multicenter, based on standard therapy, placebo-controlled study of the efficacy and safety of recombinant human neuregulin-1 in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(18): p. 1907-14.
172. Brero, A., et al., *Neuregulin-1beta1 rapidly modulates nitric oxide synthesis and calcium handling in rat cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(3): p. 443-52.
173. Raeymaekers, L., F. Hofmann, and R. Casteels, *Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle*. Biochem J, 1988. **252**(1): p. 269-73.
174. Cote, G.M., et al., *Neuregulin-1alpha and beta isoform expression in cardiac microvascular endothelial cells and function in cardiac myocytes in vitro*. Exp Cell Res, 2005. **311**(1): p. 135-46.
175. Suarez, E., et al., *A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18257-64.
176. Palaniyandi, S.S., et al., *Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target?* Cardiovasc Res, 2009. **82**(2): p. 229-39.
177. Sharp, T.E. et al., *Protein Kinase C Inhibition With Ruboxistaurin Increases Contractility and Reduces Heart Size in a Swine Model of Heart Failure With Reduced Ejection Fraction*. J AM Coll Cardiol Basic Trans Scienece. 2017;**2**(6):669-83

Originalarbeiten

Kronenbitter A., Funk F., Hackert K., Gorressen S., Glaser D., Boknik P., Poschmann G., Stühler K., Isic M., Krüger M., Schmitt JP. *Impaired Ca^{2+} cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction.* J Mol Cell Cardiol, 2018. **119**: p. 28-39 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.04.004>

Kongressbeiträge

Funk F., **Kronenbitter A.**, Schmitt JP. Oligomerisation enhances basal PLN activity *in vivo* by attenuating PKA-dependent phosphorylation. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. 2016; 389:37

Kronenbitter A., Funk F., Schmitt JP. PLN pentamers improve the regulation of myocyte Ca^{2+} cycling and cardiac relaxation Clin Res Cardiol 2016; 105: P1343

Kronenbitter A., Hackert K., Funk F., Krüger M., Schmitt JP. Molecular and systemic determinants of impaired sarcomere function after acute myocardial infarction. *1st International Symposium „Master switches after myocardial infarction,,; 2nd of July 2016, Düsseldorf*

Kronenbitter A., Funk F., Hackert K., Schmitt JP. PKA- dependent activation of Ca^{2+} cycling proteins is impaired in the remote myocardium early after myocardial infarction. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. 2017; 390:36

Kronenbitter A., Funk F., Hackert K., Krüger M., Schmitt JP. Myocyte Ca^{2+} cycling is impaired in the nonischemic remote parts of the heart early after myocardial infarction. 46th EMC 2017

Funk F., **Kronenbitter A.**, Glaser D. Boknik P., Schmitt JP. Enhanced phospholamban activity suppresses cardiomyocyte calcium cycling in the remote myocardium early after myocardial infarction. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. 2018; 391:64

Kronenbitter A., Funk F., Hackert K., Krüger M., Schmitt JP. Myocardial infarction impairs myocyte calcium transport and sarcomere function in the ischemic and in the non-ischemic myocardium. 1st PhD Student Symposium of the IRTG 1902 & SFB 1116 “Cardiovascular Disease Symposium 2018”

Isic M., **Kronenbitter A.**, Kötter S., Semmler D., Schmitt JP., Krüger M. Diabetes affects adaptive titin modification in response to acute myocardial ischemia/reperfusion. 1st PhD Student Symposium of the IRTG 1902 & SFB 1116 “Cardiovascular Disease Symposium 2018”

Lebenslauf

Person

Name	Annette Kronenbitter
Geburtsdatum	18. August 1987
Geburtsort	Heidelberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

11/2013 – 2018	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf Doktorvater: Prof. Dr. Joachim P. Schmitt
Thema	Veränderungen im myozytären Kalziumkreislauf und in der Sarkomerfunktion im nicht-ischämischen Gewebe nach Myokardinfarkt.

Studium

11/2013	Beginn der Promotion am Institut der Pharmakologie und klinischen Pharmakologie Düsseldorf
09/2013	3. Staatsexamen Pharmazie, Approbation als Apothekerin
05/2012	2. Staatsexamen Pharmazie, Abschluss als Pharmazeutin
08/2010	1. Staatsexamen Pharmazie
09/2007-02/2012	Pharmaziestudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Praktika

12/2012 – 05/2013	Pharmazeutin im Praktikum bei Sanofi GmbH, Frankfurt, New Lantus Plant, Insulinproduktion
06/2012 – 11/2012	Pharmazeutin im Praktikum in der Einhorn Apotheke, Nürnberg
09/2008 – 10/2008	Famulatur in der Apotheke des Universitätsklinikums, Heidelberg
02/2008 – 03/2008	Famulatur in der Stern-Apotheke, Heidelberg
02/2005	Schülerpraktikum, Forschung BASF AG, Ludwigshafen

Schulbildung

09/1998 – 06/2007	Hölderlin Gymnasium Heidelberg, Abitur
08/1994 – 06/1998	Kurpfalz Grundschule Heidelberg

Düsseldorf, den 01.06.2018

Danksagung

Zunächst möchte ich mich recht herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim P. Schmitt für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen bedanken. Insbesondere gilt dies für die intensive Betreuung, die konstruktiven Diskussionen und das mir und meiner Arbeit entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut promovieren zu dürfen und für die Nutzung der Infrastruktur des Institutes.

Bei Herrn Prof. Dr. Jörg Breitreutz bedanke ich mich für die Betreuung meiner Arbeit als Korreferent und für wertvolle Diskussionen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen der Förderung des Sonderforschungsbereiches 1116.

Bedanken möchte ich mich zudem bei der gesamten Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Krüger für die gute Zusammenarbeit und den ständigen produktiven Austausch über das Forschungsprojekt im Rahmen des SFB 1116.

Zudem möchte ich mich bei unserem Kooperationspartner Herrn PD Dr. Boknik für die Messung der Phosphatase-Aktivität bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Simone Gorreßen und Herrn Dominik Semmler für die fachliche Expertise und die freundliche Einarbeitung in das Ischämie- und Reperusionsmodell bei geschlossenem Thorax. Herrn Florian Funk danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der *Western-blot* Analysen. Vielen Dank auch an Frau Irmhild Rüter für die Unterstützung bei der ELISA-Messung und an Frau Susanne Hölzer für die Genotypisierung der Mäuse. Bedanken möchte ich mich zudem bei dem gesamten Kollegium für die freundliche Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere bedanken möchte ich mich hierbei bei Frau Katarzyna Hackert und Frau Dr. Susanne Homann für ihre Hilfsbereitschaft und die fachliche aber auch persönliche Unterstützung. Ebenfalls ein großer Dank geht an Frau Sandra Berger, die Koordinatorin des SFB 1116, die stets bei organisatorischen Fragen sowie in allen Belangen eine große Hilfe war. Zudem möchte ich mich bei den Sekretärinnen Frau Lohmann und Frau Montag bedanken.

Meiner Familie danke ich herzlich für den Zuspruch und die Unterstützung während meiner Arbeit. Besonders bedanke ich mich bei Thomas für seine Geduld, sein Verständnis und seine Unterstützung in allen Dingen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 01.06.2018

Annette Kronenbitter