

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Prof. Dr. Jens W. Fischer

Der Einfluss von Ruboxistaurin auf den Calcium-Haushalt und die
Sarkomerfunktion von Herzmuskelzellen diabetischer Mäuse

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Friederike Engel

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Volker Burkart

Avō meō

Zusammenfassung

Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass weltweit über 500 Millionen Menschen von einem Diabetes mellitus betroffen sind, häufig begleitet von weiteren Folgeerkrankungen. Hierbei stellen insbesondere kardiovaskuläre Komplikationen einen großen Anteil dar und sind somit die führende Todesursache bei Diabetikern.

Im kontraktile Apparat der Kardiomyozyten (Sarkomere) vermitteln Calcium-Ionen (Ca^{2+}) die elektromechanische Kopplung von Erregung und Kontraktion. Vor jeder Herzaktion steigt die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol etwa um den Faktor 100 und führt zur Kontraktion des Herzens. Anschließend wird das freigesetzte Ca^{2+} unter anderem von der Ca^{2+} -ATPase SERCA2a aktiv unter Hydrolyse von ATP zurück in den Ca^{2+} -Speicher, das sarkoplasmatische Retikulum, transportiert und initiiert so die Relaxation der Herzmuskelzelle. Bei Diabetes mellitus ist die Aktivität der SERCA2a herabgesetzt. Die resultierende Verlangsamung der intrazellulären Ca^{2+} -Regulation trägt zu der beeinträchtigten Kontraktion und Relaxation des Herzens bei und spielt somit eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung und Progression der diabetischen Kardiomyopathie.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den myozytären Ca^{2+} -Kreislauf und die Sarkomerfunktion pharmakologisch über eine Steigerung der SERCA2a-Aktivität zu verbessern. Grundlage war die Hypothese, dass eine Hemmung der Proteinkinase C (PKC) die Aktivität von Phosphatasen verringert, dadurch die Phospholamban-Phosphorylierung erhöht und so die SERCA2a-Aktivität steigert. Dazu wurden in diabetischen und nicht-diabetischen Kardiomyozyten die Effekte einer veränderten PKC-Aktivität auf die Ca^{2+} -Regulation und die Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten untersucht.

Als Modellorganismus für Diabetes mellitus Typ 2 wurden Leptin-Rezeptor-defiziente db/db-Mäuse verwendet. Die Kontrollgruppe stellten männliche db/+ -Mäuse ohne diabetische Stoffwechsellaage dar. An den jeweils isolierten und elektrisch stimulierten Kardiomyozyten wurden Messungen der Ca^{2+} -Kinetik (Fura-2-Methode) und der Sarkomerlängen durchgeführt.

Diese Arbeit zeigt, dass unter PKC-Aktivierung (Phorbol-12-myristat-13-acetat) der myozytäre Ca^{2+} -Kreislauf verlangsamt abläuft. Es wurde weniger Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt und auch die Geschwindigkeit der Freisetzung und der Aufnahme des Ca^{2+} war herabgesetzt (jeweils $p < 0,0001$). Die Sarkomere der Kardiomyozyten kontrahierten weniger stark und die Geschwindigkeit der Kontraktion und Relaxation der Sarkomere war verlangsamt.

Eine Inhibierung der PKC (Ruboxistaurin) führte zu einem gesteigerten myozytären Ca^{2+} -Transport. Die freigesetzte Ca^{2+} -Menge und die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung und -Eliminierung waren unter der pharmakologischen Behandlung mit Ruboxistaurin signifikant erhöht. Die Sarkomere kontrahierten signifikant stärker und die Kinetik der Kontraktion und Relaxation war erhöht. Eine PKC-Inhibierung bei diabetischer Stoffwechsellaage rief eine im Trend gesteigerte Ca^{2+} -Freisetzung hervor ($p = 0,28$), die Kinetik des Ca^{2+} -Kreislaufs und die Sarkomerfunktion zeigten sich ähnlich zu der Kontrollgruppe ohne Ruboxistaurin.

Die Aktivität der PKC stellt offenbar ein zentrales regulatorisches Element im Ca^{2+} -Kreislauf dar und beeinflusst maßgeblich die Sarkomerfunktion - ein potenzielles therapeutisches Ziel bei diabetischer Kardiomyopathie.

Summary

Epidemiological studies indicate that over 500 million people worldwide are affected by diabetes mellitus, which is often associated with secondary complications. Among these, cardiovascular diseases represent a major burden and are the leading cause of death in diabetic patients.

In the contractile apparatus of cardiomyocytes (sarcomeres), calcium ions (Ca^{2+}) mediate the electromechanical coupling between excitation and contraction. Before each heartbeat, the Ca^{2+} concentration in the cytosol increases by a factor of approximately 100, leading to contraction of the heart.

The released Ca^{2+} is then actively transported back into the Ca^{2+} store, the sarcoplasmic reticulum, more than 90 % by Ca^{2+} -ATPase SERCA2a, with hydrolysis of ATP, thereby initiating relaxation of the heart muscle cell. In diabetes mellitus, SERCA2a activity is diminished, resulting in impaired intracellular Ca^{2+} handling. This contributes to dysfunctional contraction and relaxation and plays a key role in the pathogenesis and progression of diabetic cardiomyopathy.

The aim of this study was to improve myocyte Ca^{2+} cycling and sarcomere function pharmacologically by enhancing SERCA2a activity. The underlying hypothesis was that inhibition of protein kinase C (PKC) would reduce phosphatase activity, thereby increasing phospholamban phosphorylation and subsequently SERCA2a activity. To test this, the effects of altered PKC activity on Ca^{2+} handling and sarcomere function were investigated in both diabetic and non-diabetic cardiomyocytes.

Leptin receptor-deficient mice (db/db) were used as a model organism for type 2 diabetes mellitus, while heterozygous db/+ mice with normal metabolism served as the control group. Measurements of Ca^{2+} kinetics (Fura-2 method) and sarcomere length were performed on isolated and electrically stimulated cardiomyocytes.

The results demonstrate that PKC activation (via phorbol-12-myristate-13-acetate) slows down myocyte Ca^{2+} cycling. Ca^{2+} release from the SR was reduced, and both the rates of release and reuptake were significantly diminished ($p < 0.0001$). Sarcomeres showed weaker contractions and reduced kinetics of both contraction and relaxation.

Conversely, PKC inhibition with ruboxistaurin enhanced myocytic Ca^{2+} handling. The amount of Ca^{2+} released, as well as the rates of release and clearance, were significantly increased ($p > 0.05$). Sarcomere shortening was more pronounced, and the kinetics of contraction and relaxation were accelerated. PKC inhibition in diabetic metabolism only caused a trend toward increased Ca^{2+} release ($p = 0.28$), while the kinetics of Ca^{2+} circulation and sarcomere function were similar to those of the control group without ruboxistaurin.

PKC activity appears to be a key regulatory element in the Ca^{2+} cycle and significantly influences sarcomere function - a potential therapeutic target in diabetic cardiomyopathy.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AP	Aktionspotenzial
ATP	Adenosintriphosphat
c	Stoffmengen-Konzentration
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CASQ	Calsequestrin
cTnC	Kardiales Troponin C
cTnI	Kardiales Troponin I
cTnT	Kardiales Troponin T
Δ	Delta-Wert
DAG	Diacylglycerol
db/db	Leptinrezeptor defiziente homozygote Maus
db/+	Leptinrezeptor defiziente heterozygote Maus
ddH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fura-2 AM	Fura-2 Acetoxymethylester
g	Erdbeschleunigung, 1 g = 9.81 m/s ²
h	Stunde
Hz	Hertz
I-1	Proteinphosphatase-Inhibitor-1
kDa	Kilodalton
Ktr	Kontrolle
μl	Mikroliter

MDa	Megadalton
Min	Minute
ml	Milliliter
mol/l	Mol pro Liter
mM	Millimol pro Liter, millimolar
μm	Mikrometer
μm/s	Mikrometer pro Sekunde
μM	Mikromol pro Liter, mikromolar
n	Stückanzahl
NCX	Natrium-Calcium-Antiporter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
%	Prozent
p	p-Wert
P	Phosphat-Ionen
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLN	Phospholamban
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMCA	Plasmamembran-Calcium-ATPase
PP1	Proteinphosphatase 1
RBX	Ruboxistaurin
Rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodin-Rezeptor
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)

SERCA2a	sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase 2a
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T	Zeit
T1DM	Diabetes mellitus Typ I
T2DM	Diabetes mellitus Typ II
T-Tubuli	Transversaltubuli
V	Volt
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutz- aufgaben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Elektromechanische Kopplung	2
1.1.1	Myozytärer Ca^{2+} -Kreislauf	2
1.1.2	Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten	6
1.1.3	Kontraktile Dysfunktion des Herzens bei Diabetes mellitus	9
1.1.4	Ruboxistaurin und PMA	9
1.2	Ziele der Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Hilfsmittel	13
2.1.3	Geräte	14
2.1.4	Software	16
2.1.5	Puffer	16
2.2	Methoden	19
2.2.1	Tierversuche	19
2.2.2	Messungen von isolierten Kardiomyozyten	20
2.2.3	Proteinanalyse mittels Western blot	30
2.2.4	Statistik	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Bestimmung idealer Stimulationsbedingungen der Kardiomyozyten mittels Proteinanalyse (Western blot)	34
3.2	Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme (Ca^{2+} -Kreislauf)	37
3.2.1	Proteinkinase C-Aktivierung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	37
3.2.2	Proteinkinase C-Inhibition mit Ruboxistaurin (RBX)	40
3.3	Sarkomerfunktion	50
3.3.1	Einfluss von PMA auf die Sarkomerfunktion	50
3.3.2	Einfluss von RBX auf die Sarkomerfunktion	53
4	Diskussion	62
4.1	Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme (Ca^{2+} -Kreislauf)	62
4.1.1	Proteinkinase C-Aktivierung – Verlangsamung des Ca^{2+} -Kreislaufs	62
4.1.2	Proteinkinase C-Inhibition – verschiedene Stoffwechsellagen	65
4.2	Sarkomerfunktion	70
4.2.1	Proteinkinase C-Aktivierung – herabgesetzte Sarkomerfunktion	70

4.2.2	Proteinkinase C-Inhibition – verschiedene Stoffwechsellagen	73
4.3	Limitationen.....	77
4.4	Schlussfolgerung.....	78
4.5	Ausblick	79
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	80

1 Einleitung

Diabetes mellitus (DM) beschreibt eine Gruppe an metabolischen Erkrankungen und ist ein stark wachsendes Gesundheitsproblem weltweit [1]. Gemeinsames Merkmal sind erhöhte Blutzuckerwerte (Hyperglykämie), weil die Patienten einen Mangel am Hormon Insulin haben und/oder eine verminderte Insulinwirkung aufweisen. Die beiden Hauptformen sind der Diabetes mellitus Typ1 (T1DM) und Typ 2 (T2DM) [2]. Laut Diabetes-Surveillance des Robert-Koch-Instituts sind rund 7 Millionen Menschen in Deutschland an DM erkrankt und jedes Jahr erkranken mehr als 500.000 Menschen neu [3].

Der T1DM ist eine Autoimmunerkrankung, die sich meist bereits im Kindes- und Jugendalter, in den meisten Fällen zwischen dem 5. und 15. Lebensjahr, zeigt [4, 5]. Es kommt durch eine immunvermittelte Zerstörung der Betazellen des Pankreas zu einem Insulinmangel und anschließender Hyperglykämie. Da der Körper kein oder nicht ausreichend Insulin produziert, müssen die Betroffenen lebenslang Insulin spritzen. 5-10 % der Erwachsenen mit DM haben einen T1DM [3].

Im Gegensatz dazu weisen 90-95 % der DM-Erkrankten einen T2DM auf. Hierbei liegen eine Insulinresistenz und eine veränderte Insulinsekretion vor. Der T2DM entwickelt sich überwiegend im höheren Alter und wird daher auch Altersdiabetes genannt. Außerdem bestehen eine starke genetische Komponente und eine Assoziation mit einem ungesunden Lebensstil, wie z.B. körperlicher Inaktivität, mangelhafter Ernährung und Rauchen [3].

DM kann schwere Folge- und Begleiterkrankungen mit sich ziehen und somit zu starken gesundheitlichen Einschränkungen führen. Die Erkrankung führt zu einem Verlust von bis zu 12 Jahren gesunder Lebenszeit und geht mit einer Vielzahl an weiteren Pathologien einher, unter anderem Neuropathien, Retinopathie, Nierenversagen und Herzerkrankungen [6]. Mehr als 35 % der Patienten mit DM haben kardiovaskuläre Erkrankungen, diese stellen zugleich die führende Todesursache bei Diabetikern dar [3, 7].

Die WHO beschreibt ein exponentielles Wachstum der Prävalenz von DM weltweit. Im Jahr 2024 schätzt die *International Diabetes Federation* (IDF) die Anzahl der an DM erkrankten Menschen weltweit auf rund 589 Millionen. Prognosen zufolge wird ein Anstieg auf 853 Millionen Betroffene im Jahr 2050 und damit eine Steigerung um 45 % erwartet [8].

1.1 Elektromechanische Kopplung

DM stellt eine Prädisposition für ein breites Spektrum an kardiovaskulären Erkrankungen dar [9]. Zum besseren Verständnis dieser Herz-Kreislauf Komplikationen bei diabetischer Stoffwechsellage beschreiben die folgenden Kapitel zuerst die physiologischen Abläufe mit Fokus auf die Regulation der kardialen Pumpfunktion.

1.1.1 Myozytärer Ca^{2+} -Kreislauf

Im Folgenden werden zunächst die allgemeinen Aspekte des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufs erläutert und anschließend die regulatorischen Einheiten dargestellt.

1.1.1.1 Allgemeine Aspekte

Das wichtigste Signalmolekül der elektromechanischen Kopplung sind Calcium-Ionen (Ca^{2+}) [10]. Unter elektromechanischer Kopplung versteht man den Signalmechanismus, der in einer Muskelzelle das Aktionspotenzial mit der Kontraktion verbindet [11].

Herzmuskelzellen werden durch Aktionspotenziale der Schrittmacherzentren erregt. Die Erregung breitet sich über die Membran der Kardiomyozyten bis in die Transversaltubuli (T-Tubuli) aus. Dies führt zur Öffnung der dortigen spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Es kommt zu einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum in das Zytosol. Das einströmende Ca^{2+} aktiviert den Ryanodin-Rezeptor (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR beginnt. Das SR dient mit einer Ca^{2+} -Konzentration von ca. 1-1,5 mmol/l als Speicher und wird während der Erregung zu 24 bis 63 % entleert [12]. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt von 10^{-7} mol/l auf 10^{-5} mol/l an.

Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer verstärkten Bindung von Ca^{2+} an den N-Terminus von Troponin C (cTnC). Nach dieser Ca^{2+} -Bindung bindet das cTnC stärker an das Troponin I (cTnI), führt zu einer Umlagerung der cTnI- Untereinheit und zieht es von seiner Bindungsstelle zu Aktin weg. Dies ruft eine Konformationsänderung im Tropomyosin-bindenden Troponin T (cTnT) hervor. In Folge wird der Tropomyosindoppelstrang in die Längsrinne der Aktindoppelhelix gedrückt und die Bindungsstellen am Aktin für den Myosinkopf werden freigegeben [11, 13]. Aktin und Myosinfilamente können miteinander interagieren und es folgt die mechanische Kontraktion. Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol der Herzmuskelzellen führt somit zur Kontraktion des Herzmuskels [11].

Durch Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt es zur Relaxation der Zelle. Die sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum- Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA2a) transportiert aktiv das Ca^{2+} zurück in das SR. Die Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) und der Natrium-Calcium-Antiporter (NCX) sitzen beide an dem Sarkolemm und transportieren das Ca^{2+} von intrazellulär nach extrazellulär. Der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter befördert das Ca^{2+} in die Mitochondrien.

Es ist bekannt, dass in humanen Kardiomyozyten die SERCA2a mit etwa 70 % den größten Anteil der zytosolischen Ca^{2+} -Elimination übernimmt. Der Rest verlässt die Zelle über das

Sarkolemm mithilfe des NCX (etwa 28 %) und der PMCA (<1 %) und etwa 2 % transportiert der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter in die Mitochondrienmatrix [10].

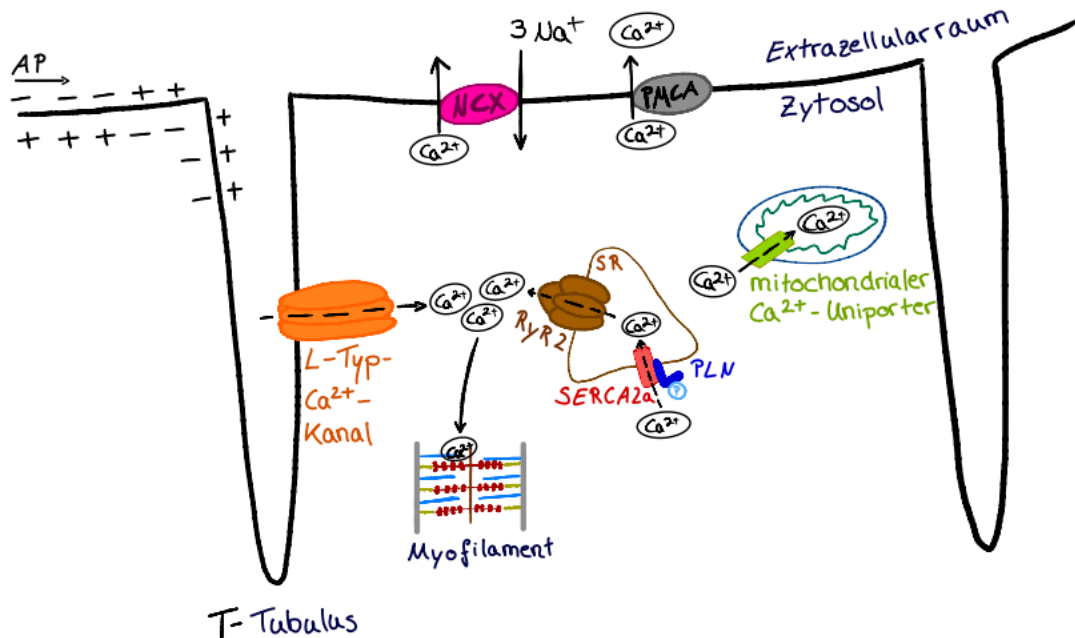


Abb. 1: Myozytärer Ca^{2+} -Kreislauf

Das ausgesendete Aktionspotential (AP) von übergeordneten Schrittmacherzentren führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Kardiomyozyten. Dieser Einstrom löst die Freisetzung weiterer Ca^{2+} -Ionen aus dem SR aus. Ca^{2+} -Ionen binden an das Sarkomer und führen so zu einer Muskelkontraktion. Mithilfe unterschiedlicher Transporter wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gesenkt. Von besonderem Interesse ist hierbei die SERCA2a, die durch Phospholamban (PLN) reguliert wird und das Ca^{2+} wieder zurück in das SR pumpt.

PKC = Proteinkinase C, PP1 = Proteinphosphatase 1, PLN = Phospholamban, P = Phosphat, SERCA2a = sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum- Ca^{2+} -ATPase 2a, SR = sarkoplasmatisches Retikulum, RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2, Ca^{2+} = Calcium-Ionen, AP = Aktionspotential, NCX = Natrium- Ca^{2+} -Austauscher, PMCA = Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase

Bei Ratten und Mäusen besteht die Besonderheit, dass die SERCA2a bis zu 92 % des zytosolischen Ca^{2+} in das SR zurückpumpt. Der NCX eliminiert 7 %, die PMCA und der mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter jeweils 1 % des intrazellulären Ca^{2+} [10, 14]. Erreicht das zytosolische Ca^{2+} seine basale Ausgangskonzentration, kann es zu einer erneuten Erregung und damit zur Ca^{2+} -Ausschüttung und Kontraktion kommen. Die Kontraktionskraft ist proportional zu der Menge des freigesetzten Ca^{2+} in das Zytosol [15].

1.1.1.2 Regulation des Ca^{2+} -Kreislaufs

Der myozytäre Ca^{2+} -Kreislauf kann durch verschiedene Faktoren reguliert werden. In den nächsten zwei Unterkapiteln wird auf den Ryanodin-Rezeptor und die SERCA2a näher eingegangen.

1.1.1.2.1 Ryanodin-Rezeptor

Ryanodin-Rezeptoren (RyR) sind die größten bisher bekannten Ionenkanäle mit einer gesamten Molekülmasse von 2,2 Megadalton (MDa). Sie sind als Homotetramere im SR verankert und haben eine pilzartige Form, die aus einem großen zytoplasmatischen Kopf und einem Transmembranstiel besteht [16]. Von den 3 existierenden Isoformen befindet sich der Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) in den Kardiomyozyten. RyR sind für die Freisetzung des Ca^{2+} aus dem SR verantwortlich sind. Der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal steht in enger funktioneller Verbindung mit dem RyR2, sodass der Ca^{2+} -Fluss durch einen der beiden Kanäle jeweils die Aktivität des anderen Kanals verändert [17, 18].

RyR werden über unterschiedliche Mechanismen reguliert und sind unter anderem das Substrat für mehrere Kinasen (Proteinkinase A (PKA) und Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)). Verschiedene Phosphorylierungsstellen am RyR2 können die Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors steuern. Eine Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren führt zu einer Phosphorylierung des RyR2 durch die PKA und damit zu einer beschleunigten Ca^{2+} -Freisetzung [19]. Die PKA stellt somit eine molekulare Verbindung zwischen physiologischem Stress und den RyR2 dar. Auch die CaMKII phosphoryliert den RyR2 und erhöht damit jene Öffnungswahrscheinlichkeit. CaMKII trägt außerdem zu Herzrhythmusstörungen und kontraktilen Funktionsstörungen bei [16].

1.1.1.2.2 SERCA2a

Die SERCA2a ist eine Ca^{2+} -ATPase des SR und transportiert aktiv unter Hydrolyse von ATP die zytosolischen Ca^{2+} -Ionen zurück in das SR. Sie steuert damit sowohl die Geschwindigkeit der zytosolischen Ca^{2+} -Elimination als auch das Ausmaß der Ca^{2+} -Beladung des SR. Dadurch ist die SERCA2a grundlegend verantwortlich für die Relaxation und Kontraktion der Kardiomyozyten [20].

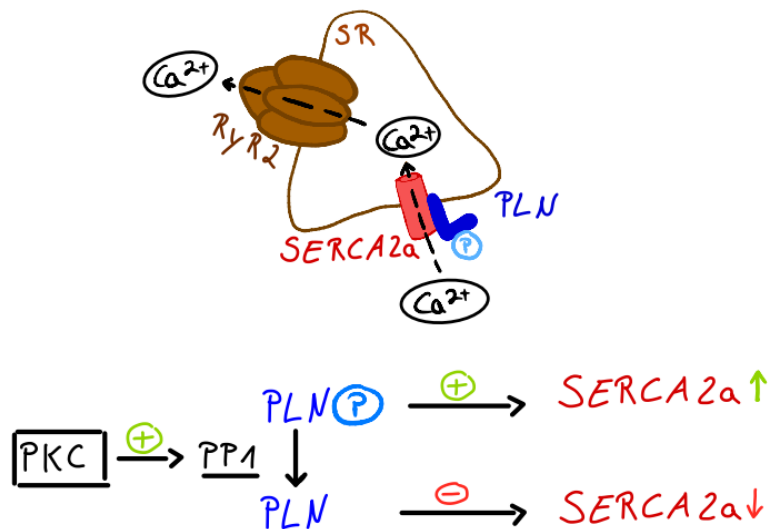


Abb. 2: SERCA2a-Aktivität

Die Proteinkinase C (PKC) führt über die Proteinphosphatase 1 (PP1) zu einer Dephosphorylierung des Phospholambans (PLN). Hierdurch wird die Aktivität der SERCA2a gehemmt und weniger Ca^{2+} pro Zeit in das SR befördert. Eine Hemmung der PKC führt zu einer erhöhten Menge an phosphoryliertem PLN, welches die Hemmung der SERCA2a aufhebt. PLN ist demnach ein reversibler Inhibitor der SERCA2a.

PKC = Proteinkinase C, PP1 = Proteinphosphatase 1, PLN = Phospholamban, P = Phosphat, SERCA2a = sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum- Ca^{2+} -ATPase 2a, SR = sarkoplasmatisches Retikulum, RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2, Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Die Aktivität der SERCA2a wird durch ihren spezifischen Regulator, das Phospholamban (PLN), gesteuert. Dieses befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen der monomeren und pentameren Form. PLN ist wie die SERCA2a ein transmembranöses Protein des SR und hemmt als Monomer vor allem im unphosphorylierten Zustand die Aktivität der SERCA2a reversibel [20]. Dabei bindet PLN an eine Transmembranfurche der SERCA2a und reduziert so die Affinität der SERCA2a zu Ca^{2+} [21]. Diese Furche kann durch Ca^{2+} besetzt werden und somit die Bindung zwischen PLN und SERCA2a verhindern [22].

Unter beta-adrenerger Stimulation der Kardiomyozyten phosphoryliert die PKA als cAMP-abhängige Proteinkinase das PLN an Serin16 (Ser16). Der weitere Ablauf wird in der Literatur mit zwei verschiedenen Modellen, dem Dissoziations- und dem Untereinheiten (*subunit*)-Modell, versucht zu beschreiben. Nach dem Dissoziationsmodell trennt sich das phosphorylierte PLN von der Calcium-ATPase SERCA2a, um seine inhibitorische Wirkung zu beenden [23]. Das Untereinheiten-Modell zeigt, dass PLN nach der Phosphorylierung an SERCA2a gebunden bleibt und die Hemmung durch Konformationsänderungen aufgehoben wird [24]. Insgesamt kommt es zu einer Enthemmung der SERCA2a und dadurch zu einer gesteigerten Ca^{2+} -Aufnahme [25].

Die PLN-Phosphorylierung kann außerdem über die CaMKII erfolgen. Bei erhöhter Ca^{2+} -Konzentration wird die CaMKII aktiv und phosphoryliert PLN an der Phosphorylierungsstelle Threonin17 (Thr17) [15, 26].

Eine weitere Möglichkeit der Phosphorylierung erfolgt durch die PKC. Edes *et al.* weisen jedoch darauf hin, dass dieser Prozess ausschließlich *in vitro* und nicht *in vivo* beobachtet wurde [27]. Die PKC-vermittelte Phosphorylierung findet im Gegensatz zu der PKA-vermittelten oder CaMKII-Phosphorylierung an Serin10 (Ser10) des PLN statt [20].

Proteinphosphatasen dienen in Kardiomyozyten als Regulatoren. Sie sind in der Lage, die durch Proteinkinasen angehängten Phosphatgruppen abzuspalten und erzeugen damit eine Reversibilität. Die Serin/Threoninphosphatase PP1 ist verantwortlich für den Phosphorylierungszustand von PLN und RyR2. Es existieren unterschiedliche regulatorische Untereinheiten, die die PP1 in ihrer Aktivität beeinflussen. Ein negativer Regulator der PP1-Aktivität ist der Proteinphosphatase-Inhibitor-1 (I-1). Das Ausmaß der inhibitorischen Kapazität wird über verschiedene Phosphorylierungsstellen an I-1 bestimmt. Eine PKA-abhängige Phosphorylierung an Threonin35 (Thr35) des I-1 ist die Voraussetzung für die Inhibition der PP1-Aktivität. Eine Phosphorylierung der Stellen Serin67 (Ser67) und Threonin75 (Thr75) durch die PKC führt hingegen zu einer Inaktivierung von I-1 und damit zu einer gesteigerten Aktivität von PP1 in Kardiomyozyten [28-30]. Eine erhöhte PKC-Aktivität kann somit indirekt die PP1 aktivieren, die das PLN dephosphoryliert. Dadurch wird die SERCA2a stärker gehemmt und der Ca^{2+} -Kreislauf läuft in den Kardiomyozyten verlangsamt ab. Hemmt man die PKC steigt demnach die Aktivität der SERCA2a [31].

1.1.2 Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten

Das Sarkomer ist die grundlegende und kleinste kontraktile Funktionseinheit der Myozyten [32]. Sarkomere setzen sich aus den Myofilamenten zusammen, die im Wesentlichen aus den Proteinpolymeren Aktin und Myosin bestehen. Das Verschieben bzw. Ineinandergleiten der Myosinfilamente führt zur Krafterzeugung der Kardiomyozyten. Aufgrund der Sarkomerverkürzung kontrahiert der Muskel, jedoch bleibt die Länge der Filamente unverändert. Relaxiert der Muskel, dehnen sich die Kardiomyozyten, da die Sarkomere länger sind.

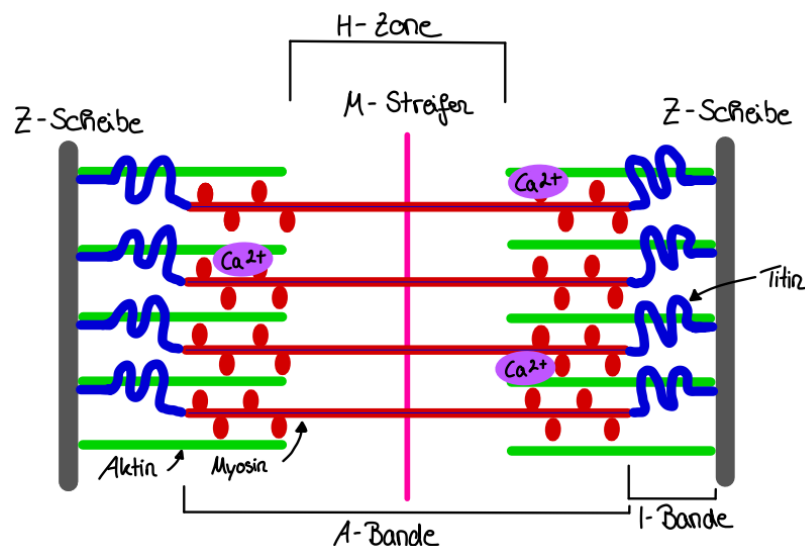


Abb. 3: Schematische Darstellung eines repräsentativen Sarkomers

Das Sarkomer lässt sich in Streifen und Banden unterteilen. An der Bildung einer Sarkomereinheit sind verschiedene Proteine beteiligt, die unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Kontraktion übernehmen. Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Die Myofilamente lassen sich in dünne und dicke Filamente unterteilen. Die dünnen Filamente werden auch Aktinfilamente genannt und bestehen im Wesentlichen aus Aktin. Sie sind über das Verankerungsprotein Aktinin mit den Z-Scheiben verbunden. Aktinfilamente verzahnen sich mit den zwischen ihnen liegenden, dicken Filamenten. Myosin bildet den Hauptbestandteil der dicken Filamente, auch als Myosinfilamente bezeichnet. Myosinmoleküle bestehen aus einem Kopf- und einem Schwanzteil, dabei weist der Kopfteil eine Affinität zu Aktin auf. Eine elastische Verbindung zwischen den dicken Filamenten und Z-Scheiben bildet das Titin. In Form von Filamenten zieht es von der Z-Scheibe des Sarkomers bis zu dem M-Streifen und spannt sich somit longitudinal durch den Myozyten. Dies verleiht ihm eine passive Steifigkeit, die für Relaxation und Kontraktion bedeutsam ist [33].

Sarkomere können weiter in Banden und Streifen unterteilt werden. Die I-Bande besteht hauptsächlich aus Aktinfilamenten. Die A-Bande hat einen zentralen Abschnitt, die sogenannte H-Zone. In der H-Zone liegen die Myosinfilamente parallel und ohne Ausbildung von den Köpfen vor. Das Zentrum der H-Zone bildet der M-Streifen. An diesem sind die entgegengesetzt verlaufenden Myosinfilamente befestigt. Die äußeren Abschnitte der A-Bande zeichnen sich durch eine parallele Ausrichtung der Aktinfilamente und Myosinfilamente mit Köpfchen aus. Die Z-Scheiben trennen die einzelnen Sarkomere voneinander und dienen den Aktinfilamenten als Verankerung.

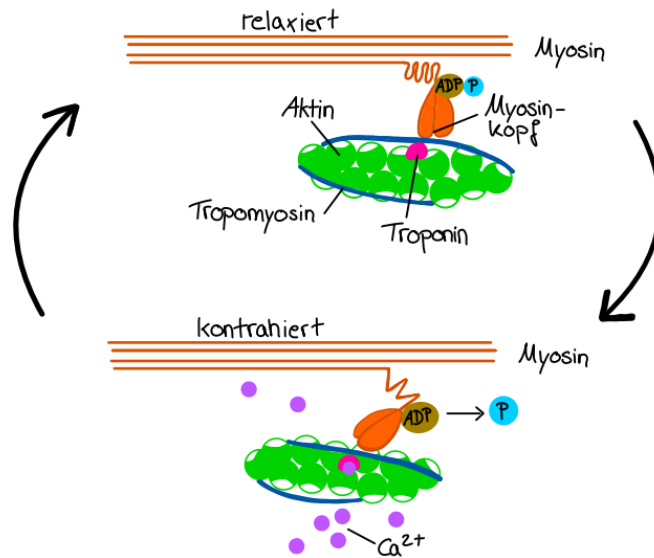


Abb. 4: Querbrückenzyklus

Relaxation: Adenosintriphosphat (ATP) bindet an den Myosinkopf und wird durch die Myosin-ATPase zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P) hydrolysiert, dies führt zur Aufrichtung des Myosinkopfes auf eine energiereiche 90°-Stellung. Tropomyosin und Troponin blockieren am Aktin die Myosinbindungsstelle. Kontraktion: Intrazellulär einströmendes Ca^{2+} bindet an Troponin und führt zu einer Konformationsänderung im Troponin-Tropomyosin-Komplex. Der Myosinkopf kann an das Aktinfilament binden und mit der Freisetzung von P wird das Aktinfilament in Richtung der Sarkomermitte gezogen. Der Myosinkopf nimmt eine niedrig-energetische 45°-Stellung an. ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, P = Phosphat

Die Muskelkontraktion beruht auf der Ca^{2+} -abhängigen Aktin-Myosin-Interaktion. Im Ruhezustand ist die Myosinbindungsstelle am Aktin durch Tropomyosin und Troponin I (cTnI) blockiert. Troponin besitzt 2 weitere Untereinheiten, das Troponin C (cTnC) und Troponin T (cTnT). Letztgenanntes ist für die Bindung des Troponins an das Tropomyosin verantwortlich. Im Rahmen des myozytären Kreislaufs kommt es bei einer elektrischen Erregung zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Ca^{2+} bindet an die cTnC-Untereinheit und führt zu Konformationsänderungen im Troponin-Tropomyosin-Komplex [34]. Zudem kann cTnC an cTnI binden und dieses von seiner Bindungsstelle am Aktin wegziehen [15]. Die Myosin-Bindungsstelle wird so an der Aktinoberfläche geöffnet und der Myosinkopf kann an das Aktin binden [35]. Der Myosinkopf ist bereits durch die Bindung und Spaltung von ATP vorgespannt. Im Rahmen der Bindung an das Aktinfilament kommt es infolge der Dissoziationen des Phosphates (P) und des ADPs zu Kraftschlägen, indem der Myosinkopf abknickt. Aktin wird um ca. 10 nm in die Sarkomermitte gezogen. Bindet neues ATP an den Myosinkopf, löst es diesen von dem verzahnten Aktin und es kommt zur erneuten Vorspannung [13]. Solange die Ca^{2+} -Konzentration erhöht ist, folgen erneute Querbrückenzyklen. Sinkt jedoch die Ca^{2+} -Konzentration, wird die Myosinbindungsstelle wieder blockiert und die Kardiomyozyten relaxieren [36].

Die Entwicklung der Kraft und der Relaxation wird unter anderem durch den Phosphorylierungszustand des cTnI reguliert. Die Phosphorylierung von cTnI durch die PKA führt zu einer Verringerung der Empfindlichkeit des Herzmuskels gegenüber Ca^{2+} und

einer Erhöhung der Relaxationsrate der Kardiomyozyten [35]. Die Daten über den Einfluss der cTnI-Phosphorylierung durch die PKC auf die Funktion des Troponin-Komplexes sind umstritten. Im Allgemeinen zeigen *in-vitro*-Studien, dass die physiologische Wirkung der PKC-Phosphorylierung der von PKA entgegengesetzt ist [35, 37].

1.1.3 Kontraktile Dysfunktion des Herzens bei Diabetes mellitus

Herzerkrankungen sind die führende Todesursache bei Patienten mit T2DM [38]. Im diabetischen Herzen ist sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion beeinträchtigt [39]. Diverse Experimente an Mausmodellen mit T2DM zeigen, dass hierfür Anomalien des intramyozytären Ca^{2+} -Kreislaufs verantwortlich sind [38, 40]. Hierzu zählen signifikant niedrigere systolische und diastolische Ca^{2+} -Spiegel in isolierten Myozyten von diabetischen Herzen und Einschränkungen der Kontraktion und Relaxation [38]. Eine Vielzahl an Studien diskutieren zwei mögliche Ursachen für den beeinträchtigten kardialen Ca^{2+} -Kreislauf bei diabetischer Stoffwechsellage:

Zum einen zeigen diabetische Myozyten eine verminderte SERCA2a-Aktivität, mit einer nachfolgend geringeren Beladung des SR mit Ca^{2+} . Die Ursache hierfür scheint in erster Linie eine Abnahme der SERCA mRNA und Proteinexpression zu sein [1]. Es folgt eine spät einsetzende systolische Dysfunktion.

Zum anderen ist die Phosphorylierung der PLN-Monomere in diabetischen Herzen deutlich herabgesetzt [41]. Es resultiert eine verminderte Affinität der SERCA2a für Ca^{2+} und eine früh einsetzende diastolische Dysfunktion [42]. Möglicherweise spielt für die verringerte PLN-Phosphorylierung eine erhöhte PP1-Aktivität eine kausale Rolle. Die Arbeitsgruppe Krüger konnte diesbezüglich eine erhöhte PKC-Aktivität in diabetischen Kardiomyozyten nachweisen [43]. Da die PKC über eine Phosphorylierung des I-1 die Aktivität der PP1 erhöht (siehe Kapitel 1.2.1.1.2), würde eine gesteigerte PKC-Aktivität zu der beobachteten reduzierten PLN-Phosphorylierung führen [28].

Der hier beschriebene Pathomechanismus in diabetischen Herzen stellt die Grundlage für die in dieser Arbeit aufgeführten Experimente dar. Durch eine Hemmung der PKC-Aktivität könnte indirekt eine verringerte Aktivität der PP1 resultieren und somit eine größere Menge an phosphoryliertem PLN vorliegen. Die SERCA2a-Aktivität würde dann weniger gehemmt und der intramyozytäre Ca^{2+} -Kreislauf wäre beschleunigt.

1.1.4 Ruboxistaurin und PMA

Die Proteinkinasen C sind eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die an den unterschiedlichsten Prozessen in Zellen beteiligt sind. Hierzu gehören Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Darüber hinaus spielen sie eine entscheidende Rolle bei Krankheiten wie DM [44]. Die PKC besitzt verschiedene Isoformen und lässt sich in die Gruppe der klassischen (cPKC α , β I, β II, γ), neuartigen (nPKC δ , ϵ , ν , θ) und atypischen (aPKC ζ , λ/τ) PKC aufteilen. Die klassischen Proteinkinasen lassen sich durch das freigesetzte DAG im Rahmen des Gq-gekoppelten Signalwegs und Ca^{2+} aktivieren. Die PKC α stellt die prädominante Isoform in Maus-, Ratten- und Menschenherzen dar und liegt

somit im Fokus der hier durchgeführten Experimente. PKC β und γ werden in geringen, aber nachweisbaren Mengen exprimiert [31].

Ruboxistaurin (RBX) ist ein oral verfügbarer pharmakologischer PKC $\alpha/\beta/\gamma$ Inhibitor [31, 45]. Der PKC-Inhibitor RBX übt seine kardioprotektive Wirkung insbesondere über eine Hemmung der PKC α aus. Studien der Arbeitsgruppe von Jeffery Molkentin, Cincinnati Children's Hospital, USA, erprobten RBX bereits in herzinsuffizienten Mausmodellen mit dem Erfolg eines verbesserten Phänotyps. Die Inhibition der PKC α durch RBX ist assoziiert mit dem Schutz vor Herzversagen durch einen verbesserten kardialen Ca²⁺-Kreislauf und eine erhöhte Myofilamentleistung [31].

Die vorliegende Arbeit untersucht neben den Effekten der PKC-Inhibition auf den myozytären Ca²⁺-Kreislauf auch umgekehrt die Folgen einer PKC-Aktivierung auf Myozyten. Hierfür wurde der PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) eingesetzt. PMA ist ein Phorbolester, der strukturell dem natürlichen PKC-Aktivator Diacylglycerol (DAG) ähnlich ist [46]. Für die Aktivierung der PKC eliminiert PMA das DAG und setzt zudem die für die Aktivierung benötigte Ca²⁺-Konzentration herab [47]. Zusätzlich ist für die Aktivierung aller PKC-Isoenzyme eine initiale Phosphorylierung durch eine PKC-Kinase notwendig. Findet diese initiale Phosphorylierung nicht statt, bleibt die PKC inaktiv [48].

1.2 Ziele der Arbeit

Diabetische Kardiomyozyten zeichnen sich durch eine für Kontraktion und Relaxation des Herzens maßgebliche Störung der intrazellulären Ca²⁺-Regulation aus. Vorarbeiten weisen darauf hin, dass unter den zugrundeliegenden Ursachen die herabgesetzte Aktivität der SERCA2a eine wesentliche Rolle spielt [1, 49]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer pharmakologischen Steigerung der SERCA2a-Aktivität in Kardiomyozyten mithilfe eines Inhibitors der PKC untersucht.

Konkret wurden in dieser Arbeit die folgenden Fragen untersucht:

- 1.) Wie verändert T2DM den Ca²⁺-Kreislauf und die Sarkomerfunktion von Kardiomyozyten?
- 2.) Welche Wirkung hat eine PKC-Aktivierung und damit eine Hemmung der SERCA2a-Aktivität auf den Ca²⁺-Kreislauf und die Sarkomerfunktion?
- 3.) Welche Wirkung hat eine PKC-Inhibierung mittels RBX auf den Ca²⁺-Haushalt und die Sarkomerfunktion in nicht-diabetischer und diabetischer Stoffwechsellage?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Substanz	Chargennummer	Hersteller
2,3-Butandion-monoxim	0000093198	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure	SLCD6197	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acrylamid / Bis-acrylamid (30 %)	300298910	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER
Albumin Rinderserum Fraktion V	3288782	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Ammoniumpersulfat	MKCG5404	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Benzamidine, Hydrochloride	3222639	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Bromphenolblau	81H3633	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	A0746482849	Merck KGaA, Darmstadt, GER
D-(+)-Glukose	039277259	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER
Desoxycholsäure	3180455	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Dimethylsulfoxid	1354C451	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure	67425	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Fura-2 AM	2077760	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glycerol	49468417	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER
Glycin	33789823	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER
Heparin-Natrium-25000	W07530	Ratiopharm GmbH, Ulm, GER

Substanz	Chargennummer	Hersteller
Imidazol	96H0089	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Immobilon Forte Western HRP Substrate	193045	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Kaliumchlorid	K50312936 850	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Kaliumnatriumtartrat	6381595	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Kollagenase Typ I	43B14042T	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA
Magnesiumchlorid Hexahydrat	BCCC0031	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	418276258	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER
Milchpulver	325229712	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	BCBZ6523	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid, >99,8 %	468277021	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER
Natriumdodecylsulfat	348273699	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER
Natriumfluorid	SLBT7525	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumhydrogencarbonat	K50975629 904	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Page Ruler Prestained Protein Ladder	00973617	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	UI294740	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat	64144202	Invivogen, San Diego, CA, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid	BCBP5502V	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Probenecid	BCBG9604V	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ruboxistaurin	3469695	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Tris(hydromethyl)aminomethan	258267221	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER
Triton X-100	67H0044	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20 (0,1 %)	071167207	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, GER

2.1.2 Hilfsmittel

Tabelle 2: Hilfsmittel

Material	Bezeichnung	Hersteller
96 well Platte	CELLSTAR®, steril, mit Deckel, F-bottom	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Blothalter	SNAP i.d.® 2.0, Blot Holder	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
chirurgisches Nahtmaterial	Perma-Hand Seide, schwarz geflochten, 7-0	Ethicon, Raritan, NJ, USA
Deckgläser	25 x 25 mm, Glasdicke 0,13-0,16	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, GER
Einmalkanülen	Sterican Gr.20, 0,4 x 20 mm	B. Braun, Melsungen, GER
Falcon	Centrifuge Tubes	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, GER
Feindosierungsspritze	Omnifix-F 1ml	B. Braun, Melsungen, GER
Filtergewebe aus Polyamid	102 x 100 cm, 150µm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, GER
Gelgießstation		Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
OP Besteck	Pinzette Dumont 5/45 Schere, 14574-11	Fine Science Tools, North Vancouver, B.C., Canada
Parafilm	Laboratory film	Bemis Company, Neenah, WI, USA
Petrischale	CELLSTAR®, Zellkultur Schale, PS, 100/20 MM, steril,	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipette	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, GER
Plastikpipette	Pasteurpipetten aus PE, 1ml	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, GER
Spritze	Omnifix Luer Lock Solo 20 ml	B. Braun, Melsungen, GER
Steriler Spritzenfilter	Filtropur S 0,2	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, GER
Stoppuhr	Clock, Model No. TR118	Oregon Scientific, Tualatin, OR, USA
Thermometer		TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Wertheim, GER
Transfermembran	Immobilon-FL, 0,45 µm, 26,5 cm x 3,75 m-Rolle	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

2.1.3 Geräte

In der folgenden Tabelle werden die eingesetzten Geräte nach ihrem Arbeitsplatz sortiert aufgeführt.

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Allgemeines		
Analysenwaage	sartorius analytic	Sartorius AG, Göttingen, GER
Blutzuckermessgerät	Stat Strip Xpress	Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA, USA
Glukoseteststreifen	Stat Strip Xpress, LOT: 0320174309	Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA, USA
Inkubator	Orbital Shaker-Incubator ES-20	Grant Instruments, Cambridge, Cambridgeshire, UK
Milli-Q Wassersystem	Millipak Express 20	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Schüttelgerät	Duo Press.to.mix	LABIN GmbH, Zwentendorf, Österreich
Waage	EMB 500-1	Kern & Sohn GmbH, Balingen, GER
Isolation der Kardiomyozyten		
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD	Leica Camera AG, Wetzlar, GER
Peristaltische Pumpe	perimax	Spetec, Erding, GER
Standzentrifuge	Minifuge RF	Heraeus, Hanau, GER
Stereomikroskop	Stemi 2000-C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Thermostat	polystat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Calcium-Messplatz		
Bildschirm	SyncMasterS22B150	Samsung, Seoul, Südkorea
Energieversorgung der Kamera	MyoCam-S Power	IonOptix, Westwood, MA, USA
Energieversorgung der Lichtquelle	High intensity arc lamp power supply	Cairn Research, Faversham, Kent, UK

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Fluorescence System Interface		IonOptix, Westwood, MA, USA
Kamera	MyoCam-S	IonOptix, Westwood, MA, USA
Lichtquelle	HyperSwitch Light Source	IonOptix, Westwood, MA, USA
Microscope Chamber System		IonOptix, Westwood, MA, USA
Mikroskop	Myocyte Fluorescence Microscope, MoticAE31 & Olympus UApo/340 Objective	IonOptix, Westwood, MA, USA
PC	OPTIPLEX 790	DELL, Round Rock, TX, USA
Pumpe (peristaltisch)	REGLO-ICC	Ismatec, Wertheim, GER
Stimulator	MyoPacer EP Field Stimulator	IonOptix, Westwood, MA, USA
Temperatur Kontroll Instrument	2Ch micro, temperature controller	Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA
Proteinanalyse		
Dispergiergerät	Ultra-Turrax, T 10 basic	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, GER
Gel -und Blot Imager	UVP ChemStudio	Analytik Jena GmbH, Jena, GER
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Synergy™ Mx	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
Minizentrifuge	MiniSpin	Eppendorf, Hamburg, GER
Protein Detektions-System	SNAP i.d. 2.0	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Spannungsquelle für Elektrophorese	PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, GER

2.1.4 Software

Tabelle 4: Software

Programm	Hersteller
Graphpad Prism 9	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Ion Wizard 6.4.1.73	IonOptix, Westwood, MA, USA
VisionWorks Acquisition and analysis Version: 8.20.17096.9551	Analytik Jena GmbH, Jena, GER
Gen5 2.05 Mikroplatten-Software	BioTek, Winooski, VT, USA

2.1.5 Puffer

Tabelle 5: Puffer und Lösungen, die für die Isolation von Kardiomyozyten verwendet wurden

Puffer	Zusammensetzung
Puffer I	• 126 mM Natriumchlorid • 4,4 mM Kaliumchlorid • 1,0 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat ad 500 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser)
Puffer II	• 4 mM Natriumhydrogencarbonat • 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure • 30 mM 2,3-Butandion-monoxim • 11 mM Glukose • 50 ml Puffer I ad 1000 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser) pH-Wert: 7,3-7,35; sterile Filtration mit Porengröße von 0,2 µm
Puffer III	• 4 mM Natriumhydrogencarbonat • 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure • 11 mM Glukose • 25 ml Puffer I ad 500 ml DdH ₂ O (Millipore Wasser) pH-Wert: 7,3-7,35; sterile Filtration mit Porengröße von 0,2 µm
Kollagenaselösung	• 0,4 mg/ml Kollagenase Typ I (300 U/mg) • 20 ml Puffer II • 0,1 M Calciumchlorid Lösung (5 µl auf 20 ml)
Waschpuffer I	• 0,4 g (20 mg/ml) Albumin Rinderserum Fraktion V • 20 ml Puffer II • 1 M Calciumchlorid Lösung (2 µl auf 20 ml)
Waschpuffer II	• 0,2 g (20 mg/ml) Albumin Rinderserum Fraktion V • 10 ml Puffer II • 1 M Calciumchlorid Lösung (2µl auf 20 ml)

Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer III	• 0,2 g (20 mg/ml) Albumin Rinderserum Fraktion V • 5 ml Puffer II • 5 ml Puffer III • 1 M Calciumchlorid Lösung (5 µl auf 10 ml)

Tabelle 6: Puffer, die bei der Messung der isolierten Kardiomyozyten verwendet wurden

Puffer	Zusammensetzung
Ladepuffer	• 137 mM Natriumchlorid • 5,4 mM Kaliumchlorid • 0,5 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat • 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure • 5,5 mM Glukose ad 1000 ml DdH₂O (Millipore Wasser) pH-Wert: 7,3-7,35; sterile Filtration mit Porengröße von 0,2 µm • 1 M Calciumchlorid Lösung (frisch zugeben, 10 µl auf 10 ml)
Perfusionspuffer	• 137 mM Natriumchlorid • 5,4 mM Kaliumchlorid • 1,2 mM Calciumchlorid • 0,5 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat • 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure • 5,5 mM Glukose • 500 µM Probenecid ad 1000 ml DdH₂O (Millipore Wasser) pH-Wert: 7,3-7,35; sterile Filtration mit Porengröße von 0,2 µm

Tabelle 7: Puffer und Lösungen, die für die Proteinanalyse verwendet wurden (Herstellung der Herzlysate)

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	• 10 mM Tris(hydromethyl)aminomethan, pH 8,0 • 0,5 mM Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure • 0,5 % Triton X-100 • 0,1 % Desoxycholsäure • 0,1 % Natriumdodecylsulfat • 140 mM Natriumchlorid
Phosphataseinhibitor-Mix (100x)	• 200 mM Imidazol • 400 mM Kaliumnatriumtartrat • 500 mM Natriumfluorid
Lysepuffer für Herzgewebe	• 10 ml Lysepuffer • 100 µl Phosphataseinhibitor-Mix (100x) • 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid • 10 mM Benzamidin
3 x Lämmli-puffer	• 1,5 mg Bromphenolblau • 0,6 g Natriumdodecylsulfat • 3 ml Glycerol • 3,9 ml Tris(hydromethyl)aminomethan (50 mM) ad 10 ml DdH₂O (Millipore Wasser) pH-Wert: 6,8

Tabelle 8: Puffer und Gele, die für die Proteinanalyse verwendet wurden (Gelelektrophorese)

Puffer bzw. Gel	Zusammensetzung
Trenngel (15 %)	• 2,13 ml DdH₂O (Millipore Wasser) • 1,97 ml Trenngel Puffer • 3,79 ml Acrylamid / Bis-acrylamid (30 %) • 3,9 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin • 51,1 µl Ammoniumpersulfat (100mg/ml)
Trenngel Puffer	• 0,4 % Natriumdodecylsulfat • 3 M Tris(hydromethyl)aminomethan pH-Wert: 8,8
Sammelgel	• 2,06 ml DdH₂O (Millipore Wasser) • 825 µl Sammelgel Puffer • 412,5 µl Acrylamid / Bis-acrylamid (30 %) • 3,3 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin • 33 µl Ammoniumpersulfat (100 mg/ml)
Sammelgel Puffer	• 0,4 % Natriumdodecylsulfat • 1M Tris(hydromethyl)aminomethan pH: 6,8
10 x Laufpuffer	• 250 mM Tris(hydromethyl)aminomethan • 1,9 mM Glycin • 1 % Natriumdodecylsulfat

Tabelle 9: Puffer und Lösungen, die für die Proteinanalyse verwendet wurden (Western blot)

Puffer bzw. Lösungen	Zusammensetzung
10 x TBS	• 100 mM Tris(hydromethyl)aminomethan • 1,5 mM Natriumchlorid pH-Wert: 7,6
1 x TBS-T	• 1 x TBS (100ml) • 0,1% Tween 20 (1ml) ad 1000 ml DdH₂O (Millipore Wasser)
1 x Western blot Transferpuffer	• 200 ml Methanol • 100 ml 10 x Transferpuffer ad 1000 ml DdH₂O (Millipore Wasser)
10 x Transferpuffer	• 15,15 g Tris(hydromethyl)aminomethan • 56,25 g Glycin
Blockmilch	• Milchpulver in TBS-T Puffer (0,5 %; 5 %)

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

In den folgenden Experimenten diente die Maus als Modellorganismus. Sie bietet den Vorteil, dass gut erforschte genetische Modelle für T2DM existieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Leptin-Rezeptor-defizienten db/db-Mäuse als Modellorganismus für T2DM herangezogen.

Die Organisationsnummer der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität für durchgeführte Organentnahmen lautet O95/13.

Alle Experimente fanden unter der Berücksichtigung der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes statt.

2.2.1.1 Verwendete Tiere

Die verwendeten Tiere entstammten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland. Sie wurden dort unter standardisierten Bedingungen gehalten und gezüchtet.

Für die Untersuchung des PKC-Aktivators PMA wurden männliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Zu dem Zeitpunkt der Experimente waren die Tiere 8 bis 9 Wochen alt. Die Mäuse stammten direkt von der Firma Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich).

Veränderungen des Leptin-Signalwegs stehen im engen Zusammenhang mit Stoffwechselkrankheiten wie Fettleibigkeit und T2D [50]. Leptin-defiziente ob/ob-Mäuse und Leptin-Rezeptor-defiziente db/db-Mäuse stellen diesbezüglich häufig verwendete Mausmodelle dar. Bei beiden Modellorganismen bildet sich eine Fettleibigkeit aus. Gegensätzlich zu der leichten Insulinresistenz von ob/ob-Mäusen entwickeln db/db-Mäuse einen ausgeprägten, Lebenszeit verkürzenden DM [50]. Dieses hyperglykämische Syndrom ähnelt dem DM des Menschen [51]. In dieser Arbeit dienten somit die Leptin-Rezeptor-defiziente db/db-Mäuse als Modellorganismus für T2DM. Bereits im Alter von 4 Wochen nahm bei den db/db-Mäusen sowohl das Körpergewicht als auch die Plasmainsulinkonzentration zu. Nach 7 Wochen ist die Blutzuckerkonzentration erhöht und eine Insulinresistenz lag vor [15, 51]. Als Kontrollgruppe wurden männliche db/+ -Mäuse ohne diabetische Stoffwechsellage verwendet. Diese beiden genetischen Modellorganismen wurden von der Firma Charles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, Massachusetts, USA) und aus der Zucht der Arbeitsgruppe in der ZETT bezogen. Die Tiere wurden im Alter von 10 bis 12 Wochen untersucht.

2.2.1.2 Gewichtsbestimmung und Glukosemessung

Sowohl von den Leptin-Rezeptor-defizienten db/db-Mäusen als auch den db/+ -Mäusen wurde unmittelbar vor der zervikalen Dislokation das Körpergewicht bestimmt. Zudem wurde nach zervikaler Dislokation und Eröffnen des Thorax die Glukosekonzentration im Blut gemessen. Dies diente der Sicherstellung der diabetischen Stoffwechsellaage bei den db/db-Mäusen.

2.2.2 Messungen von isolierten Kardiomyozyten

Im Folgenden wird die Isolation der Kardiomyozyten, die Messung sowohl des Ca^{2+} -Kreislaufs als auch der Sarkomerlänge, die Auswahlkriterien und Auswertung der Kardiomyozyten und ein exemplarischer Messablauf beschrieben.

2.2.2.1 Isolation der Kardiomyozyten

Die Mäuse wurden mindestens 15 Minuten (Min) vor der Organentnahme mittels 400 I.E (Internationale Einheiten) Heparin-Natrium intraperitoneal heparinisiert. Nach zervikaler Dislokation wurde das Herz aus dem Thorax entnommen und die Aorta innerhalb von 5 Min auf eine Kanüle aufgezogen. Mithilfe dieser konnte das Herz an ein Perfusionssystem angeschlossen werden. Die Kanüle durfte nicht zu weit in die Aorta reichen, damit eine Spülung des Gewebes mit Puffer 2 über die Koronargefäße möglich war. Hierdurch wurde das Blut aus dem Herzen entfernt, sichtbar durch 2 initiale rote Tropfen und die rasch anschließende blasse Farbe des Myokards (Abb. 5).

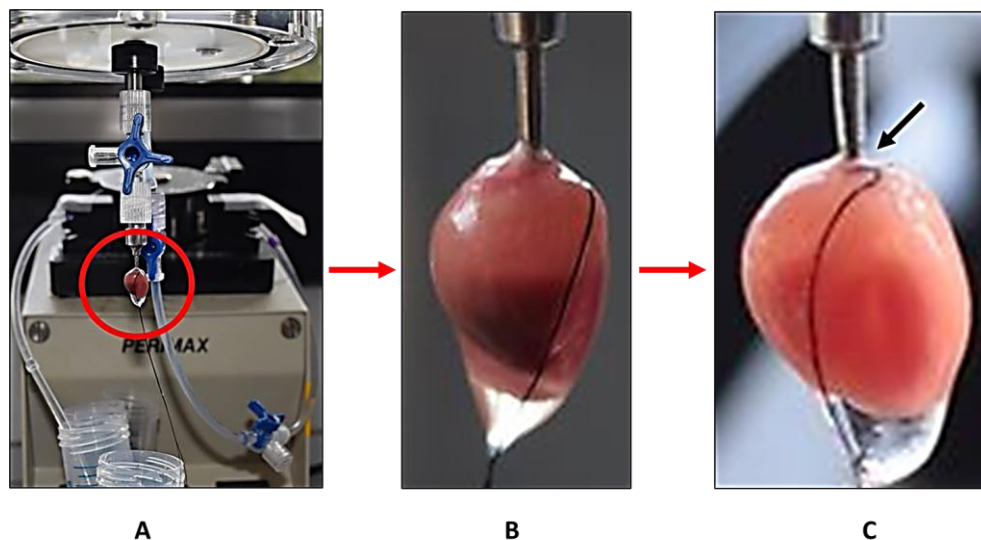


Abb. 5: Kanülierung der Aorta ascendens

Bild A zeigt als Gesamtüberblick das Perfusionssystem mit aufgehängtem Herz (siehe roter Kreis). Bild B und C sind ein Ausschnitt hiervon und zeigen die Herzfarbe vor (A) und nach (B) Beginn der Perfusion. Die Aorta ist mit einem feinen schwarzen Faden an der Kanüle befestigt (schwarzer Pfeil). Die Kanüle ist wiederherum an das Perfusionssystem (siehe Bild A) angeschlossen.

Anschließend wurde das Herz mit einer Kollagenaselösung für 6 Min perfundiert. Die Temperatur des Puffers 2 und der Kollagenaselösung betrug während der gesamten Perfusionszeit konstante 39,1 °C. Im Anschluss wurde das Herz in eine Petrischale mit Waschpuffer 1 gelegt und die Vorhöfe entfernt. Der linke Ventrikel wurde in drei, am Apex verbundene Teile geschnitten. Das Myokard wurde in einem 50 ml Röhrchen mit Waschpuffer 1 bei 36,8 °C für 10 Min inkubiert. Nach Überführung in eine Petrischale wurde das verdaute Herzgewebe mit einer feinen Schere zerkleinert. Um die einzelnen Kardiomyozyten aus dem Gewebe zu isolieren, wurde mit einer Plastikpipette das Gewebslysate vorsichtig aufgesogen und wieder abgelassen. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, bis sich eine Trübfärbung der Lösung einstellte. Die Kardiomyozyten lagen nun einzeln in Lösung vor. Die Zelllösung wurde dann durch ein Nylonnetz in ein Röhrchen gegeben, um so die übrig gebliebenen Gewebestücke von den isolierten Kardiomyozyten zu separieren. Die abfiltrierten Gewebestücke wurden verworfen. Nach 15 Min Sedimentation bildete sich in der Zelllösung am Boden des Reaktionsgefäßes ein Pellet. Der restliche Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es folgte ein zweifacher Waschvorgang zur weiteren Aufreinigung der Kardiomyozyten. Zu dem Pellet wurde zuerst etwas Waschpuffer 2 gegeben, mit einer Plastikpipette vorsichtig resuspendiert und dann gänzlich in Waschpuffer 2 überführt. Nach 10 Min Sedimentationszeit bildete sich erneut ein Pellet. Wieder wurde der Überstand verworfen und das gleiche Vorgehen wurde mit Waschpuffer 3 wiederholt. Die Zusammensetzungen der in 2.2.2.1 verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

2.2.2.2 Messung des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufs

Die Messung des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufs erfolgte mithilfe der Fura-2-Methode und der im nachfolgenden Unterkapitel beschriebenen Aufbereitung der Kardiomyozyten. Zudem wird der Versuchsaufbau mit Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration veranschaulicht.

2.2.2.2.1 Fluoreszenzindikator Fura-2

Der Fluoreszenzindikator Fura-2 dient der Darstellung des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufs. Bindet Fura-2 an Acetoxymethylester (AM), entsteht Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM). Dieses Derivat ist membranpermeabel und kann in das Zellinnere intakter Kardiomyozyten eindringen. Intrazellulär werden die vier Acetoxymethylestergruppen mittels zellulärer Esterasen abgespalten. Es entsteht Fura-2, welches die Zellmembran nicht passieren kann und daher im Zellinneren der Kardiomyozyten verbleibt [52]. Fura-2 kann mit Ca^{2+} -Ionen über die frei gewordenen Carboxylat-Gruppen einen Chelatkomplex eingehen und somit zur Bestimmung von intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen verwendet werden [53].

Der Fluoreszenzfarbstoff hat folgende Besonderheit: Fura-2 weist zwei Fluoreszenzmaxima auf, bei denen anregendes Licht eine maximale Fluoreszenzantwort generiert.

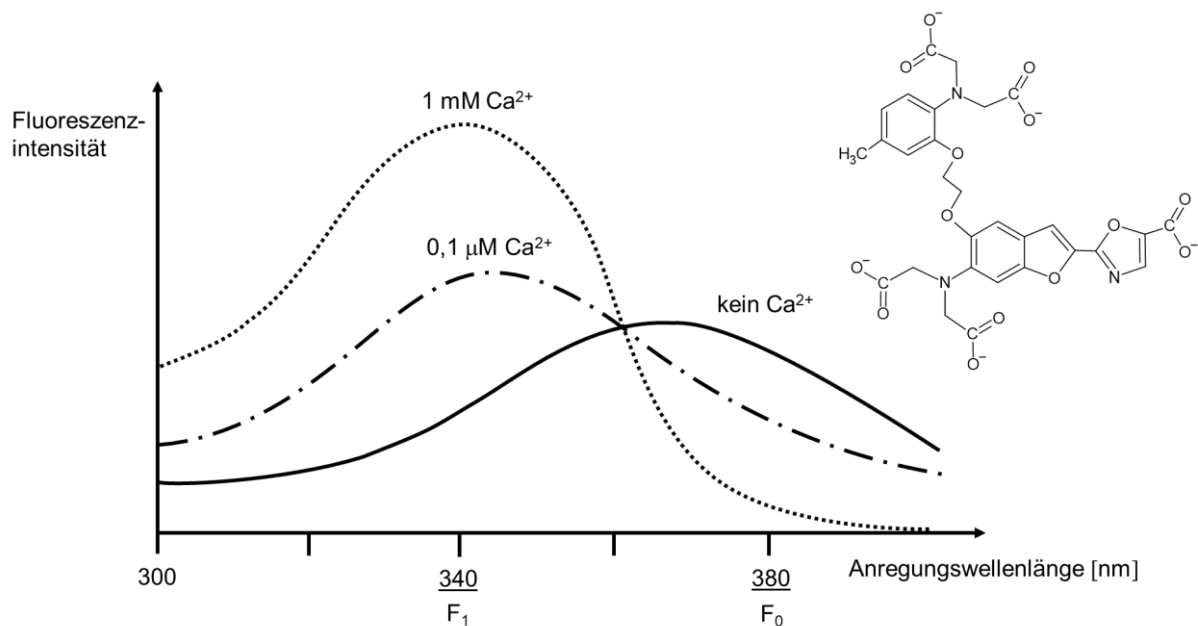


Abb. 6: Fluoreszenzanregungsspektren von Fura-2 bei verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen
 Modifizierte Abbildung nach [54], ergänzt um die Strukturformel von Fura-2, Ca²⁺ = Calcium-Ionen, mM = Millimolar, μM = Mikromolar, nm = Nanometer, F₁ = Anregungswellenlänge von 340 nm, F₀ = Anregungswellenlänge von 380 nm

Liegt Fura-2 ohne Ca²⁺ vor, wird bei einer Anregungswellenlänge von 370-380 nm ein Fluoreszenzmaximum hervorgerufen. Dies ist in der Abb. 6 durch die schwarze durchgängige Kurve dargestellt. Steigt die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration an und damit auch der Anteil an Ca²⁺-gesättigtem Fura-2, sinkt die erforderliche Wellenlänge für das Fluoreszenzmaximum. Die Anregungswellenlänge liegt dann bei 340 bis 350 nm. Mit steigender Ca²⁺-Konzentration ist die Fluoreszenzintensität des Maximums generell höher [53].

Die isolierten Kardiomyozyten wurden in den folgenden Experimenten bei einer Wellenlänge von 340 nm (F₁) und 380 nm (F₀) gemessen.

2.2.2.2.2 Aufbereitung der Kardiomyozyten

Nach der Isolation der Kardiomyozyten wurden diese in Ladepuffer überführt. Es folgte die Beladung mit Fura-2 AM für 15 Min und anschließend ein doppelter Waschvorgang mit Ladepuffer für jeweils 5 Min. Danach wurden die Zellen in Perfusionspuffer gegeben. Da Fura-2 AM lichtsensibel ist, erfolgten die beschriebene Aufbereitung der Kardiomyozyten und die anschließenden Messungen im Dunklen.

2.2.2.2.3 Versuchsaufbau

Für die Messung des myozytären Ca²⁺-Kreislaufs und der Sarkomerfunktion wurde die Messkammer mit Perfusionspuffer aufgefüllt und 3 Tropfen der Zellsuspension hinzupipettiert.

Eine peristaltische Pumpe transportierte konstant frischen Puffer in das Zellbad, damit die Kardiomyozyten ständig umspült wurden. Ein Heizer regulierte die Temperatur des zulaufenden Puffers und hielt sie bei 37 °C. Mithilfe einer weiteren Pumpe wurde der Puffer am Ende der Messkammer wieder abgesaugt. Sowohl der Zulauf als auch der Ablauf erfolgte stets bei konstantem Druck und mit der gleichen konstanten Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min.

Die peristaltische Pumpe besitzt 3 unabhängige Kanäle, die es ermöglichten, die Kardiomyozyten mit verschiedenen Lösungen zu umspülen:

- bei basaler, elektrischer Stimulation: Perfusionspuffer
- bei Dimethylsulfoxid (DMSO)-Stimulation: DMSO gelöst in Perfusionspuffer (1µM)
- bei RBX-Stimulation: RBX gelöst in DMSO und Perfusionspuffer (1µM)

2 Elektroden reichten in die Messkammer hinein und wurden von der Zelllösung umgeben. Durch die elektrische Stimulation mit 10 Volt (V) bei 0,5 Hertz (Hz) kontrahierten die isolierten Kardiomyozyten in der Zelllösung taktweise. Ein Mikroskop ermöglichte es, die Kontraktion der Zellen zu beobachten. Während laufender elektrischer Stimulation wurde unter Sicht eine geeignete Zelle für die folgende Messung ausgewählt. Eine Mikroskopkamera ermöglichte es, den ausgewählten Kardiomyozyten auf einem angeschlossenen Bildschirm abzubilden. Es folgte eine Feinjustierung, in der die Zelle möglichst scharf und den Messbereich ausfüllend eingestellt wurde. Während der Messung wurden zeitgleich die Veränderungen der Sarkomere und des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufs unter dauerhaft aktivierter elektrischer Stimulation aufgezeichnet.

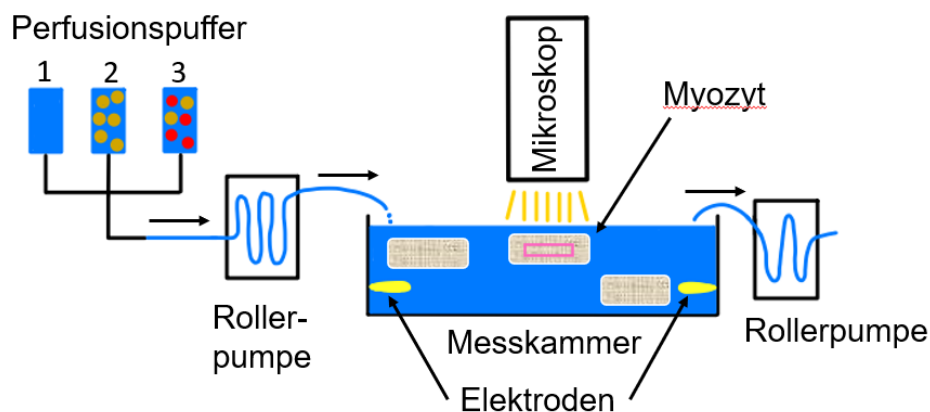


Abb. 7: Ca^{2+} -Messplatz

Die isolierten Kardiomyozyten wurden ständig mit 37 °C erwärmter, frischer Pufferlösung umspült. Je nach Experiment konnte zwischen Kanal 1-3 gewechselt werden. 1.Kanal: nur Perfusionspuffer, 2.Kanal: Perfusionspuffer mit DMSO, 3.Kanal: Perfusionspuffer mit DMSO und RBX, Zulauf und Ablauf wurden über Rollerpumpen in Druck und Geschwindigkeit reguliert. Die elektrische Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte mithilfe von Elektroden, die sich links und rechts an den Seiten des Myozytenbads befanden (in der Abb. 7 in Gelb dargestellt). Der Myozyt wurde in dem Bereich der *region of interest* (ROI), dargestellt als violette Box, gemessen. DMSO = Dimethylsulfoxid, RBX = Ruboxistaurin

2.2.2.2.4 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Die elektrische Stimulation öffnet spannungsaktivierte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Diese sitzen auf der Zelloberfläche von ventrikulären Kardiomyozyten und lassen nach Öffnung einen Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär nach intrazellulär zu. Durch das einströmende Ca^{2+} kommt es zu einer schnellen Aktivierung der RyR des SR. Es folgt die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR in das Zytosol [55]. Das freigesetzte Ca^{2+} kann dann an Fura-2 binden.

Fura-2 dient als ratiometrischer Indikator zur Visualisierung der Veränderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Liegt Fura-2 ungebunden vor, beträgt das Fluoreszenzmaximum 380 nm. An Ca^{2+} gebundenes Fura-2 hingegen hat bei der Anregungswellenlänge von 340 nm das Fluoreszenzmaximum. Die Fluoreszenzintensivität wurde bei 340 nm (F_1) und bei 380 nm (F_0) gemessen. Das Verhältnis dieser beiden Parameter zueinander wird mit dem Quotienten F_1/F_0 ausgedrückt. Mithilfe dieser ratiometrischen Betrachtung können die Veränderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen dargestellt werden. Zudem wird der Einfluss von möglichen Ungleichheiten in der Fura-2 Beladung der Zellen oder Unterschieden in der Zelldicke minimiert [56].

Während der Messung wurde mit einer Frequenz von 500 Hz zwischen den beiden Wellenlängen gewechselt. Innerhalb einer Sekunde konnten an 250 Messstellen die Fluoreszenzintensivität bei 340 nm und 380 nm bestimmt werden. Der Wechsel zwischen diesen beiden Wellenlängen erlaubt demnach eine Bewertung von dem Verhältnis von Ca^{2+} -gebundenem Fura-2 zu freiem Fura-2. Eine hohe zeitliche Auflösung der Ca^{2+} -Kinetik ist möglich.

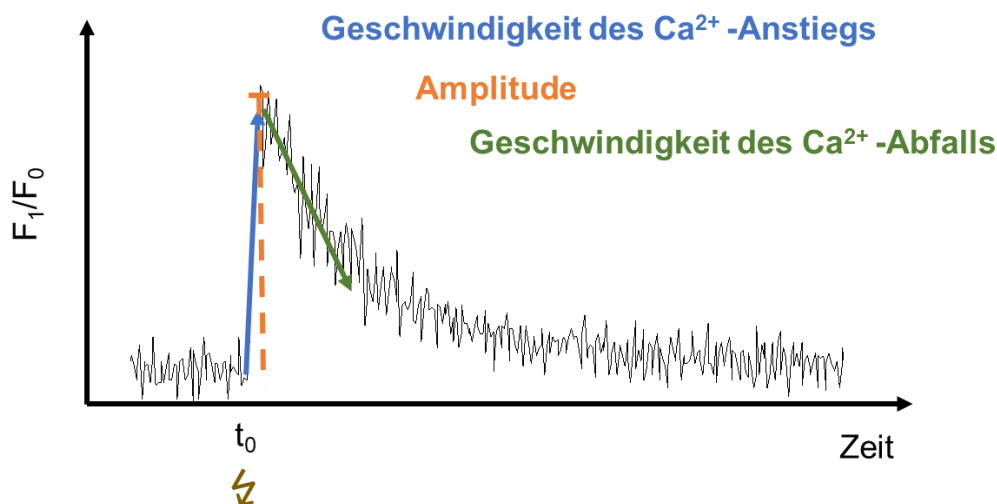


Abb. 8: Repräsentativer Ca^{2+} -Transient

Ca^{2+} = Calcium-Ionen, F_1 = Anregungswellenlänge von 340 nm, F_0 = Anregungswellenlänge von 380 nm, Symbol Blitz = elektrische Stimulation, t_0 = Zeitpunkt der elektrischen Stimulation

Die elektrische Stimulation zum Zeitpunkt t_0 führt zu einem steilen Anstieg des Verhältnisses F_1/F_0 . Das freigesetzte intrazellulär vorliegende Ca^{2+} bindet an das Fura-2 und erhöht damit den Anteil von F_1 . Die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR wird in diesem Anstieg dargestellt. Die insgesamt freigesetzte Menge an Ca^{2+} kann an der Amplitude abgelesen werden. Je größer die Amplitude, desto mehr Ca^{2+} befindet sich im Zytosol. Mit dem Einleiten der Diastole wird der Ca^{2+} -Spiegel intrazellulär gesenkt. Die SERCA2a pumpt aktiv den größten Teil des Ca^{2+} zurück in das SR. Über den Natrium-Calcium-Antiporter (NCX) und die Plasmamembran Calcium-ATPase (PMCA) verlässt das Ca^{2+} die Zelle nach extrazellulär. Der Abfall von F_1/F_0 spiegelt die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination wider. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die SERCA zwischen 90 und 96 % der gesamten Elimination ausmachen [57]. Fura-2 liegt vorwiegend ungebunden vor, das Fluoreszenzmaximum verschiebt sich Richtung F_0 . Mit Beginn der elektrischen Stimulation wurden die Zellen maximal 15 Min gemessen. Anschließend wurden die Kardiomyozyten aus der Messkammer abgesaugt und frische Zellen der resuspendierten Zelllösung hinzugegeben.

2.2.2.3 Messung der Sarkomerlänge

Das durch die elektrische Stimulation intrazellulär freigesetzte Ca^{2+} geht eine Bindung mit cTnC ein. Dadurch werden die Aktinbindungsstellen freigegeben und es folgt eine Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten. Diese führt zu einer mechanischen Kontraktion, welche in der Veränderung der Sarkomerlängen sichtbar ist.

Die Mikroskopkamera ermöglichte es, die Veränderungen an den Sarkomeren während der elektrischen Stimulation zu erfassen, indem sie die Z-Streifen der Sarkomere optisch erfasst und mittels Fourier-Transformation in jedem Bild die Sarkomerlänge bestimmt. Mit einer Bildfrequenz von 1000 pro Sekunde wurden in einer Videoaufnahme die kontraktile Amplitude, die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit als Parameter in Echtzeit ermittelt. Vor der Aufnahme wurde eine *region of interest* (ROI) aus einem Bereich der Zelle festgelegt. Die ROI wurde für jede Messung neu positioniert und konnte in ihrer Länge und Breite variieren. Bevorzugt wurde für die ROI ein Bereich gewählt, indem das gestreifte Muster der Sarkomere deutlich zu sehen war.

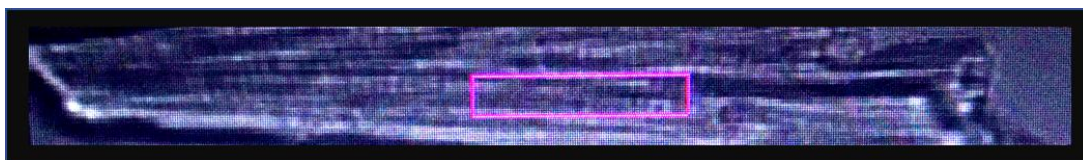


Abb. 9: Isolierter Kardiomyozyt mit gestreiftem Muster und definierter *region of interest* (ROI) (violette Box)

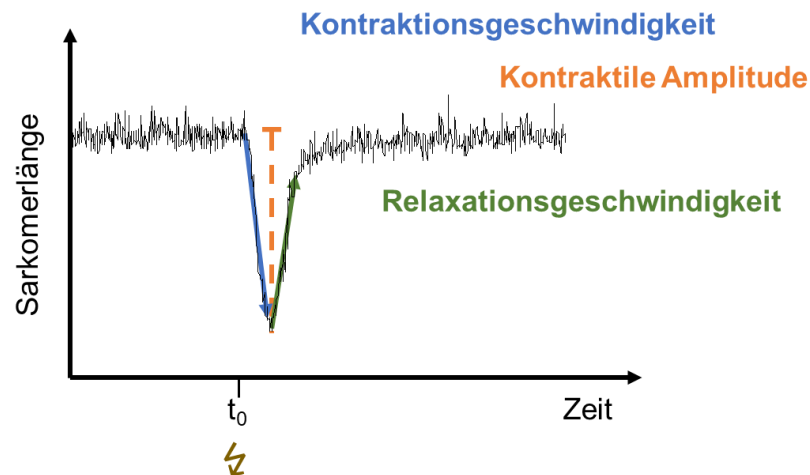


Abb. 10: Repräsentative Sarkomerfunktion

Symbol Blitz = elektrische Stimulation, t_0 = Zeitpunkt der elektrischen Stimulation

Die elektrische Stimulation zum Zeitpunkt t_0 führt zu einer Kontraktion der Sarkomere. Am Kurvenminimum ist die maximale Kontraktion erreicht, die Sarkomere sind zu diesem Zeitpunkt maximal verkürzt. Die Größe der kontraktiven Amplitude ist die Differenz zwischen der basalen Sarkomerlänge und der Sarkomerlänge nach maximaler Kontraktion. Die Kontraktionsgeschwindigkeit spiegelt wider, wie schnell das Kurvenminimum und damit die maximale Kontraktion der Sarkomere erreicht wird. Die Relaxationsgeschwindigkeit steht für die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Ausgangslänge der Sarkomere vor der elektrischen Stimulation.

2.2.2.4 Auswahlkriterien für geeignete Kardiomyozyten

Die Ca^{2+} -Transienten und die Sarkomerlängen wurden von jedem gemessenen Kardiomyozyten parallel aufgenommen. Es wurden Kardiomyozyten ausgewählt, die isoliert, also nicht als Gruppe, vorlagen. Außerdem mussten sie für die Messung der Sarkomerlängen ein deutlich erkennbares Streifen-Muster und eine ungehinderte Kontraktion und Relaxation aufweisen.

Für die Bestimmung des Ca^{2+} -Kreislaufs sollte das Maximum des Ca^{2+} -Transienten ohne Nebenmaxima erreicht werden. Der Aufstrich erfolgte daher nahezu senkrecht. Der Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zeichnete sich ebenfalls nahezu linear, auf jeden Fall stufenfrei ab.

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

Mithilfe der Software IonWizard 6.4 erfolgte die Auswertung der Messungen. Pro Kardiomyozyt wurden hierfür mindestens 10 repräsentative Ca^{2+} -Transienten und 10 Sarkomerfunktionen ausgewählt. Diese wurden jeweils aufaddiert und danach gemittelt,

um so repräsentative Parameter wie z.B. die Amplitude und Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeit des Ca^{2+} pro Kardiomyozyt zu erhalten.

2.2.2.5.1 Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung

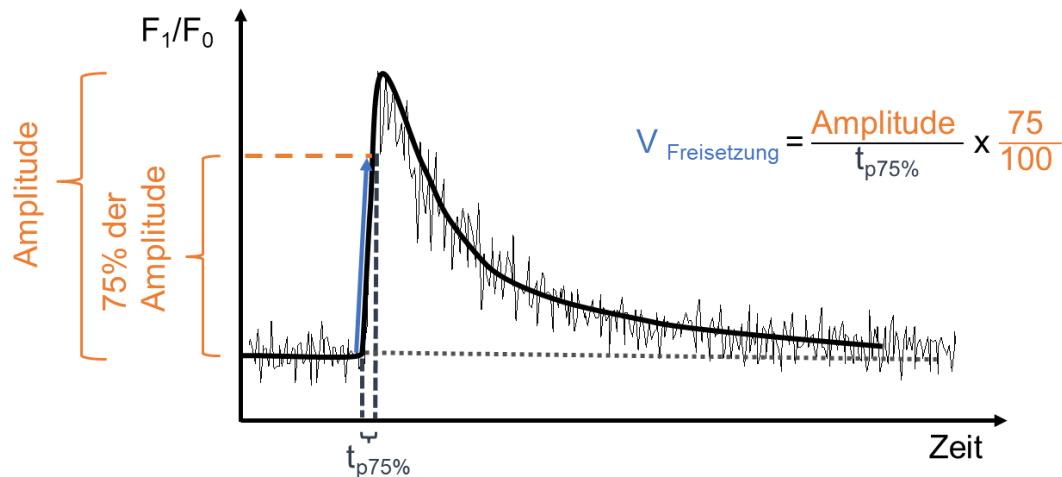


Abb. 11: Ermittlung der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung

$t_{p75\%}$ = Zeit, nach der 75 % des *peaks* erreicht sind, $V_{\text{Freisetzung}}$ = Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung, F_1 = Anregungswellenlänge von 340 nm, F_0 = Anregungswellenlänge von 380 nm

Mit Beginn der elektrischen Stimulation steigt der Ca^{2+} -Transient nahezu linear an. In diesem Aufstrich der Kurve wird die Geschwindigkeit, mit der das Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt wird, dargestellt. Für die Ermittlung der exakten Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung ($V_{\text{Freisetzung}}$) wurde die Amplitudengröße, zu der 75 % des Maximums erreicht war, in Bezug zu der Zeit $t_{p75\%}$ gesetzt.

2.2.2.5.2 Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination

Nach dem Maximum des Ca^{2+} -Transients nimmt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in der Diastole wieder ab. Der nahezu lineare Abfall bildet die Schnelligkeit ab, mit der das Ca^{2+} eliminiert wird. Die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination ($V_{\text{Elimination}}$) wurde mittels der Zeit $t_{bl75\%}$ berechnet, nach der das Maximum des Transients um 75 % gefallen war.

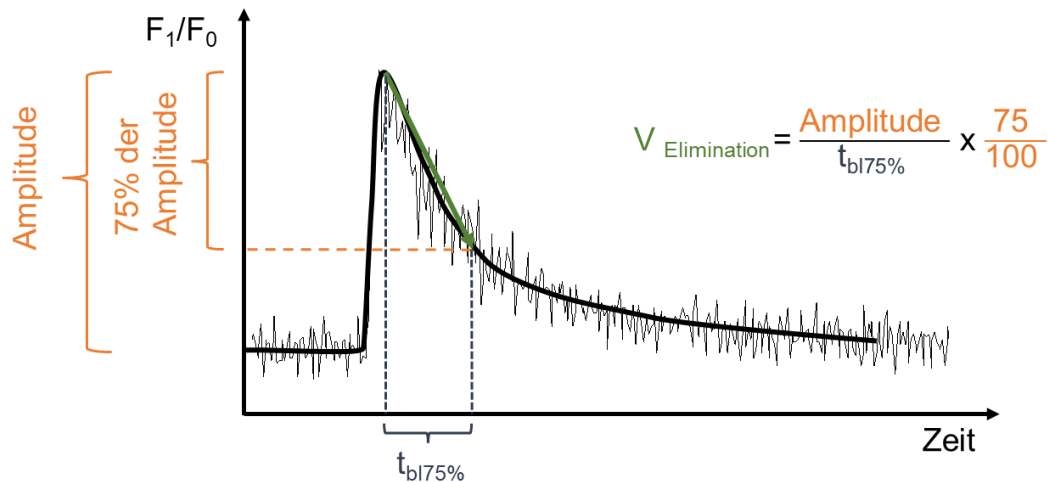


Abb. 12: Ermittlung der Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination

$t_{bl75\%}$ = Zeit, nach der 75 % der *baseline* erreicht sind, $V_{\text{Elimination}}$ = Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Elimination, F_1 = Anregungswellenlänge von 340 nm, F_0 = Anregungswellenlänge von 380 nm

2.2.2.5.3 Kontraktionsgeschwindigkeit der Sarkomere

Nach der elektrischen Stimulation fällt die Länge der Sarkomere nahezu linear auf ein Minimum ab. Die Sarkomere sind nun maximal verkürzt, d.h. am stärksten kontrahiert. Die kontraktile Amplitude erreicht ihren größten Wert. Die Geschwindigkeit des Abfalls steht für die Kontraktionsgeschwindigkeit ($V_{\text{Kontraktion}}$) der Sarkomere. Sie berechnet sich aus der Zeit $t_{K75\%}$, zu der die Sarkomere um 75 % verkürzt waren.

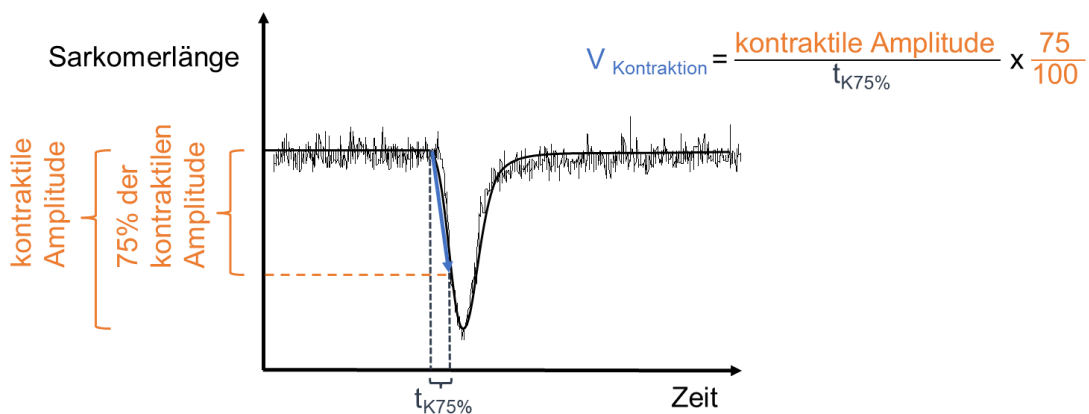


Abb. 13: Kontraktionsgeschwindigkeit der Sarkomere

$t_{K75\%}$ = Zeit, nach der 75 % der maximalen Kontraktion erreicht sind, $V_{\text{Kontraktion}}$ = Kontraktionsgeschwindigkeit

2.2.2.5.4 Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere

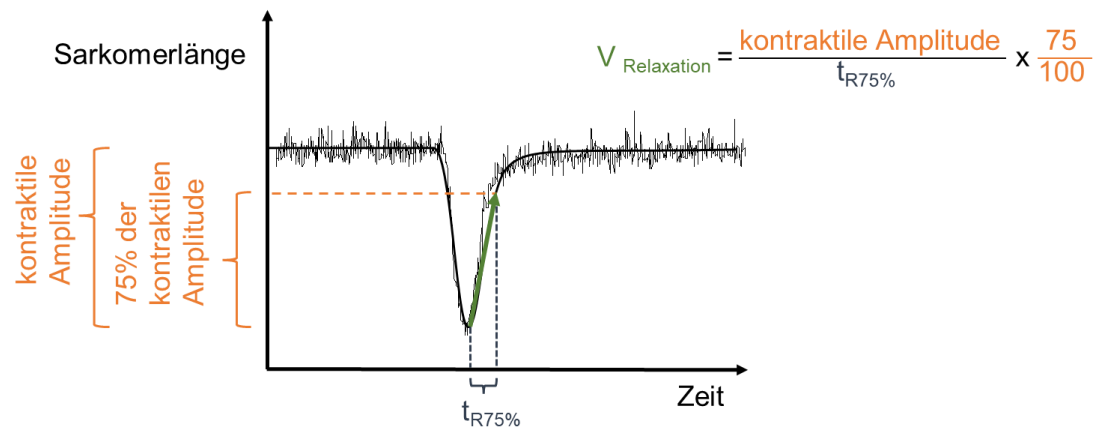


Abb. 14: Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere

$t_{R75\%}$ = Zeit, nach der 75 % der Relaxation erreicht sind, $V_{\text{Relaxation}}$ = Relaxationsgeschwindigkeit

Nach dem Erreichen des Minimums steigt die Sarkomerlänge wieder an. Die Sarkomere verlängern sich und die kontraktile Amplitude nimmt ab. Die Zeit $t_{R75\%}$ zu der die Sarkomerfunktion wieder auf 75 % der Relaxation angestiegen war, steht somit für die Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere.

2.2.2.6 Exemplarischer Messablauf

Die Messung der isolierten Kardiomyozyten am IonOptix-Messplatz erfolgte nach einem der folgenden zwei Protokolle:

1.) Die Zellen wurden nach der Isolation zunächst für eine festgelegte Dauer (zwischen 5 und 120 Min) in Pufferlösung mit PMA, RBX oder Kontrolllösung inkubiert. Bei der anschließenden Messung wurden sie elektrisch stimuliert und es wurden mindestens 10 Transienten für die spätere Datenanalyse aufgezeichnet.

In Vorversuchen wurde mit diesem Protokoll und den im folgenden Kapitel erläuterten Proteinanalysen eine geeignete Konzentration und Dauer der Behandlung ermittelt, in der Effekte der PKC-Stimulation (PMA) bzw. PKC-Inhibition (RBX) dargestellt werden können.

2.) Die Zellen wurden ohne Vorbehandlung direkt nach der Isolation gemessen. Wie in Abb. 15 dargestellt, wurden nach Beginn der elektrischen Stimulation zunächst mindestens 10 Transienten unter Basalbedingungen aufgezeichnet. Unter fortlaufender Stimulation und Datenaufzeichnung wurde dann über ein angeschlossenes Perfusionssystem die Pufferlösung, in der sich die gemessene Zelle befand, gegen Puffer ohne oder mit RBX (10^{-6} mol/l) ausgetauscht. 10 Min nach Beginn der Behandlung wurden in der späteren Datenanalyse erneut 10 repräsentative Transienten ausgewertet (Zeitpunkt t_{10}) und diese Werte mit den unter Basalbedingungen 10 Min zuvor gemessenen Werten (Zeitpunkt t_0) verglichen.

Pro isoliertem Herzen wurde eine vergleichbare Anzahl Kardiomyozyten mit und ohne RBX gemessen, jeweils zu t_0 und t_{10} . Die Messungen der Kardiomyozyten mit und ohne RBX-Behandlung fanden jeweils abwechselnd statt, um gleiche zeitliche Bedingungen zu gewährleisten.

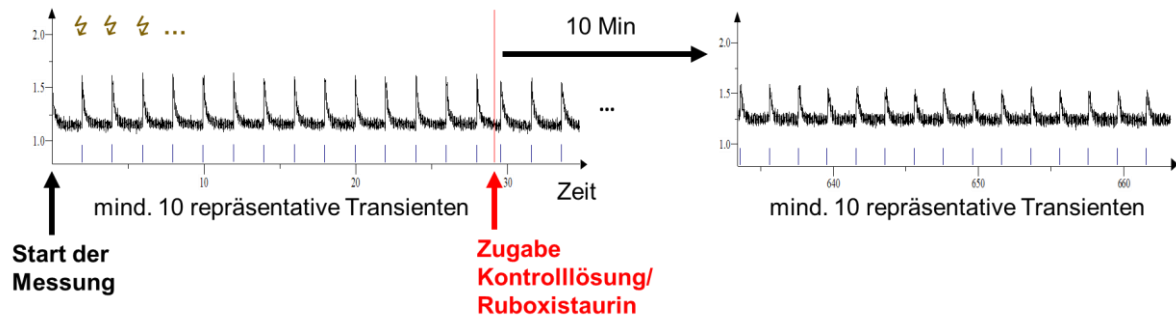


Abb. 15: Exemplarischer Messablauf

Nach der Aufzeichnung von 10 repräsentativen Transienten erfolgte die Zugabe einer Kontrolllösung bzw. des Proteinkinase C Inhibitors RBX für 10 Min. Nach 10 Min Stimulation wurden erneut 10 repräsentative Transienten gemessen.

F_1/F_0 = Fluoreszenz bei 340nm/380nm, Symbol Blitz = elektrische Stimulation der Kardiomyozyten

Der hier gezeigte Versuchsablauf ermöglichte es, die gleiche Zelle sowohl zuerst ohne als auch nach Stimulation mit der Kontroll- oder RBX-Lösung zu messen. Mögliche Nebeneffekte und Zellunterschiede konnten so minimiert werden und erhöhten die Aussagekraft des Stimulationseffektes. Zur Analyse der aufgezeichneten Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerfunktionen diente als Methodik die IonWizard Software 6.4 (Kapitel 2.2.2.5).

2.2.3 Proteinanalyse mittels Western blot

Die Analyse der Proteine der Kardiomyozyten erfolgte mithilfe eines Western blots. Der Western blot ist ein weit verbreitetes analytisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Das Proteingemisch wird zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran übertragen (*blotting*). Mit entsprechenden Antikörpern lassen sich nun die aufgetrennten, jeweils spezifischen Proteinbanden nachweisen. Die methodischen Schritte sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

2.2.3.1 Herstellung des Lysats

Die reine, isolierte Kardiomyozytenfraktion wurde nach Verwerfen des Überstandes von Waschpuffer 3 in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei einer Temperatur von $-80^\circ C$ gelagert. Für die Herstellung des Herzlysats wurden zu den tiefgefrorenen Herzgeweben jeweils 200 μl Lysepuffer für Herzgewebe gegeben. Anschließend wurden die Proben mit

einem Ultra-Turrax für 10 Sekunden unter Kühlung auf Eis mechanisch zerkleinert. Die 15-minütige Zentrifugation des Homogenats erfolgte mit einer Beschleunigung von 10000 $\times g$ bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übernommen und das Pellet verworfen.

60 μl des Überstandes wurden jeweils mit 30 μl des Lämmli-Puffers versetzt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C eingelagert. Der Rest wurde sowohl unverdünnt als auch 1:1 mit ddH₂O verdünnt in eine 96-well Platte pipettiert. Hiermit erfolgte die Proteinbestimmung mit der BCA-Methode.

2.2.3.2 Quantitative Bestimmung der Protein-Menge mittels BCA-Methode

Zunächst wurde ein BCA-Reagenz bestehend aus Reagenz a und Reagenz b des gebrauchsfertigen *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher) im Verhältnis von 50:1 gemischt.

Zu 25 μl der Zelllysate wurden 200 μl des Arbeitsreagens gegeben. Die Standardisierung erfolgte mit einer Verdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin. Die Proben wurden zugedeckt bei 37 °C für 30 Min geschwenkt. Die quantitative Bestimmung der Protein-Mengen fand photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät statt.

2.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Das Proteingemisch wurde mit einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Molekülgröße nach aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel bestand aus einem 15%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel. Jede Tasche des Gels wurde anschließend mit der gleichen Proteinmenge beladen. Als Referenz lief zudem ein Molekulargewichtsmarker mit. Nach der 20-minütigen Einlaufphase wurden die Spannung des elektrischen Feldes von 80 V auf 150 V erhöht. Es folgte die Trennphase für weitere 40 Min.

2.2.3.4 Der Western blot

Nach der Abtrennung des Sammelgels vom Trenngel erfolgte das Übertragen (*blotting*) des Gels auf die Membran. Hierfür wurde eine Art Sandwich gebaut (Abb. 16). Zunächst wurde die Membran 30 Sekunden mit 100%igem Methanol benetzt und somit aktiviert. Nach Spülung mit Transferpuffer wurde die Membran luftblasenfrei auf das Gel gelegt und von beiden Seiten mit 3-lagigem Filterpapier und Blot-Schwämmen bedeckt. Der Aufbau des hier beschriebene Transferstapels wurde in Blotpuffer durchgeführt.

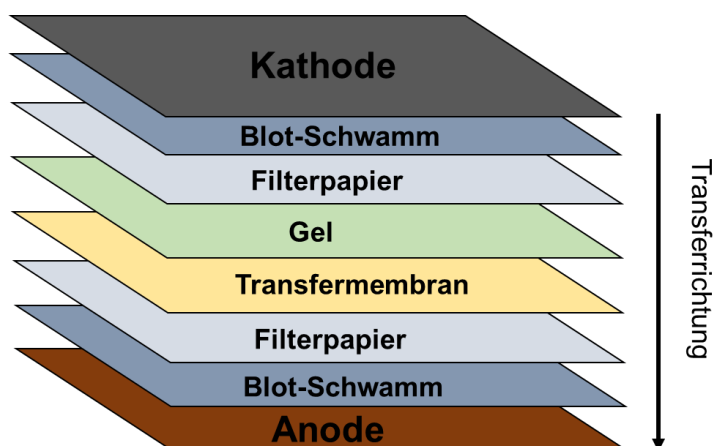


Abb. 16: Schematischer Transferstapel

Nach Überführung des Transferstapels in die Western blot-Kammer wurde diese mit Transferpuffer aufgefüllt. Für die richtige Orientierung lag die Transfermembran näher an der Anode und das Gel befand sich näher zur Kathoden-Seite. Die daraufhin angelegte Spannung (100 V) verlief für 1 Stunde senkrecht zu Membran und Gel.

Zum Blockieren der Stellen der Membran, die kein Probenprotein gebunden haben, wurden 30 ml einer Blockierlösung (0,5 % Milchpulver in TBS-T) bei Raumtemperatur per Vakuum durch die Membran gesaugt (Millipore SNAP i.d. 2.0). Es folgte die Beladung mit dem Primärantikörper, welcher in 5 % Milchpulver in TBS-T gelöst vorlag. Die Inkubation erfolgte schwenkend über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Membranen viermal mit jeweils 30 ml TBS-T Lösung im Protein Detektions-System (Millipore SNAP i. d. 2.0) gewaschen. Danach wurde ein Zweitantikörper, der in 0,5 % Blockmilch gelöst war, für 10 Min auf die Membranen gegeben. Anschließend erfolgte wieder ein vierfacher Waschschrift mit jeweils 30 ml TBS-T. Für die abschließende Proteindetektion wurden die Membranen für 1 Min mit 6 ml des Chemilumineszenzsubstrats ECL Reagenz (Millipore, Immobilon forte) beladen. Danach wurden beide Membranen auf eine Glasplatte gelegt und mithilfe des *Blot Imager* fotografiert.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper		
<i>rabbit</i> anti-CASQ2 (PA1-913)	1:5000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>rabbit</i> anti-Phospho-(Ser) PKC Substrat (#2261)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Sekundärantikörper		
<i>goat</i> anti- <i>rabbit</i> IgG H&L (HRP)	1:10.000	Abcam

2.2.4 Statistik

Die Daten wurden mit der Software Graphpad Prism 9 statistisch ausgewertet.

Für die Darstellung des PMA-Effekts wurden die Rohwerte der gemessenen Kardiomyozyten in einem ungepaarten zweiseitigen *Student's t*-Test miteinander verglichen. Die Auswertung des RBX-Effekts auf die Kardiomyozyten erfolgte mithilfe der Berechnung von Delta-Werten. Diese stellen Differenzwerte zwischen den Messwerten nach Stimulation und den Basalwerten dar. Die Differenz wurde jeweils in den Abbildungen auf der y-Achse aufgetragen. Zudem wurden diese Delta-Werte auf die Veränderung in der jeweiligen Kontrollgruppe normalisiert. Dies ermöglicht ein einfaches und schnelles Ablesen des RBX-Effekts auf die Myozyten. Auch hier wurden die Daten mittels ungepaartem zweiseitigen *Student's t*-Test statistisch einander gegenübergestellt. Es wurden stets zwei Versuchsgruppen mittels ungepaartem zweiseitigen *Student's t*-Test statistisch miteinander verglichen.

Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SEM). Statistische Ausreißer wurden mithilfe der ROUT-Methode identifiziert und eliminiert. Jede gemessene Zelle wurde als Einzelwert in der Stichprobe gewertet. Die Anzahl der verwendeten Tiere und damit der unabhängigen Experimente wird jeweils angegeben. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die idealen Stimulationsbedingungen der Kardiomyozyten mittels Proteinanalysen bestimmt. In den anschließenden Experimenten wurden die Größe und die Geschwindigkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme der Kardiomyozyten sowie die daraus resultierende Sarkomerfunktion analysiert.

3.1 Bestimmung idealer Stimulationsbedingungen der Kardiomyozyten mittels Proteinanalyse (Western blot)

Die folgenden Versuche untersuchten den Einfluss des PKC-Aktivators PMA und des PKC-Inhibitors RBX auf den PKC-abhängigen Phosphorylierungszustand der zellulären Proteine des Herzens. Die Bestimmung idealer Stimulationsbedingungen mit diesen beiden PKC-Modulatoren stellte die Voraussetzung für die späteren Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme dar.

Die Isoenzyme der klassischen PKC phosphorylieren Serin- oder Threoningruppen, die von Arginin oder Lysin an der -3, -2 oder +2 Position und einer hydrophoben Aminosäure an Position +1 umgeben sind. In den hier dargestellten Western blots (Abb. 17, Abb. 18) wurden zelluläre Proteine, die an der oben genannten Serin- oder Threoningruppe phosphoryliert sind, mittels des Primärantikörpers anti-Phospho-(Ser)-PKC-Substrat detektiert.

Mit dem ersten Western blot (Abb. 17) wurde der Einfluss eines PKC-Aktivators untersucht. Als PKC-Aktivator diente PMA. PMA weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem natürlichen Aktivator DAG auf. Erfolgte eine Stimulation der Zellen mit PMA, zeigte sich eine Zunahme der PKC-abhängigen Phosphorylierung. PMA aktivierte die PKC, folglich wurden mehr Proteine phosphoryliert, die dann von dem anti-Phospho-(Ser)-PKC-Substrat-Antikörper im Western blot nachgewiesen wurden.

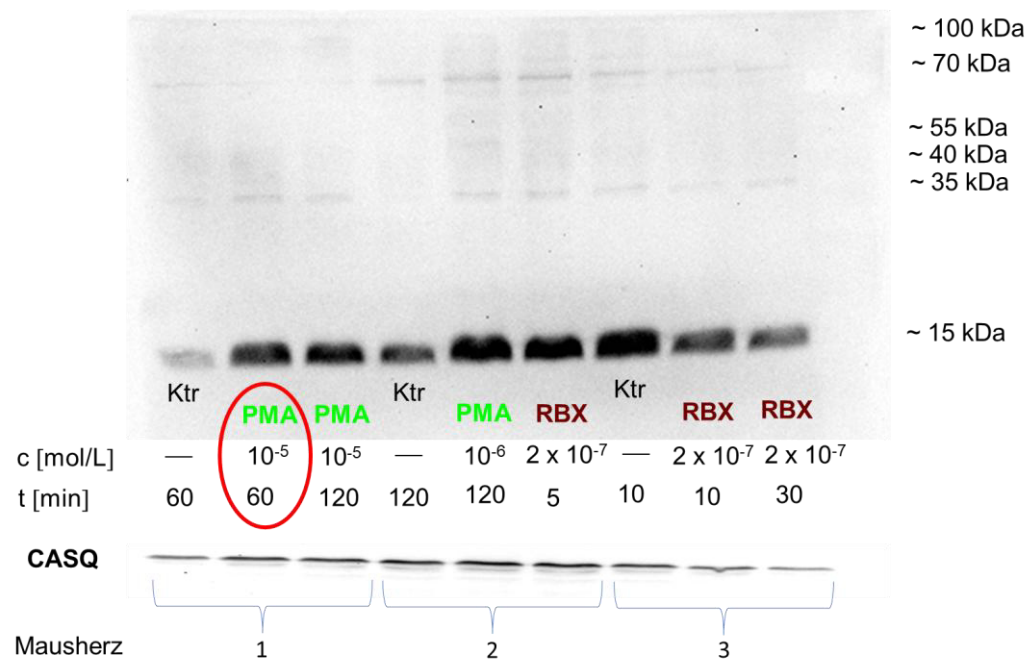


Abb. 17: Detektion der PKC-phosphorylierten Proteine mittels Western blot – Bestimmung geeigneter Inkubationsbedingungen für die Stimulation mit PMA

Die Proteine entstammten insgesamt 3 isolierten Herzen, jeweils eine Kontrollgruppe und 2 verschiedene Stimulationsbedingungen wurden pro Mauserherz aufgetragen. Vor der Proteinanalyse wurden die Zellen entsprechend den angegebenen Zeiten und Konzentrationen mit PMA bzw. RBX inkubiert. Die Banden innerhalb einer Spur stehen für die verschieden großen Proteine, welche nachgewiesen wurden. Rechts in der Abbildung sind die Proteingrößen angegeben, diese wurden mithilfe eines Markers bestimmt. Zur Absicherung, dass jede Bedingung für die gleiche Proteinmenge getestet wurde, wurde ein weiterer Western blot mit einem Antikörper gegen das Protein Calsequestrin (CASQ) als Kontrolle angefertigt. Eine Stimulation mit PMA führte zu mehr phosphorylierten Proteinen, RBX verringerte diese.

Ktr = Kontrolle, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, RBX = Ruboxistaurin, CASQ = Calsequestrin, c = Konzentration, t = Zeit, mol/L = Mol pro Liter, min = Minute, kDa = Kilodalton

In der ersten Spur des Western blots wurde die Kontrolle aufgetragen. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Es zeigten sich schwache Banden, die für eine Grundaktivität der PKC sprechen.

Die Zellen der Spur 2 wurden bei 30 °C mit einer Konzentration von 10^{-5} mol/l PMA für 1 Stunde vorinkubiert, die der Spur 3 für 2 Stunden. Die Proteine aus den ersten 3 Spuren stammten aus derselben Maus, die Banden in Spur 2 und 3 zeichneten sich dunkler als in Spur 1 ab. Folglich liegen hier mehr phosphorylierte Proteine vor als in der Kontrollgruppe, dies lässt sich auf die aktivierende Rolle von PMA zurückführen.

Die PKC-Signale nach ein- und zweistündiger Inkubationszeit mit 10^{-5} mol/l PMA zeigten dagegen kaum einen Unterschied (Spur 2 und 3). Für die folgenden Ca^{2+} -Messungen der Kardiomyozyten wurde deshalb eine Konzentration von 10^{-5} mol/l PMA bei einstündiger Inkubationszeit verwendet. Außerdem konnte so der myozytäre Ca^{2+} -Kreislauf bereits nach einer Stunde Stimulation gemessen werden, wodurch eine höhere Qualität der frisch isolierten Primärzellen gewährleistet blieb.

Ein umgekehrtes Bild zeigte sich bei den 3 letzten Spuren. Hier wurde eine Kontrollgruppe mit RBX-stimulierten Zellen verglichen. Die Konzentration des RBX betrug in den letzten beiden Proben jeweils 2×10^{-7} mol/l und die Inkubationszeit lag bei 10 bzw. 30 Min. Die Proteinbanden der Kontrollgruppe zeigten sich in ihrer Intensität deutlich stärker im Vergleich zu den beiden RBX-Gruppen. RBX hemmt die PKC-Aktivität, folglich werden weniger Proteine entsprechend phosphoryliert und die Banden erschienen heller.

Zur Bestimmung einer passenden RBX-Konzentration wurde ein weiterer Western blot durchgeführt (Abb. 18).

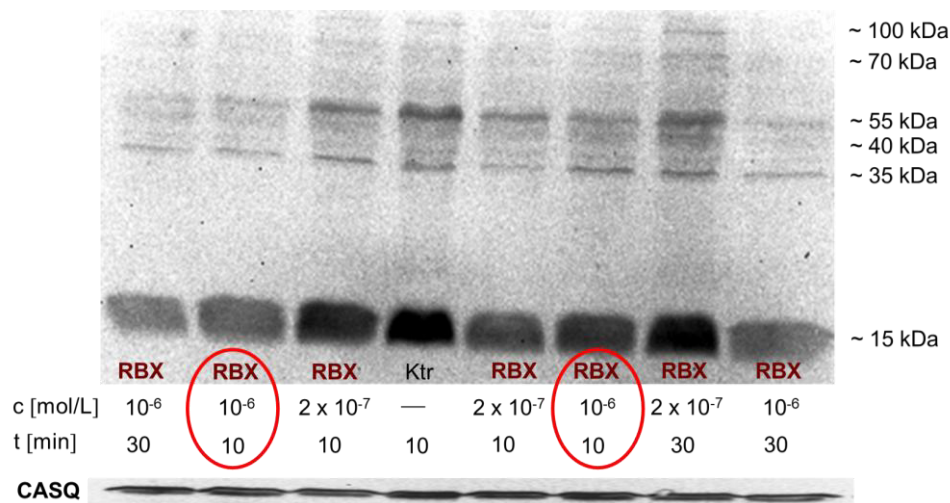


Abb. 18: Detektion der PKC-phosphorylierten Proteine mittels Western blot – Bestimmung geeigneter Inkubationsbedingungen für die Behandlung mit RBX

Die hier aufgetragenen Proteinproben entstammten 2 Herzen, die Kardiomyozyten wurden nach der Isolation durchmischt. Die Zellen wurden vor der Proteinanalyse wie angegeben mit RBX inkubiert. Auch hier diente das Protein CASQ in einem weiteren Western blot als Kontrolle. Rechts in der Abbildung sind die Proteingrößen angegeben, diese wurden mithilfe eines Markers bestimmt. Ktr = Kontrolle, RBX = Ruboxistaurin, CASQ = Calsequestrin, c = Konzentration, t = Zeit, mol/L = Mol pro Liter, min = Minute, kDa = Kilodalton

Die Kontrolle wurde in der Mitte des Western blots in der 4. Spur aufgetragen und es wurden 4 weitere verschiedene Bedingungen getestet. Die Zellen stammten aufgrund der erforderlichen Proteinmenge aus 2 Mäusen und wurden vor Verwendung gemischt. Bei einer Inkubation mit RBX mit einer Konzentration von 2×10^{-7} mol/l für 10 Min zeigten sich die Proteinbanden heller. Verfünffachte man die Konzentration auf 10^{-6} mol/l RBX für 10 Min Inkubationszeit erschienen die Banden, vor allem in Spur 2, noch heller. Bei dieser Konzentration und einer Inkubationszeit von 30 Min zeigten sich die Banden im durchgeführten Western blot am hellsten. Eine Konzentration von 10^{-6} mol/l RBX für 10 Min zeigte bereits deutliche Effekte des RBX. Diese kurze Inkubationszeit ermöglichte es, die gleiche Zelle unter kontinuierlicher elektrischer Stimulation sowohl zunächst basal als auch während 10-minütiger RBX-Exposition zu messen. Dieses Vorgehen minimierte mögliche Unterschiede der einzelnen Zellen und stellte den Einfluss des RBX besonders klar dar. Für die weiteren Versuche wurden die Zellen deshalb für 10 Min mit 10^{-6} mol/l RBX inkubiert.

3.2 Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme (Ca^{2+} -Kreislauf)

In den folgenden Versuchsreihen wurde der Einfluss der PKC auf die intrazellulären Ca^{2+} -Ströme untersucht. Hierfür wurde die PKC sowohl durch PMA aktiviert als auch mithilfe von RBX inhibiert. Repräsentativ für die Darstellung der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme wurden, wie in Kapitel 2.2.2.2.4 beschrieben, die Parameter Amplitude, Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls untersucht.

3.2.1 Proteinkinase C-Aktivierung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)

In den nachfolgenden Experimenten wurde PMA als PKC-Aktivator verwendet. Wie Kapitel 3.1 verdeutlicht, wurden die Kardiomyozyten mit einer PMA-Konzentration von 10^{-5} mol/l für 1 Stunde bei 30 °C inkubiert und anschließend gemessen. Da PMA in DMSO gelöst vorlag, wurden die Zellen der Kontrollgruppe mit DMSO inkubiert und ebenfalls 1 Stunde später gemessen. Dies diente zum Ausschluss eines Effektes seitens des DMSOs.

3.2.1.1 Amplitude

Im ersten Schritt wurde untersucht, ob eine PKC-Aktivierung die insgesamt freigesetzte Menge an Ca^{2+} beeinflusst.

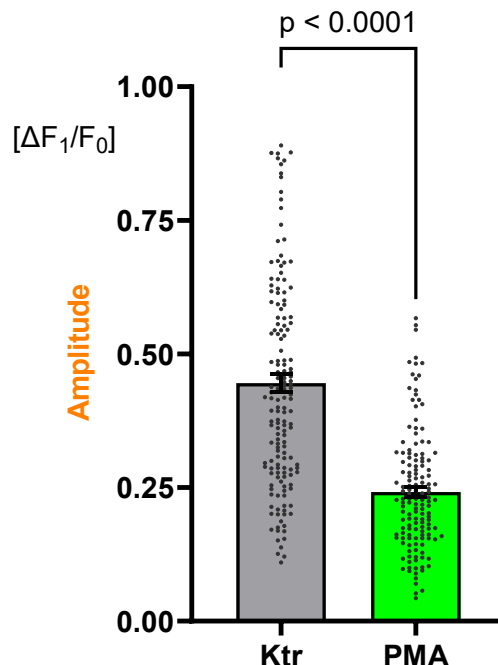


Abb. 19: Amplitude der Ca^{2+} -Transienten in der Kontrollgruppe und der PMA-Gruppe

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Amplituden von Ca^{2+} -Transienten $\pm$ SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 15$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test. $\Delta F_1/F_0$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm, Ktr = Kontrolle, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat

Die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten war in den Kardiomyozyten der Kontrollgruppe größer als in den mit PMA stimulierten Zellen. Demnach wurde signifikant mehr Ca^{2+} in der Kontrollgruppe freigesetzt ($p < 0,0001$). Die Menge an freigesetztem Ca^{2+} sank signifikant durch die PKC-Aktivierung mittels PMA.

3.2.1.2 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs

Als nächstes wurde die Kinetik der Ca^{2+} -Ströme genauer betrachtet. Die Abb. 20 zeigt, dass PMA die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs beeinflusste.

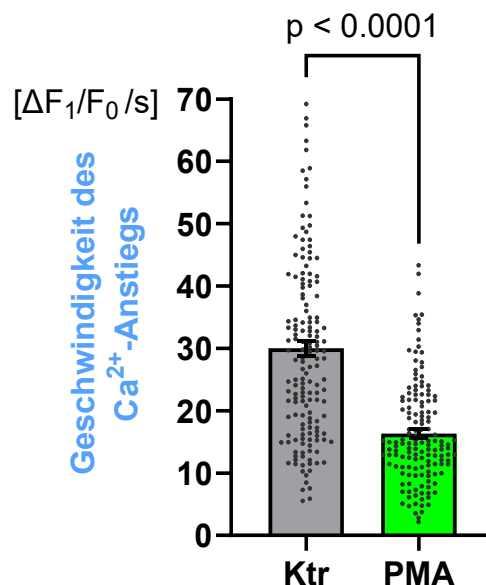


Abb. 20: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs in der Kontrollgruppe und der PMA-Gruppe

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs $\pm$ SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 15$ Herzen. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

$\Delta F_1/F_0/s$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm pro Sekunde, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Ktr = Kontrolle, Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Wie die Amplitude war auch die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs in der Kontrollgruppe größer im Vergleich zu der PMA-Gruppe. Die Freisetzungsgeschwindigkeit des Ca^{2+} in den Kardiomyozyten war somit durch die Stimulation mit PMA signifikant verlangsamt ($p < 0,0001$).

3.2.1.3 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls

Nach der Kontraktion der Kardiomyozyten relaxieren die Zellen aufgrund sinkender zytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Eliminationsgeschwindigkeit des Ca^{2+} wurde zuletzt untersucht.

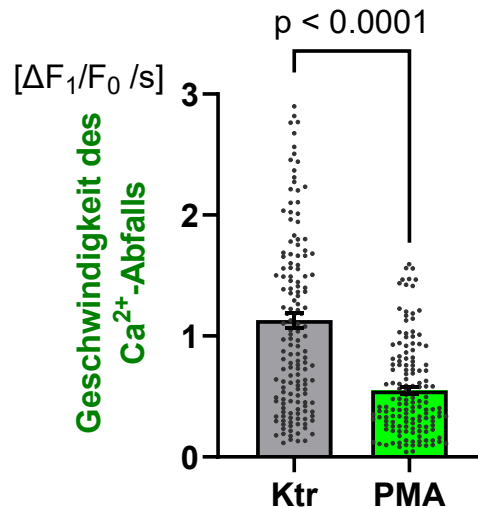


Abb. 21: Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls in der Kontrollgruppe und der PMA-Gruppe

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls $\pm$ SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 15$ Herzen. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

$\Delta F_1/F_0/s$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm pro Sekunde, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Ktr = Kontrolle, Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls zeigte sich in der PMA-Gruppe signifikant langsamer als in den Kontroll-Kardiomyozyten ($p < 0,0001$). Die Elimination des zytosolischen Ca^{2+} erfolgte durch die Stimulation mit PMA mit reduzierter Geschwindigkeit.

Fazit:

Eine PKC-Aktivierung mittels PMA führt zu einer verlangsamten Freisetzungs- und Aufnahmekinetik des Ca^{2+} in das SR. Zudem wurde bei den Ca^{2+} -Zyklen insgesamt weniger Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt. Schlussendlich verlangsamt eine erhöhte PKC-Aktivität den intramyozytären Ca^{2+} -Kreislauf.

3.2.2 Proteinkinase C-Inhibition mit Ruboxistaurin (RBX)

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss von RBX, einem PKC-Inhibitor, auf die Größe und Geschwindigkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme in Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage untersucht. RBX lag ebenfalls in DMSO gelöst vor, dementsprechend wurde auch hier die Kontrollgruppe mit DMSO gebildet. Wie in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben, wurden die Zellen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der RBX-Gruppe zunächst basal und anschließend nach Exposition mit der Kontrolllösung bzw. RBX-Lösung gemessen.

Um den alleinigen Effekt der Exposition mit der Kontroll- bzw. RBX-Lösung zu bestimmen, mussten Differenz-Werte berechnet werden. Die basal gemessenen Werte wurden hierfür für jede Zelle von den Messwerten nach 10-minütiger Substanzzugabe subtrahiert. Je größer der Betrag dieser Differenz-Werte (Delta-Werte) ist, desto größer war der Unterschied zwischen den Basalmessungen und den Transienten 10 Min nach Behandlung.

Formel:

$$\Delta \text{ (Delta) Wert} = \text{Messwert 10 Min nach Substanzzugabe} - \text{Messwert basal}$$

Da sich die Messwerte auch der Kontrollzellen ohne Behandlung mit RBX über die Zeit verringerten, wurden die berechneten Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe auf den Abfall der Kontrollgruppe während der 10 Min seit Zugabe der Substanz normalisiert. Hierfür wurde der Durchschnittswert des Abfalls des jeweiligen Parameters (Amplitude, Geschwindigkeit Ca^{2+} -Anstieg/Abfall) während der 10 Min von allen einzelnen Delta-Werten abgezogen. Dies ermöglicht, den Effekt des untersuchten PKC-Inhibitors RBX anschaulicher darzustellen.

3.2.2.1 Der Einfluss von Ruboxistaurin auf den Ca^{2+} -Kreislauf in Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage

3.2.2.1.1 Amplitude

Die folgende Abb. 22 zeigt den Unterschied der freigesetzten Ca^{2+} -Menge zwischen der Kontrollgruppe und der RBX-Gruppe nicht-diabetischer Kardiomyozyten.

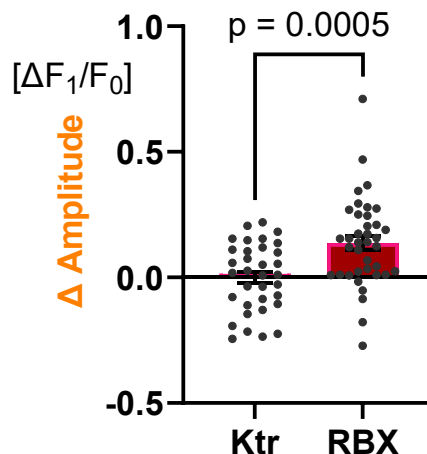


Abb. 22: Delta-Werte der Amplituden der Ca^{2+} -Transienten von Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage nach Behandlung mit der Kontrolllösung oder RBX-Lösung

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Amplituden von Ca^{2+} -Transienten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der Amplitude während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten setzten nach RBX-Exposition signifikant mehr Ca^{2+} frei als Myozyten der Kontrollgruppe. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 7$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test. $\Delta F_1/F_0$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm, Ktr = Kontrollgruppe, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe

Nach PKC-Inhibition mittels RBX konnte signifikant mehr Ca^{2+} freigesetzt werden als in der Kontrollgruppe ($p = 0,0005$). Der Mittelwert des Delta-Werts der Kontrollgruppe lag aufgrund der Normalisierung bei 0 und der Mittelwert der RBX-Gruppe bei 0,137 $\Delta F_1/F_0$. Die Differenz zwischen beiden Gruppen betrug somit 0,137 mit einem SEM von $\pm 0,038$.

3.2.2.1.2 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs

In der Abb. 23 wird der Effekt von RBX auf die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs dargestellt.

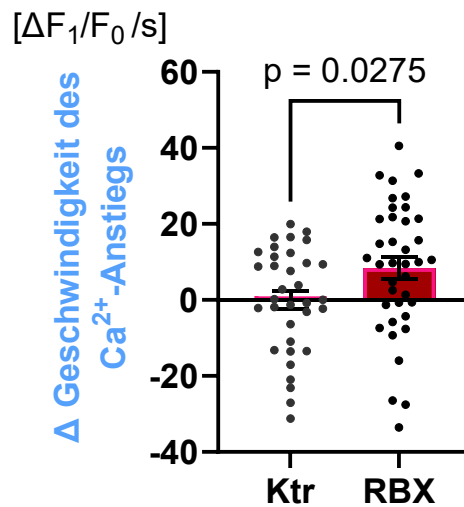


Abb. 23: Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Anstiegs in Kontroll- und RBX-behandelten Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Anstiegs $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten setzten nach RBX-Exposition schneller Ca^{2+} frei als Myozyten der Kontrollgruppe. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 7$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

$\Delta F_1/F_0/s$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm pro Sekunde, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe, Ktr = Kontrollgruppe, Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Die Freisetzungsgeschwindigkeit des Ca^{2+} konnte mithilfe des RBX im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne RBX signifikant erhöht werden ($p = 0,0275$). Der Mittelwert der RBX-Gruppe war um 8,402 mit einer SEM von $\pm 3,731$ höher.

3.2.2.1.3 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls

Die nachfolgende Abb. 24 zeigt die Auswirkung von RBX auf die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls in den Kardiomyozyten.

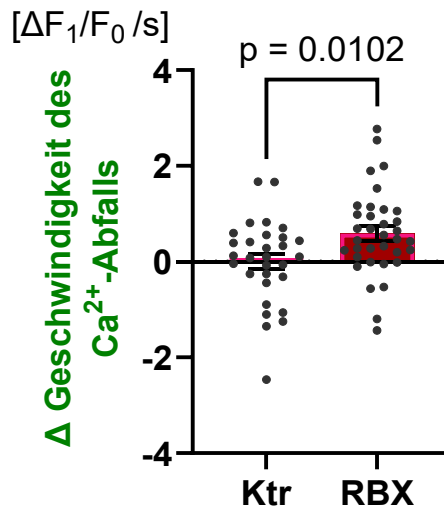


Abb. 24: Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Abfalls in Kontroll- und RBX-behandelten Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Abfalls $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten eliminierten unter RBX-Exposition das Ca^{2+} schneller als Myozyten der Kontrollgruppe. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 7$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

$\Delta F_1/F_0/s$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm pro Sekunde, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe, Ktr = Kontrollgruppe, Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Auch die Eliminierungsgeschwindigkeit des Ca^{2+} war unter RBX-Exposition signifikant schneller als in der Kontrollgruppe ($p = 0,0102$). Die Differenz zwischen den Mittelwerten der Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe betrug $0,583 \pm 0,220$.

Fazit:

Eine PKC-Inhibierung mittels RBX in den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage erhöht die freigesetzte Ca^{2+} -Menge und beschleunigt die Geschwindigkeit sowohl des Ca^{2+} -Anstiegs als auch des Ca^{2+} -Abfalls im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

3.2.2.2 Der Einfluss von Ruboxistaurin auf den Ca^{2+} -Kreislauf in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage

Für die Untersuchung des Einflusses von RBX auf den Ca^{2+} -Transport in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage wurden männliche Leptin-Rezeptor-defiziente db/db-Mäuse im Alter von 10-12 Wochen als Modellorganismus herangezogen und in identischer Weise wie nicht-diabetische Tiere (3.2.2.1) untersucht.

3.2.2.2.1 Amplitude

Die Abb. 25 ermöglicht Rückschlüsse auf die freigesetzte Ca^{2+} -Menge in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage.

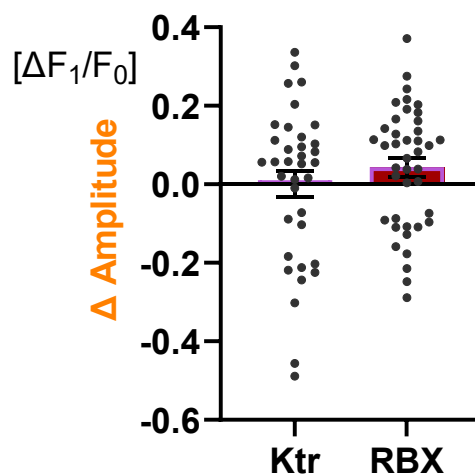


Abb. 25: Delta-Werte der Amplituden der Ca^{2+} -Transienten von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage nach Behandlung mit der Kontrolllösung oder RBX-Lösung

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Amplituden von Ca^{2+} -Transienten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der Amplitude während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten diabetischer Stoffwechsellage setzten nach RBX-Exposition im Trend mehr Ca^{2+} frei als Myozyten der Kontrollgruppe. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 6$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

$\Delta F_1/F_0$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm, Ktr = Kontrollgruppe, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe

Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage reagierten ebenso auf die RBX-Behandlung. Auch hier konnte eine im Trend erhöhte freigesetzte Ca^{2+} -Menge unter PKC-Inhibition beobachtet werden. Der Unterschied stellte sich im Gegensatz zu den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage jedoch als Tendenz des Mittelwerts und nicht signifikant dar ($p = 0,2805$). Der Mittelwert der RBX-Gruppe war um $0,044 \pm 0,040$ höher.

3.2.2.2.2 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs

Neben der freigesetzten Ca^{2+} -Menge wurde auch die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs in den diabetischen Kardiomyozyten unter RBX-Exposition und in der Kontrollgruppe ohne RBX untersucht (Abb. 26).

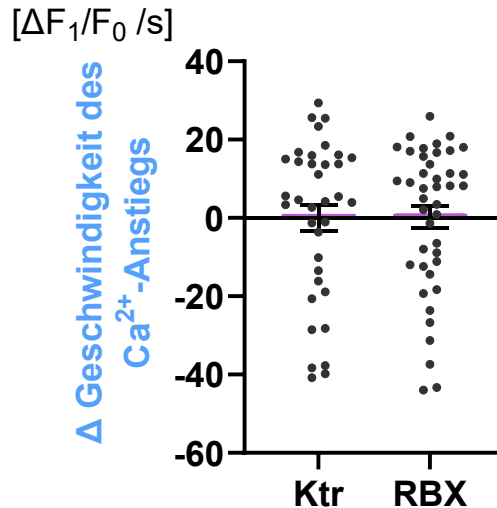


Abb. 26: Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Anstiegs in Kontroll- und RBX-behandelten Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Anstiegs $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten diabetischer Stoffwechsellage setzten nach RBX-Exposition tendenziell schneller Ca^{2+} frei als Myozyten der Kontrollgruppe. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 6$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test. $\Delta F_1/F_0/s$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm pro Sekunde, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe, Ktr = Kontrollgruppe, Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs zeigte sich in den RBX-behandelten Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage unverändert gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,9633$). Beim Vergleich der Mittelwerte der Delta-Werte konnte ein Wert von 0 in der Kontrollgruppe und ein Wert von 0,203 $\Delta F_1/F_0/s$ in der RBX-Gruppe festgestellt werden. Die Differenz beider Werte betrug somit $0,203 \pm 4,400$.

3.2.2.2.3 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls

Zuletzt wurde der Effekt des RBX auf die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls in diabetischen Kardiomyozyten untersucht, dies stellt Abb. 27 dar.

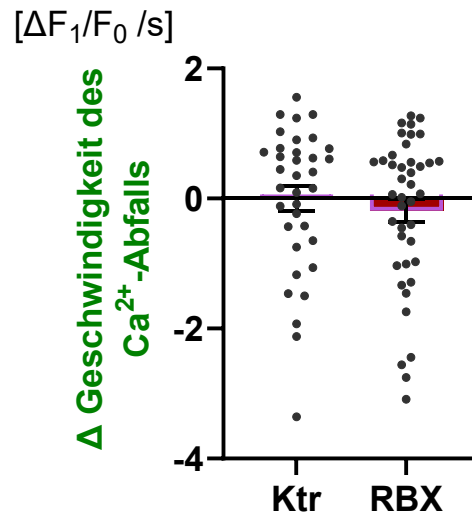


Abb. 27: Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Abfalls in Kontroll- und RBX-behandelten Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Abfalls $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten diabetischer Stoffwechsellage eliminierten nach RBX-Exposition nicht schneller Ca^{2+} als Myozyten der Kontrollgruppe. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 6$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

$\Delta F_1/F_0/s$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm pro Sekunde, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe, Ktr = Kontrollgruppe, Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls war in den RBX-behandelten Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage ebenfalls unverändert gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,4813$). Der Mittelwert der Kontrollgruppe betrug aufgrund der Normalisierung 0 und es zeigte sich eine Differenz von $-0,185 \pm 0,262$ zu der RBX-Gruppe.

Fazit:

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass unter 10-minütiger RBX-Exposition die Kardiomyozyten diabetischer Stoffwechsellage eine im Trend gesteigert freigesetzte Ca^{2+} -Menge aufwiesen. Dagegen entsprachen unter RBX-Exposition die Geschwindigkeiten des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs und Ca^{2+} -Abfalls denen der Kontrollgruppe.

3.2.2.3 Der Vergleich von Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage nach RBX-Behandlung

In den nachfolgenden Abbildungen wird ein direkter Vergleich zwischen dem RBX-Effekt in Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage, bezogen auf die Ca^{2+} -Amplitude und die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs/Abfalls der Kardiomyozyten, dargestellt.

Heterozygote Mäuse ohne diabetische Stoffwechsellage stellen die erste Säule in den nachfolgenden Abbildungen dar. Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage stammten aus homozygot Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen und bilden die zweite Säule in den Abbildungen. Da die Kardiomyozyten der beiden Gruppen (heterozygot und homozygot) jeweils auf die Änderungen ihrer entsprechenden Kontrollgruppe, also den Myozyten ohne RBX-Behandlung, normalisiert worden sind, liegen beide gezeigte Mittelwerte hier nicht bei 0.

3.2.2.3.1 Amplitude

Die nachfolgende Abb. 28 veranschaulicht die Veränderung der Amplituden der Ca^{2+} -Transienten in Kardiomyozyten aus nicht-diabetischen und diabetischen Tieren während der 10-minütigen Behandlung mit RBX. Die Amplitude dient als Surrogat für den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg in den Kardiomyozyten.

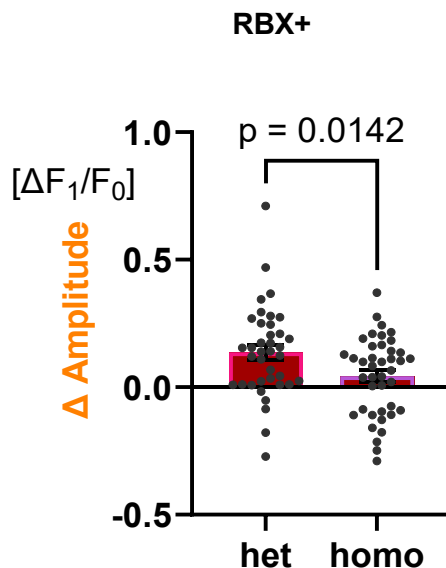


Abb. 28: Delta-Werte der Amplituden der Ca^{2+} -Transienten nach RBX-Behandlung von Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Amplituden von Ca^{2+} -Transienten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der beiden verschiedenen Stoffwechselgruppen wurden jeweils auf ihren Abfall der Amplitude während der 10-minütigen Messdauer in der jeweiligen Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage zeigten einen stärkeren Effekt des RBX, in diesem Fall eine höhere freigesetzte Ca^{2+} -Menge, im Vergleich zu diabetischen Myozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test. $\Delta F_1/F_0$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm, RBX = Ruboxistaurin, het = nicht-diabetische Stoffwechsellage, homo = diabetische Stoffwechsellage

Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage zeigten im Vergleich zu diabetischen Zellen einen signifikant stärkeren Ca^{2+} -Anstieg durch RBX-Exposition ($p = 0,0142$). Der Delta-Mittelwert von $0,137 \Delta F_1/F_0$ steht dem Wert von $0,044 \Delta F_1/F_0$ bei Kardiomyozyten des Diabetes Modells gegenüber.

3.2.2.3.2 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs

Außerdem wurde die Geschwindigkeit des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs in den nicht-diabetischen und diabetischen Kardiomyozyten unter RBX-Exposition untersucht, dargestellt in der folgenden Abb. 29.

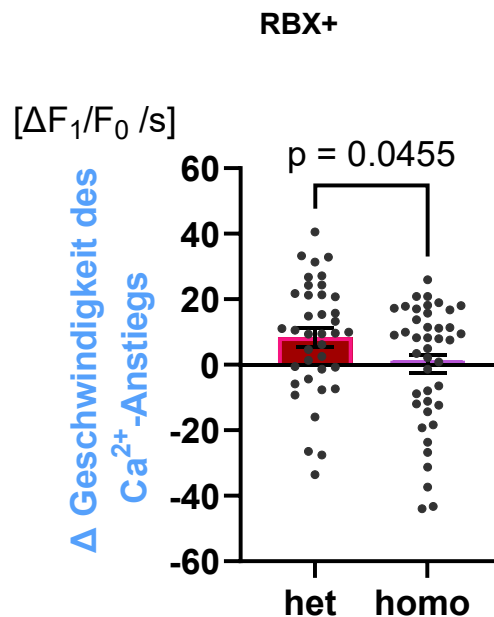


Abb. 29: Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Anstiegs nach RBX-Behandlung von Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der beiden verschiedenen Stoffwechselgruppen wurden jeweils auf ihren Abfall der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs während der 10-minütigen Messdauer in der jeweiligen Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage setzten signifikant schneller Ca^{2+} frei als die Kardiomyozyten des Diabetes Modells ($p = 0,0455$). Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

$\Delta F_1/F_0/s$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm pro Sekunde, het = nicht-diabetische Stoffwechsellage, homo = diabetische Stoffwechsellage, RBX = Ruboxistaurin, Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs stellte sich in den nicht-diabetischen Myozyten mit einem p -Wert von 0,0455 signifikant beschleunigt dar. Im Vergleich zeigten die diabetischen Kardiomyozyten einen Mittelwert der Delta-Anstiegsgeschwindigkeit des Ca^{2+} von $0,203 \Delta F_1/F_0/s$ und damit weniger als Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage mit einem Mittelwert von $8,402 \Delta F_1/F_0/s$.

3.2.2.3.3 Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls

Als letzter Parameter wurde die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls beider Stoffwechsellagen unter RBX-Stimulation verglichen.

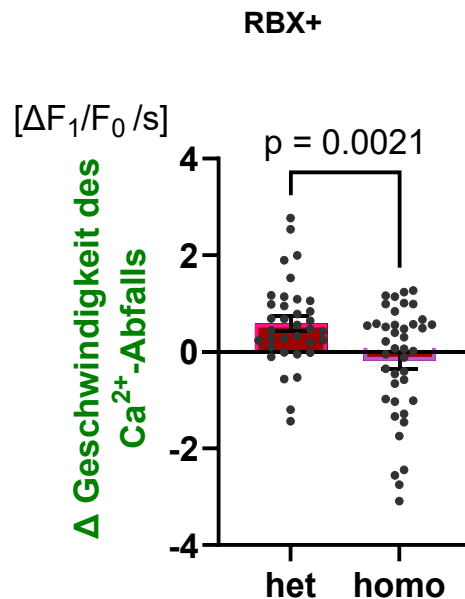


Abb. 30: Delta-Werte der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Abfalls nach RBX-Behandlung von Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der beiden verschiedenen Stoffwechselgruppen wurden jeweils auf ihren Abfall der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls während der 10-minütigen Messdauer in der jeweiligen Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage eliminierten signifikant schneller das Ca^{2+} als die Kardiomyozyten des Diabetes Modells ($p < 0,0021$). Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

$\Delta F_1/F_0/s$ = Delta-Fluoreszenz bei 340nm/380nm pro Sekunde, het = nicht-diabetische Stoffwechsellage, homo = diabetische Stoffwechsellage, RBX = Ruboxistaurin, Ca^{2+} = Calcium-Ionen

Ein signifikanter Unterschied ließ sich zudem in dem Vergleich der Geschwindigkeiten des Ca^{2+} -Abfalls beobachten ($p < 0,0021$). Der Delta-Mittelwert der nicht-diabetischen Kardiomyozyten zeigte sich um $0,768 \pm 0,240$ größer. Der Delta-Mittelwert der nicht-diabetischen Kardiomyozyten betrug $0,583 \Delta F_1/F_0/s$ im Gegensatz dazu stand der negative Wert von $-0,185 \Delta F_1/F_0/s$ in der Gruppe der diabetischen Myozyten.

Fazit:

Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage zeigten einen signifikant stärkeren Effekt des RBX. Dies bezog sich sowohl auf die höhere freigesetzte Ca^{2+} -Menge als auch die beschleunigte Freisetzungs- und Eliminationsgeschwindigkeit des Ca^{2+} im myozytären Kreislauf.

3.3 Sarkomerfunktion

In den folgenden Versuchsreihen wurde der Einfluss der PKC auf die Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten untersucht. Hierfür wurde die PKC sowohl durch PMA aktiviert als auch mithilfe von RBX inhibiert. Repräsentativ für die Darstellung der Sarkomerfunktion wurden, wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben, die Parameter kontraktile Amplitude, Kontraktionsgeschwindigkeit und Relaxationsgeschwindigkeit untersucht.

3.3.1 Einfluss von PMA auf die Sarkomerfunktion

Als PKC-Aktivator kam in den nachfolgenden Experimenten erneut PMA zum Einsatz. Die verwendete Konzentration sowie die Inkubationsdauer entsprachen dabei den Bedingungen der zuvor beschriebenen Experimente zur Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme unter PMA-Einfluss.

3.3.1.1 Kontraktile Amplitude

Da Änderungen im Ca^{2+} -Haushalt unmittelbare Konsequenzen für Kontraktion und Relaxation haben, wurde in den untersuchten Kardiomyozyten parallel zum Einfluss der PKC-Modulatoren auf die intrazellulären Ca^{2+} -Ströme auch die Sarkomerfunktion analysiert. Dargestellt ist der Effekt des PMAs auf die maximale Kontraktionslänge der Sarkomere.

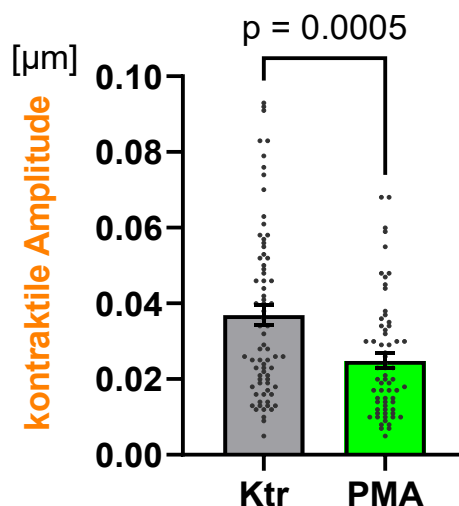


Abb. 31: Kontraktile Amplitude der Kardiomyozyten in der Kontrollgruppe und der PMA-Gruppe

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der kontraktiven Amplituden $\pm$ SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 15$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

Ktr = Kontrolle, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat

Wie in Abb. 31 zu sehen, war die kontraktile Amplitude in der PMA-Gruppe um $32,63 \% \pm 9,11 \%$ kleiner als in der Kontrollgruppe ($p = 0,0005$). Folglich kontrahierten die Sarkomere unter dem Einfluss von PMA weniger stark.

3.3.1.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Kontraktionsgeschwindigkeit war in den mit PMA stimulierten Kardiomyozyten signifikant langsamer im Vergleich zu den Kontrollzellen ($p = 0,0218$).

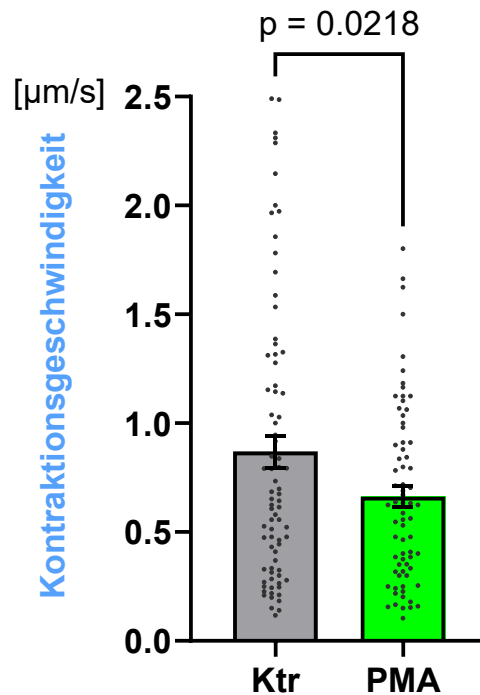


Abb. 32: Kontraktionsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten in der Kontrollgruppe und der PMA-Gruppe

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Kontraktionsgeschwindigkeit $\pm$ SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 15$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

Ktr = Kontrolle, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat

3.3.1.3 Relaxationsgeschwindigkeit

Die PMA-Stimulation der Kardiomyozyten führte ebenso zu einer herabgesetzten Relaxationsgeschwindigkeit. Dieser Unterschied stellte sich als signifikant dar ($p < 0,0001$).

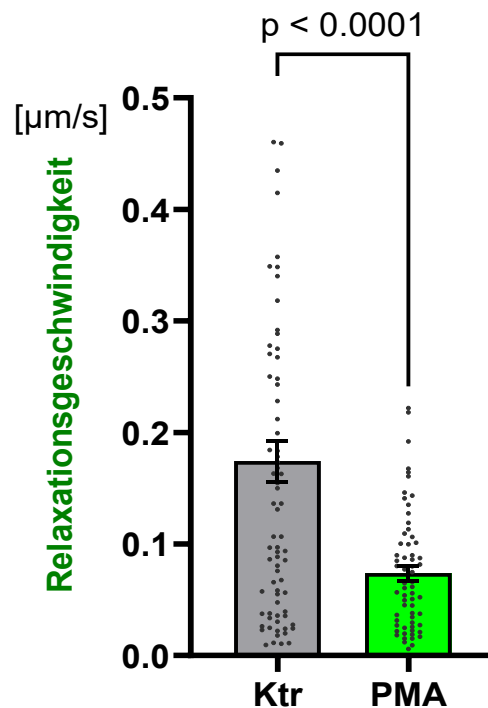


Abb. 33: Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten in der Kontrollgruppe und der PMA-Gruppe

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Kontraktionsgeschwindigkeit $\pm$ SEM. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 15$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

Ktr = Kontrolle, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat

Fazit:

Eine aktivierte PKC führte somit zu einer geringeren kontraktile Amplitude und gleichzeitig einer verlangsamten Kinetik der Kontraktion und Relaxation der Sarkomere.

3.3.2 Einfluss von RBX auf die Sarkomerfunktion

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss von RBX auf die Sarkomerfunktion in Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage untersucht. Der Versuchsablauf entspricht den Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme unter RBX-Einfluss, näher dargestellt in Kapitel 3.2.2.

3.3.2.1 Einfluss von RBX auf die Sarkomerfunktion in Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage

3.3.2.1.1 Kontraktile Amplitude

Der Effekt des RBX auf die maximale Kontraktion der Sarkomere ist in der Abb. 34 zu sehen. Verglichen wurden hier Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage nach Exposition mit der Kontrolllösung oder RBX-Lösung.

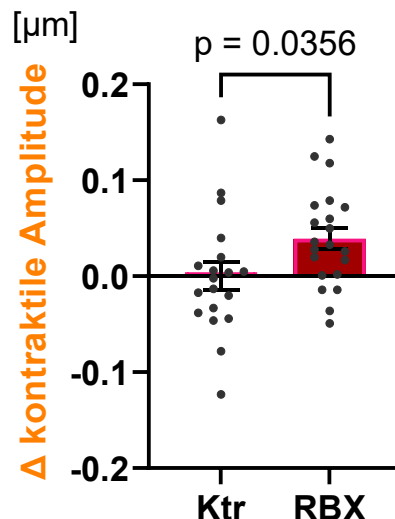


Abb. 34: Delta-Werte der kontraktiven Amplituden von Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage nach Behandlung mit der Kontrolllösung oder RBX-Lösung

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der kontraktiven Amplituden von Kardiomyozyten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der kontraktiven Amplituden während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten, die mit RBX behandelt wurden, kontrahierten signifikant stärker als Zellen der Kontrollgruppe ($p = 0,0356$). Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 6$. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

Ktr = Kontrollgruppe, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe

Die Kardiomyozyten zeigten nach der Behandlung mit RBX eine signifikant stärkere Kontraktion als Myozyten der Kontrollgruppe ($p = 0,0356$). Der Mittelwert der Delta-Werte liegt in Säule 1 der Abb. 34 aufgrund der Normalisierung bei 0, in Säule 2 bei $0,039 \mu\text{m}$.

3.3.2.1.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

In der nachfolgenden Abb. 35 wird der Effekt des RBX auf die Kontraktionsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage dargestellt.

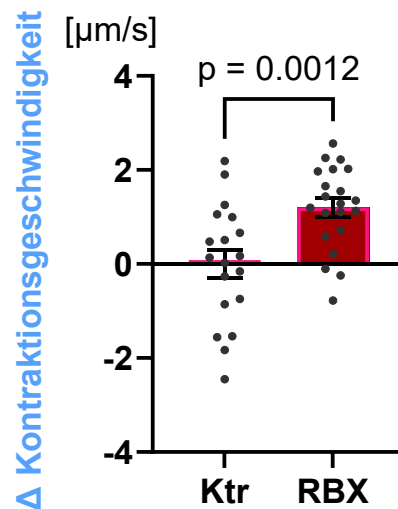


Abb. 35: Delta-Werte der Kontraktionsgeschwindigkeiten in Kontroll- und RBX-behandelten Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Kontraktionsgeschwindigkeiten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der Kontraktionsgeschwindigkeit während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten kontrahierten nach RBX-Exposition signifikant schneller als Myozyten der Kontrollgruppe ($p = 0,0012$). Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 6$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

Ktr = Kontrollgruppe, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe

Die Kontraktionsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten nach RBX-Exposition ist im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant schneller ($p = 0,0012$). Der Mittelwert der Delta-Werte in der RBX-Gruppe lag bei $1,201 \mu\text{m/s}$ und in der Kontrollgruppe aufgrund der Normalisierung bei 0.

3.3.2.1.3 Relaxationsgeschwindigkeit

Die Abb. 36 visualisiert die Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten nach Anwendung der Kontrolllösung oder RBX-Lösung.

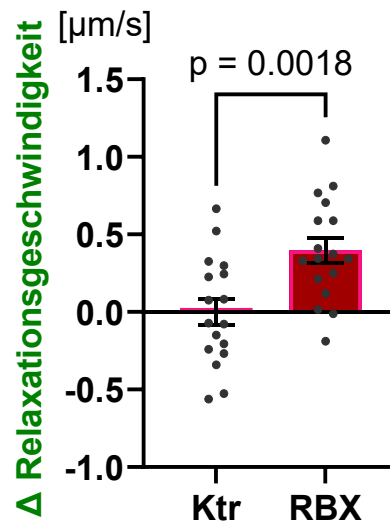


Abb. 36: Delta-Werte der Relaxationsgeschwindigkeiten in Kontroll- und Ruboxistaurin-behandelten Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Relaxationsgeschwindigkeiten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der Relaxationsgeschwindigkeit während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten relaxierten nach RBX-Exposition signifikant schneller als Myozyten der Kontrollgruppe ($p = 0,0018$). Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 6$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

Ktr = Kontrollgruppe, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe

Mit RBX-behandelte Zellen relaxierten mit einem Unterschied der Mittelwerte von $0,398 \pm 0,117$ schneller. Dieser beobachtete Geschwindigkeitsunterschied erwies sich mit einem p -Wert von 0,0018 als signifikant.

3.3.2.2 Einfluss von RBX auf die Sarkomerfunktion in Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage

3.3.2.2.1 Kontraktile Amplitude

Die Abb. 37 vergleicht die Stärke der Kontraktion von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage nach Behandlung mit Kontrolllösung oder RBX-Lösung.

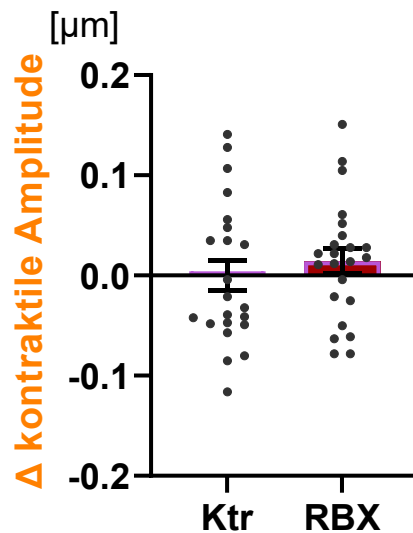


Abb. 37: Delta-Werte der kontraktiven Amplituden von Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage nach Behandlung mit der Kontrolllösung oder RBX-Lösung

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der kontraktiven Amplituden von Kardiomyozyten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf die Zunahme der kontraktiven Amplituden während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten, die mit RBX behandelt wurden, kontrahierten tendenziell stärker als Zellen der Kontrollgruppe ($p = 0,47$). Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 6$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

Ktr = Kontrollgruppe, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe

Hierbei zeigte sich das Ausmaß der Kontraktion der diabetischen Kardiomyozyten nach RBX-Exposition unverändert gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,4728$). Im Mittel lagen die Delta-Werte der kontraktiven Amplitude in der RBX-Gruppe bei $0,014 \mu\text{m}$ und in der Kontrollgruppe aufgrund der Normalisierung bei 0. Die Differenz zwischen beiden Mittelwerten betrug daher $0,014$ mit einer SEM von $\pm 0,020$.

3.3.2.2.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Abb. 38 zeigt den Effekt des RBX auf die Kontraktionsgeschwindigkeit der diabetischen Kardiomyozyten.

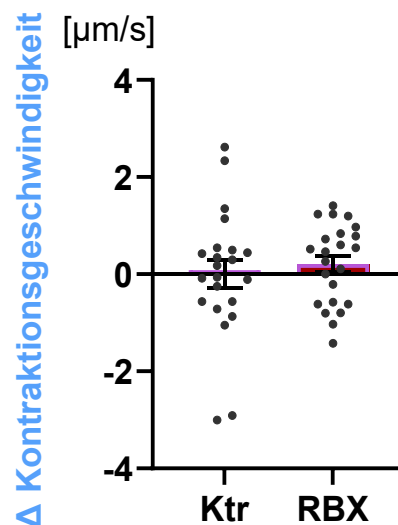


Abb. 38: Delta-Werte der Kontraktionsgeschwindigkeiten in Kontroll- und RBX-behandelten Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Kontraktionsgeschwindigkeiten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf den Abfall der Kontraktionsgeschwindigkeit während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten kontrahierten nach RBX-Exposition tendenziell schneller als Myozyten der Kontrollgruppe ($p = 0,5281$). Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 6$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

Ktr = Kontrollgruppe, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe

Auch die Kontraktionsgeschwindigkeit war nach RBX-Exposition in den diabetischen Myozyten unverändert zu den Kontroll-Kardiomyozyten ($p = 0,5281$). Die Durchschnittsgeschwindigkeit der Delta-Werte betrug in der RBX-Gruppe $0,209 \mu\text{m/s}$ und in der Kontrollgruppe aufgrund der Normalisierung 0.

3.3.2.2.3 Relaxationsgeschwindigkeit

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 39) zeigt den Effekt des RBX auf die Relaxationsgeschwindigkeit in den diabetischen Kardiomyozyten.

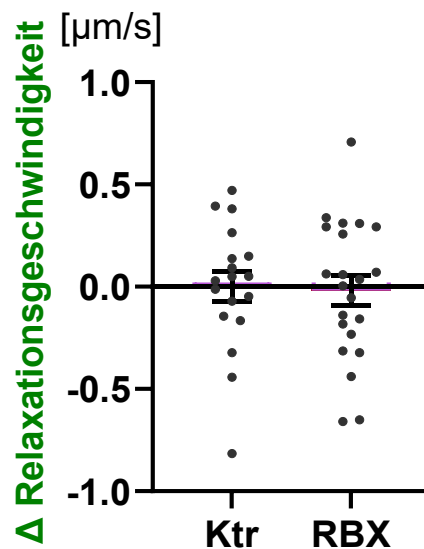


Abb. 39: Delta-Werte der Relaxationsgeschwindigkeiten in Kontroll- und RBX-behandelten Kardiomyozyten mit diabetischer Stoffwechsellage

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Relaxationsgeschwindigkeiten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der Kontroll- und RBX-Gruppe wurden auf die Zunahme der Relaxationsgeschwindigkeit während der 10-minütigen Messdauer in der Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten relaxierten tendenziell langsamer nach RBX-Exposition. Dieser Unterschied zeigte sich als nicht-signifikant, mit einem p-Wert von 0,8588. Gemessen wurden isolierte Kardiomyozyten aus $n = 6$ Herzen. Jeder einzelne Punkt steht für einen gemessenen Kardiomyozyten. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test. Ktr = Kontrollgruppe, RBX = Ruboxistaurin-Gruppe

Die Geschwindigkeit der Relaxation war in der Gruppe der RBX-behandelten Kardiomyozyten ebenfalls unverändert zur Kontrollgruppe ($p = 0,8588$). Die Delta-Werte der Durchschnittsgeschwindigkeit betrugen in der Kontrollgruppe aufgrund der Normalisierung 0 und in der RBX-Gruppe -0,019 $\mu\text{m/s}$.

3.3.2.3 Vergleich der Sarkomerfunktion von Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage nach RBX-Behandlung

3.3.2.3.1 Kontraktile Amplitude

In der Abb. 40 sind die Delta-Werte der kontraktiven Amplituden aufgetragen. Die nicht-diabetischen Kardiomyozyten und die diabetischen Zellen wurden nach der RBX-Exposition miteinander verglichen.

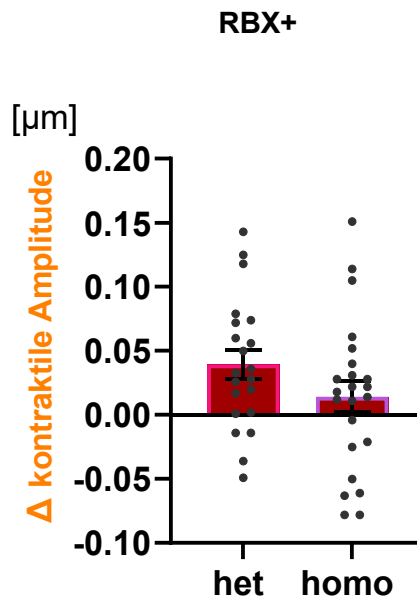


Abb. 40: Delta-Werte der kontraktiven Amplituden von Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage nach RBX-Exposition

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der kontraktiven Amplituden von Kardiomyozyten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der beiden verschiedenen Stoffwechselgruppen wurden jeweils auf ihren Abfall/Zunahme der Amplitude während der 10-minütigen Messdauer in der jeweiligen Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage zeigten einen tendenziell stärkeren Effekt des RBX, in diesem Fall eine stärkere Kontraktion, im Vergleich zu den diabetischen Myozyten ($p = 0,1416$). Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

het = nicht-diabetische Stoffwechsellage, homo = diabetische Stoffwechsellage

Die Zunahme der Kontraktion unter RBX war in den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage stärker ausgeprägt als in den diabetischen Myozyten. Dieser Unterschied stellt eine Tendenz mit einem p -Wert von 0,1416 dar. Im Mittel betrug der Delta-Wert für das Ausmaß der Kontraktion bei nicht-diabetischen Zellen 0,039 μm und bei diabetischen 0,014 μm .

3.3.2.3.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Neben dem Ausmaß der Kontraktion wurde auch die Kontraktionsgeschwindigkeit zwischen den beiden Stoffwechsellagen unter RBX-Exposition verglichen (Abb. 41).

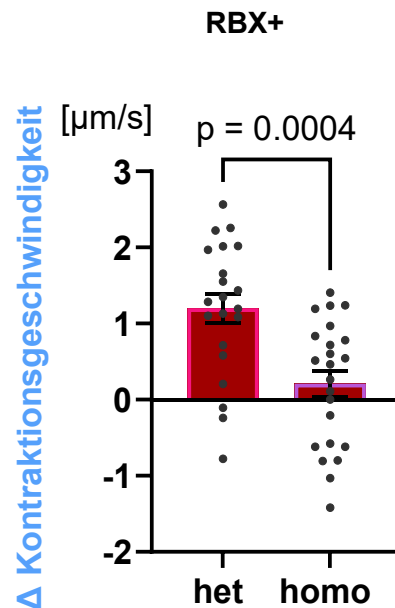


Abb. 41: Delta-Werte der Kontraktionsgeschwindigkeiten von Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage nach RBX-Exposition

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Kontraktionsgeschwindigkeiten von Kardiomyozyten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der beiden verschiedenen Stoffwechselgruppen wurden jeweils auf ihren Abfall der Amplitude während der 10-minütigen Messdauer in der jeweiligen Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage kontrahierten signifikant schneller als diabetische Myozyten ($p = 0,0004$). Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

het = nicht-diabetische Stoffwechsellage, homo = diabetische Stoffwechsellage

Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage zeigten unter RBX-Behandlung eine signifikant deutlichere Zunahme als diabetische Kardiomyozyten mit der gleichen Behandlung ($p = 0,0004$). Der Mittelwert der Delta-Werte der Kontraktionsgeschwindigkeiten in nicht-diabetischen Zellen betrug $1,201 \mu\text{m/s}$ und in den diabetischen Kardiomyozyten $0,209 \mu\text{m/s}$.

3.3.2.3.3 Relaxationsgeschwindigkeit

Ein sehr ähnliches Bild zu der Abb. 41 der Kontraktionsgeschwindigkeit ist die Darstellung der Delta-Werte der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 42).

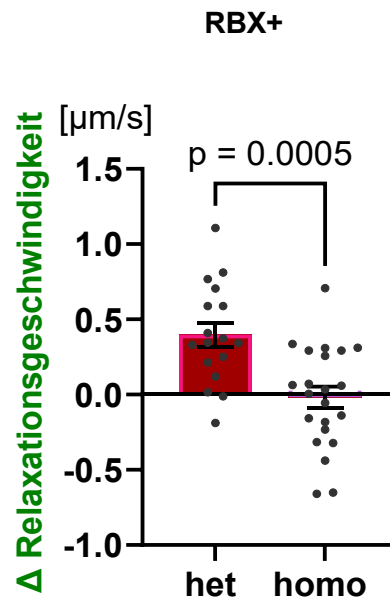


Abb. 42: Delta-Werte der Relaxationsgeschwindigkeiten von Kardiomyozyten ohne und mit diabetischer Stoffwechsellage nach RBX-Exposition

Das Säulendiagramm zeigt Mittelwerte der Delta-Werte der Relaxationsgeschwindigkeiten von Kardiomyozyten $\pm$ SEM. Die Delta-Werte der beiden verschiedenen Stoffwechselgruppen wurden jeweils auf ihren Abfall/Zunahme der Amplitude während der 10-minütigen Messdauer in der jeweiligen Kontrollgruppe normalisiert. Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage relaxierten signifikant schneller als diabetische Myozyten ($p = 0,0005$). Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels ungepaartem t -Test.

het = nicht-diabetische Stoffwechsellage, homo = diabetische Stoffwechsellage

Auch hier war die Zunahme der Geschwindigkeit der Relaxation der Zellen ohne diabetischen Stoffwechsel unter Behandlung mit RBX signifikant höher als in der Gruppe der diabetischen Kardiomyozyten ($p = 0,0005$). Im Mittel betrug unter RBX die Delta-Relaxationsgeschwindigkeit in den nicht-diabetischen Zellen $0,398 \mu\text{m/s}$ und in den diabetischen $-0,019 \mu\text{m/s}$.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer PKC-Aktivierung und Hemmung auf den intramyozytären Ca^{2+} -Kreislauf und auf die Sarkomerfunktion untersucht.

PMA als Aktivator der PKC führte in den Kardiomyozyten zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Ca^{2+} -Transports, sowohl die insgesamt freigesetzte Ca^{2+} -Menge als auch die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und -Abfalls waren reduziert. Zudem kontrahierten die Sarkomere der Kardiomyozyten unter aktivierter PKC weniger und auch die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit waren im Vergleich zur Kontrolle ohne PMA verlangsamt.

Die Auswirkungen einer PKC-Hemmung mittels RBX auf den intramyozytären Ca^{2+} -Transport und die Sarkomerfunktion wurden sowohl in Kardiomyozyten ohne als auch mit diabetischer Stoffwechsellage ermittelt. Die Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeit des zytosolischen Ca^{2+} und die freigesetzte Ca^{2+} -Menge vor jeder Kontraktion der nicht-diabetischen Kardiomyozyten waren unter RBX-Behandlung signifikant erhöht. Des Weiteren kontrahierten die Sarkomere deutlicher und auch die Kinetik der Kontraktion und Relaxation war unter RBX signifikant beschleunigt. Diese RBX-Effekte auf den myozytären Ca^{2+} -Kreislauf und die Sarkomerfunktion waren in Kardiomyozyten aus Mäusen mit diabetischer Stoffwechsellage aufgrund einer homozygoten Leptin-Rezeptor-Defizienz signifikant schwächer ausgeprägt.

4.1 Größe und Geschwindigkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme (Ca^{2+} -Kreislauf)

4.1.1 Proteinkinase C-Aktivierung – Verlangsamung des Ca^{2+} -Kreislaufs

In der vorliegenden Arbeit wurde in murinen Kardiomyozyten nach Inkubation mit PMA ein verringertes Ausmaß an freigesetztem intramyozytären Ca^{2+} und eine herabgesetzte Geschwindigkeit sowohl des Ca^{2+} -Anstiegs als auch des Ca^{2+} -Abfalls gemessen.

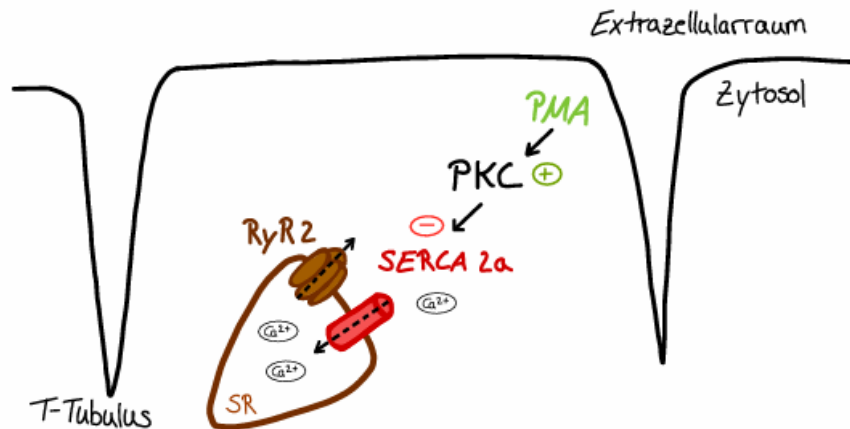


Abb. 43: Einfluss von PMA auf den Ca^{2+} -Kreislauf

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte unter PMA-Stimulation als PKC-Aktivator eine herabgesetzte Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls gemessen werden, vermutlich aufgrund einer gehemmten SERCA2a-Aktivität. Zudem zeigte sich die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs verlangsamt, hier dargestellt an der Ca^{2+} -Freisetzung über den RyR2, und die insgesamt freigesetzte intramyozytäre Ca^{2+} -Menge war verringert.

SERCA2a = sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum- Ca^{2+} -ATPase 2a, PKC = Protein-kinase C, SR = sarkoplasmatisches Retikulum, RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2, Ca^{2+} = Calcium-Ionen, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat

Ward *et al.* untersuchten ebenfalls den Effekt von PMA auf isolierte Kardiomyozyten [58]. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit verwendeten sie jedoch Meerschweinchen und nicht Mäuse als Modellorganismus. Eine Stimulation der isolierten Meerschweinchen-Kardiomyozyten mit einer PMA-Konzentration von 10^{-8} mol/l ergab nach 4 Min Stimulationsdauer ein herabgesetztes Ausmaß an freigesetztem Ca^{2+} im Vergleich zum Zeitpunkt vor PMA-Stimulation. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde der PMA-Effekt mit einer Konzentration von 10^{-5} mol/l an murinen isolierten Kardiomyozyten untersucht. Anhand Western blot Analysen wurde eine ideale PMA-Konzentration und Stimulationsdauer ermittelt, um einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von Substraten der PKC beobachten zu können. Es zeigte sich bei einer PMA-Konzentration von 10^{-5} mol/l kein auffälliger Unterschied zwischen Inkubationszeiten von 1 oder 2 Stunden. Einen annähernd ähnlichen Effekt der PKC-Aktivierung ließ sich bei einer PMA-Konzentration von 10^{-6} mol/l für 2 Stunden Inkubationszeit beobachten. Aufgrund der kürzeren Inkubationszeit und der damit einhergehenden höheren Qualität der frisch isolierten Primärzellen wurde eine Konzentration von 10^{-5} mol/l bei 1 Stunde Inkubation gewählt. In Vorversuchen zeigten kurze Inkubationszeiten von 15 Min oder 30 Min bei einer PMA-Konzentration von 10^{-6} mol/l keine deutliche Steigerung der Phosphorylierung von Substraten der PKC im Vergleich zur Inkubation mit DMSO als Kontrollgruppe. Neben den verschiedenen Speziesarten unterscheiden sich die Versuche von Ward *et al.* im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit in der Zielgröße der Konzentrations-Findungsstudie (Ca^{2+} -Transport versus Proteinphosphorylierung). Möglicherweise induzieren daher geringe PMA-Konzentrationen und kürzere Inkubationszeiten noch keine im Western blot sicher-detektierbare Phosphorylierungsänderung der PKC-Substrate, hätten aber bereits für eine Aktivierung der Ca^{2+} -Regulatoren ausgereicht. Trotz der Unterschiede in der Wahl des Modellorganismus als auch der PMA-Stimulationszeit und Konzentration ließ sich im

Hinblick auf die isolierten Kardiomyozyten in beiden Versuchsansätzen ein reduziertes Ausmaß der freigesetzten intrazellulären Ca^{2+} -Menge feststellen.

Neben der reduzierten freigesetzten Ca^{2+} -Menge in den Kardiomyozyten lässt sich auch die in dieser Arbeit gemessene reduzierte Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls unter PMA-Stimulation in der Literatur wiederfinden. Hierfür wurden an isolierten Ratten-Kardiomyozyten die intrazellulären Ca^{2+} -Transienten aufgezeichnet und nach PMA-Stimulation von 200 ng PMA/ml ($3,24 \times 10^{-7}$ mol/l) für 48 Stunden eine verlängerte Halbwertszeit des intramyozytären Ca^{2+} -Abfalls im Vergleich zu Kardiomyozyten ohne PMA gemessen [59]. Als mögliche Ursache führt Hartong *et al.* eine unter PMA-Stimulation reduzierte SERCA2a-Expression an. Die SERCA2a pumpt das freie intrazelluläre Ca^{2+} des myozytären Ca^{2+} -Kreislaufs zurück in das SR und ist somit maßgeblich an der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfall innerhalb der Kardiomyozyten beteiligt. Aufgrund der Beobachtung, dass die SERCA2a-mRNA erst nach 12 Stunden PMA-Inkubation herabgesetzt ist, schlussfolgerte die Arbeitsgruppe um Hartong, dass PMA keinen direkten Effekt auf die SERCA2a-Herabregulation, z.B. in Form einer PKC-Aktivitätserhöhung, ausübt, sondern durch nachgeschaltete Ereignisse vermittelt wird. Die PMA-Inkubation der murinen Kardiomyozyten erfolgte in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Hartong *et al.* mit einer höheren PMA-Konzentration von 10^{-5} mol/l, jedoch unter deutlich kürzerer Stimulationsdauer von einer Stunde. Dies lässt eine veränderte genetische Expression der SERCA2a-mRNA unwahrscheinlich erscheinen, da in den Experimenten von Hartong *et al.* zwar unter niedrigerer PMA-Konzentration von $3,24 \times 10^{-7}$ mol/l, aber erst frühestens nach 12 Stunden eine veränderte SERCA2a-mRNA nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigte sich eine signifikante Abnahme der SERCA2a-Proteinmenge erst nach 80-stündiger Inkubation mit PMA ($3,24 \times 10^{-7}$ mol/l). Es gilt jedoch zu beachten, dass es sich bei den Experimenten von Hartong *et al.* und denen der vorliegenden Arbeit um zwei verschiedene Modellorganismen handelt und eine direkte Vergleichbarkeit daher nicht möglich ist.

Im Gegensatz zu Hartong *et al.* stellt die Arbeitsgruppe um Braz nicht eine veränderte genetische Expression und Proteinmenge der SERCA2a-Pumpen in den Mittelpunkt der Diskussion, sondern beschreibt insbesondere die PMA-vermittelte PKC-Aktivierung als direkte Ursache für die herabgesetzte SERCA2a-Funktion [60]. Phorbol ester und damit auch PMA sind potente Aktivatoren der PKC [47]. Sie stellen einen wichtigen Bestandteil bei der Untersuchung einer Vielzahl an PKC-abhängigen Effekten in Zellen dar [58]. Die PKC α ist die im Herzen am stärksten exprimierte Isoform und bildet einen fundamentalen Regulator für den Ca^{2+} -Kreislauf in den Kardiomyozyten. Unter Stimulation mit PMA verändert sie ihre Lokalisation und transloziert zu der Z-Linie und den T-Tubuli-Netzwerken. Hier liegen ebenfalls erhöhte Mengen an L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, PLN, SERCA2a und PP-1 vor. Diese räumliche Lokalisation erlaubt der PKC α über die Phosphorylierung des I-1 eine Hochregulation der PP-1 Aktivität. Eine Zunahme der PP-1 Aktivität führt zu einer vermehrten Hypophosphorylierung von PLN, die eine Inhibition der SERCA2a nach sich zieht. Die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Abfalls und die Beladung des SR mit Ca^{2+} sind infolge der inhibierten SERCA2a herabgesetzt und darauffolgend die Freisetzung des Ca^{2+} während der Systole reduziert [15, 31, 60]. Dies ist übereinstimmend mit dem in der vorliegenden Arbeit gemessenen, reduzierten Ausmaß an freigesetztem Ca^{2+} und der verlangsamten Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und -Abfalls innerhalb der Kardiomyozyten unter PMA-Stimulation.

4.1.2 Proteinkinase C-Inhibition – verschiedene Stoffwechsellagen

Die Haupttodesursache bei Patienten mit T2DM sind kardiovaskuläre Ereignisse [61]. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der PKC in diabetischen Herzen erhöht ist und damit möglicherweise mitverantwortlich für die beeinträchtigte Herzfunktion bei Diabetikern ist [41, 43]. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht somit die pharmakologische Inhibition der PKC, um die Bedeutung der PKC insbesondere in diabetischen Kardiomyozyten darzustellen und so der Gefahr eines kardiovaskulären Ereignisses bei Diabetikern entgegenzuwirken. Zunächst wurde der Effekt des PKC-Inhibitors RBX auf den intramyozytären Ca^{2+} -Kreislauf sowohl bei nicht-diabetischen als auch diabetischen Kardiomyozyten untersucht und anschließend ein Vergleich gezogen.

4.1.2.1 RBX beschleunigt den intramyozytären Ca^{2+} -Kreislauf der nicht-diabetischen Kardiomyozyten

In den nicht-diabetischen Kardiomyozyten wurde nach PKC-Inhibition mittels RBX-Inkubation vermehrt intrazelluläres Ca^{2+} freigesetzt und die Geschwindigkeit des intramyozytären Ca^{2+} -Anstiegs und -Abfalls war erhöht.

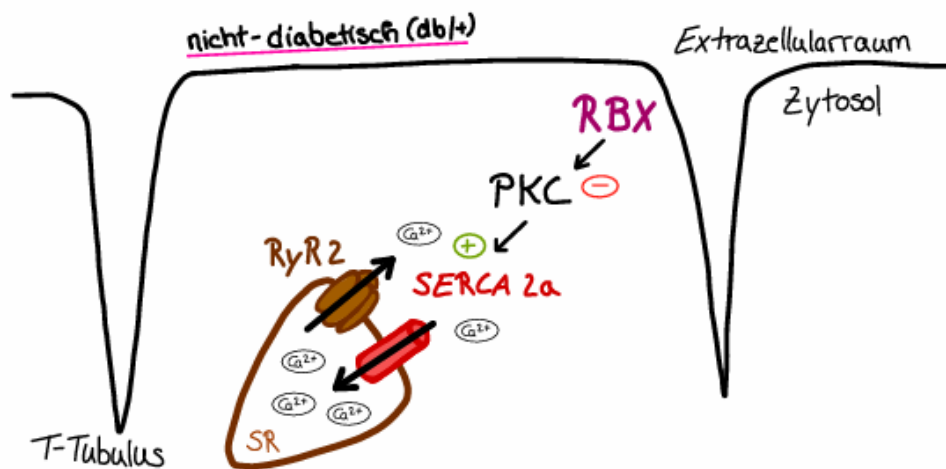


Abb. 44: Einfluss von RBX auf den Ca^{2+} -Kreislauf nicht-diabetischer Kardiomyozyten

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte RBX über eine PKC-Hemmung die Geschwindigkeit des zytosolischen Ca^{2+} -Abfalls in Kardiomyozyten beschleunigen, insbesondere die SERCA2a scheint in diesem Zusammenhang eine bedeutende regulatorische Rolle zu spielen. Des Weiteren zeigte sich die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs erhöht, hier dargestellt durch die Ca^{2+} -Freisetzung über den RyR2, und die insgesamt freigesetzte Menge des intrazellulären Ca^{2+} war unter RBX gesteigert.

SERCA2a = sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum- Ca^{2+} -ATPase 2a, PKC = Protein-kinase C, SR = sarkoplasmatisches Retikulum, RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2, Ca^{2+} = Calcium-Ionen, RBX = Ruboxistaurin

Parallel hierzu konnte in vergangenen Studien in Kardiomyozyten genetisch modifizierter Mäuse mit fehlender PKC α (PKC $\alpha^{-/-}$) eine größere Amplitude der intramyozytären Ca $^{2+}$ -Transienten und damit vermehrt freigesetztes intrazelluläres Ca $^{2+}$ gemessen werden als in Myozyten der Kontrollgruppe (Wildtyp) [31]. Zudem war die Geschwindigkeit des Ca $^{2+}$ -Abfalls in den PKC $\alpha^{-/-}$ -Kardiomyozyten beschleunigt [60]. Als mögliche Ursache für den Anstieg der Ca $^{2+}$ -Transienten wurde eine Erhöhung der Ca $^{2+}$ -Ströme über L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanäle im Sarkolemm diskutiert. Die PKC α kann über die $\alpha 1c$ -Untereinheit der L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanäle eine Hemmung der Kanalaktivität vermitteln [45, 62]. Eine Inhibition bzw. Deletion der PKC α könnte möglicherweise die Aktivität der L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanäle steigern und somit über die Wechselwirkung mit den RyR des SR die Ca $^{2+}$ -Freisetzung verstärken. Direkte Messungen der mittleren L-Typ-Ca $^{2+}$ -Stromdichte ergaben jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und PKC $\alpha^{-/-}$ -Myozyten. Weiterführend konnte die Arbeitsgruppe um Molkentin sowohl eine um 30 % herabgesetzte PP1-Aktivität als auch eine damit einhergehende erhöhte PLN-Phosphorylierung an Serin16 in PKC $\alpha^{-/-}$ -Herzen messen. Dies bedingt eine gesteigerte SERCA2a-Aktivität mit einer nachfolgend gemessenen erhöhten Ca $^{2+}$ -Beladung des SR. In der Systole kann mehr Ca $^{2+}$ aus dem SR freigesetzt werden und auch die Kinetik der Ca $^{2+}$ -Ströme kann so durch ein Fehlen der PKC α erhöht werden. Kardiomyozyten mit fehlender PKC $\beta\gamma$ (PKC $\beta\gamma^{-/-}$) zeigten weder ein signifikant verändertes freigesetztes Ca $^{2+}$ -Ausmaß noch eine erhöhte PLN-Phosphorylierung. Zudem wurden keine weiteren Veränderungen in den Mengen von PLN-, SERCA2a oder RyR-Proteinen in den Herzen der beiden Genotypen von Mäusen beobachtet. Die Arbeitsgruppe um Molkentin ordnet somit insbesondere der Isoform PKC α eine bedeutende Rolle im Rahmen des Ausmaßes des intramyozytären Ca $^{2+}$ -Transports zu. Die vorliegende Arbeit verwendet RBX als PKC-Inhibitor der murinen Kardiomyozyten. RBX wurde in spät-klinischen Studien zur Behandlung des diabetischen Makula-Ödems eingesetzt und hierbei als selektiver PKC β -Inhibitor beschrieben [63]. Dagegen stellten Liu *et al.* und die Arbeitsgruppe Hambleton eine gleichermaßen selektive Inhibition der α -Isoform fest (EC50 von 14 nmol/l für PKC α und EC50 von 19 nmol/l für PKC β II) [31, 64]. Zusätzlich gegeben, dass die PKC α die prädominante Isoform der PKC im Herzen ist, vermuten die Autoren, dass RBX am Herzen hauptsächlich über die α -Isoform wirkt. Eine Deletion der PKC α in den Kardiomyozyten (PKC $\alpha^{-/-}$) kann somit analog zu der in der vorliegenden Arbeit vorrangig gehemmten PKC α -Isoform durch RBX zu dem beschriebenen beschleunigten intramyozytären Ca $^{2+}$ -Kreislauf auf Grundlage der PKC α -vermittelten Erhöhung der SERCA2a-Aktivität führen.

4.1.2.2 RBX führt zu einem unveränderten intramyozytären Ca $^{2+}$ -Kreislauf der diabetischen Kardiomyozyten

Die diabetischen Kardiomyozyten setzten unter RBX-Inkubation eine tendenziell erhöhte Menge an Ca $^{2+}$ frei, allerdings zeigte sich die Geschwindigkeit des Ca $^{2+}$ -Anstiegs und -Abfalls im Vergleich zu der Kontrollgruppe unverändert.

Die im Trend erhöht freigesetzte Ca $^{2+}$ -Menge durch PKC-Inhibition kann anhand einer gesteigerten PKC-Aktivität in diabetischen Kardiomyozyten erklärt werden. Bekannt ist, dass unter diabetischer Stoffwechsellage der Ca $^{2+}$ -Transport in Kardiomyozyten gestört ist. Insbesondere die Dysfunktion des SR wird hierfür in vielen Studien als Ursache angeführt [1]. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass hierbei PLN als Regulator der SERCA2a-Aktivität eine entscheidende Rolle im Rahmen der SR-Dysfunktion spielt.

Diabetische Kardiomyozyten weisen bereits unter basalen Bedingungen einen reduzierten Anteil an phosphorylierten PLN-Monomeren auf. Der Proteingehalt des gesamten PLN zeigt sich hingegen unverändert. Dieses Phänomen wurde in demselben Modellorganismus festgestellt, der auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (db/db-Mäuse) [38, 41]. Demnach führt ein erhöhter Anteil an dephosphoryliertem PLN, als Inhibitor der SERCA2a, insbesondere zu einer verlangsamen und damit reduzierten Ca^{2+} -Aufnahme in das SR. Ein Grund für die reduzierte Phosphorylierung von PLN-Monomeren stellt in den db/db-Herzen möglicherweise die erhöhte Aktivität der PKC dar [43]. Diese kann Folge der chronischen Entzündungsprozesse bei Diabetes sein und durch die intrazelluläre DAG-Freisetzung im Rahmen des veränderten Lipid-Haushalts in den db/db-Myozyten beeinflusst worden sein [41, 44]. Eine Inhibition der erhöhten PKC-Aktivität durch RBX führt über einen erhöhten Anteil an phosphoryliertem PLN zu einer gesteigerten SERCA2a-Aktivität. Mehr Ca^{2+} kann so in das SR gepumpt und bei der nächsten Kontraktion freigesetzt werden, das Ausmaß an freigesetzter Ca^{2+} -Menge ist erhöht. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit war die Steigerung der freigesetzten intramyozytären Ca^{2+} -Menge jedoch nur im Trend zu beobachten. Entgegen der Erwartung zeigte sich trotz der vermuteten gesteigerten SERCA2a-Aktivität unter PKC-Inhibierung die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und -Abfalls unverändert zu der Kontrollgruppe ohne RBX-Inkubation.

Eine erste mögliche Erklärung hierfür liefert eine nicht PKC-abhängige Veränderung in diabetischen Kardiomyozyten, die einen Einfluss von RBX als PKC-Inhibitor unwirksam macht. Neben der bereits geschilderten PKC-Aktivitätserhöhung in diabetischen Mäusen kann ebenso eine veränderte neuronale Aktivität Ursache der verminderten Phosphorylierung von PLN sein [38, 65]. Laut der Arbeitsgruppe um Giachetti ist es denkbar, dass ein längerer Anstieg der Glukose im Rahmen der diabetischen Stoffwechsellage zu einer Abnahme der Sympathikus-Aktivität führt und dadurch den Abfall des phosphorylierten PLN erklärt [65]. Eine pharmakologische Inhibierung der PKC mit RBX bleibt in diesem Fall ohne Auswirkung auf den Ca^{2+} -Kreislauf und kann somit die unveränderte Ca^{2+} -Anstiegs- und -Abfallgeschwindigkeit erklären, nicht jedoch die im Trend erhöhte freigesetzte Ca^{2+} -Menge.

Eine PKC-abhängige Erklärung könnte auf der Isolation der Kardiomyozyten beruhen. Die erhöhte PKC-Aktivität bei diabetischer Stoffwechsellage wurde in intaktem Gewebe festgestellt. Somit könnte die Isolierung der einzelnen Kardiomyozyten zu einer herabgesetzten PKC-Aktivierung führen, da die Zellen sich nicht mehr in ihrem hyperglykämischen Milieu befinden, das zur PKC-Aktivierung einen wesentlichen Beitrag leisten könnte [66]. Eine Inkubation mit einem PKC-Inhibitor führt folglich zu einem unveränderten intramyozytären Ca^{2+} -Kreislauf.

Das nachfolgende Kapitel 4.1.2.3 stellt weitere Möglichkeiten als Erklärung für den unveränderten Ca^{2+} -Kreislauf diabetischer Kardiomyozyten unter RBX dar und bezieht sich dabei sowohl auf histologische Aspekte als auch Stoffwechseleränderungen bei Diabetes.

4.1.2.3 Vergleich der beiden Stoffwechsellagen

Im Vergleich zeigte die RBX-Stimulation signifikante Unterschiede zwischen der diabetischen und der nicht-diabetischen Stoffwechsellage von Kardiomyozyten. Sowohl das Ausmaß an freigesetztem intrazellulären Ca^{2+} als auch die Ca^{2+} -Anstiegs- und Abfallskinetik waren unter RBX in den nicht-diabetischen Myozyten höher als in den diabetischen Myozyten. Es stellt sich die Frage, warum nicht umgekehrt eine PKC-Inhibierung den Ca^{2+} -Kreislauf in den db/db-Kardiomyozyten mit erhöhter PKC-Aktivität stärker beschleunigt als in den nicht-diabetischen Tieren ohne erhöhte PKC-Aktivität [43].

Neben dem bereits unter 4.1.2.2 aufgeführten Argument der eingeschränkten RBX-Wirkung auf diabetische Kardiomyozyten lassen sich insbesondere beim Vergleich der beiden Stoffwechsellagen mögliche Unterschiede als weitere Ursachen herausarbeiten.

Eine mögliche Antwort der eingangs gestellten Frage liefert die Oil Red O-Färbung von db/db-Kardiomyozyten in Funk *et al.* [41]. Es lassen sich eindrücklich die vielen Fetttropfchen, verteilt über die ganze Zelle, erkennen. Es scheint, dass die tropfenförmigen Lipide sich entlang der Sarkomerstruktur der Myozyten anlagern. Diese massive Akkumulation könnte eine Barriere für das RBX bilden, da möglicherweise das RBX aufgrund seiner Lipophilie vom Fett gebunden wird. Folglich könnte das RBX seine intrazelluläre Zielstruktur nicht erreichen und damit auch keinen starken Effekt auf den Ca^{2+} -Kreislauf der db/db-Mäuse ausüben. Diese histologische Veränderung des db/db-Myokards existiert nicht in den Kardiomyozyten ohne diabetische Stoffwechsellage. Eine Möglichkeit, dieser zellulären Charakteristik von db/db-Myozyten entgegenzuwirken, wäre unter anderem eine Erhöhung der RBX-Konzentration oder eine längere Stimulationszeit.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete RBX-Konzentration wurde anhand von Western blot Analysen mit Wildtyp-Kardiomyozyten bestimmt. Eine RBX-Inkubation von 10 Min bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/l zeigte bereits eine herabgesetzte Menge an PKC-phosphorylierten Proteinen. Eine längere Inkubationsdauer von 30 Min bei gleichbleibender Konzentration reduzierte die PKC-phosphorylierten Proteine weiter. Aufgrund der Möglichkeit, die gleiche Zelle zunächst unter basalen Bedingungen und anschließend nach RBX-Stimulation messen zu können, wurde für die Experimente dieser Arbeit die Inkubation von 10 Min bei 10^{-6} mol/l RBX ausgewählt. Eine Einschränkung der Aussage zu der PKC-Inhibierung stellt jedoch das verwendete Mausmodell des Wildtyps dar. Möglicherweise hätten Western blot Analysen von db/db-Kardiomyozyten gezeigt, dass bei einer RBX-Konzentration von 10^{-6} mol/l für 10 Min keine adäquate PKC-Hemmung erfolgen kann.

Eine weitere mögliche Antwort auf die zu Beginn des Kapitels gestellte Frage bezieht sich auf die Veränderungen der Stoffwechsellage bei diabetischen Kardiomyozyten. In diabetischen Kardiomyozyten findet im Gegensatz zu nicht-diabetischen Zellen eine Umschaltung von der Glykolyse auf die Fettsäureoxidation statt, die mit einem erhöhten myokardialen Sauerstoffverbrauch einhergeht [67, 68]. Es kommt zu einer mitochondrialen Entkopplung der ATP-Synthese vom Sauerstoffverbrauch. Dies führt zu einer Energieverarmung der Zellen. Besonders die SERCA2a der Kardiomyozyten weist einen hohen ATP-Verbrauch auf, um den Ca^{2+} -Gradienten über die SR-Membran aufrecht zu erhalten, und wäre so in ihrer Funktion stark beeinträchtigt. Darüber hinaus ist bekannt,

dass eine erhöhte Fettsäureoxidation zu einer Verringerung der mitochondrialen Oxidationskapazität und einer Erhöhung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt [41]. Es wurde zudem gezeigt, dass ROS die SERCA-Aktivität herabregulieren [69]. Diese Stoffwechselveränderungen im diabetischen Herzen können Ursache dafür sein, dass RBX seinen SR-abhängigen Wirkmechanismus nicht ungehindert ausüben kann und die Kardiomyozyten der nicht-diabetischen Kontrollgruppe stärker von der PKC-Hemmung profitierten.

Zuletzt kann eine verminderte Proteinexpression der SERCA2a in db/db-Herzen als Erklärung für die im Vergleich zu den nicht-diabetischen Herzen herabgesetzte Menge an Ca^{2+} und langsamere Ca^{2+} -Anstiegs- und -Abfallsgeschwindigkeit unter RBX diskutiert werden [1, 38, 41]. RBX könnte über die erhöhte PKC-Aktivität in diabetischen Kardiomyozyten die Aktivität der SERCA2a besonders stark steigern, jedoch nicht in dem Ausmaß, die reduzierte SERCA2a-Expression auszugleichen. Folglich stellt sich der Ca^{2+} -Kreislauf unter RBX-Stimulation in den diabetischen Kardiomyozyten langsamer als in den nicht-diabetischen Herzen mit unveränderter SERCA2a-Expression dar. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass beim Betrachten des Ca^{2+} -Kreislaufs diabetischer Kardiomyozyten eine RBX-Inkubation nur mit einer tendenziell erhöhten freigesetzten Ca^{2+} -Menge einher ging und die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und -Abfalls unverändert blieb (Kapitel 3.2.2.2). Es erscheint somit wahrscheinlich, dass RBX z.B. aufgrund der oben aufgeführten histologischen Veränderungen unter diabetischer Stoffwechsellage und den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen kaum Auswirkungen auf die SERCA2a diabetischer Kardiomyozyten ausüben kann.

4.2 Sarkomerfunktion

4.2.1 Proteinkinase C-Aktivierung – herabgesetzte Sarkomerfunktion

Es stellt sich nun die Frage, inwiefern eine PKC-Aktivierung mit PMA die Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten beeinflusst und inwieweit der Ca^{2+} -Kreislauf hierbei eine Rolle spielt. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde sowohl ein herabgesetzter Ca^{2+} -Kreislauf (Kapitel 3.2.1) als auch eine verringerte kontraktile Amplitude und Kontraktions-/Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere nach PMA-Inkubation von 10^{-5} mol/l für eine Stunde gemessen (Kapitel 3.3.1).

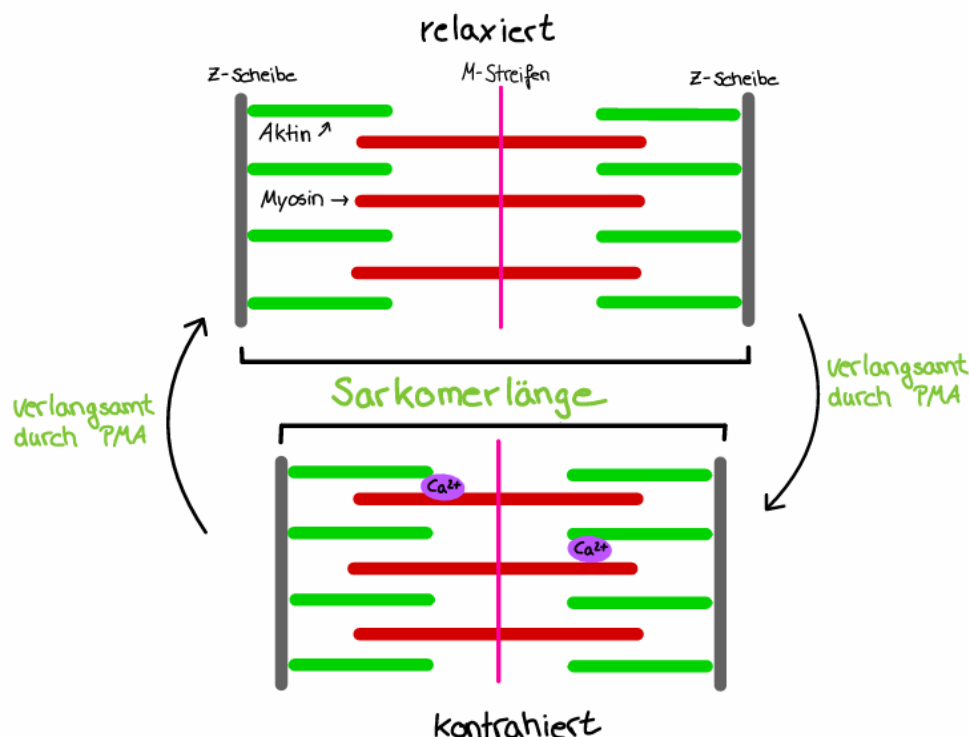


Abb. 45: Einfluss von PMA auf die Sarkomerfunktion isolierter Kardiomyozyten

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit führte eine PMA-Stimulation zu einer geringeren Kontraktion der Sarkomere, die kontraktile Amplitude zeigte sich demnach herabgesetzt. Ebenso waren die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten der einzelnen Kardiomyozyten unter PMA verlangsamt.

Ca^{2+} = Calcium-Ionen, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat

Die Funktion der Sarkomere von Kardiomyozyten wird durch schnelle Veränderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration koordiniert [60]. Die erniedrigte Menge an freigesetztem intrazellulären Ca^{2+} in den Kardiomyozyten unter einer PMA-Stimulation von 10^{-8} mol/l geht gemäß Ward *et al.* mit einer herabgesetzten Inotropie einher, gemessen anhand von Kraftmessungen an ganzen Meerschweinchen-Herzen [58]. Als Ursache der verringerten Kontraktionsstärke infolge der PMA-Stimulation werden nicht PKC-abhängige Mechanismen vermutet. Grundlage dieser Annahme ist ein ebenfalls negativer inotroper Effekt weiterer Phorbole, die jedoch nicht die PKC aktivieren. Zudem lässt sich der negativ

inotrope Effekt unter einer PMA-Stimulation mit 10^{-8} mol/l nicht durch eine PKC-Hemmung aufheben. Als PKC-unabhängige Mechanismen für die negative Inotropie führt Ward *et al.* zum einen den Zusammenhang mit dem Vorhandensein der Fettsäureseitenketten auf. So zeigen die PKC-aktivierenden Phorbolster mit einer langen Seitenkette, wie z.B. PMA, eine stärkere negative inotrope Wirkung als Phorbol-Dibutyrate, ebenfalls ein Phorbolster, jedoch mit einer kurzen Seitenkette. Zum anderen deutet im Rahmen der herabgesetzten Kinetik der Sarkomere unter PMA-Stimulation insbesondere die stark verlangsamte Relaxationsgeschwindigkeit auf eine Hemmung der sarkoplasmatischen retikulären Funktion hin. Dieser Effekt wurde jedoch auch unter Phorbol-Didecanoat, einem nicht PKC-aktivierenden Phorbolster, beobachtet, was für eine PKC-unabhängige Wirkung auf das SR spricht. An dieser Stelle ist jedoch zu beachten, dass Ward *et al.* Meerschweinchen-Herzen als Modellorganismus nutzte und somit die beschriebenen Beobachtungen nicht exakt auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten an murinen Kardiomyozyten zu übertragen sind. Die Experimente der vorliegenden Arbeit treffen Aussagen, inwieweit und schnell die Sarkomere kontrahieren, jedoch findet keine Messung der Kraftgenerierung statt. Die verringerte kontraktile Amplitude und Kontraktions-/ Relaxationsgeschwindigkeit nach PMA-Inkubation stehen jedoch im Einklang mit der unter PMA gemessenen negativen Inotropie von Meerschweinchen-Herzen der Arbeitsgruppe um Ward.

Im Gegensatz dazu liefern Watson *et al.* eine mögliche PKC-abhängige Erklärung für die negative Inotropie isolierter Rattenherzen unter PMA-Stimulation [70]. Sie diskutieren eine PKC-abhängige Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers in isolierten Rattenherzen mit nachfolgend erhöhten Na^+ -Konzentrationen. Es folgt eine vermehrte Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Dies führt zu einer Ca^{2+} -Überladung mit nachfolgend herabgesetzter Kontraktilität. Interessanterweise konnte jedoch keine Studie, die im Rahmen des negativen inotropen Effekts von einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgeht, einen positiven inotropen Effekt aufzeichnen, der einer Ca^{2+} -Überladung vorausgehen würde [58].

Einen weiteren PKC-abhängigen Mechanismus als mögliche Ursache für die herabgesetzte kontraktile Amplitude und Kinetik der Sarkomerkontraktion und Relaxation stellen Braz *et al.* dar [60]. Sie gehen dabei insbesondere auf den Zusammenhang zwischen verändertem Ca^{2+} -Kreislauf der Kardiomyozyten unter PKC-Aktivierung und die damit einhergehende Funktion der Sarkomere ein. Transgene Mäuse mit einer Überexpression der PKC α zeigen hypokontraktile Herzen, im Gegensatz dazu haben PKC α -defiziente Mäuse hyperkontraktile Herzen. Um den sekundären Effekten einer chronisch veränderten PKC-Aktivität zu entgehen, wurde in adulten Rattenmyozyten eine akute Steigerung bzw. Hemmung der PKC-Aktivität mittels Adenovirus-vermitteltem Gentransfer von Wildtyp (AdPKC- α) oder dominant-negativer PKC- α (AddnPKC- α) durchgeführt (akut für 24-48 Stunden infiziert). Im Hinblick auf die kontraktile Reaktionsfähigkeit der einzelnen Zellen konnte eine reduzierte myozytäre Kontraktilität unter Steigerung der PKC-Aktivierung festgestellt werden, gemessen an der maximalen Verkürzung. Die Myozyten des AddnPKC- α Typs zeigten hingegen eine erhöhte Kontraktilität. Auch die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit zeigte im Vergleich die höchste Geschwindigkeit in den Myozyten mit dominant-negativer PKC α , danach folgte die Kontrollgruppe und die langsamste Kontraktionsgeschwindigkeit wurde in der Gruppe unter PKC-Aktivierung gemessen. Diese Unterschiede stellten sich mit $p < 0,05$ als signifikant dar. Anhand spezifischer PP1-Phosphatase Assays konnte eine gesteigerte PP1-Aktivität in den transgenen Mäusen mit überexprimierter PKC α gemessen werden. Übereinstimmend

zeigte sich auch in den akut infizierten Kardiomyozyten mit AdPKC- α eine um 30 % gesteigerte PP1-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe, dagegen wiesen Kardiomyozyten mit AddnPKC- α eine um 60 % reduzierte PP1-Aktivität auf. Eine hohe PKC-Aktivität setzt somit über den I-1 und die daraus folgende erhöhte PP1-Aktivität die SERCA2a-Aktivität herab, die freigesetzte Ca^{2+} -Menge und die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und -Abfalls pro Kontraktion sind reduziert. Weniger freigesetztes intrazelluläres Ca^{2+} kann mit einem verringerten Ausmaß der Kontraktion der Sarkomere einhergehen und eine verlangsamte Geschwindigkeit des intramyozytären Ca^{2+} -Anstiegs und -Abfalls steht in Zusammenhang mit einer herabgesetzten Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde der Phorbolester PMA als potenter, breit wirkender PKC-Aktivator verwendet [31, 58]. Das in den Experimenten gemessene verringerte Ausmaß der Kontraktion und die herabgesetzte Kontraktions-/Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere unter PMA-Stimulation kann somit möglicherweise Auswirkung einer erhöhten PP1-Aktivität, wie in den akut infizierten Kardiomyozyten mit AdPKC- α nachgewiesen, sein.

Die PKC α kann auch über eine Phosphorylierung der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2) die kardiale Kontraktilität direkt beeinflussen [45]. Die Hauptaufgabe der β -adrenergen Rezeptoren am Herzen ist die Regulierung der Kontraktilität als Reaktion auf Katecholamine [71]. Eine mögliche Desensibilisierung der Rezeptoren stellt sicher, dass keine unkontrollierte Stimulation stattfindet. Dieser Effekt wird durch eine Phosphorylierung der β -adrenergen Rezeptoren, unter anderem durch die GRK2, vermittelt. Eine erhöhte PKC α -Aktivität durch eine PMA-Stimulation führt zu einer gesteigerten GRK2-vermittelten Phosphorylierung und Aktivierung und damit zu einer Beeinträchtigung der durch β -Agonisten stimulierten ventrikulären Funktion. Dieser Mechanismus kann unter Voraussetzung einer β -adrenergen Basalaktivität in den isolierten Zellen zu der in der vorliegenden Arbeit gemessenen herabgesetzten kontraktile Amplitude und Kontraktions-/Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere unter PMA-Stimulation beitragen.

4.2.2 Proteinkinase C-Inhibition – verschiedene Stoffwechsellagen

4.2.2.1 RBX aktiviert die Sarkomerfunktion nicht-diabetischer Kardiomyozyten

Neben dem Ausmaß der Kontraktion war auch die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere von nicht-diabetischen Kardiomyozyten unter RBX gesteigert.

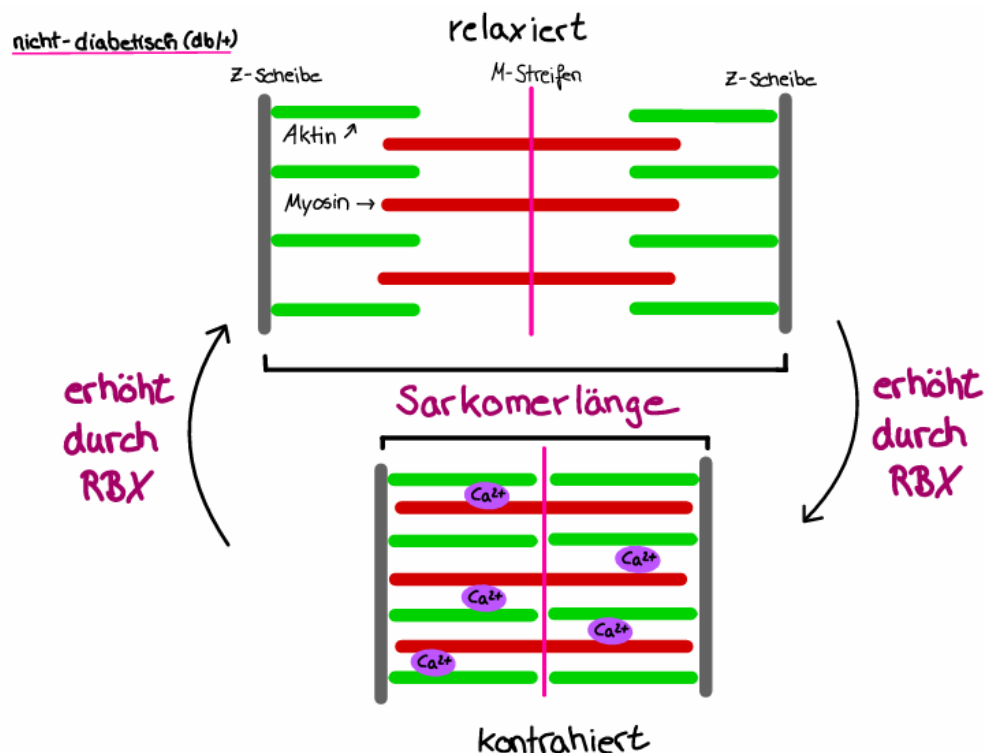


Abb. 46: Einfluss von RBX auf die Sarkomerfunktion isolierter nicht-diabetischer Kardiomyozyten

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte RBX zu einer erhöhten kontraktile Amplitude führen, die Sarkomere verkürzten sich somit in der Systole stärker. Die Geschwindigkeit sowohl der Kontraktion als auch der anschließenden Relaxation war unter RBX erhöht.

Ca²⁺ = Calcium-Ionen, RBX = Ruboxistaurin

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass PMA als PKC-Aktivator sowohl den Ca²⁺-Kreislauf als auch die kardiale myozytäre Sarkomerfunktion herabsetzen kann [31, 64]. Mehrere Experimente verdeutlichten dies an einer reduzierten Kontraktion muriner Kardiomyozyten, der herabgesetzten Kontraktilität isolierter Rattenherzen [72-74] und in der geringeren kontraktile Amplitude und Kontraktions-/ und Relaxationsgeschwindigkeit muriner isolierter Myozyten unter PMA (Kapitel 3.3.2.1). Demgegenüber zeigte die in dieser Arbeit durchgeführte PKC-Inhibition einen entgegengesetzten Effekt. Auf der Annahme basierend, dass PMA als PKC-Aktivator zu einer reduzierten Sarkomerfunktion der Herzen führt, untersuchten Liu *et al.* ebenfalls den gegenteiligen Effekt einer PKC-Hemmung [31].

Sie konnten zeigen, dass an Wildtyp-PKC α -exprimierenden Mäusen unter RBX eine gesteigerte kardiale Kontraktilität vorlag. Im Gegensatz dazu hatte RBX keine Auswirkung auf die kardiale Kontraktilität in Mäusen ohne PKC α . Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der in weiterer Literatur beschriebenen regulatorischen Funktion der PKC α -Isoform in Bezug auf den kardialen Ca²⁺-Kreislauf und die Sarkomerfunktion [60]. Die Experimente von Liu *et al.* verdeutlichen zudem, dass RBX erfolgreich die α -Isoform der PKC hemmen kann und damit eine erfolgversprechende pharmakologische Intervention zur Kontraktilitätssteigerung darstellt. Übereinstimmend hierzu sind in der vorliegenden Arbeit die kontraktile Amplitude und die Kinetik der Kontraktion und Relaxation der einzelnen Kardiomyozyten unter RBX ebenfalls erhöht.

Die naheliegende Erklärung für diese Ergebnisse basiert auf dem bereits beschriebenen SR-abhängigen Mechanismus [31]. Die pharmakologische Inhibition der PKC α -Aktivität führt über I-1 und PP1 zu einer erhöhten Phosphorylierung des PLN mit nachfolgender SERCA2a-Aktivierung. Die gesteigerte Kontraktilität wäre somit Folge der erhöhten Ca²⁺-Beladung des SR und der beschleunigten Kinetik des Ca²⁺-Transports unter RBX.

Außerdem könnte der Phosphorylierungsstatus der Myofilamentproteine zu deren erhöhter Kontraktion unter RBX beitragen. Eine Vielzahl an Studien konnte zeigen, dass die Phosphorylierung von cTnI und cTnT durch zahlreiche PKC-Isoenzyme eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Kraftentwicklung des ventrikulären Myofilaments, Ca²⁺-Sensitivität und Kontraktilität spielt [75, 76]. Insbesondere der PKC α konnte eine Schlüsselrolle in der kontraktile Dysfunktion zugewiesen werden [60]. Es ist daher plausibel, dass eine erhöhte PKC α -Aktivität über Phosphorylierung der cTnI und/oder cTnT zu einer Myofilamentdysfunktion mit herabgesetzter Ca²⁺-Empfindlichkeit der Myofilamente und geringerer Kontraktilität der Myozyten führt [45]. Belin *et al.* bestätigten dies, indem sie an ventrikulären Myozyten einen Abfall der Ca²⁺-Empfindlichkeit der Myofilamente durch eine PKC α -induzierte Phosphorylierung messen konnten [77]. Darüber hinaus zeigten sie, dass eine PP1-abhängige Dephosphorylierung dem entgegenwirken könnte. Eine Inhibition der PKC α mittels RBX könnte somit kardioprotektiv sein, indem eine PKC α -vermittelte Phosphorylierung der Myofilamentproteine cTnI und cTnT verhindert wird [31].

Weiterführend wurde in der Vergangenheit die PKC-vermittelte Phosphorylierung mit einer Degeneration der Myofibrillen in Kardiomyozyten in Verbindung gebracht [45]. Die Erhaltung der Integrität der Myofibrillen könnte ein weiterer möglicher Mechanismus für die positiven Auswirkungen der PKC-Hemmung sein [78].

4.2.2.2 RBX führt zu einer unveränderten Sarkomerkontraktion der diabetischen Kardiomyozyten

Die kontraktile Amplitude und die Kontraktions-/Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere blieb in den diabetischen Kardiomyozyten unter RBX unverändert.

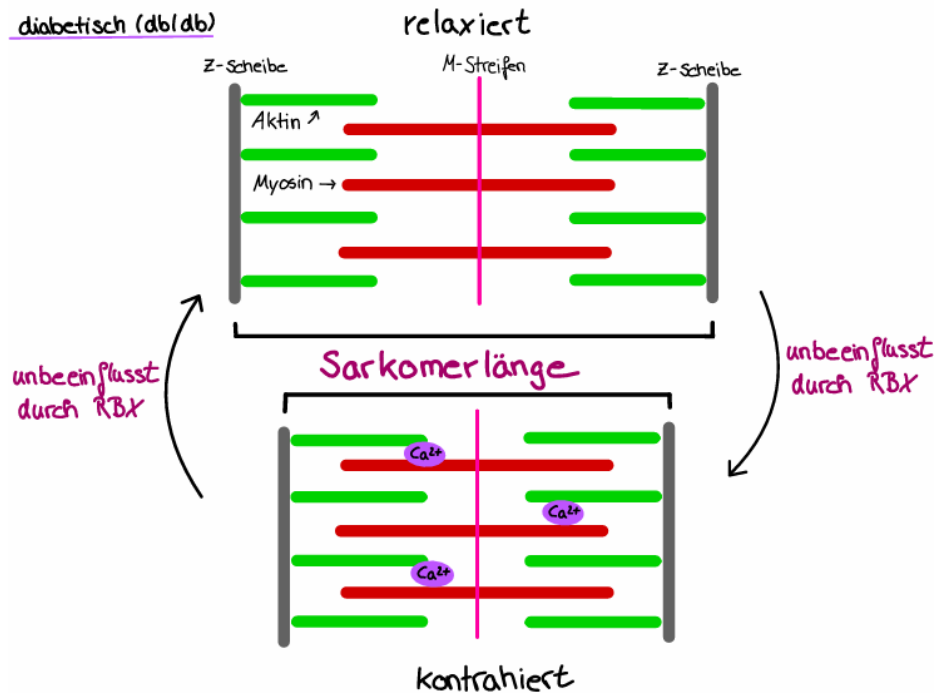


Abb. 47: Einfluss von RBX auf die Sarkomerkontraktion isolierter diabetischer Kardiomyozyten

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit führte RBX zu einer unveränderten kontraktile Amplitude und Kinetik der Kontraktion und Relaxation diabetischer Kardiomyozyten im Vergleich zu diabetischen Myozyten ohne RBX.

Ca²⁺ = Calcium-Ionen, RBX = Ruboxistaurin

Die Funktion der Sarkomere von Kardiomyozyten wird durch Veränderungen der intramyozytären Ca²⁺-Konzentration gesteuert. Die aufgeführten Argumente unter Kapitel 4.1.2.2 und 4.1.2.3 können daher auch Erklärungen für die unveränderte Sarkomerkontraktion der diabetischen Kardiomyozyten unter RBX sein. Hierzu zählen in diabetischen Kardiomyozyten unter anderem die Dysfunktion des SR, histologische Veränderungen in Form von Fetttropfen als Barriere für das RBX und die veränderte Stoffwechsellage mit verstärkter Fettsäureoxidation und ihren Folgen.

In der Literatur finden sich zwei weitere Ansätze, die insbesondere auf der Ebene der Sarkomerkontraktion die unveränderte Auswirkung von RBX auf Kardiomyozyten diabetischer Stoffwechsellage zu erklären versuchen.

Zum einen konnte Funk *et al.* in db/db-Kardiomyozyten eine erhöhte Ca²⁺-Sensitivität der Myofilamente messen. Die Ursache hierfür ist der Phosphorylierungszustand des kardialen Troponin I (cTnI). Doppelt phosphoryliertes cTnI hat eine geringere Ca²⁺-Sensitivität, indem es die Ca²⁺-Affinität der Ca²⁺-bindenden Troponin-Untereinheit (cTnC) verringert. Die

Expression des cTnI zeigte keine signifikante Veränderung in den db/db-Herzen, hingegen lag ein reduzierter Anteil an doppelt phosphorylierten cTnI vor. Dies lässt auf eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität schließen und stellt somit einen möglichen basalen Kompensationsmechanismus zur Beibehaltung der Myokardfunktion trotz des eingeschränkten Ca^{2+} -Kreislaufs in diabetischen Kardiomyozyten dar [41]. Im Rahmen eines weiteren Einflussfaktors, in diesem Fall mit dem PKC-Inhibitor RBX, kommt es möglicherweise zu einer Erschöpfung des bereits basal wirkenden Kompensationsmechanismus und folglich zu keiner Aktivierung der myozytären Sarkomerfunktion. Widerlegt wird diese Überlegung jedoch durch eine Stimulation der db/db-Kardiomyozyten mit dem β -Agonisten Isoproterenol, bei der ein stärkerer Anstieg der aktiven Kraftentwicklung aufgrund der erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität in den db/db-Herzen als in den db/+ -Herzen aufgezeichnet werden konnte [41].

Zum anderen stellt möglicherweise das verwendete Mausmodell einen limitierenden Faktor dar. In den Experimenten dieser Arbeit wurden homozygote Leptin-Rezeptor defiziente Mäuse (db/db-Mäuse) im Alter von 10-12 Wochen als Modell für T2DM verwendet. Die Arbeitsgruppe um Belke *et al.* berichtet von Merkmalen einer diabetischen Kardiomyopathie mit verminderter kontraktile Leistung und einem veränderten Herzstoffwechsel bei db/db-Mäusen im Alter von 10-14 Wochen [79]. Eine Inkubation mit RBX könnte diesen Veränderungen über eine PKC-Inhibierung nicht entgegenwirken und würde die unveränderte Sarkomerfunktion der Kardiomyozyten erklären. Die Ergebnisse einer eingeschränkten Kontraktilität von Belke *et al.* beziehen sich jedoch auf Experimente an isolierten, perfundierten Herzen und sind somit nur eingeschränkt zu verwerten.

Auch Funk *et al.* konnte in 10-12 Wochen alten Mäusen in der mRNA-Expression erste Hinweise auf eine beginnende Kardiomyopathie feststellen, jedoch zeigten sich funktionell die Herzen unbeeinträchtigt. Mithilfe von Untersuchungen *in vivo* mittels MRT verdeutlichte die Arbeitsgruppe, dass bei db/db-Mäusen im Alter von 10-12 Wochen keine Veränderungen der linksventrikulären Pumpfunktion im Vergleich zu nicht-diabetischen Tieren (db/+) bestehen [41]. Damit erscheint eine basale kontraktile Funktionsstörung der db/db-Mäuse im Rahmen einer beginnenden Kardiomyopathie unwahrscheinlich und steht somit der Behandlung mit RBX nicht entgegen. Schlussfolgernd scheint der ausbleibende Effekt von RBX auf den myozytären Ca^{2+} -Haushalt der db/db-Mäuse entscheidend für die ebenfalls geringe bzw. fehlende Aktivierung der Sarkomerfunktion durch RBX in dem verwendeten Modell der vorliegenden Arbeit zu sein.

Das folgende Kapitel stellt einen weiteren Ansatz zur Erklärung der unveränderten Sarkomerfunktion unter RBX-Inkubation dar und bezieht sich hierbei insbesondere auf den Vergleich der beiden Stoffwechsellagen.

4.2.2.3 Vergleich der beiden Stoffwechsellagen

Im Einklang mit dem veränderten Ca^{2+} -Kreislauf ist auch die kontraktile Amplitude und Kontraktions-/Relaxationsgeschwindigkeit der Sarkomere in den nicht-diabetischen Kardiomyozyten im Vergleich zu den diabetischen unter RBX-Inkubation signifikant stärker erhöht.

Bereits die vorangestellten Kapitel liefern hierfür mögliche Erklärungsansätze. So könnte zum einen die Dysfunktion des SR durch eine gesteigerte PKC-Aktivität einen möglichen

Beitrag leisten (Kapitel 4.1.2.2.). In Kapitel 4.1.2.3 werden insbesondere die histologischen Veränderungen und die Energieversorgung der diabetischen Kardiomyozyten als Erklärung aufgeführt. Auch die veränderte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente spielt eine entscheidende Rolle im Vergleich der beiden Stoffwechsellagen (Kapitel 4.2.2.2).

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung analysiert den strukturellen Unterschied der diabetischen Herzen zu den nicht-diabetischen Herzen als direkte Auswirkung auf die kardiale Sarkomerfunktion. Die massive Akkumulation von Lipiden in den db/db-Myozyten ordnet sich, wie in der Oil Red O-Färbung von Funk *et al.* gezeigt, fast linear entlang der Zelllängsachse an [41]. Diese histologische Veränderung der diabetischen Kardiomyozyten könnte mit einer mechanischen Belastung einhergehen, die den Ca^{2+} -vermittelt aktivierenden Einfluss von RBX auf die kardiale Sarkomerfunktion reduziert.

4.3 Limitationen

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Versuchsaufbau ermöglicht es, *ex vivo* in lebenden, schlagenden Primärzellen die Effekte der PKC auf physiologische Parameter wie den intrazellulären Ca^{2+} -Transport und die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen zu messen. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten sich jedoch Grenzen hinsichtlich der Aussagekraft der erhobenen Daten, die im Folgenden erläutert werden.

Zum einen war die Streuung der Einzel-Messwerte hoch. Die große Varianz könnte mit einer unterschiedlichen Qualität der isolierten Kardiomyozyten zusammenhängen und auf Unterschiede in der Präparation zurückzuführen sein. Die Zeit der Entnahme des Herzens bis zur anschließenden Perfusion mit der Kollagenaselösung wurde möglichst minimiert, variierte jedoch aus technischen Gründen in einem Zeitfenster von 3,42 bis zu 7,26 Min (im Mittel 5,08 Min). Insbesondere die Präparation der db/db-Herzen gestaltete sich aufgrund der großen Menge an epikardialem Fettgewebe teilweise zeitintensiv. Um der Heterogenität der Zellen zu begegnen, wurden die gemessenen Zellen nach definierten Kriterien ausgewählt. Hierzu gehörte unter anderem eine isolierte Lage der Kardiomyozyten, Zellen in Gruppenverbänden wurden nicht ausgemessen. Außerdem wurden bei der Analyse der Ca^{2+} -Transienten strikte Qualitätskriterien auf alle Zellen angewendet. Eine ungehinderte Kontraktion und Relaxation beim Vorliegen von einem deutlich erkennbaren Streifen-Muster galt als Kriterium für die Messung der Sarkomerfunktion. Da die Messwerte innerhalb jeder Gruppe dennoch deutlich variierten, erscheint es für zukünftige Ca^{2+} -Messungen empfehlenswert, die Ein- und Ausschlusskriterien noch klarer zu formulieren und dabei sowohl morphologische und funktionelle Aspekte als auch die Größe der gemessenen Signale mit einzubeziehen. Messwerte von $F_1/F_0 > 0,3$ für die Amplitude der Transienten sowie Änderungen der Sarkomerlängen von mindestens $> 0,03 \mu\text{m}$ können hierbei eine konkrete Hilfe sein. Eine Vergrößerung der Stichproben und das Bilden von Mittelwerten aus allen Zellen pro Maus könnten der großen Streuung der Messwerte entgegenwirken. Damit würde zugleich dem Problem begegnet, dass das Messergebnis jedes Kardiomyozyten als eigener Wert in die Stichprobe eingeht, obwohl die Messung mehrerer Zellen aus derselben Maus keine gänzlich unabhängigen Experimente darstellen.

Eine weitere Limitation für die Experimente der vorliegenden Arbeit stellt möglicherweise eine nicht ideale RBX-Konzentration und Inkubationszeit dar. Die Inkubationsbedingungen

mit RBX wurden mittels Western blot Analysen an Wildtyp-Mäusen ermittelt (Kapitel 3.1). Eine RBX-Konzentration von 10^{-6} mol/l für 10 Min führte zu einer deutlichen Hemmung PKC-abhängig phosphorylierter Proteine und stellte somit die Grundlage für die weiteren Experimente dar. Mit db/db-Herzgewebe wurden dagegen keine eigenen Analysen durchgeführt. Möglicherweise hätten sie unter den genannten Inkubationsbedingungen eine ungenügende PKC-Inhibierung durch RBX gezeigt, weil die PKC-Aktivität in db/db-Herzgewebe erhöht und die PLN-Phosphorylierung noch stärker reduziert ist als in Wildtyp-Mäusen [41, 80]. Die Verwendung von diabetischen Herzen für die Western blot Analysen der durch RBX herabgesetzten PKC-abhängig phosphorylierten Proteine könnte hierfür eine Antwort liefern. Ein weiterer Verbesserungsansatz zur Ermittlung der idealen RBX-Konzentration und Inkubationszeit für die Experimente dieser Arbeit könnten Western blot Analysen unter Verwendung von Antikörpern gegen einzelne PKC-Substrate darstellen, idealerweise Proteine des myozytären Ca^{2+} -Haushalts oder Antikörper gegen die Autophosphorylierungsstelle T497 der PKC α . Angesichts der Diskrepanz mit Ward *et al.*, die an ganzen Meerschweinchen-Herzen Kraftmessungen unter PMA-Stimulation durchführten, könnte zudem eine RBX-Dosisfindung anhand von Ca^{2+} -Messungen stattfinden und wäre somit besser übertragbar auf die anschließenden Messungen des Ca^{2+} -Kreislaufs und der Sarkomerfunktion.

4.4 Schlussfolgerung

Die Experimente dieser Arbeit zeigen die Auswirkung der PKC auf den Ca^{2+} -Kreislauf und die Sarkomerfunktion innerhalb von Kardiomyozyten.

Durch die Aktivierung der PKC wird der intramyozytäre Ca^{2+} -Kreislauf signifikant verlangsamt und die Sarkomerfunktion herabgesetzt. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit der Literatur [58, 60].

Anhand weiterer in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wird deutlich, dass eine Inhibierung der PKC am Herzen mittels RBX den intramyozytären Ca^{2+} -Kreislauf und nachfolgend sowohl die kontraktile Amplitude als auch die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten der Sarkomere signifikant erhöhen bzw. beschleunigen kann. Ein möglicher Erklärungsansatz stellt hierfür die SERCA2a-Aktivität in den Vordergrund. Eine Hemmung der PKC führt zu einem aktiven I-1 und damit einer gehemmten PP1-Aktivität, nachfolgend erhöht sich die Menge an phosphoryliertem PLN, welches die Hemmung der SERCA2a aufhebt [31]. Die gesteigerte Kontraktilität unter RBX wäre Folge der erhöhten Ca^{2+} -Beladung des SR, da diese maßgeblich für die Geschwindigkeit und das Ausmaß der nächsten SR- Ca^{2+} -Freisetzung ist.

Weiterführend haben frühere Studien gezeigt, dass die Aktivität der PKC in diabetischen Herzen erhöht ist und damit möglicherweise zur eingeschränkten Herzfunktion bei Diabetikern beiträgt [41]. Ein weiterer Fokus der Arbeit lag somit auf der pharmakologischen Inhibition der PKC in diabetischen Kardiomyozyten, um so der Gefahr kardiovaskulärer Ereignisse bei Diabetikern entgegenzuwirken. In den hier dargestellten Experimenten war die Steigerung der freigesetzten intramyozytären Ca^{2+} -Menge jedoch nur im Trend zu beobachten. Entgegen der Erwartung zeigte sich trotz der vermuteten gesteigerten SERCA2a-Aktivität unter PKC-Inhibierung die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs und -Abfalls und auch die Sarkomerfunktion unverändert zu der Kontrollgruppe ohne

RBX-Inkubation. Mögliche Erklärungsmodelle liefert die vorliegende Arbeit und bezieht sowohl histologische Aspekte als auch Veränderungen der Stoffwechsellage bei diabetischen Kardiomyozyten mit in die Diskussion ein (Kapitel 4.1.2.3 und 4.2.2.3).

Warum im Diabetes-Modell keine signifikanten Veränderungen durch RBX nachgewiesen werden konnten, im Wildtyp-Modell dagegen wohl, steht im Widerspruch zu der Ausgangshypothese und bleibt eine zentrale Frage. Dies sollte in weiterführenden Studien untersucht werden. Erste mögliche Ansätze werden im folgenden Kapitel 4.5 aufgeführt.

Auf der Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente lässt sich der Schluss ziehen, dass eine RBX-Behandlung zwar die Herzfunktion akut verbessern kann, sich für die Behandlung einer diabetischen Kardiomyopathie jedoch nicht zu empfehlen scheint.

4.5 Ausblick

Aufgrund der vorliegenden Befunde wäre es weiterführend sehr interessant, RBX in einem *in vivo* Ansatz zu testen. Eine orale Darreichungsform des RBX konnte in vergangenen Studien als gut verträglich und wirksam eingestuft werden. Neben Großtieren wurde RBX in oraler Applikationsform auch schon in klinischen Phase III-Studien am Menschen getestet und stand zur Behandlung der diabetischen Retinopathie kurz vor der Zulassung. Sie wurde jedoch aufgrund fragwürdiger klinischer Wirksamkeit und mutmaßlich aus wirtschaftlichen Gründen seit 2007 vom Hersteller nicht weiter verfolgt [63, 81, 82].

Neben den db/db-Mäusen spielen die PKC und ihre Auswirkung auf die Ca^{2+} -Regulation auch eine wichtige Rolle im Krankheitsgeschehen des Myokardinfarkts. Kronenbitter *et al.* beschreiben im nicht-ischämischen *remote* Myokard nach Myokardinfarkt einen verlangsamten Ca^{2+} -Abfall und damit einhergehend eine langsame Relaxation der Sarkomere, ganz oder teilweise verursacht durch eine reduzierte SERCA2a-Aktivität [80]. Des Weiteren trägt eine gestörte SR-Füllung mit Ca^{2+} zu einer verminderten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und damit zu der herabgesetzten Sarkomerkontraktion im *remote* Myokard bei. Als mögliche Ursache der reduzierten SERCA2a-Aktivität aufgrund einer reduzierten PLN-Phosphorylierung diskutiert die Arbeitsgruppe um Kronenbitter eine erhöhte PKC-Aktivität, zumal da Kötter *et al.* gezeigt hatten, dass die PKC-Aktivität im *remote* Myokard erhöht ist [83]. RBX könnte genau an dieser Stelle als PKC-Inhibitor eingreifen. Aufgrund der signifikanten Steigerung des Ca^{2+} -Kreislaufs und der damit einhergehenden gesteigerten Sarkomerfunktion der nicht-diabetischen Kardiomyozyten unter RBX könnte eine PKC-Hemmung in der Frühphase nach Myokardinfarkt in Wildtyp-Mäusen somit eine erfolgsversprechende Behandlungsoption darstellen. Der Ausblick wäre eine bessere kontraktile Funktion des *remote* Myokards RBX-behandelter Herzen nach Myokardinfarkt und dadurch eine verbesserte Prognose der Patienten.

Diese Arbeit zeigt, dass RBX in normalen Wildtyp-Kardiomyozyten einen signifikanten Effekt der Steigerung des Ca^{2+} -Kreislaufs und der Sarkomerfunktion ausübt. Es verdeutlicht, dass eine RBX-Stimulation auch in zukünftigen Studien bei anderen Formen der Herzinsuffizienz, nicht nur nach Myokardinfarkt, eine entscheidende Rolle in der Behandlung der Patienten spielen könnte.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Belke D, Dillmann W. Altered Cardiac Calcium Handling in Diabetes. Springer nature, Current Hypertension Reports; 2004.6:424–9
2. Bundesministerium für Gesundheit. Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2. <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/diabetes.html>; Stand 11.12.2025; Zugriffsdatum 08.02.2026.
3. Robert Koch Institut. Diabetes Surveillance. Diabetes im Überblick 2022 https://diabsurv.rki.de/SharedDocs/downloads/DE/DiabSurv/Infografik_Ueberblick.html?nn=11915670; Zugriffsdatum 08.02.2026.
4. Robert Koch Institut. Diabetes in Deutschland - Bericht der nationalen Diabetes-Surveillance 2019.
5. Vanderniet J, Jenkins A, Donaghue K. Epidemiology of Type 1 Diabetes. Current Cardiology Reports; 2022.24:1455–65
6. Kulzer B. Körperliche und psychische Folgeerkrankungen bei Diabetes mellitus. Bundesgesundheitsblatt; 2022.65:503–10
7. Nakamura K, Miyoshi T, Yoshida M, Akagi S, Saito Y, Ejiri K, et al. Pathophysiology and Treatment of Diabetic Cardiomyopathy and Heart Failure in Patients with Diabetes Mellitus. International Journal of Molecular Sciences; 2022.23(7):3587
8. Federation ID. IDF Diabetes Atlas. 2025. Report No.: 978-2-930229-96-6.11th edition
9. Ritchie RH, Abel E. Basic Mechanisms of Diabetic Heart Disease. Circulation Research; 2020.126:1501–25
10. Bers D. Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. Circulation Research; 2000.87:275-81
11. Bers D. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. Annual Review of Physiology; 2008.70:23-49
12. Shannon T, Guo T, Bers D. Ca^{2+} Scraps: Local Depletions of Free $[\text{Ca}^{2+}]$ in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum During Contractions Leave Substantial Ca^{2+} Reserve. Circulation Research; 2003.93:40-5
13. Schmidt R, Lang F, Heckmann M. Physiologie des Menschen. Springer; 2017. ISBN: 978-3-662-54121-0. 31. Ausgabe
14. Bassani J, Bassani R, Bers D. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. Journal of Physiology; 1994.279-93
15. Kronenbitter A. Veränderungen im myozytären Kalziumkreislauf und in der Sarkomerfunktion im nicht-ischämischen Gewebe nach Myokardinfarkt. Institut für

16. Van Petegem F. Ryanodine receptors: structure and function. *The journal of biological chemistry*, Vol. 287; 2012.31624–32
17. Sham J, Cleemann L, Morad M. Functional coupling of Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92; 1995.121-5
18. Fill M, Copello J. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev*; 2002.82: 893–922
19. Wehrens X, Lehnart S, Reiken S, Marks A. Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circulation Research*; 2004.94:e61-e70
20. E K, Hajjar R. Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome. *Circulation Research*; 2012.110:1646-60
21. Kimura Y, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan D. Phospholamban Inhibitory Function Is Activated by Depolymerization. *The journal of biological chemistry*, Vol. 272; 1997.15061–4
22. Toyoshima C, Asahi M, Sugita Y, Khanna R, Tsuda T, MacLennan D. Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2003.100(2):467-72
23. Wittmann T, Lohse M, Schmitt JP. Phospholamban pentamers attenuate PKA-dependent phosphorylation of monomers. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 80; 2014.90–7
24. Dong X, Thomas D. Time-resolved FRET reveals the structural mechanism of SERCA–PLB regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 449; 2014.196–201
25. Wittmann T. Die Bedeutung von Phospholamban Pentameren für die Phospholamban-Phosphorylierung und die Regulation der SERCA2a-Aktivität. Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2014.
26. Wegener A, Simmerman H, Liepnieks J, Jones L. Proteolytic cleavage of phospholamban purified from canine cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *The journal of biological chemistry*; 1986.5154-9
27. Edes I, Kranias E. Phospholamban and Troponin I Are Substrates for Protein Kinase C In Vitro but Not in Intact Beating Guinea Pig Hearts. *Circulation Research*; 1990.67:394-400
28. Funk F. Mechanismen der Phospholamban-vermittelten Regulation von SERCA2a. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2018.

29. Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, Chen G, Kranias E. Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293; 2007.H762–H9
30. Sahin B, Shu H, Fernandez J, El-Armouche A, Molkenin J, Nairn A, et al. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by protein kinase C. *The journal of biological chemistry*, Vol 281; 2006.
31. Liu Q, Chen X, MacDonnell S, Kranias E, Lorenz JN, Leitges M, et al. Protein kinase C α , but not PKC β or PKC γ , Regulates Contractility and Heart Failure Susceptibility: Implications for Ruboxistaurin as a Novel Therapeutic Approach. *Circulation Research*; 2009.105:94-200
32. Pettinato A, Ladha F, Hinson J. The Cardiac Sarcomere and Cell Cycle. *Current Cardiology Reports*; 2022.24:623–30
33. Loescher C, Hobbach A, Linke W. Titin (TTN): from molecule to modifications, mechanics, and medical significance. *Cardiovascular Research*; 2022.118, 2903–18
34. Squire J. Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. *International Journal of Molecular Sciences*; 2019.20, 5715
35. Katrukha I. Human Cardiac Troponin Complex. Structure and Functions. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 78; 2013.1447-65
36. Metskas LA, Rhoades E. Order-Disorder Transitions in the Cardiac Troponin Complex. *Journal of Molecular Biology*; 2016.428, 2965–77
37. Hinken A, Hanft L, Scruggs S, Sadayappan S, Robbins J, Solaro R, et al. Protein kinase C depresses cardiac myocyte power output and attenuates myofilament responses induced by protein kinase A. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*; 2012.33:439–48
38. Belke D, Swanson E, Dillmann W. Decreased Sarcoplasmic Reticulum Activity and Contractility in Diabetic db/db Mouse Heart. *Diabetes*, Vol. 53; 2004.3201-8
39. Lehrke M, Marx N. Diabetes Mellitus and Heart Failure. *The American Journal of Medicine*; 2017.130, S40-S50
40. Lacombe V, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Sridhar A, Emani S, Bonagura J, et al. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293; 2007.R1787–R97
41. Funk F, Kronenbitter A, Isic M, Flocke V, Gorreßen S, Semmler D, et al. Diabetes disturbs functional adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 173; 2022.47–60
42. Zhong Y, Ahmed S, Grupp I, Matlib M. Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281; 2001.H1137–H47

43. Hopf A-E, Andresen C, Kötter S, Isic M, Ulrich K, Sahin S, et al. Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circulation Research*; 2018.123:342-55
44. Kolczynska K, Loza-Valdes A, Hawro I, Sumara G. Diacylglycerol-evoked activation of PKC and PKD isoforms in regulation of glucose and lipid metabolism: a review. *Lipids in Health and Disease*; 2020.19:113
45. Liu Q, Molkentin J. Protein kinase C α as a heart failure therapeutic target. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51; 2011.474–8
46. Halenda SP, Feinstein M. Phorbol myristate acetate stimulates formation of phosphatidyl inositol 4-phosphate and phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate in human platelets. *Biochemical and biophysical research communications*, Vol 124; 1984.507-13
47. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct Activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters. *The journal of biological chemistry*, Vol. 257; 1982.7847-51
48. Cazaubon S, Parker P. Identification of the phosphorylated region responsible for the permissive activation of protein kinase C. *The journal of biological chemistry*, Vol. 268; 1993.17559-63
49. Singh R, Waqar T, Howarth F, Adeghate E, Bidasee K, Singh J. Hyperglycemia-induced cardiac contractile dysfunction in the diabetic heart. *Heart Failure Reviews*; 2017.23:37–54
50. Surian F, Vieira-Silva S, Falony G, Roumain M, Paquot A, Pelicaen R, et al. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. *Microbiome*; 2021.9:147
51. Wyse B, Dulin W. The Influence of Age and Dietary Conditions on Diabetes in the Db mouse. *Diabetologia* 6; 1970.268-73
52. Tsien R. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, Vol. 290; 1981.527–8
53. Oakes S, Martin W, Lisek C, Powis G. Incomplete hydrolysis of the calcium indicator precursor fura-2 pentaacetoxymethyl ester (fura-2 AM) by cells. *Analytical Biochemistry*, Vol. 169; 1987.159-66
54. Sauermost R, Freudig D. FURA-2. *Lexikon der Biologie* 1999. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/fura-2/26073>; Zugriffsdatum 08.02.2026.
55. Cannell M, Soeller C. Numerical Analysis of Ryanodine Receptor Activation by L-Type Channel - Activity in the Cardiac Muscle Diad.; 1997.112-22
56. Tsien R, Rink T, Poenie M. Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*, Vol. 6; 1985.145-57

57. Li L, Chu G, Kranias E, Bers D. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 274; 1998.H1335-H47
58. Ward C, Moffat M. Positive and Negative Inotropic Effects of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate. *J Mol Cell Cardiol*, Vol. 24; 1992.937-48
59. Hartong R, Villarreal F, Giordano F, Hilal-Dandan R, McDonough P, Dillmann W. Phorbol Myristate Acetate-induced Hypertrophy of Neonatal Rat Cardiac Myocytes is Associated with Decreased Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ATPase (SERCA2) Gene Expression and Calcium Reuptake. *J Mol Cell Cardiol*, Vol. 28; 1996.
60. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, et al. PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nature medicine*, Vol. 10; 2004.248-54
61. ElSayed N, Aleppo G, Aroda V, Bannuru R, Brown F, Bruemmer D, et al. 10. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*, Vol. 46; 2023.S158–S90
62. Yang L, Doshi D, Morrow J, Katchman A, Chen X, Marx S. Protein Kinase C Isoforms Differentially Phosphorylate Ca_v1.2 α_{1c} . *Biochemistry*; 2009.48(28):6674-83
63. Aiello L, Mass B, Davis M, Wis M, Girach A, Hu K, et al. Effect of Ruboxistaurin in Patients With Diabetic Macular Edema. *Arch Ophthalmol.*; 2007.125:318-24
64. Hambleton M, Hahn H, Pleger S, Kuhn M, Klevitsky R, Carr A, et al. Pharmacological- and Gene Therapy-Based Inhibition of Protein Kinase Ca/ β Enhances Cardiac Contractility and Attenuates Heart Failure. *Circulation Research*; 2006.114:574-82
65. Giachetti A. The Functional State of Sympathetic Nerves in Spontaneously Diabetic Mice. *Diabetes*, Vol. 27; 1978.969-74
66. Wang M, Zhang W, Zhu J, Fu G, Zhou B. Breviscapine ameliorates hypertrophy of cardiomyocytes induced by high glucose in diabetic rats via the PKC signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*; 2009.30:1081-91
67. Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright J, Hu X, et al. Mitochondrial Energetics in the Heart in Obesity-Related Diabetes: Direct Evidence for Increased Uncoupled Respiration and Activation of Uncoupling Proteins. *Diabetes*, Vol. 56; 2007.2457-66
68. Buchanan J, Mazumder P, Hu P, Chakrabarti G, Roberts M, Yun U, et al. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology*; 2005.146(12):5341–9
69. Berra-Romani R, Guzmán-Silva A, Vargaz-Guadarrama A, Flores-Alonso J, Alonso-Romero J, Treviño S. Type 2 Diabetes Alters Intracellular Ca²⁺ Handling in Native

Endothelium of Excised Rat Aorta. *International Journal of Molecular Sciences*; 2019.21(1):250

70. Watson J, Karmazyn M. Concentration-dependent effects of protein kinase C-activating and -nonactivating phorbol esters on myocardial contractility, coronary resistance, energy metabolism, prostacyclin synthesis, and ultrastructure in isolated rat hearts. *Circulation Research*; 1991.69:1114-31
71. Koch W. Genetic and phenotypic targeting of β -adrenergic signaling in heart failure. *Molecular and Cellular Biochemistry*; 2004.263:5–9
72. Capogrossi M, Kaku T, Filburn C, Pelto D, Hansford R, Spurgeon H, et al. Phorbol ester and dioctanoylglycerol stimulate membrane association of protein kinase C and have a negative inotropic effect mediated by changes in cytosolic Ca^{2+} in adult rat cardiac myocytes. *Circulation Research*; 1990.66:1143-55
73. Capogrossi M, Kachadorian W, Gambassi G, Spurgeon H, Lakatta E. Ca^{2+} dependence of α -adrenergic effects on the contractile properties and Ca^{2+} homeostasis of cardiac myocytes. *Circulation Research*; 1991.69:540-50
74. Wang Y, Benedict W, Hüser J, Samarel A, Blatter L, Lipsius S. Brief rapid pacing depresses contractile function via Ca^{2+} /PKC-dependent signaling in cat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2001.280:H90–H98
75. Sumandea MP, Pyle W, Kobayashi T, de Tombe P, Solaro R. Identification of a functionally critical protein kinase C phosphorylation residue of cardiac troponin T. *The journal of biological chemistry*, Vol. 278; 2003.35135–44
76. Burkart E, Sumandea M, Kobayashi T, Nili M, Martin A, Homsher E, et al. Phosphorylation or glutamic acid substitution at protein kinase C sites on cardiac troponin I differentially depress myofilament tension and shortening velocity. *The journal of biological chemistry*, Vol. 278; 2003.11265–72
77. Belin R, Sumandea M, Allen E, Schoenfelt K, Wang H, Solaro R, et al. Augmented Protein Kinase C- α -Induced Myofilament Protein Phosphorylation Contributes to Myofilament Dysfunction in Experimental Congestive Heart Failure. *Circulation Research*; 2007.101:95-204
78. Sussman M, Hamm-Alvarez S, Vilalta P, Welch S, Kedes L. Involvement of Phosphorylation in Doxorubicin-Mediated Myofibril Degeneration. *Circulation Research*; 1997.80:52-61
79. Aasum E, Hafstad A, Severson D, Larsen T. Age-Dependent Changes in Metabolism, Contractile Function, and Ischemic Sensitivity in Hearts From db/db Mice. *Diabetes*, Vol. 52; 2003.52:434–41
80. Kronenbitter A, Funk F, Hackert K, Gorreßen S, Glaser D, Boknik P, et al. Impaired Ca^{2+} cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 119; 2018.28-39

81. Davis M, Sheetz M, Aiello L, Milton R, Danis R, Zhi X, et al. Effect of ruboxistaurin on the visual acuity decline associated with long-standing diabetic macular edema. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 50; 2009.1–4
82. Alshammari R, Aleanizy F, Aldarwesh A, Alqahtani F, Mahdi W, Alquadeib B, et al. Retinal Delivery of the Protein Kinase C- β Inhibitor Ruboxistaurin Using Non-Invasive Nanoparticles of Polyamidoamine Dendrimers. *Pharmaceutics*; 2022.14(7):1444
83. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, et al. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation Research*; 2016.119:1017-29

Danksagung

Auf dem Weg zur Entstehung meiner Dissertation wurde ich von zahlreichen Menschen begleitet und unterstützt, an dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Joachim P. Schmitt, für die herausragende Betreuung der Promotionsarbeit. Danke, dass Sie jederzeit erreichbar waren, mir in allen Fragen unermüdlich zur Seite standen und mich so in jeder Phase der Arbeit unterstützt und ermutigt haben.

Auch möchte ich Frau Prof. Dr. Martina Krüger für die zuverlässige Mitbetreuung herzlich danken.

Weiter möchte ich mich bei meinen AG-Kolleginnen und -Kollegen für die ausgezeichnete Einarbeitung und die Inspiration zur Lösung neuer Fragestellungen bedanken.

Ich danke Florian, Susanne und Julian für die lehrreiche und bereichernde gemeinsame Zeit im Labor, an die ich mich immer wieder gerne zurückerinnere.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken für die liebevolle und motivierende Unterstützung während der Zeit im Labor und des Verfassens dieser Arbeit. Danke, dass Ihr immer für mich da seid.