

Diplomarbeit

**Effekt von K201 und Dantrolen auf die Ca<sup>2+</sup> Freisetzung aus  
dem sarkoplasmatischen Retikulum in Herzmuskelzellen  
mit einer Ryanodin-Rezeptor Mutation bei Druckbelastung**

eingereicht von

**Marinko Matovina**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Abteilung für Kardiologie**

**Universitätsklinik für Innere Medizin**

unter der Anleitung von

**Ass. Prof. PD Dr. Simon Sedej**

Graz, den 05.02.2015

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, den 05.02.2015

Marinko Matovina eh

*Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit gewidmet.*

## Danksagungen

Mein ganz herzlicher Dank gilt meinem Betreuer *Ass. Prof. PD Dr. Simon Sedej* für die Überlassung des spannenden Themas meiner Diplomarbeit und der freundschaftlichen Einführung in die Welt der Grundlagenforschung. Sein Enthusiasmus und sein erbauendes Engagement haben mir geholfen, auch über Phasen des Zweifels hinweg zu kommen. Seine stets hilfreichen Anmerkungen waren mir bei der Durchführung der Versuche, bei der Interpretation der Ergebnisse, sowie bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit von unschätzbarem Wert.

Bedanken möchte ich mich auch bei *Dr. med. univ. Uwe Primessnig*, der mir unterstützend beim Erlernen im Umgang mit dem Konfokalmikroskop und der Auswertung der Daten zur Seite stand.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei *MSc. Snježana Radulović* für die freundschaftliche Zusammenarbeit und das gute Klima während der zahlreichen gemeinsamen Stunden im Labor bedanken.

Ein weiterer Dank gilt *PhD Senka Ljubojević* für das Überlassen von unzähligen Terminen am konfokalen Mikroskop.

Ebenso möchte ich Herrn *Prof. Dr. Burkert Pieske*, dem Leiter der Kardiologie in Graz, der die Rahmenbedingungen für experimentelle Forschungsarbeiten geschaffen hat, danken.

Von ganzen Herzen möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meiner Freundin *Sabine* für ihr Verständnis und ihre Unterstützung die sie mir das ganze Studium über erbrachte und meinen Eltern *Mate* und *Emica*, die mir meine lange Ausbildung ermöglicht haben und dafür auf vieles im Leben verzichteten, bedanken.

## Zusammenfassung

Dysfunktionen des Ryanodin-Rezeptor-2 (RyR2) verursachen eine erhöhte, diastolische SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung, die mit Arrhythmien, kontraktile Dysfunktion und kardialem Remodelling kausal assoziiert sind. In dieser Arbeit untersuchten wir die Hypothese ob die RyR2 Stabilisatoren K201 und Dantrolen das SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck bei Mäusen mit einer RyR2 Mutation (gain-of-function) und einer zusätzlicher Druckbelastung reduzieren können. Die RyR2<sup>R4496C+/-</sup> Knock-in Mäuse (RyR\*) und ihre Wildtyp Wurfgeschwister wurden zur Hälfte einer Scheinoperation (Sham) unterzogen, die andere Hälfte wurde mit einer minimalinvasiven transaortalen Konstriktion (TAC) versorgt, um eine Druck-induzierte Überlast zu erzeugen. Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz (als ein Maß für das SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck), der  $\text{Ca}^{2+}$  Transient Amplituden und die Koffein-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$  Transient Amplituden (als ein Maß des SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehaltes) wurden mittels konfokaler Laser-Scanning  $\text{Ca}^{2+}$  Messungen (Fluo-4/AM) an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten (1 Woche nach der Operation) unter Kontrollbedingungen und nach Vorinkubation mit 300 nmol/L K201 oder 1  $\mu\text{mol/L}$  Dantrolen gemessen. Beide RyR2 Stabilisatoren veränderten die SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase der WT-Sham Zellen nicht. Hingegen reduzierte sich merklich der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz mit angeglichenen SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalten bei den RyR\*-TAC und WT-TAC Kardiomyozyten, sowie bei RyR\*-Sham Zellen infolge der K201 und Dantrolen Behandlung. Der RyR2 stabilisierende Effekt war in Anwesenheit von K201 ausgeprägter als bei Dantrolene. In den RyR\*-TAC und WT-TAC Zellen erhöhte die Behandlung mit K201 und Dantrolen den SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt, jedoch nicht die  $\text{Ca}^{2+}$  Transient Amplituden. Unsere Daten zeigen, dass die pharmakologische Stabilisierung des RyR2 durch K201 und Dantrolen, die spontane SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung in RyR\*-TAC Mäusen reduziert. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine Einschränkung des SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck, das maladaptive Remodelling des Myokards bei Druckbelastung abschwächen kann.

## Abstract

Ryanodine receptor (RyR2) dysfunction causes increased diastolic SR  $\text{Ca}^{2+}$  release associated with arrhythmias, contractile dysfunction and myocardial remodeling. In this study we tested the hypothesis that RyR2 stabilizers K201 and dantrolene attenuate the SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak in mice carrying a RyR2 mutation (gain-of-function) in response to pressure overload. RyR2<sup>R4496C+/-</sup> knock-in mice (RyR\*) and their wild-type (WT) littermates underwent surgery without (Sham) or with minimal invasive transverse aortic constriction (TAC) to induce pressure-induced overload. Changes in  $\text{Ca}^{2+}$  spark frequency (as a measure for the SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak),  $\text{Ca}^{2+}$  transient peak amplitude and caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient peak amplitude (as a measure for the SR  $\text{Ca}^{2+}$  load) were monitored by means of laser-scanning confocal  $\text{Ca}^{2+}$  imaging (Fluo-4/AM) in isolated ventricular cardiomyocytes (1 week post-surgery) under control conditions and after the pre-incubation with 300 nmol/L K201 or 1  $\mu\text{mol/L}$  dantrolene. Both RyR2 stabilizers did not change the SR  $\text{Ca}^{2+}$  release and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in WT-Sham cells. However, K201 and dantrolene markedly reduced the increase in  $\text{Ca}^{2+}$  spark frequency at matched SR  $\text{Ca}^{2+}$  content in RyR\*-TAC and WT-TAC cardiomyocytes as well as RyR\*-Sham cells. The RyR2 stabilizing effect was more pronounced in the presence of K201 than dantrolene. In RyR\*-TAC and WT-TAC cells, K201 and dantrolene treatment increased the SR  $\text{Ca}^{2+}$  load, but not the  $\text{Ca}^{2+}$  transient peak amplitude. Our data demonstrate that pharmacological stabilization of the RyR2 by K201 and dantrolene reduces spontaneous SR  $\text{Ca}^{2+}$  release in RyR\*-TAC mice. This finding suggests that restricted SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak attenuates adverse myocardial remodeling in the setting of pressure-induced overload.

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| DANKSAGUNGEN.....   | III       |
| ZUSAMMENFASSUNG .....   | IV        |
| ABSTRACT .....  | V         |
| INHALTSVERZEICHNIS .....  | VI        |
| GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN .....   | VIII      |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....   | X         |
| TABELLENVERZEICHNIS .....   | XI        |
| <b>1 EINLEITUNG.....</b>  | <b>12</b> |
| 1.1 ELEKTROMECHANISCHE KOPPLUNG DES HERZENS .....                     | 14        |
| 1.2 RYANODIN-REZEPTOR TYP 2 (RYR2) .....                              | 16        |
| 1.3 CA <sup>2+</sup> -SPARKS.....                                     | 17        |
| 1.4 ERWORBENE RYR2 DYSFUNKTION UND HERZINSUFFIZIENZ .....             | 18        |
| 1.4.1 <i>Kardiale Umbauprozesse (Remodelling)</i> .....               | 18        |
| 1.4.2 <i>Gestörte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Homöostase</i> ..... | 20        |
| 1.4.3 <i>SR Ca<sup>2+</sup> Leck</i> .....                            | 20        |
| 1.5 ANGEBORENE RYR2 DYSFUNKTION UND CPVT .....                        | 23        |
| 1.6 PHARMAKOTHERAPIE DER HERZINSUFFIZIENZ UND CPVT .....              | 25        |
| 1.6.1 <i>RyR2 Stabilisator – K201</i> .....                           | 25        |
| 1.6.2 <i>RyR2 Stabilisator – Dantrolen</i> .....                      | 26        |
| 1.7 ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN DIESER ARBEIT .....                     | 27        |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                  | <b>28</b> |
| 2.1 MAUSMODELL.....   | 28        |
| 2.2 MINIMALINVASIVE TRANSAORTALE KONSTRIKTION (TAC OPERATION).....    | 29        |
| 2.3 ISOLATION VON VENTRIKULÄREN MAUS-KARDIOMYOZYTEN.....              | 30        |
| 2.3.1 <i>Isolation des Herzens</i> .....                              | 30        |
| 2.3.2 <i>Kannülierung der Aorta</i> .....                             | 30        |
| 2.3.3 <i>Enzymatische Perfusion des Herzens</i> .....                 | 31        |
| 2.4 KONFOKALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE .....                        | 32        |
| 2.4.1 <i>Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4/AM</i> .....                     | 32        |
| 2.4.2 <i>Fluo-4/AM Beladung der Maus-Kardiomyozyten</i> .....         | 33        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.4.3    | <i>Konfokales Laser-Scanning Mikroskop</i> .....  | 33        |
| 2.4.4    | <i>Messprotokoll</i> .....  | 35        |
| 2.5      | DATENAUSWERTUNG.....  | 39        |
| 2.6      | LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN .....  | 40        |
| 2.7      | STATISTIK .....   | 43        |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE</b> .....   | <b>44</b> |
| 3.1      | MORPHOMETRISCHE ANALYSE .....   | 44        |
| 3.2      | DIASTOLISCHE SR $Ca^{2+}$ FREISETZUNG ( $Ca^{2+}$ -SPARKS) UNTER KONTROLLBEDINGUNGEN .....                    | 45        |
| 3.3      | $Ca^{2+}$ -TRANSIENT AMPLITUDEN UND SR $Ca^{2+}$ GEHALT UNTER KONTROLLBEDINGUNGEN .....                       | 46        |
| 3.4      | $Ca^{2+}$ SPARK-FREQUENZ NACH DER BEHANDLUNG MIT K201 UND DANTROLEN.....                                      | 47        |
| 3.5      | $Ca^{2+}$ -TRANSIENT AMPLITUDEN UND SR $Ca^{2+}$ GEHALT NACH DER BEHANDLUNG MIT K201 UND DANTROLEN .....      | 49        |
| <b>4</b> | <b>DISKUSSION</b> .....   | <b>51</b> |
| 4.1      | PHARMAKOLOGISCHE STABILISIERUNG DES RYR2 MITTELS K201 UND DANTROLEN .....                                     | 51        |
| 4.2      | EINFLUSS DER RYR2 STABILISIERUNG AUF DIE ZELLULÄRE $Ca^{2+}$ HOMÖOSTASE UND GENESE DER HERZINSUFFIZIENZ ..... | 52        |
| 4.3      | KLINISCHE RELEVANZ DER ARBEIT .....   | 53        |
| 4.4      | LIMITATION .....  | 54        |
| <b>5</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....   | <b>55</b> |

## Glossar und Abkürzungen

|                  |  |
|------------------|--|
| ACE              | Angiotensin Converting Enzyme (Engl.)  |
| Ca <sup>2+</sup> | Kalzium Ion  |
| CaM              | Calmodulin (Engl.)   |
| CaMKII           | Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II  |
| CaSpF            | Ca <sup>2+</sup> Spark Frequenz  |
| CCD              | Central Core Disease (Engl.)   |
| CICR             | Kalzium-induzierte Kalzium Freisetzung<br>(Engl. Ca <sup>2+</sup> -induced Ca <sup>2+</sup> release)                     |
| CPVT             | katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie<br>(Engl. Catecholaminergic polymorphic ventricular<br>tachycardia) |
| DAD              | Delayed afterdepolarization (Engl.)  |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid   |
| DP1              | Domain peptide 1 (Engl.)   |
| EAD              | Early afterdepolarization (Engl.)  |
| FDHM             | Full Duration Half Maximum (Engl.)   |
| FWHM             | Full Width Half Maximum (Engl.)  |
| mmHg             | Millimeter Quecksilbersäule (Blutdruck Masseinheit)  |
| HMV              | Herzminutenvolumen   |
| MI               | Myokardinfarkt   |
| LTCC             | L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal  |
| MCU              | Mitochondrialer Ca <sup>2+</sup> - Uniporter   |
| MH               | Maligne Hyperthermie   |
| NCX              | Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> Austauscher  |
| NYHA             | New York Heart Association (Engl.)   |
| PKA              | Proteinkinase A  |
| PLN              | Phospholamban  |
| PMCA             | Plasma membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPase (Engl.)   |
| PP1              | Proteinphosphatase 1   |
| viii             |  |

|          |   |
|----------|---|
| PP2A     | Proteinphosphatase 2A                                       |
| RAAS     | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System                         |
| RT50     | Time to half maximum Relaxation (Engl.)                     |
| RyR1     | Ryanodin-Rezeptor Typ 1                                     |
| RyR2     | Ryanodin-Rezeptor Typ 2                                     |
| SERCA-2a | sarko-/endoplasmatisches Retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase |
| SOICR    | Store-overload induced Ca <sup>2+</sup> release (Engl.)     |
| SR       | sarkoplasmatisches Retikulum                                |
| TAC      | Transverse Aortenkonstriktion                               |
| TTP      | Time to peak (Engl.)  |
| WT       | Wildtyp   |

# Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: <b>Elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten.</b> .....  | 15 |
| Abbildung 2: <b>Struktur des RyR2 mit Regulationsproteinen und deren Bindungsstellen</b> .....   | 16 |
| Abbildung 3: <b>Zwei- (oben) und drei-dimensionale (unten) Darstellung eines <math>Ca^{2+}</math>-Sparks</b> .....                               | 17 |
| Abbildung 4: <b>Vergleich der linksventrikulären Geometrie</b> .....   | 18 |
| Abbildung 5: <b>Schematische Darstellung der Ursachen des SR <math>Ca^{2+}</math> Lecks</b> .....  | 21 |
| Abbildung 6: <b>Lokalisationen der CPVT Mutationen auf der RyR2 Sequenz</b> .....  | 23 |
| Abbildung 7: <b>Langendorff-Perfusionsanlage</b> .....   | 31 |
| Abbildung 8: <b>Konfokales Prinzip</b> .....   | 34 |
| Abbildung 9: <b>Schema des Line-Scan-Bildes</b> .....  | 36 |
| Abbildung 10: <b>Messprotokoll</b> .....   | 36 |
| Abbildung 11: <b>Originalaufnahmen der <math>Ca^{2+}</math>-Transienten, <math>Ca^{2+}</math>-Sparks und Koffein Transienten</b> ...38           |    |
| Abbildung 12: <b>Maus Körpergewicht</b> .....  | 44 |
| Abbildung 13: <b>Relatives Herzgewicht</b> .....   | 44 |
| Abbildung 14: <b><math>Ca^{2+}</math> Spark Frequenz unter Kontrollbedingungen (ohne pharmakologische<br/>Behandlung)</b> .....                  | 45 |
| Abbildung 15: <b>Gemittelte <math>Ca^{2+}</math>-Transient Amplituden und SR <math>Ca^{2+}</math> Gehalt unter<br/>Kontrollbedingungen</b> ..... | 46 |
| Abbildung 16: <b>Originalaufnahmen der diastolischen (spontanen) <math>Ca^{2+}</math> Sparks</b> .....   | 47 |
| Abbildung 17: <b><math>Ca^{2+}</math>-Spark-Frequenz nach der Behandlung mit K201 und Dantrolen</b> .....  | 48 |
| Abbildung 18: <b><math>Ca^{2+}</math>-Transient Amplituden und SR <math>Ca^{2+}</math> Gehalt</b> .....  | 50 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <i>Tabelle 1: Kannülierungslösung (CS)</i> .....                | 40 |
| <i>Tabelle 2: Perfusionslösung (PS)</i> .....                   | 40 |
| <i>Tabelle 3: Enzymlösung (DIG)</i> .....                       | 41 |
| <i>Tabelle 4: Stopplösung-1 (MS1)</i> .....                     | 41 |
| <i>Tabelle 5: Stopplösung-2 (MS2)</i> .....                     | 41 |
| <i>Tabelle 6: Ca<sup>2+</sup> Aufbau Lösungen</i> .....         | 41 |
| <i>Tabelle 7: 1M Normal Tyrode</i> .....                        | 42 |
| <i>Tabelle 8: 3M Normal Tyrode</i> .....                        | 42 |
| <i>Tabelle 9: 0Na<sup>+</sup>/0Ca<sup>2+</sup>-Lösung</i> ..... | 42 |
| <i>Tabelle 10: Koffein-Lösung</i> .....                         | 43 |
| <i>Tabelle 11: K201 (JTV-519)</i> .....                         | 43 |
| <i>Tabelle 12: Dantrolen</i> .....                              | 43 |

# 1 Einleitung

Herzinsuffizienz ist die Unfähigkeit des Herzens eine ausreichende Durchblutung des Organismus entsprechend seiner metabolischen Ansprüche bereitzustellen. (Yano, Yamamoto, et al. 2005) Typische klinische Symptome bei Herzinsuffizienz sind Dyspnoe (vor allem bei körperlicher Belastung), Ödeme und eine Reduktion der Leistungsfähigkeit. Studien konnten zeigen, dass die Prävalenz der Herzinsuffizienz ab dem 65. Lebensjahr deutlich zunimmt. (Mosterd et al. 1999) In der Allgemeinbevölkerung steigt die Prävalenz mit einem Alter von über 65 Jahren von 3-20 Fällen pro 1000 Personen auf über 10 Fälle pro 1000 Personen. (McMurray & Pfeffer 2005) Nach Diagnosestellung versterben innerhalb von 5 Jahren etwa 50% Patienten mit Herzinsuffizienz an kardialen Pumpversagen, während die andere Hälfte an plötzlichem Herztod infolge ventrikulärer Arrhythmien ver stirbt. (Packer 1985; Bleumink et al. 2004)

Der genaue Entstehungsmechanismus der Herzinsuffizienz ist bis heute noch nicht geklärt. Die arterielle Hypertonie stellt den kardiovaskulären Hauptrisikofaktor bei der Entstehung der Herzinsuffizienz dar. (Levy et al. 1996) Es konnte gezeigt werden, dass sich das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verdoppelt, wenn der systolische Blutdruck um mindestens 20 mmHg und diastolische Blutdruck um mindestens 10 mmHg über den normalen Blutdruck von 140 mmHg (systolisch) und 90 mmHg (diastolisch) steigen. (Lloyd-Jones et al. 2002) Chronisch erhöhter arterieller Blutdruck führt zur Hypertrophie und Fibrosierung des linken Ventrikels. (Drazner 2011) Dadurch verhärtet sich der Herzmuskel und nimmt an Dehnbarkeit ab, dies führt zur Abnahme der Kontraktilität und in weiterer Folge zur Herzinsuffizienz. Die zugrundeliegenden zellulären Prozesse sind bisher noch nicht ausreichend verstanden, die eine kausale Therapie in einem frühen Stadium der Herzinsuffizienz ermöglichen würden.

Studien haben gezeigt, dass die Herzinsuffizienz mit einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase einhergeht. (Hasenfuss & Pieske 2002; Lou et al. 2012; Bers 2006) Gestörte  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase führt einerseits zu Veränderungen der elektromechanischen Kopplung und begünstigt damit das Auftreten von Arrhythmien. (Pogwizd & Bers 2004; Janse 2004) Andererseits kommt es zur Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalwege, die Entstehung

der Hypertrophie auslösen oder sogar beschleunigen. (van Oort et al. 2010; Yamaguchi et al. 2007)

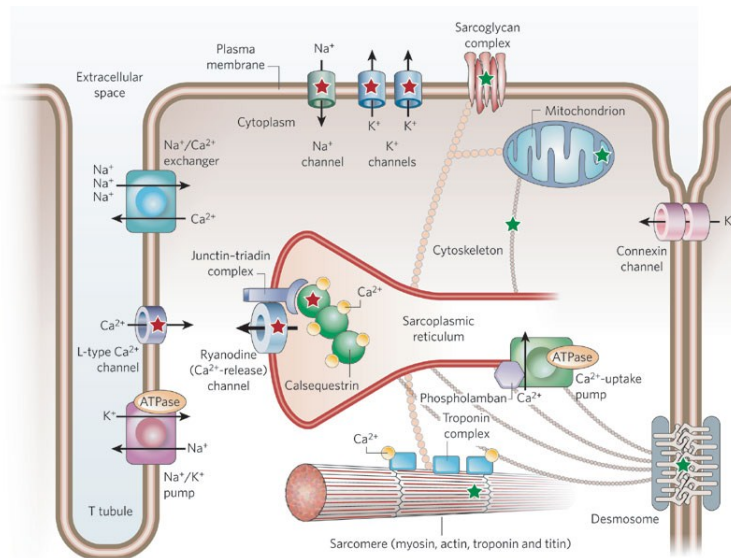
Ursächlich für die gestörte  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase ist häufig eine funktionelle Dysfunktion des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzungskanals, den Ryanodin-Rezeptor-2 (RyR2). Während der Herzerkrankung wird diese RyR2 Fehlregulation erworben, die sich in der Diastole (Relaxationsphase) als spontane  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (sog. SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck) manifestiert und Arrhythmien auslösen kann. (Belevych et al. 2011; Curran et al. 2010) Das SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck findet sich auch bei kongenitalen Arrhythmie-Syndromen, wie z. B. der katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT). Die CPVT stellt einen hereditären Defekt des RyR2 dar, der unter physischem und emotionalem Stress lebensgefährliche Rhythmusstörungen hervorrufen.

## **1.1 Elektromechanische Kopplung des Herzens**

Die elektromechanische Kopplung beschreibt den Prozess von der elektrischen Stimulation der Kardiomyozyten, über die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Ausschüttung aus dem SR, zur mechanischen Kontraktion des Herzens. (Bers 2002b) Um eine synchrone Aktivierung (Erregung und Kontraktion) der Kardiomyozyten zu ermöglichen, weist die sarkolemmale Membran der Kardiomyozyten tiefe Einstülpungen in das Zellvolumen (intrazellulärer Raum) auf. Diese sogenannten Transversal-Tubuli (T-Tubuli, Abbildung 1) verlaufen senkrecht zur Faserrichtung der Myofilamente und tragen in ihrer Membran zahlreiche spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (LTCC). Die T-Tubuli grenzen an die Terminalzisternen des SR in Höhe der Z-Linie des Sarkomers. Hier befinden sich die LTCC der T-Tubuli in unmittelbarer Nachbarschaft zu den RyR2.

Eine Einheit aus T-Tubuli mit LTCC und SR mit RyR2 wird als Diade und der zytosolische Raum dazwischen als diadischer Spalt bezeichnet. Funktionell werden die Diaden auch als „Couplon“ bezeichnet, die aus bis zu 25 LTCC und bis zu 250 RyR2 bestehen und somit eine SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzungseinheit bilden. (Franzini-Armstrong et al. 1999; Inoue & Bridge 2005; Baddeley et al. 2009; Hayashi et al. 2009)

Bei der elektromechanischen Kopplung depolarisiert das Aktionspotenzial die Membran und aktiviert die spannungsabhängigen LTCC (Abbildung 1). Infolge dieser Aktivierung gelangt eine geringe Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum in den diadischen Spalt. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom aktiviert und öffnet die RyR2 und führt zur  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Engl. calcium-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, CICR) einer großen Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR in das Zytosol (London & Krueger 1986) Der Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beschreibt einen  $\text{Ca}^{2+}$  Transient, deren Amplitude von  $\sim 0,1 \mu\text{mol/L}$  in der Diastole auf  $\sim 1 \mu\text{mol/L}$  während der Systole ansteigt. (Bers 2002b) Freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol führt zur Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C an den Myofilamenten und aktiviert damit die kontraktile Elemente.



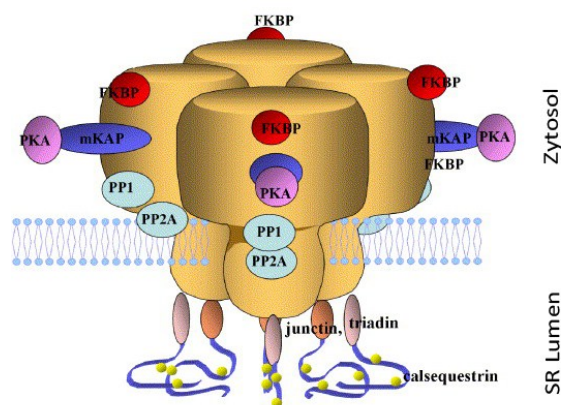
**Abbildung 1: Elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten.**

Das über die T-Tubuli fortgeleitete Aktionspotenzial aktiviert L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Daraus resultierende  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom aktiviert RyR2 und es folgt die  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Das  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an die Myofilamente und aktiviert die Kontraktion (Systole). Anschließend wird das  $\text{Ca}^{2+}$  durch die sarko-/endoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA-2a) und den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austausch (NCX) aus dem Zytoplasma eliminiert. Dabei kommt es zur Relaxation (Diastole) der Kardiomyozyten. Für Details siehe Kapitel 1.1 (Abbildung aus Knollmann & Roden 2008)

Die Relaxation der Kardiomyozyten erfolgt durch die Reduktion der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration (Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten) von  $\sim 1 \mu\text{mol/L}$  in der Systole auf  $\sim 0,1 \mu\text{mol/L}$  in der Diastole. Mit der Inaktivierung der RyR2 und der SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung nimmt die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration im diastischen Spalt ab. Der Hauptmechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$  Elimination wird mengenmäßig durch den energieabhängigen Prozess der sarko-/endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2a (SERCA-2a) getragen. Beim Menschen übernimmt die SERCA-2a über 60% (Pieske et al. 1999) und bei der Maus zirka 90% (Li et al. 1998) der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Elimination aus dem Zytosol. Einen weiteren Beitrag der  $\text{Ca}^{2+}$  Elimination leistet der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX). Sein Anteil der  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination beträgt beim Menschen 37% (Pieske, 1999) und bei der Maus 9%. (Li et al. 1998) Die restlichen 1-2% des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  werden beim Menschen und der Maus durch den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter und der sarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eliminiert. (Pieske et al. 1999; Li et al. 1998; Bers 2002b)

## 1.2 Ryanodin-Rezeptor Typ 2 (RyR2)

Es sind drei Isoformen (1-3) des RyR bekannt. Der RyR Typ 2 wird vornehmlich im Herzen gefunden (Giannini et al. 1995; Otsu et al. 1990; Nakai et al. 1990). RyR2 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, der aus 4 gleichen Monomeren besteht (Homotetramer). Jedes der 4 Monomere besteht im Durchschnitt aus über 5000 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 565 kDa (Takeshima et al. 1989) Bis zu 90% der RyR2-Polypeptidkette bilden den N-terminalen Abschnitt des RyR2. Diese Gerüststruktur ragt in das Zytoplasma und hat eine modulierende Wirkung auf die Kanalfunktion. (Marks et al. 2002) Die restlichen 10% der RyR2-Sequenz bilden die C-terminale Region. Dieser Teil bildet die Transmembranregion, sowie die Region der Kanalpore bestehend aus 4-10 transmembranen Helices. (Zorzato et al. 1990; Du et al. 2002) Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der elektromechanischen Kopplung unterliegt der RyR2 einer starken Regulierung. Die Regulationsproteine Calmodulin (CaM),  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), FKBP 12.6 (auch Calstabin-2 genannt), Proteinkinase A (PKA), Proteinphosphatase 1 (PP1) und Proteinphosphatase 2A (PP2A) binden an den RyR2 (zytosolische Seite) und bilden einen Makromolekülkomplex aus, der die RyR2 Funktion reguliert. (Bers 2004) Zusätzlich ist der RyR2 an der luminalen Seite des SR durch Triadin, Junctin und Calsequestrin reguliert. (Zhang et al. 1997)

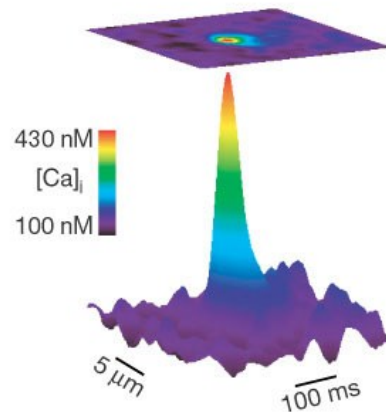


### Abbildung 2: Struktur des RyR2 mit Regulationsproteinen und deren Bindungsstellen

Schematische Darstellung eines RyR2 Makromolekülkomplexes. Calmodulin (CaM), FKBP12.6 (calstabin2), Proteinkinase A (PKA), Proteinphosphatase 1 (PP1) und Proteinphosphatase 2A (PP2A) binden an zytosolische Regionen des RyR2. An der intraluminalen Seite des SR sind Triadin, Junction und Calsequestrin mit dem RyR2 verbunden. (Yano, Ikeda, et al. 2005)

### 1.3 $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks

Die Aktivierung der RyR2 im Couplon stellen den sog. „ $\text{Ca}^{2+}$ -Spark“ Ursprung dar. (Cheng et al. 1993; Lederer et al. 2004; López-López et al. 1994)  $\text{Ca}^{2+}$  Sparks sind gekennzeichnet als eine zeitlich und räumlich getrennte lokale  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung in das Zytosol (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Zwei- (oben) und drei-dimensionale (unten) Darstellung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks**

$\text{Ca}^{2+}$ -Spark wurde aufgenommen in einem Maus-Kardiomyozyt. Peak-förmiger Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  in einem RyR2-Cluster. (Modifizierte Abbildung aus Bers 2002a)

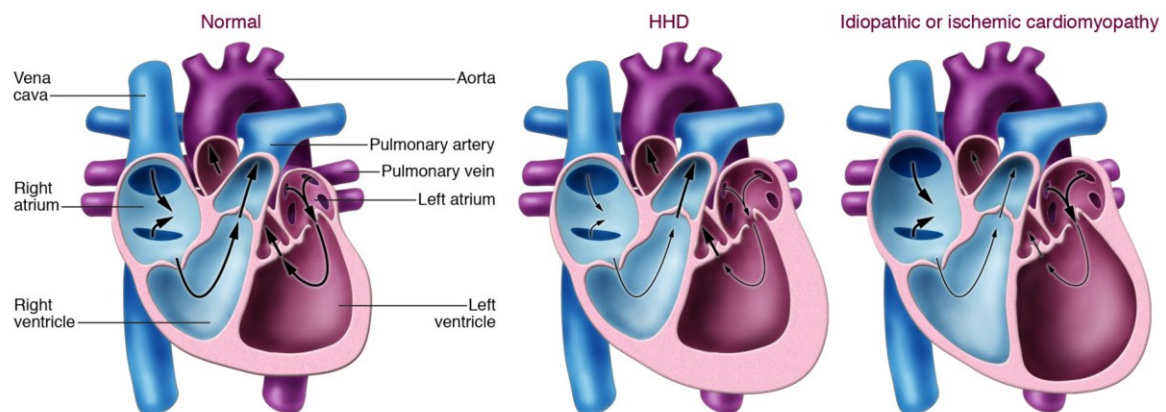
Eine synchrone SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung über den RyR2 ist entscheidend für eine rhythmische Kontraktion des Herzens. Das Aktionspotenzial synchronisiert  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks und erreicht in der Systole dadurch eine Uniformität des  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten. (Bers 2002b)

Generell wird angenommen, dass es im Kardiomyozyten während der Relaxationsphase keine  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung gibt. Es zeigte sich jedoch, dass auch in einem gesunden Kardiomyozyten ~1% aller vorhandenen RyR2 während der Diastole offen bleiben, über die  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR in das Zytosol tritt. Hierbei handelt es sich um stochastische Öffnungen individueller RyR2-Cluster in einem Kardiomyozyten. (Bers 2014) Diese spontane diastolische SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzungen werden als diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  Sparks bezeichnet. Die lokale  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, die während einem  $\text{Ca}^{2+}$  Spark freigesetzt wird, ist hoch (im  $\mu\text{mol/L}$  Bereich), da ein Cluster von 6-20 RyR2 an einer Kontaktstelle (sog. Junction, Engl.) aktiviert werden. (Bers 2014)

## 1.4 Erworbene RyR2 Dysfunktion und Herzinsuffizienz

### 1.4.1 Kardiale Umbauprozesse (Remodelling)

Infolge von Druck- oder Volumenbelastungen, Infarktschäden im Myokard oder anderen genetischen Faktoren werden im Herzen Umbauprozesse (sog. Remodelling) aktiviert, die einer reaktiven Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Genexpression unterliegen. Dabei kommt es zu Struktur- und Funktionsänderungen des Herzens auf molekularer und zellulärer Ebene, die durch Zellwachstum (Hypertrophie) und mit einer interstitiellen Kollagenbildung (z. B. Fibrose) gekennzeichnet sind. (Cohn et al. 2000)



#### Abbildung 4: Vergleich der linksventrikulären Geometrie

Schematische Darstellung eines gesunden Herzens (Normal, links) im Vergleich mit hypertensiver Herzkrankheit (HHD, mitte) und idiopathischer/ischämischer Kardiomyopathie (idiopathic or ischemic cardiomyopathy, rechts). Der Hauptunterschied zwischen HHD und den Kardiomyopathien ist die Kammergeometrie. HHD zeigt eine linksventrikuläre Hypertrophie, Patienten mit ischämischer oder idiopathischer Kardiomyopathie zeigen eine vergrößerte, dilatiertere linke Kammer. (Abbildung aus Berk et al. 2007)

Eine chronische (nichtbehandelte) Blutdruckerhöhung im peripheren Gefäßsystem induziert im Herzen eine linksventrikuläre Hypertrophie, einem Schutzmechanismus gleichend, der es dem Herzen ermöglicht dem hämodynamisch wirksamen Stress entgegenzuwirken (Abbildung 4). (Berk et al. 2007) Da die Kardiomyozyten terminal differenziert sind, resultiert eine Größenzunahme des Herzens primär durch Wachstum der bestehenden Myozyten. (Fearnley et al. 2011) Durch die Hypertrophie ermöglicht das kardiale Remodelling dem geschädigten Herzen die Pumpleistung zu steigern und kann dadurch das kardiale Auswurfvolumen zunächst erhalten. (Fearnley et al. 2011)

Neben dieser Größenzunahme der Kardiomyozyten kommt es durch den Remodelling-Prozess zu Veränderungen der extrazellulären Matrix, mit vermehrter interstitieller und perivaskulären Fibrose. (Weber 2000) Die interstitielle Fibrose führt zu erhöhter Steifigkeit des Myokards/Ventrikels, die in diastolische linksventrikuläre Dysfunktion (reduzierte Füllung) und einer diastolischen Herzinsuffizienz mündet. (Burlew & Weber 2002) Auch ventrikuläre Arrhythmien werden durch die gestörte elektrische Erregung als Folge der kardialen Remodeling hervorgerufen. (McLenachan & Dargie 1990) Durch die perivaskuläre Fibrosierung nimmt die Wanddehnbarkeit der intramuralen Gefäße ab und es kommt zur Reduktion der koronaren Flussreserve. (Frohlich 2001) Menschen mit Bluthochdruck zeigen bei der Entstehung der Hypertrophie und deren Progression in die Herzinsuffizienz deutliche interindividuelle Unterschiede im Grad der Wanddickenzunahme, sowie in der geometrischen Form des Herzens. (Sehgal & Drazner 2007; Ganau et al. 1992) Der grundlegende Mechanismus für die interindividuellen Unterschiede, bei dem Nachlast-induzierten Remodelling-Prozess ist derzeit noch nicht geklärt. (Drazner 2011) Die Progredienz des hypertonen Zustandes mündet von den zunächst kompensatorischen Mechanismen in ein maladaptives kardiales Remodelling, dass konsekutiv mit einer linksventrikulären Dilatation und einer kontraktilen Dysfunktion einhergeht. (Chien 1999)

### 1.4.2 Gestörte intrazelluläre $Ca^{2+}$ Homöostase

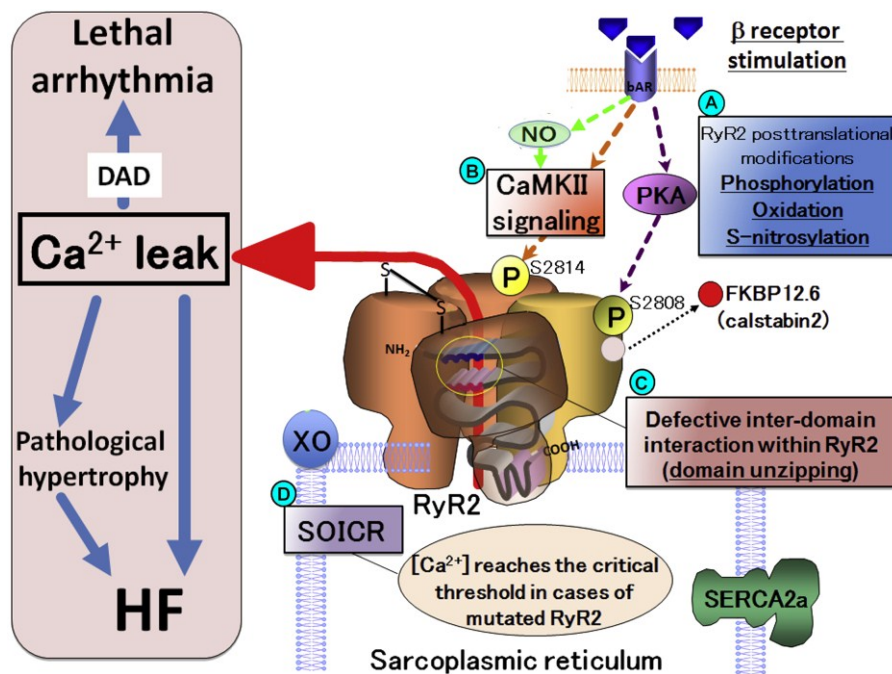
Neben den morphologischen Änderungen des Herzens kommt es während dem Remodelling-Prozess auch zu Veränderungen der elektromechanischen Kopplung. Eine gestörte  $Ca^{2+}$  Homöostase stellt hierbei die zentrale Rolle bei der Entstehung der Hypertrophie dar. Diese Veränderung aktiviert den  $Ca^{2+}$ -abhängige CaN/NFAT Hypertrophie Signalweg (van Oort et al. 2010) und trägt konsequent zur sich entwickelnden Herzinsuffizienz bei. (Berridge et al. 2003; Pieske et al. 1999) Bei der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Reduktion der  $Ca^{2+}$ -Transienten Amplitude (in der Systole) und SR  $Ca^{2+}$  Gehaltes kommt. (Hasenfuss & Pieske 2002; Pieske et al. 1999; Yano, Ikeda, et al. 2005) In der Diastole kommt es dagegen zu einem verlangsamten Abfall der  $Ca^{2+}$  Konzentration im Zytosol. (Pieske et al. 1999; Beuckelmann et al. 1992; Kubo et al. 2001) Ursächlich für diese veränderte  $Ca^{2+}$  Homöostase stehen zwei Mechanismen im Vordergrund. Zum einen resultiert die reduzierte SR  $Ca^{2+}$  Freisetzung durch die herunterregulierte SERCA-2a Expression (Reduktion der SR  $Ca^{2+}$  Wiederaufnahme) und der kompetitiven Hochregulation der NCX Expression. (Hasenfuss et al. 1999; Hasenfuss et al. 1994) Zum anderen wird die  $Ca^{2+}$  Homöostase durch eine erhöhte spontane  $Ca^{2+}$  Freisetzung aus dem SR während der Diastole (SR  $Ca^{2+}$  Leck) gestört. Hierbei findet sich ein für die  $Ca^{2+}$ -induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung sensibilisierter RyR2 aufgrund einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit. (Ai et al. 2005; Maier et al. 2003; Marx et al. 2000; Wehrens et al. 2004)

### 1.4.3 SR $Ca^{2+}$ Leck

Verschiedene Mechanismen rufen bei der Herzinsuffizienz dieses SR  $Ca^{2+}$  Leck und die zugrundeliegende Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 hervor.

Zum einen wird das SR  $Ca^{2+}$  Leck durch eine Kombination aus post-translationellen Modifikationen des RyR2 und Veränderungen des RyR2 Makromolekülkomplexes verursacht (Abbildung 5). Hierbei wird der RyR2 selbst mittels Oxidation, Nitrosylierung und Phosphorylierung post-translationell modifiziert. (Marx et al. 2000; Zhang et al. 2003; Damy et al. 2004; Mochizuki et al. 2007; Terentyev et al. 2008; Reiken, Lacampagne, et al. 2003) Zusätzlich nimmt die Menge der modulierenden Untereinheiten FKBP 12.6,

Proteinphosphatase 1, Proteinphosphatase 2A und Phosphodiesterase 4D3 des RyR2 Makromolekülkomplexes ab. (Marx et al. 2001; Reiken, Gaburjakova, et al. 2003; Lehnart et al. 2005) Zum anderen kommt es bei der Herzinsuffizienz zu einer erhöhten Aktivierung der CaMKII, die den RyR2 phosphoryliert und damit erhöht die RyR2 Öffnungswahrscheinlichkeit. (Maier et al. 2003)



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ursachen des SR Ca<sup>2+</sup> Lecks**

Das SR Ca<sup>2+</sup> Leck wird durch folgende (vier, A-D) Mechanismen hervorgerufen: A) Posttranslationelle Modifikation des RyR2, B) Direkte Aktivierung des RyR2 durch Phosphorylierung über Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) oder Proteinkinase A (PKA), C) Gestörte Interaktion innerhalb der Domäne des RyR2, D) Beim erhöhten SR Ca<sup>2+</sup> Gehalt kommt es zu einem erhöhten spontanen SR Ca<sup>2+</sup> Leck durch mutierte RyR2 (sog. store-operated intracellular Ca<sup>2+</sup> release-SOICR). Abkürzungen: HF= Herzinsuffizienz. (Abbildung aus (Yano & Okuda 2014)

Ein weiterer Mechanismus ist die Störung der Interaktion zwischen zwei Domänen innerhalb des RyR2. (Yano et al. 2006) Hierbei wird die Inaktivierung des RyR2 gestört, dass zur vermehrten Öffnung des RyR2 führt. (Oda et al. 2005)

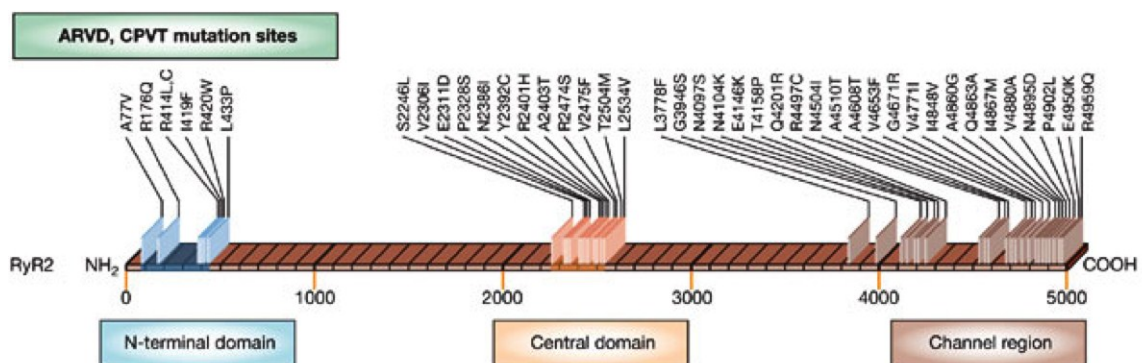
Alle diese Mechanismen führen bei der Herzinsuffizienz zu einer Reduktion des SR Ca<sup>2+</sup> Gehaltes und verringern damit die systolische Kontraktionsfähigkeit. In der Diastole führt das SR Ca<sup>2+</sup> Leck zu steigenden intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration, wodurch es in der diastolischen Relaxationsphase zu einem geringen Ca<sup>2+</sup> Abfall kommt. (Bers 2014) Doch hat das SR Ca<sup>2+</sup> Leck nicht nur Auswirkungen auf die Kontraktions- und

Relaxationsfähigkeit, sondern stellt das Substrat für lebensbedrohlichen Arrhythmien dar. (Yano et al. 2006) Durch den vermehrt geöffneten RyR2, kommt es vermehrt zu spontanen  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzungen in der Diastole. Diese diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Sparks können benachbarte Kontaktstellen aktivieren und eine spontane Welle der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung hervorrufen. (Bers 2014) Diese  $\text{Ca}^{2+}$  Wellen verbreiten sich durch die gesamte Zelle und lösen die Arrhythmien aus. (Cheng et al. 1996) Ebenso ist das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  Leck für die bereits herzinsuffiziente Zelle energetisch kostbar, da das ausgetretene  $\text{Ca}^{2+}$  entweder über die SERCA-2a in SR wiederaufgenommen wird (direkt ATP-vermittelter Prozess) oder über den NCX aus der Zelle hinaus abtransportiert werden muss (indirekt ATP-vermittelter Prozess). (Bers 2014)

## 1.5 Angeborene RyR2 Dysfunktion und CPVT

Das SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck tritt nicht nur in erworbener Form bei der Herzinsuffizienz auf, sondern findet sich auch bei hereditären Arrhythmie-Syndromen, wie z. B. bei der CPVT. Die CPVT stellt eine angeborene Erkrankung dar, die gekennzeichnet ist durch das Auftreten  $\beta$ -adrenerg-vermittelter ventrikulären Arrhythmien, die bei jungen Individuen trotz strukturell intaktem Herzen zu Synkopen, Herzstillständen und sogar zum plötzlichen Herztod führt. (Leenhardt et al. 1995) Kennzeichnend für die CPVT sind die ventrikulären Arrhythmien mit variabler Morphologie, die unter Ruhekonditionen nicht präsent sind, jedoch bei physischer Anstrengung, emotionaler Erregung oder durch Gabe von Katecholaminen auftreten.

Die genetischen Analysen identifizierten zwei Gene, die molekulare Grundlage der CPVT bilden. Zum einen wurde die autosomal-dominante Variante mit Veränderung des RyR2-Genes entdeckt (Priori et al. 2001) und zum anderen konnte die rezessive Form mit Veränderungen des kardialen Calsequestrin (CASQ2) Genes entschlüsselt werden. (Lahat et al. 2001) Beide Gen-Loci exprimieren Proteine die an der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung beteiligt sind: RyR2 und das Calsequestrin (das  $\text{Ca}^{2+}$  Hauptspeicherprotein im Lumen des SR).



**Abbildung 6: Lokalisationen der CPVT Mutationen auf der RyR2 Sequenz**

Gezeigt sind Punktmutationen des RyR2, die für CPVT und ARVD (Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie) verantwortlich gemacht werden. RyR2 Mutationen sind auf 3 Hauptregionen verteilt (N-terminale, zentrale und C-terminale Region farblich markiert mit blau, orange, braun). (Abbildung wurde modifiziert nach Yano et al. 2006).

Die meisten der mehr als 150 RyR2 Mutationen (siehe: <http://www.fsm.it/cardmoc>), die mit CPVT in Verbindung gebracht werden, stellen Punktmutationen dar, wodurch es zum Austausch (Substitution) einer Aminosäure gegen eine andere Aminosäure kommt. Diese

Substitutionen finden sich hierbei auf den 3 Hauptregionen des RyR2: der N-terminalen, der zentralen und der C-terminalen Region (Abbildung 6). (Yano et al. 2006)

Eine der ersten mit CPVT in Verbindung gebrachten genetischen Veränderung, stellt die humane R4497C Mutation (Punktmutation Stelle 4497 des RyR2, mit Austausch eines Arginins gegen ein Cystein) dar. (Priori et al. 2001) Die klinischen Untersuchungen und die Stammbaumanalyse einer italienischen Familie ergaben eine hochmaligne Variante der CPVT. Die Mutter, sowie alle Kinder der Familie (2 Töchter bereits im jugendlichen Alter am plötzlichen Herztod gestorben) sind Träger der R4497C Mutation und entwickelten bidirektionale ventrikuläre Tachykardien während den Belastungstests. (Priori et al. 2001) Zelluläre Untersuchungen ergaben, dass eine  $\beta$ -adrenerge Aktivierung von Kardiomyozyten mit einer CPVT Mutation zu einer unkontrollierten SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung in der Diastole führt, wodurch es zu verzögerten Nachdepolarisationen und einer getriggerten Aktivität infolge des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Anstiegs kommt. (Liu et al. 2006) Bei der angeborenen RyR2 Dysfunktion werden diese spontanen  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzungen zu einem durch die  $\text{Ca}^{2+}$  Überladung des SR hervorgerufen (store-overload induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, SOICR). Die mutierten RyR2 zeigen hierbei gegenüber luminalen  $\text{Ca}^{2+}$  ein verstärktes Öffnungsverhalten. (Jiang et al. 2004; Jiang et al. 2005)

## **1.6 Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz und CPVT**

Die derzeitige pharmakologische Therapie der Herzinsuffizienz konzentriert sich auf die Blockade der neurohumoralen Signalwege (z.B. ACE Hemmer,  $\beta$ -Blocker). Zusätzlich werden zur Milderung der Luftnot und Ödembildung Diuretika gegeben. Diese Strategien verbessern die Überlebensraten und senken die Hospitalisierungsraten der Patienten, jedoch verhindern sie nicht die Progression der Herzinsuffizienz. (Marks 2013) Zunehmende Erkenntnisse über die zentrale Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$  Regulation führten zur Entwicklung der RyR2-Stabilisatoren (z. B. K201), einer neuen Medikamentenklasse für die Therapie der CPVT und potenziell auch der Herzinsuffizienz.

### **1.6.1 RyR2 Stabilisator – K201**

K201 (auch bekannt als JTV-519) ist ein 1,4-Benzothiazepin-Derivat mit einer Diltiazem-ähnlichen chemischen Struktur. Die genaue chemische Bezeichnung lautet [4-[3-(4-benzylpiperidin-1-yl) propionyl]-7-methoxy-2, 3, 4, 5-tetrahydro-1, 4-benzothiazepin monohydrochlorid. Ursprünglich wurde K201 für die Reduktion des Zelltodes infolge von Myokardinfarkten entwickelt. (Kaneko 1994) Es stellte sich jedoch heraus, dass K201 ein unspezifischer Blocker der spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ist, mit einer hohen antiarrhythmischen und kardioprotektiven Wirkung. (Kaneko & Matsuda 2009) Es konnte gezeigt werden, dass K201 die kontraktile Funktion in Gewebeproben von terminal insuffizienten humanen Herzen durch die Inhibition des SR  $\text{Ca}^{2+}$  Lecks verbessert. (Toischer et al. 2010)

Die Wirkung von K201 ist jedoch komplex und zeigte unterschiedliche Wirkmechanismen auf, die Tierart- und Konzentrationsabhängig waren. Zum einen inhibierte K201 die SR  $\text{Ca}^{2+}$  Wiederaufnahme über SERCA-2a und hemmte ebenso sarkolemme  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. (Loughrey et al. 2007; Kimura et al. 1999) Zum anderen führte K201 zu einer Konformationsänderung des RyR2 und reduzierte damit dessen Öffnungswahrscheinlichkeit. (Yano et al. 2003) Gezeigt werden konnte auch, dass K201 die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung bei bestehender  $\text{Ca}^{2+}$  Überladung des SR reduzieren kann. (Hunt et al. 2007; Sedej et al. 2010; Sacherer et al. 2012)

### 1.6.2 RyR2 Stabilisator – Dantrolen

Dantrolen, mit der chemischen Bezeichnung 1-[[5-(4-Nitrophenyl)furan-2-yl]methylidenamino]imidazolidin-2,4-dion) ist ein Muskelrelaxans, das in der Anästhesie hauptsächlich für die Therapie der lebensbedrohlichen Malignen Hyperthermie (MH) verwendet wird. MH ist eine genetische Veränderung des Ryanodin-Rezeptor-1 (RyR1), der Skelettmuskulatur. Über 70 verschiedene Punktmutationen des RyR1-Gens wurden beschrieben, die MH oder die Central-Core-Myopathie hervorrufen. (Yano et al. 2006) Alle RyR1, die eine MH-Mutation aufweisen sind durch ein SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck gekennzeichnet. (Yano et al. 2006; Yano et al. 2008) Einige RyR2 Mutationen, die mit der CPVT in Zusammenhang gebracht werden, sind in korrespondierenden Regionen des RyR1 bei der Malignen Hyperthermie lokalisiert. (Ikemoto & Yamamoto 2002) Nach der Entdeckung der Dantrolen-Bindungsstelle am RyR1 zwischen den Aminosäuren Leu<sup>590</sup>-Cys<sup>609</sup> und der Erkenntnis, dass sich diese Bindungsstelle für Dantrolen auch am RyR2 befindet begannen Untersuchungen mit Dantrolen an Kardiomyozyten. (Kobayashi et al. 2009; Kobayashi et al. 2010; Maxwell et al. 2012) Es stellte sich hierbei heraus, dass Dantrolen den RyR2 stabilisiert und dadurch das SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck reduziert. Dantrolen zeigt ebenso positive Effekte auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten aus insuffizienten Herzen, da es die  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten Amplitude auf die Werte von Wildtyp (WT) Zellen wiederhergestellte. (Kobayashi et al. 2009)

## **1.7 Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit**

Eine Störung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase, hervorgerufen durch den Austritt von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR über den RyR2, trägt zur Progression der Herzinsuffizienz bei. (van Oort et al. 2010) Erworbene RyR2 Dysfunktion (z.B. infolge druckinduzierter Hypertrophie), sowie die angeborene RyR2 Fehlregulation (z. B. CPVT) zeigen einen verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$  Verlust aus dem SR in der Diastole. Dieser Mechanismus führt konsekutiv zur Minderung des SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehaltes und der damit verbundenen reduzierten Kontraktilität. Eine pharmakologische Stabilisierung des RyR2 unter diesen pathophysiologischen Bedingungen könnte die  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase stabilisieren und damit die Kontraktilität der Kardiomyozyten verbessern.

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden ob eine akute pharmakologische Stabilisierung des RyR2 mittels K201 und Dantrolen in den Maus-Kardiomyozyten mit einer humanen RyR2 Mutation nach Druckbelastung (1) die Frequenz der spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungseignisse ( $\text{Ca}^{2+}$  Spark Frequenz) reduziert und (2) die  $\text{Ca}^{2+}$  Transient Amplitude bzw. SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt normalisiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mausmodell

Um den Effekt der pharmakologischen Stabilisierung des RyR2 in Bezug auf das SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase zu untersuchen, wurde ein Mausmodell mit einer genetisch bedingten Erhöhung der diastolischen SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung über RyR2 herangezogen. Mittels ortsspezifische Mutagenese (site-direct mutagenesis, Engl.) wurde eine Punktmutation auf der Position 4496 des kardialen RyR2 induziert um heterozygote  $\text{RyR2}^{\text{R4496C}/-}$  Knock-in Mäuse zu generieren ( $\text{RyR2}^*$ ). Diese  $\text{RyR2}^*$  Mutation ist äquivalent zu der erst identifizierte humane RyR2 Mutation (R4497C) bei Menschen mit CPVT. (Cerrone et al. 2005) Diese Mutation erhöht die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des  $\text{RyR2}^*$  (Fernández-Velasco et al. 2009) und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors (sog. „Gain-of-Function“ Defekt), die als häufige spontane SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzungen ( $\text{Ca}^{2+}$  Sparks) detektierbar sind. Insbesondere unter katecholaminerger Stimulation (Stress) entwickeln die  $\text{RyR2}^*$  Mäuse, ähnlich wie die CPVT-Patienten mit der  $\text{RyR2}^{\text{R4497C}/-}$  Mutation, polymorphe ventrikuläre Tachykardien und zeigen eine erhöhte Inzidenz des plötzlichen Herztods. (Cerrone et al. 2005) Die  $\text{RyR2}^*$  Mäusen haben unter basalen Bedingungen allerdings eine normale Herzpumpfunktion und zeigen keine Anzeichen einer strukturellen Herzerkrankung. (Cerrone et al. 2005)

Neben den  $\text{RyR2}^*$  Mäusen wurden Experimente an ihren WT Wurfgeschwistern (Kontrolle) durchgeführt. Insgesamt wurden 112 Mäuse (Männchen und Weibchen) im Alter von 9-14 Wochen verwendet. Alle Tierversuche in dieser Arbeit wurden vom Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft genehmigt und wie im Tierversuchsantrag (BMWF-66.010/0098-II/3b/2012) beschrieben durchgeführt.

## **2.2 Minimalinvasive transaortale Konstriktion (TAC Operation)**

WT und RyR2\* Mäuse wurden einer transversalen aortalen Konstriktion (TAC Operation) unterzogen um eine linksventrikuläre Hypertrophie zu erzeugen. (Hu et al. 2003) Hierdurch entsteht eine kardiale Druckbelastung, die pathophysiologisch vergleichbar ist mit der beim Menschen auftretenden Druckbelastungen infolge einer Aortenstenose oder einem chronischen arteriellen Bluthochdruck. Typischerweise führt die TAC Operation zu einer linksventrikulären konzentrische Hypertrophie, die zunächst eine kompensierte Pumpfunktion aufweist, im weiteren Verlauf jedoch über eine exzentrische Hypertrophie und linksventrikuläre Dekompensation und Dilatation in eine Herzinsuffizienz übergeht. Die zu untersuchenden Versuchstiere wurden mit einem Körpergewicht bei Weibchen  $21\pm 1$  Gramm und Männchen  $24\pm 1$  Gramm ausgewählt. Zu Beginn des operativen Eingriffes wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin/Xylazin Mischung anästhesiert. In Höhe des Jugulums wurde ein horizontaler Schnitt gesetzt. Über diesen operativen Zugang wurde eine Ligatur um den transversalen Abschnitt der Aorta, mittels eines 5-0 Fadens, gelegt und mit einer 27-Gauge Nadel sichergestellt, dass der Knoten ausreichend fixiert wurde. Die 27-Gauge Nadel diente als Kalibermaß um eine Reduktion des blutdurchgängigen Durchmessers zu erreichen. Nach Verengung der Aorta, wurde die 27-Gauge Nadel wieder entfernt. Der Hautschnitt wurde mit 4-5 Nähten verschlossen. Nach dem operativen Eingriff wurden die Mäuse in einem mit Sauerstoff angereicherten Käfig bei einer Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  bis zu ihrer vollständigen Erholung von der Anästhesie aufbewahrt. Chirurgische Eingriffe wurden von Dr. Simon Sedej (Abt. für Kardiologie) durchgeführt. (Hu et al. 2003)

Als Kontrollgruppe dienten Mäuse, die einer Scheinoperation (Sham) unterzogen wurden, um die unspezifischen Effekte einer Operation an sich (Narkoseeffekte, Entzündungsreaktion) ausblenden zu können und spezifisch den Effekt der Druckbelastung zu untersuchen. Alle Tiere bekamen eine Woche lang das Analgetikum Novalgin® (Sanofi, Österreich) mit dem Wirkstoff Metamizol-Na (15 Tropfen gelöst in 100 ml Trinkwasser). Messungen wurden an den Mäusen 1 Woche nach dem Eingriff (TAC oder Sham) durchgeführt.

## **2.3 Isolation von ventrikulären Maus-Kardiomyozyten**

### *2.3.1 Isolation des Herzens*

Die Versuchstiere (1 Woche post-OP) wurden zunächst mit Isofluran (2%) in Allgemeinnarkose versetzt. Zur Verhinderung einer Thrombenbildung wurde den Tieren 50IE Heparin intramuskulär injiziert. Anschließend wurden die Körpergewichte bestimmt und die Mäuse für weitere 15 Minuten in den Käfig gesetzt, um eine ausreichende Heparinisierung sicher zu stellen.

Die Tötung der Tiere erfolgte mittels zervikaler Dislokation (Genickbruch) unter tiefe Isofluran Narkose. Das Tier wurde nun auf dem Präparationsplatz in Rückenlage an allen vier Extremitäten fixiert, dies gewährleistete einen optimalen thorakalen Zugang.

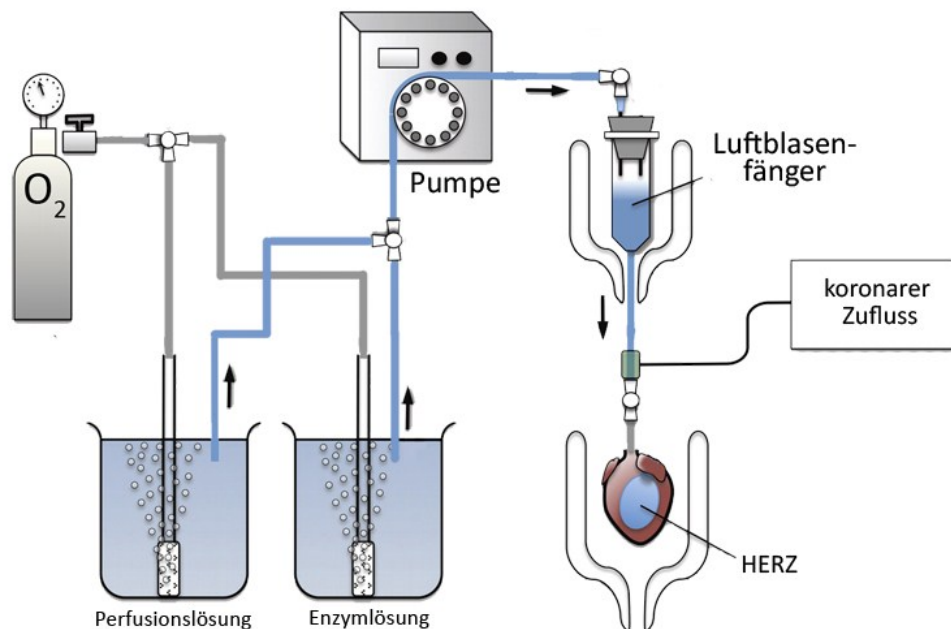
Ein substernaler Schnitt eröffnete den Thorax, das Zwerchfell wurde durchtrennt, hierbei wurde sorgsam darauf geachtet keine weiteren Organe zu verletzen. Entlang der Axillarlinien wurde beidseitig der Thorax aufgeschnitten, um einen besseren Zugang zum Herzen zu bekommen. Nach Eröffnung des Perikards lag das Herz in orthogonaler Lage im Thorax. Das Herz (mit dem Aortenstumpf) wurde zügig entnommen, in ein Becherglas mit der gekühlten Kannülierungslösung (für die Zusammensetzung siehe Kap.2.6, Tabelle 1 ) transferiert und gewogen.

### *2.3.2 Kannülierung der Aorta*

Für die retrograde Perfusion des Herzens, musste zuerst der Aortenstumpf mit einer Perfusionskanüle verbunden werden. Hierbei wurde das Herz sorgsam in eine, mit auf Eis gekühlter Kannülierungslösung (siehe Kap.2.6, Tabelle 1 ) gefüllten, Petrischale transferiert. In dieser Kannülierungslösung wurde das Herz am Aortenstumpf unter dem Stereomikroskop auf eine 18-Gauge Kanüle gestülpt und mit einem chirurgischen 5-0 Faden (Ethicon®, Johnson&Johnson, USA) fixiert. Die Koronararterien wurden mit gekühlter Kannülierungslösung gespült.

### 2.3.3 Enzymatische Perfusion des Herzens

Die enzymatische Perfusion des Herzens fand an der Langendorff-Perfusionsanlage statt (Abbildung 7). Das Herz wurde an die Perfusionsanlage angeschlossen und für 4 Min mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Perfusionslösung (PS) (siehe Kap.2.6, Tabelle 2) bei  $37^\circ\text{C}$  und einer konstanten Durchflussrate von 3 ml/Min perfundiert. Dies beugte einen Koronarspasmus vor und verhinderte die Kontraktion der Herzmuskelzellen. Danach wurde die Perfusion auf die Trypsin- und Liberase-enthaltene Enzymlösung (siehe Kap.2.6, Tabelle 3) für weitere 6 Minuten umgestellt um die Zellverbindungen zu lösen. Nach der enzymatischen Verdauung wurden beide Ventrikel abgesetzt und in einem kleinen Becherglas, gefüllt mit Stopplösung-1 (siehe Kap.2.6, Tabelle 4) aufgefangen. Die Stopplösung-1 inaktivierte die Verdauungsenzyme und schützte die Kardiomyozyten vor weiterer Verdauung.



**Abbildung 7: Langendorff-Perfusionsanlage**

Hierbei handelt es sich um ein 2 Kammersystem, das mit einem Luftblasenfänger verbunden ist. Beide Lösungen wurden oxygeniert. Der bis zur Hälfte mit Perfusionslösung (PS) gefüllte Luftblasenfänger ermöglicht eine luftblasenfreie Perfusion der Koronararterien. Am Ende des Luftblasenfängers wurde das Herz über die am Herzen befestigte Kanüle fixiert und mittels einer Schlauchpumpe bei einer konstanten Durchflussrate von 3 ml/Min perfundiert. (modifiziert, aus Liao et al. 2012)

Der enzymatischen Verdauung des Herzens schloss sich nun die mechanische Dissoziation an. Zunächst wurden die Ventrikel in kleine Stücke zerteilt. Die Dissoziation der Kardiomyozyten wurde durch Erzeugung eines Soges mit Hilfe einer abgerundeten Transferpipette verstärkt. Dieser Vorgang wurde mit vier verschiedenen Transferpipetten bei kleiner werdendem Kaliber-Durchmesser wiederholt. Die Zellsuspension wurde nun zur Trennung der isolierten Kardiomyozyten von unverdaulichem Herzgewebe durch einen Siebfilter mit einer Maschenweite von 250  $\mu\text{m}$  filtriert. Die Zellsuspension wurde dabei in einem Röhrchen aufgefangen, in dem sich in den nächsten 10 Minuten ein Zellpellet absetzte. Daraufhin begann die drei-stufige  $\text{Ca}^{2+}$ -Auffüllung des SR mit den PS Lösungen, die eine ansteigende  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration (125  $\mu\text{mol/L}$ , 250  $\mu\text{mol/L}$  und 500  $\mu\text{mol/L}$ ) (siehe Kap.2.6, Tabelle 6) beinhalteten. Nach dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau, der eine Überladung der Kardiomyozyten mit  $\text{Ca}^{2+}$  verhinderte, wurden Kardiomyozyten in der Normal Tyrode Lösung mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (siehe Kap. 2.6, Tabelle 7) aufbewahrt.

## **2.4 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie**

### *2.4.1 Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4/AM*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der grün fluoreszierende  $\text{Ca}^{2+}$  Indikator Fluo-4/AM (Molecular Probes™, USA) verwendet. Fluo-4/AM ist ein auf der Grundlage von Fluo-3 weiterentwickeltes Fluorochrom das für die Detektion von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Konfokal- und Fluoreszenzmikroskopie verwendet wird. Fluorochrome sind Moleküle, die nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge eine Strahlung mit einer längeren Wellenlänge emittieren. Fluo-4/AM hat ein Absorptionsmaximum von 494 nm und ein Emissionsmaximum bei 516 nm. Die Nähe des Absorptionsmaximums von Fluo-4/AM und der Wellenlänge von 488 nm des in der Konfokalmikroskopie verwendeten Argon Lasers führt zu einer hohen Fluoreszenzanregung des Fluo-4/AM. Fluo-4/AM diffundiert aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft in die Zelle und bindet dort an  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Zusatzbezeichnung „AM“ steht für Acetoxymethyl-Ester der für die hohe Lipophilität des Fluorochroms verantwortlich ist. Dieser Ester wird nach der Diffusion intrazellulär durch unspezifische Esterasen abgespalten. Hierbei verliert das Fluorochrom seine Lipophilität und verbleibt länger in der Zelle.

#### *2.4.2 Fluo-4/AM Beladung der Maus-Kardiomyozyten*

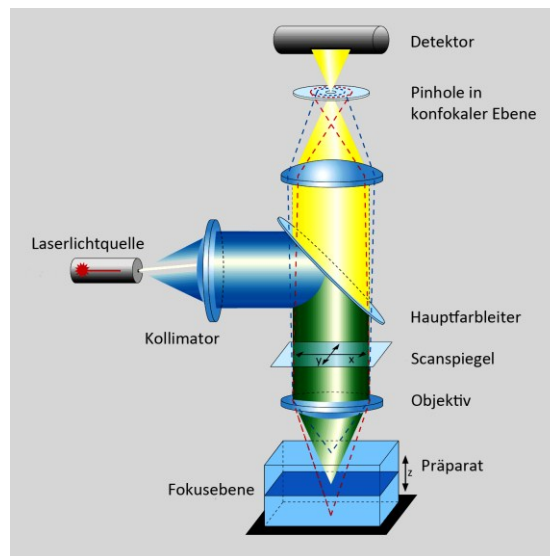
Ventrikuläre Maus-Kardiomyozyten wurden mit 8  $\mu\text{mol/L}$  Fluo-4/AM (gelöst in Normal Tyrode Lösung mit 1  $\text{mmol/L}$   $\text{CaCl}_2$ ) für 30 Minuten bei Raumtemperatur beladen. Nach der Beladungszeit wurden die Zellen und der Anteil, des nicht aufgenommenen Fluo-4/AM mit Normal Tyrode-1 Lösung ausgewaschen. Die Zellen wurden in die Laminin-beschichteten Messschalen mit einem Glasboden ausplattiert. Laminin erhöht die Adhärenz der Kardiomyozyten an den Glasböden der Messschalen während der Perfusion. Im Anschluss folgte eine 10-minütige De-Esterifizierung des Fluo-4/AM.

#### *2.4.3 Konfokales Laser-Scanning Mikroskop*

Subzelluläre Kalziumkonzentrationsänderungen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie untersucht. Hiermit konnten Aussagen über die spontane diastolische Öffnungswahrscheinlichkeit des kardialen RyR2, die sich in Form spontaner  $\text{Ca}^{2+}$  Sparks zeigten, in den einzelnen Untersuchungsgruppen getroffen werden. Ebenso wurden hiermit die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten und die SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalte ermittelt.

### 2.4.3.1 Aufbau des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde ein Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss®, LSM 510 Meta, Deutschland) verwendet.



**Abbildung 8: Konfokales Prinzip**

Das Schema zeigt den Aufbau des Laser-Scanning-Mikroskops. Monochromatisches Anregungslicht (blau dargestellt) des Argon-Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm wird kollimariert durch einen dichroitischen Spiegel auf das Präparat reflektiert. Die im Strahlengang dazwischengeschalteten Spiegel ermöglichen eine Auslenkung des Strahlengangs in x- und y-Richtung. Das Anregungslicht wird durch das Objektiv auf das Präparat fokussiert. Das vom Fluorochrom emittierte Licht passiert in entgegengesetzter Richtung den dichroitischen Spiegel (gelb dargestellt). Die nachgeschaltete Linse bündelt das Fluoreszenzlicht in Richtung der Lochblende. Diese Blende ist zur Fokusebene konjugiert angeordnet und reflektiert die nicht aus der Fokusebene stammenden Lichtemissionen (hier blau- bzw. rot-gestrichelte Linie). Der Detektor registriert nur das exakt im Fokus liegende Fluoreszenzlicht. Der grüne Strahlengang, demonstriert die Überlagerung des Anregungs- und Emissionslichtes (modifiziert nach, Zeiss LSM 510 Meta, Broschüre).

Bei dieser Art der Lichtmikroskopie wird das Präparat, mit einem Laserstrahl, gerastert entlang einer Linie belichtet. Als Anregungsquelle für Fluo-4/AM diente ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Durch diesen fokussierten Laserstrahl kann ein sehr kleiner Bereich des Präparates angeregt werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht passiert in entgegengesetzter Richtung des Laserstrahls eine Lochblende (sog. Pinhole, Engl.). Streustrahlen werden so weitestgehend ausgeblendet und nur noch das exakt auf der Fokusebene liegende Signal wird vom Detektor detektiert. Der Laserstrahl wird während der Abrasterung durch verstellbare Spiegel in x- und y-Richtung ausgelenkt. Durch diese Auslenkung wird ein zweidimensionales Bild erzeugt.

#### 2.4.4 Messprotokoll

Alle Messungen wurden innerhalb 4 Stunden nach der Isolation an vier Untersuchungsgruppen durchgeführt:

1. Wildtyp-Zellen nach der Sham Operation (WT-Sham),
2. Wildtyp-Zellen nach TAC Operation (WT-TAC),
3. RyR2<sup>R4496C+/-</sup>-Zellen nach der Sham Operation (RyR\*-Sham),
4. RyR2<sup>R4496C+/-</sup>-Zellen nach der TAC Operation (RyR\*-TAC).

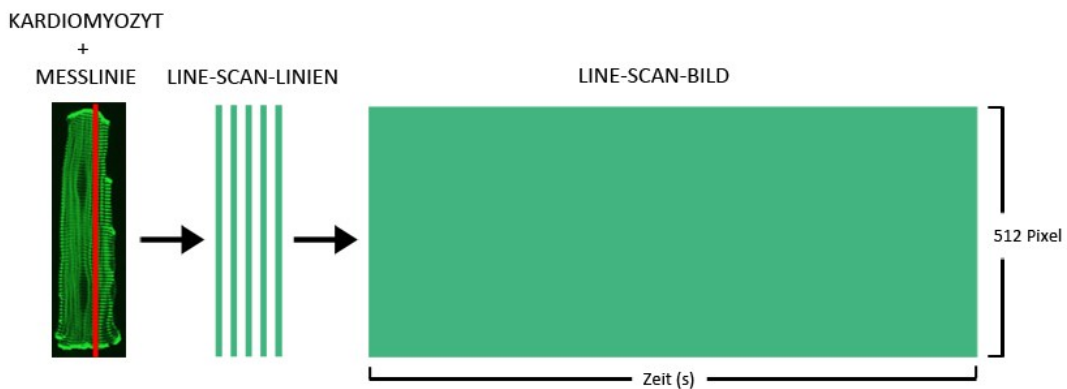
Für die Messungen mit RyR2 Stabilisatoren wurden Zellen mit 300 nmol/L K201 (überlassen von Prof. Dr. Marc A. Vos, University Medical Center Utrecht) oder 1 µmol/L Dantrolen (Sigma-Aldrich®) mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. K201 und Dantrolen wurden zunächst als 10 mmol/L Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Die Endkonzentration des Lösungsmittels DMSO betragen bei den Messungen mit K201 und Dantrolen ≤0,01%.

Zu Beginn der Messdurchführung wurden die mit Fluo-4/AM beladenen und ausplattierten Kardiomyozyten (siehe Kap.2.4.2) in die Messvorrichtung des LSM eingesetzt. Auf die Messschale wurde ein Deckel mit zwei Platinelektroden, einer Absaugvorrichtung und dem Lösungszulauf gelegt. Dem Lösungszulauf war ein Durchflusserwärmer vorgeschaltet der die Lösungen auf 32-35°C erwärmte.

Bei den Messungen der K201- oder Dantrolen-behandelten Zellen wurden der Normal Tyrode (mit 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> bzw. 3 mmol/L CaCl<sub>2</sub>) jeweils entweder 300 nmol/L K201 oder 1 µmol/L Dantrolen hinzugefügt. Hiermit konnte eine gleichbleibende Wirkstoffkonzentration während den Messungen sichergestellt werden. Die primäre Auswahl, der für die Messungen verwendeten Kardiomyozyten, erfolgte anhand einer optischer Selektion, hierbei wurde darauf geachtet, dass die Zellen eine gleichmäßig rechteckige Form und eine klare Querstreifung (Sarkomeren) aufwiesen. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Zellen ohne elektrische Stimulation keine rhythmischen oder arrhythmischen Kontraktionen zeigten.

Kardiomyozyten, die primären Selektionskriterien erfüllten, wurden zunächst anhand eines Überblick-Laserscans betrachtet. Hierbei wurde die gleichmäßige Beladung der Zelle

mit Fluo-4/AM am Rechner überprüft. In diesem Schritt konnte der Fokus auf den zytosolischen Bereich der Zelle neu justiert werden. Zur weiteren Vorbereitung der Messungen wurde mittels der LSM-Software (LSM-Image-Browser, Firma Zeiss®) eine Line-Scan-Linie über die Zelle gelegt. Die Linie wurde dabei parallel der Längsachse des Kardiomyozyten ausgerichtet und um wenige Mikrometer außerhalb der Zellenden verlängert um die Hintergrundfluoreszenz mitzubestimmen. Entlang dieser Linie regte der Laser während der Messung das an  $\text{Ca}^{2+}$  gebundene Fluo-4/AM an und erfasste die Fluoreszenzsignale, die Änderungen der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im zeitlichen Verlauf widerspiegeln. Das zweidimensionale Messbild (Line-Scan-Bild) wurde durch die zeitliche Aneinanderreihung der Einzellinien erzeugt (siehe Abb. 9).



**Abbildung 9: Schema des Line-Scan-Bildes**

Links: Originales konfokalmikroskopisches Bild eines Kardiomyozyten, es zeigt die Lage der Messlinien, mit einer Länge von 512 Pixel. Rechts: Schematische Darstellung eines Line-Scan-Bildes, entstanden durch die Aneinanderreihung der einzelnen Line-Scan-Linien.

Die Messungen an den Kardiomyozyten wurden nach dem zuvor festgelegten Messprotokoll (Abbildung 10) vorgenommen:

|             |  |                         |   |                         |  |                         |
|-------------|--|-------------------------|---|-------------------------|--|-------------------------|
|             | <60 Sek.                                       | 9,81 Sek. (9800 Linien) | <30 Sek.                                    | 9,81 Sek. (9800 Linien) | 10 Sek.                                | 9,81 Sek. (9800 Linien) |
|             | <b>Ca<sup>2+</sup>-Transienten<br/>Messung</b> |                         | <b>Ca<sup>2+</sup>-Sparks<br/>Messung</b>   |                         | <b>Coffein-Transienten<br/>Messung</b> |                         |
| Lösung      | 1M NT  |                         | 0Na <sup>+</sup> /0Ca <sup>2+</sup> -Lösung |                         | 3M NT                                  | 30mM Koffein-Lösung     |
| Stimulation | 1 Hz Pacing                                    |                         | No Pacing                                   |                         | 1 Hz Pacing                            | No Pacing               |

**Abbildung 10: Messprotokoll**

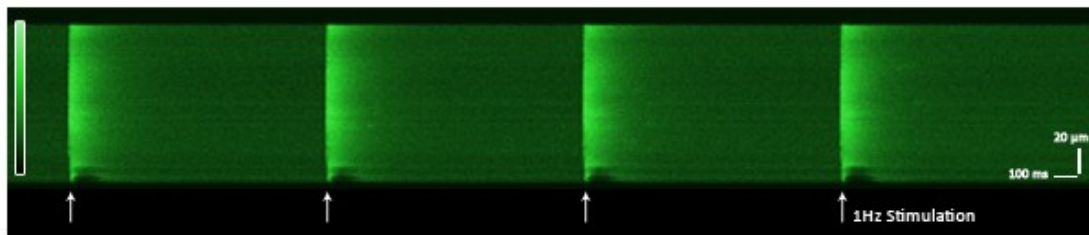
Zu Beginn der Messungen wurden die Kardiomyozyten mit 1M NormalTyrode (siehe Kap.2.6,Tabelle 7) perfundiert und mit 1 Hz elektrisch stimuliert. Nun folgte die nach dem Messprotokoll die Messung der „steady-state“  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Infolge der elektrischen Stimulation kam es intrazellulär zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung zeigte sich in der Aufnahme als Anstieg der Fluoreszenzintensität ( $\text{Ca}^{2+}$  Transient, Abbildung 11A).

Direkt nach der  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten Aufnahme wurde die elektrische Feldstimulation abgestellt und die Perfusion auf die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung ( $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ -Lösung) (siehe Kap.2.6, Tabelle 9) umgestellt um den NCX zu inaktivieren und den  $\text{Ca}^{2+}$  Verlust aus der Zelle zu vermeiden, womit die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration konstant gehalten wurde. Durch das hohe räumliche und zeitliche Auflösungsvermögen des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops können lokale spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungseignisse ( $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks) während der Diastole ermittelt werden. Die zweite Aufnahme wurde direkt nach dem Lösungswechsel auf die  $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ -Lösung gestartet.

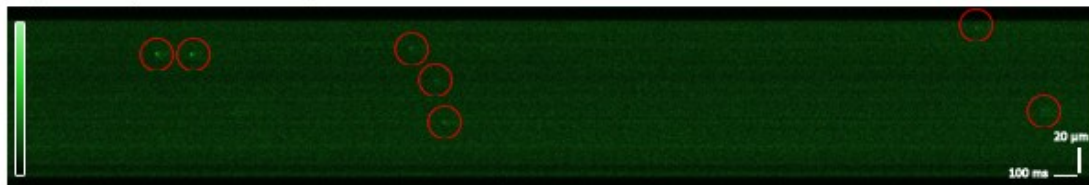
Nach dieser Messung wurde die Zelle für 10 Sekunden mit der 3M Normal Tyrode (siehe Kap.2.6, Tabelle 8) perfundiert und mit 1Hz elektrisch stimuliert. Die dritte Messung wurde gestartet und dabei zügig auf die 30 mmol/L Koffein-haltige 3M Normal Tyrode Lösung (siehe Kap.2.6, Tabelle 10) gewechselt und das Koffein-induzierte Transient wurden registriert. Die zügige Koffein-Perfusion entleerte das SR vollständig von  $\text{Ca}^{2+}$ , indem die RyR2 komplett und im weiteren Verlauf reversibel geöffnet wurden (Bassani JW 1992, Bers 2001). Dieser Koffein-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$  Transient ermöglicht Rückschlüsse über den SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt der Zelle zu ziehen.

$\text{Ca}^{2+}$  Ionen werden durch die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA-2a) zurück in das SR gepumpt, jedoch gelangen die  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen durch die Koffein-induzierte Öffnung des RyR2 wieder im Zytosol. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination aus dem Zytoplasma wird in diesem Zustand daher fast ausschließlich durch den NCX getragen. Der Mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU) und die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase machen unter der Koffeingabe eine vernachlässigen Teil von 0,5% der  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination aus. (Li et al. 1998)

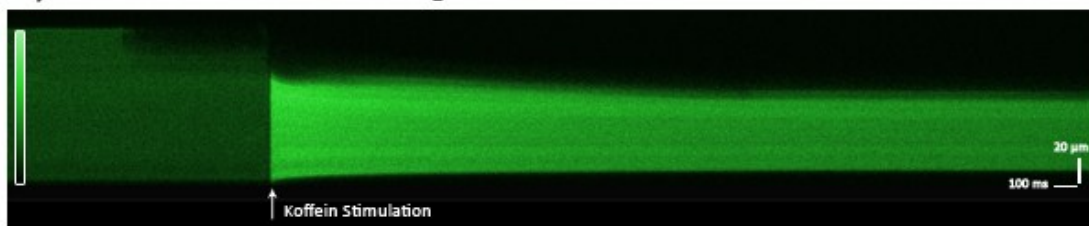
### A) Ca<sup>2+</sup>-Transienten-Messung



### B) Ca<sup>2+</sup>-Spark-Messung



### C) Coffein-Transienten-Messung



## Abbildung 11: Originalaufnahmen der Ca<sup>2+</sup>-Transienten, Ca<sup>2+</sup>-Sparks und Koffein Transienten

(A) Line-Scan Bild mit Ca<sup>2+</sup>-Transienten infolge elektrisch stimulierter Ca<sup>2+</sup>-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung (1Hz), weiße Pfeile zeigen Zeitpunkt der Stimulation. (B) Ca<sup>2+</sup>-Spark-Messung in der Diastole (ohne Stimulation), Ca<sup>2+</sup> Sparks rot eingekreist (C) Koffein-induzierter Ca<sup>2+</sup> Transient wurde mittels einer schnellen Koffein-Perfusion ausgelöst, weißer Pfeil zeigt Zeitpunkt der Koffein Stimulation an.

## 2.5 Datenauswertung

Die Auswertung der Line-Scan Bilder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, der Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Messungen erfolgte zunächst visuell, mit Hilfe eines von der Arbeitsgruppe selbst programmierten Software, in der Programmiersprache IDL® (Exelis Inc., USA).

Die Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und des Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten erfolgte mit Excel. Für die Bestimmung der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und des Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wurden die Transienten zunächst normalisiert. Hierbei wurde das Maximum der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Fluoreszenzintensität nach elektrischer bzw. Koffein-induzierter Stimulation (F) durch das Minimum vor der jeweiligen Stimulation ( $F_0$ ) dividiert. Hierdurch konnten die eigentliche Menge der Fluoreszenzintensität, das die relative  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration darstellt, pro Stimulation/Kontraktion ermittelt werden.

Nun folgte die Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Messungen. Es wurde zunächst die Breite der Zelle bestimmt, indem die Hintergrundmessung von der Scanbreite abgezogen wurde. Anhand der im Bereich der Zelle liegenden Messbreite wurde das Line-Scan Bild optisch nach der Anzahl aufgetretenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks analysiert. Die ausgewerteten Datensätze wurden exportiert und für die weitere Analyse in Excel importiert. Mit Hilfe von Excel wurden die diastolischen Line-Scan Aufnahmen zusätzlich Software-unterstützt ausgewertet. Hierbei wurde zunächst die Anzahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks der einzelnen Zellen ermittelt und anhand der Zeiten des TTP, der „Full Duration Half Maximum“ (FDHM) und „Full Width Half Maximum“ (FWHM) ausgewählt. Die folgenden Kriterien wurden angewandt: TTP 5-15 ms, FDHM 10-30 ms, FWHM 1-4 ms. (Bers 2002b; Fernández-Velasco et al. 2009) Die  $\text{Ca}^{2+}$  Sparkfrequenz wurde durch die Anzahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks in einem Voxelvolumen 1 pL und in einer Dauer von 1 s berechnet ( $\text{pL}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Um eine Vergleichbarkeit der Sparkfrequenzen der Einzelzellen zu erlangen wurde die  $\text{Ca}^{2+}$  Sparkfrequenz auf den SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt normalisiert. Dabei wurde die  $\text{Ca}^{2+}$  Sparkfrequenz durch den SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt der jeweiligen Zelle dividiert.

## 2.6 Lösungen und Chemikalien

Folgende Lösungen wurden für die Isolation der Maus-Kardiomyozyten und der Konfokal-mikroskopischen Messungen verwendet:

Tabelle 1: Kannülierungslösung (CS)

| Substanz                    | Zusammensetzung             | Konzentration |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------|
| Perfusionslösung (PS)       | 150 ml (pH = 7,46 bei 37°C) |               |
| CaCl <sub>2</sub> (1 mol/L) | 150 µL                      | 1 mmol/L      |

Tabelle 2: Perfusionslösung (PS)

| Substanz   | Firma          | Art. Nr. | Molekulargewicht (g/mol) | Konzentration (mmol/L) |
|--|----------------|----------|--------------------------|------------------------|
| NaCl   | Sigma-Aldrich® | S9625    | 58,4                     | 135                    |
| KCl  |                | P4504    | 74,6                     | 4,7                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      |                | P5379    | 136,1                    | 0,6                    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O |                | S0876    | 268,7                    | 0,6                    |
| MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O                |                | M9397    | 246,5                    | 1,2                    |
| HEPES  |                | H4034    | 238,3                    | 10                     |
| Taurin   |                | T0625    | 125,1                    | 30                     |
| 2,3-Butanedione monoxime (BDM)                       |                | B0753    | 101,1                    | 10                     |
| Glukose  |                | G7528    | 180,2                    | 10                     |

Tabelle 3: Enzymlösung (DIG)

| Substanz                     | Firma                      | Art. Nr.  | Konzentration |
|------------------------------|----------------------------|-----------|---------------|
| <b>Perfusionslösung (PS)</b> | 25 ml (pH = 7,46 bei 37°C) |           |               |
| <b>Liberase TM</b>           | Roche®                     |           | 0,075 mg/ml   |
| <b>Trypsin 10x</b>           | GIBCO®                     | 15090-046 | 0,056 mg/ml   |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>      | Fluka®                     | 21115     | 12,5 µmol/L   |

Tabelle 4: Stopplösung-1 (MS1)

| Substanz                       | Firma                        | Art. Nr. | Konzentration    |
|--------------------------------|------------------------------|----------|------------------|
| <b>Perfusionslösung (PS)</b>   | 2.25 ml (pH = 7,46 bei 37°C) |          |                  |
| <b>Bovine Calf Serum (BCS)</b> | Sigma-Aldrich®               | B8056    | 0,25 mg/ml (10%) |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>        | Fluka®                       | 21115    | 12,5 µmol/L      |

Tabelle 5: Stopplösung-2 (MS2)

| Substanz                       | Firma                      | Art. Nr. | Konzentration |
|--------------------------------|----------------------------|----------|---------------|
| <b>Perfusionslösung (PS)</b>   | 19 ml (pH = 7,46 bei 37°C) |          |               |
| <b>Bovine Calf Serum (BCS)</b> | Sigma-Aldrich®             | B8056    | 5%            |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>        | Fluka®                     | 21115    | 12,5 µmol/L   |

Tabelle 6: Ca<sup>2+</sup> Aufbau Lösungen

| Lösung                             | Zusammensetzung                               | Konzentration (mmol/L) |
|------------------------------------|---|------------------------|
| <b>Ca<sup>2+</sup> Schritt I</b>   | 8 ml MS2 + 10 µL 0,1 mmol/L CaCl <sub>2</sub> | 0,125                  |
| <b>Ca<sup>2+</sup> Schritt II</b>  | 4 ml MS2 + 10 µL 0,1 mmol/L CaCl <sub>2</sub> | 0,25                   |
| <b>Ca<sup>2+</sup> Schritt III</b> | 8 ml MS2 + 40 µL 0,1 mmol/L CaCl <sub>2</sub> | 0,5                    |

Tabelle 7: 1M Normal Tyrode

| Substanz                              | Firma              | Art. Nr. | Molekulargewicht (g/mol) | Konzentration (mmol/L) |
|---------------------------------------|--------------------|----------|--------------------------|------------------------|
| NaCl                                  | Sigma-<br>Aldrich® | S9625    | 58,4                     | 135                    |
| KCl                                   |                    | P4504    | 74,6                     | 4,7                    |
| CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O |                    | C3306    | 147,02                   | 1                      |
| MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O |                    | M9272    | 203,3                    | 1                      |
| HEPES                                 |                    | H4034    | 238,3                    | 10                     |
| Glukose                               |                    | G7528    | 180,2                    | 10                     |

Tabelle 8: 3M Normal Tyrode

| Substanz                              | Firma              | Art. Nr. | Molekulargewicht (g/mol) | Konzentration (mmol/L) |
|---------------------------------------|--------------------|----------|--------------------------|------------------------|
| KCl                                   | Sigma-<br>Aldrich® | P4504    | 74,6                     | 4,7                    |
| CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O |                    | C3306    | 147,02                   | 3                      |
| MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O |                    | M9272    | 203,3                    | 1                      |
| HEPES                                 |                    | H4034    | 238,3                    | 10                     |
| Glukose                               |                    | G7528    | 180,2                    | 10                     |

Tabelle 9: 0Na<sup>+</sup>/0Ca<sup>2+</sup>-Lösung

| Substanz                              | Firma              | Art. Nr. | Molekulargewicht (g/mol) | Konzentration (mmol/L) |
|---------------------------------------|--------------------|----------|--------------------------|------------------------|
| LiCl                                  | Sigma-<br>Aldrich® | L9650    | 42,39                    | 91                     |
| LiOH                                  |                    | 545856   | 23,95                    | 33                     |
| KCl                                   |                    | P4504    | 74,56                    | 4                      |
| EGTA                                  |                    | E3889    | 380,4                    | 10                     |
| MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O |                    | M9272    | 203,3                    | 1                      |
| HEPES                                 |                    | H4034    | 238,31                   | 10                     |
| Glukose                               |                    | G7528    | 180,2                    | 10                     |

Tabelle 10: **Koffein-Lösung**

| Substanz                | Firma                     | Art. Nr. | Molekulargewicht<br>(g/mol) | Konzentration |
|-------------------------|---------------------------|----------|-----------------------------|---------------|
| <b>3M Normal Tyrode</b> | 30 ml, pH = 7,46 bei 37°C |          |                             |               |
| <b>Koffein</b>          | Sigma-Aldrich®            | C8960    | 194,19                      | 30 mmol/L     |

Tabelle 11: **K201 (JTV-519)**

| Substanz   | Firma  | Art. Nr. | Molekulargewicht<br>(g/mol) | Konzentration |
|--|--|----------|-----------------------------|---------------|
| <b>K201 (JTV-519)</b><br>(C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S*HCl) | Überlassen von Prof. Dr.<br>Marc A. Vos (University<br>Medical Center Utrecht) |          | 461,07                      | 0,3 µmol/L    |
| <b>DMSO</b>  | Sigma-Aldrich®   | D8418    | 78,13                       | 0,01%         |

Tabelle 12: **Dantrolen**

| Substanz  | Firma          | Art. Nr. | Molekulargewicht<br>(g/mol) | Konzentration |
|---|----------------|----------|-----------------------------|---------------|
| <b>Dantrolen</b><br>(C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> *CH <sub>3</sub> OH) | Sigma-Aldrich® | D9175    | 336,23                      | 1 µmol/L      |
| <b>DMSO</b>   | Sigma-Aldrich® | D8418    | 78,13                       | 0,003%        |

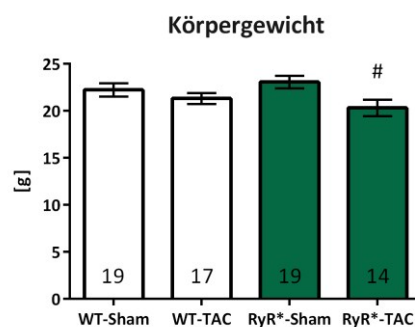
## 2.7 Statistik

Die erhobenen Daten sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. Die Wirkungen von unterschiedlichen Behandlungen innerhalb und zwischen den Gruppen wurden mittels *t*-Test oder Mann-Whitney U-test bzw. mit der Zweiweg-Varianzanalyse (ANOVA, Holm-Sidak Post-hoc-Test) statistisch überprüft. Hierfür wurde das Programm GraphPad PRISM® (GraphPad Software, Inc., USA) für die statistische Analyse, sowie die Erstellung der Graphiken verwendet. Ein *P*-Wert von *P*<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Morphometrische Analyse

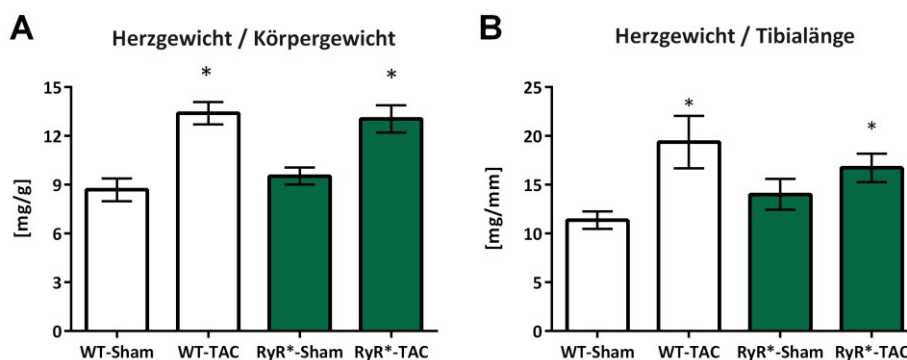
WT und RyR\* Mäuse hatten 1 Woche nach dem Sham-Eingriff ein ähnliches Körpergewicht (Abbildung 12). Im Vergleich zu den WT Mäusen (TAC versus Sham:  $-0,92 \pm 0,7g$ ), hatten RyR2\* Mäuse allerdings eine Woche nach Aortenkonstriktion signifikant reduziertes Körpergewicht (TAC versus Sham:  $-2,76 \pm 0,4g$ ,  $P < 0.05$ , Abbildung 12).



**Abbildung 12: Maus Körpergewicht**

Zahlen in den Säulen stellen die Anzahl der Mäuse dar. # $P < 0.05$  gegenüber RyR\*-Sham Gruppe.

WT und RyR\* Herzen wiesen 1 Woche nach dem Sham-Eingriff keine signifikante Unterschiede im relativen Herzgewicht auf. Chronisch erhöhte Druckbelastung durch TAC führte in den WT Mäusen als auch in den RyR2\* Mäusen zu einer signifikanten Zunahme des Herzgewicht/Körpergewicht- und Herzgewicht/Tibialängen-Verhältnisses ( $P < 0.05$ , Abb. 13A-B).



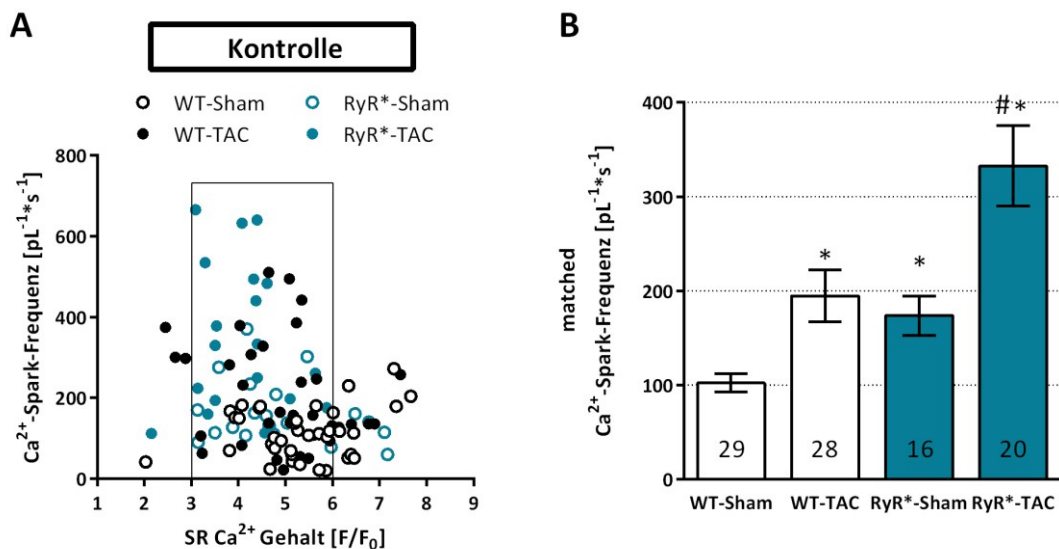
**Abbildung 13: Relatives Herzgewicht**

A) Das Herzgewicht wurde auf das Körpergewicht bzw. auf B) die linke Tibialänge normalisiert.

\* $P < 0.05$  gegenüber entsprechender Sham Gruppe.

### 3.2 Diastolische SR Ca<sup>2+</sup> Freisetzung (Ca<sup>2+</sup>-Sparks) unter Kontrollbedingungen

Die RyR\*-Sham Kardiomyozyten wiesen eine signifikant erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz im Vergleich zu den WT-Sham Zellen auf (173,6±20,9 pL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> versus 102,2±9,7 pL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, *P*<0.05, Abb. 14). Infolge der zusätzlichen druckinduzierten Hypertrophie mittels Aortenkonstriktion kam es in den WT-TAC Mäusen zu einer signifikante Zunahme der Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz (194,6±27 pL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, *P*<0.05 versus WT-Sham). Ebenso stieg signifikant die Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz bei den RyR\* Mäusen infolge der TAC-Operation auf 332,7±42,9 pL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (*P*<0.05 versus RyR\*-Sham). Dieser Anstieg war allerdings signifikant im Vergleich zu der Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz Zunahme in den WT-TAC Zellen (*P*<0.05 versus WT-TAC, Abb.14).

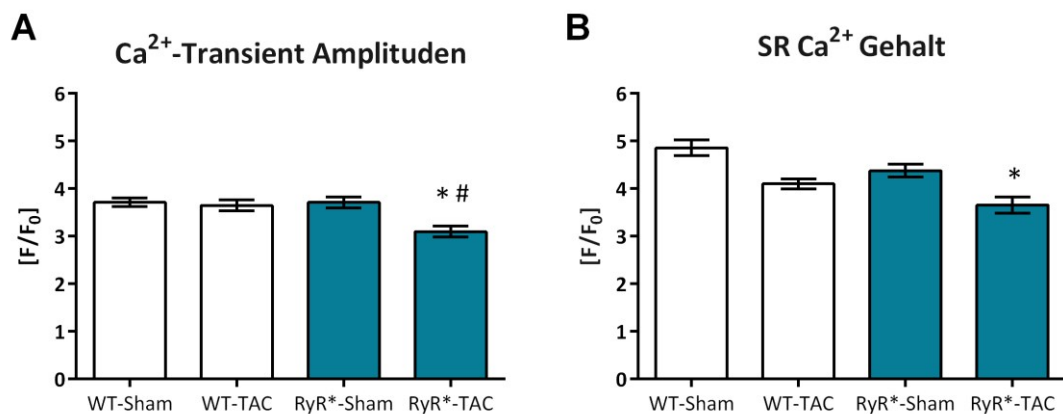


**Abbildung 14: Ca<sup>2+</sup> Spark Frequenz unter Kontrollbedingungen (ohne pharmakologische Behandlung)**

A) Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz als Funktion des SR Ca<sup>2+</sup> Gehaltes, jedes Kreissymbol repräsentiert Messergebnisse aus einer Zelle. B) Analyse der Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz bei angeglichenem SR Ca<sup>2+</sup> Gehalt (3<F/F<sub>0</sub><6; Kästchen in der Abb. A) zeigt signifikant erhöhtes SR Ca<sup>2+</sup> Leck bei den RyR\*-TAC Kardiomyozyten. Zahlen in den Säulen stellen die Zellzahl dar. \**P*<0.05 gegenüber entsprechenden Sham, #*P*<0.05 gegenüber WT-TAC.

### 3.3 $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden und SR $Ca^{2+}$ Gehalt unter Kontrollbedingungen

Um die Effekte der erhöhten  $Ca^{2+}$ -Spark-Frequenz auf intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Homöostase zu untersuchen, wurden  $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden und SR  $Ca^{2+}$  Gehalt quantifiziert. WT- und RyR\*-Sham Kardiomyozyten zeigten keine signifikante Unterschiede in der Amplituden der  $Ca^{2+}$ -Transienten (Abb. 15A). Die Koffein-induzierte  $Ca^{2+}$ -Transient Amplitude der RyR\*-Sham Mäuse war im Vergleich der WT-Sham Mäuse geringer, zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied (Abb. 15B). Eine Woche nach TAC hatten die WT Zellen normale  $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden und der SR  $Ca^{2+}$  Gehalt war im Vergleich zu dem der WT-Sham Zellen tendenziell geringer (Abb. 15A-B). Im Gegensatz zu den WT-TAC Zellen nahmen die  $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden, sowie die Koffein-induzierte  $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden der RyR\*-TAC Kardiomyozyten signifikant ab ( $P < 0.05$ , Abb. 15A-B).

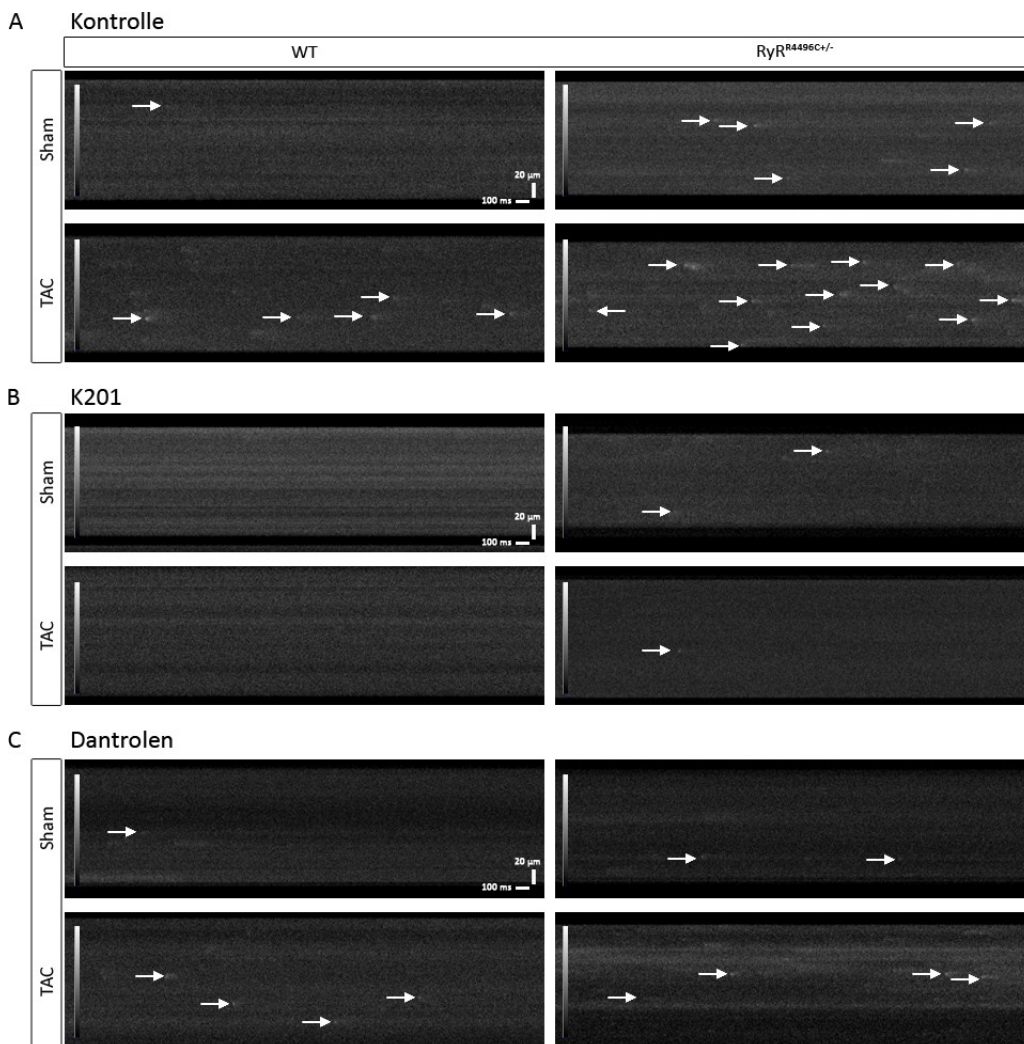


**Abbildung 15: Gemittelte  $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden und SR  $Ca^{2+}$  Gehalt unter Kontrollbedingungen**

A) Reduktion der  $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden in den RyR\*-TAC Kardiomyozyten. B) Verringerter SR  $Ca^{2+}$  Gehalt (Koffein-induzierte  $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden) in den RyR\*-Sham (tendenziell) und RyR\*-TAC Zellen (signifikant). \*  $P < 0.05$  gegenüber WT-TAC, #  $P < 0.05$  gegenüber RyR\*-Sham.

### 3.4 $Ca^{2+}$ Spark-Frequenz nach der Behandlung mit K201 und Dantrolen

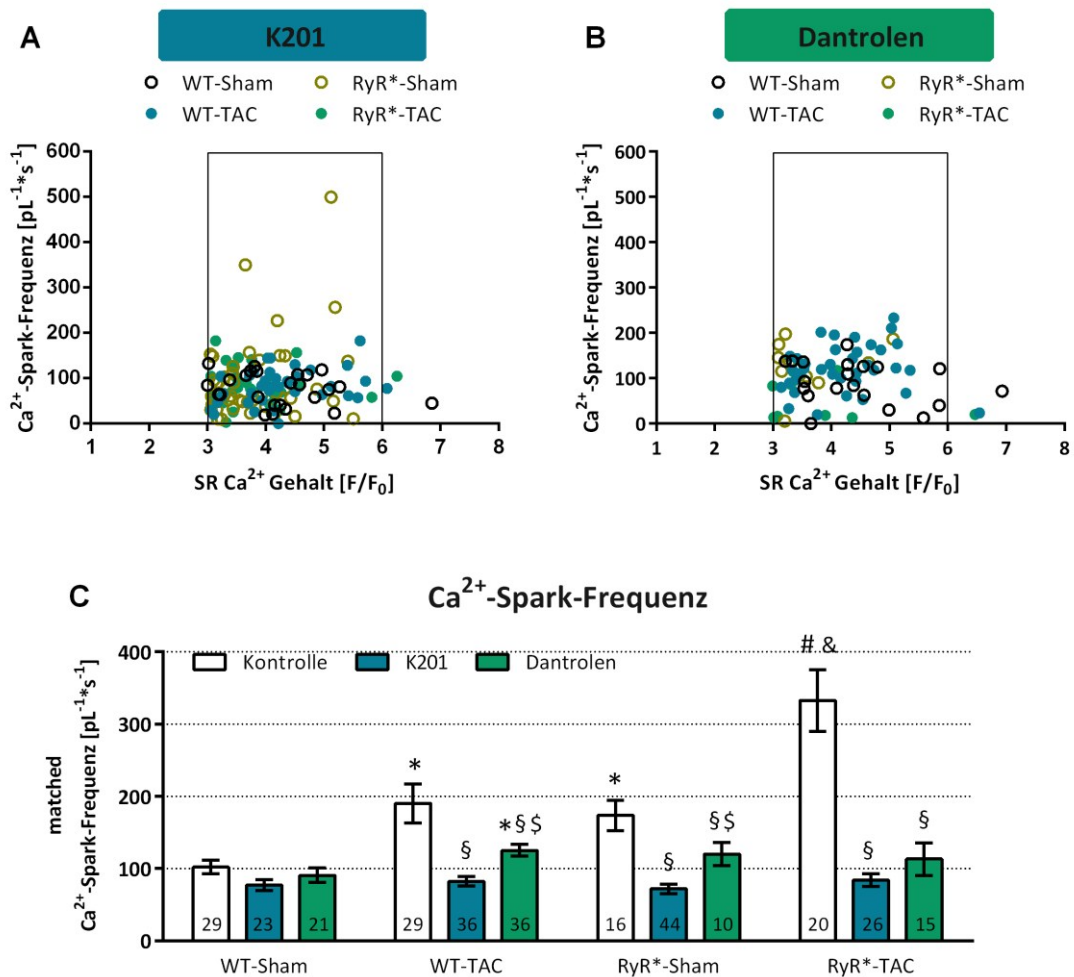
Effekt der RyR2-Stabilisatoren K201 und Dantrolen auf die Senkung der  $Ca^{2+}$ -Spark-Frequenz und damit eine Reduktion des SR  $Ca^{2+}$  Lecks wurden mindestens eine Stunde nach der Vorinkubation mit 300 nmol/L K201 oder 1  $\mu$ mol/L Dantrolen mittels Konfokalmikroskop in den nicht stimulierten Kardiomyozyten gemessen. Das Wirksamkeitspotenzial der beiden RyR2-Stabilisatoren auf die diastolische (spontane) SR  $Ca^{2+}$  Freisetzung zeigte sich bereits in den Originalaufnahmen (Line-Scan Bilder) der Messgruppen (Abb. 16).



**Abbildung 16: Originalaufnahmen der diastolischen (spontanen)  $Ca^{2+}$  Sparks**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Line-Scan Bilder der diastolischen  $Ca^{2+}$  Spark Messungen: A) nur DMSO ohne pharmakologische Behandlung mit K201 oder Dantrolen (Kontrollbedingungen), B) nach Behandlung mit K201, und C) nach Behandlung mit Dantrolen in allen 4 Gruppen. Am stärksten sank die Anzahl der  $Ca^{2+}$  Sparks nach der Behandlung mit K201 oder Dantrolen in den RyR\*-TAC Zellen. Die Pfeile weisen auf die  $Ca^{2+}$  Sparks hin.

Die Behandlung der RyR\*-Sham Zellen mit K201 führte zu einer signifikanten Reduzierung der Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ( $P < 0.05$ , Abb. 14A, 17A und C). Die Frequenz der SR Ca<sup>2+</sup> Freisetzungseignisse senkte sich ebenfalls signifikant nach der K201 Behandlung der RyR\*-TAC Zellen von  $332,7 \pm 42,9 \text{ pL}^{-1}\text{s}^{-1}$  auf  $83,87 \pm 8,62 \text{ pL}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $P < 0.05$ , Abb. 14A, 17A und C). K201 verminderte das SR Ca<sup>2+</sup> Leck in der WT-TAC Gruppe um mehr als 50% ( $P < 0.05$ , Abb. 17C).



**Abbildung 17: Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz nach der Behandlung mit K201 und Dantrolen**

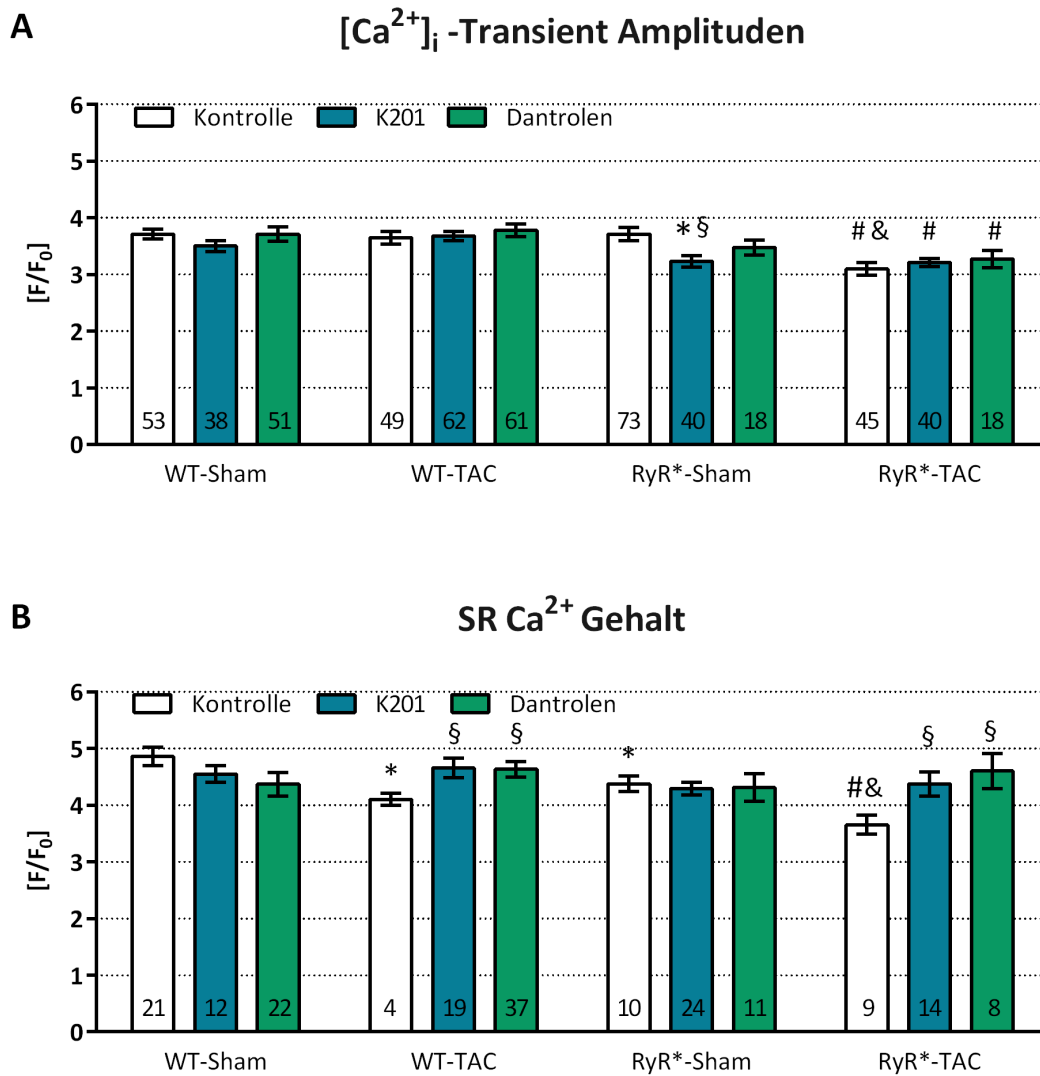
Grafik zeigt Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz als Funktion des SR Ca<sup>2+</sup> Gehaltes nach der Behandlung mit (A) K201 und (B) Dantrolen. Jedes Kreissymbol stellt Messergebnisse aus einer Zelle dar. Ca<sup>2+</sup>-Spark-Frequenz ist signifikant gesunken in den RyR\*-TAC Zellen nach der Behandlung mit K201 und Dantrolen. Ebenso haben K201 und Dantrolen die Frequenz der SR Ca<sup>2+</sup> Freisetzungseignisse in den WT-TAC und RyR\*-Sham Zellen signifikant reduziert. \* $P < 0.05$  gegenüber WT-Sham unter Kontrollbedingungen (DMSO), # $P < 0.05$  gegenüber WT-TAC unter Kontrollbedingungen (DMSO), & $P < 0.05$  gegenüber RyR\*-Sham unter Kontrollbedingungen (DMSO), § $P < 0.05$  gegenüber der Kontrollgruppe mit DMSO (weiße Balken), § $P < 0.05$  gegenüber der K201-behandelten Gruppe (blaue Balken).

Die Messungen der Dantrolen-behandelten Zellen lieferten ähnliche Ergebnisse wie nach der Behandlung mit K201. In beiden TAC-Gruppen wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz signifikant reduziert: in den RyR\*-TAC Zellen sank die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz signifikant nach der Behandlung mit Dantrolen von  $332,7 \pm 42,9 \text{ pL}^{-1}\text{s}^{-1}$  auf  $113,20 \pm 22,49 \text{ pL}^{-1}\text{s}^{-1}$  im Vergleich zu den unbehandelten RyR\*-TAC Zellen ( $P < 0.05$ ; Abb. 17C). Dantrolengabe konnte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz der WT-TAC Zellen und RyR\*-Sham ebenso signifikant senken ( $P < 0.05$ ; Abb. 17C). K201 hat im Vergleich zu Dantrolen-behandelten WT-TAC und RyR\*-Sham Zellen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz effektiver gesunken (Abb. 17C). Sowohl K201 als auch Dantrolen hatten keine signifikante Wirkung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz in den WT-Sham Kardiomyozyten (Abb. 17C).

### ***3.5 $\text{Ca}^{2+}$ -Transient Amplituden und SR $\text{Ca}^{2+}$ Gehalt nach der Behandlung mit K201 und Dantrolen***

Eine Woche nach der TAC-Operation hatten WT Zellen nach der K201 und Dantrolen Behandlung normale  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und einen ansteigenden SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt im Vergleich mit den Kontrollbedingungen (Abb. 18A-B). Die Stabilisierung des mutierten RyR2 mit K201 und Dantrolen nach TAC hat die  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten nicht verändert. Der SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt der RyR\*-TAC Zellen allerdings ist dabei gestiegen im Vergleich mit Kontrollbedingungen (Abb. 18B).

K201 und Dantrolen hatten keinen signifikanten Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient Amplituden und Koffein-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient Amplituden in den WT-Sham Kardiomyozyten (Abb. 18A-B). Das reduzierte SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck in den RyR\*-Sham Zellen nach der Behandlung mit K201 und Dantrolen hatte keinen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient Amplituden (Abb. 18A).



**Abbildung 18:  $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden und SR  $Ca^{2+}$  Gehalt**

A)  $Ca^{2+}$ -Transient Amplituden und B) SR  $Ca^{2+}$  Gehalt, N = 10-73 Zellen pro behandelter Gruppe wurden 1 Woche nach Sham/TAC untersucht. Testsubstanzen K201 und Dantrolene jeweils gelöst in DMSO. \* $P < 0.05$  gegenüber WT-Sham unter Kontrollbedingungen (nur DMSO), # $P < 0.05$  gegenüber WT-TAC unter Kontrollbedingungen (nur DMSO), & $P < 0.05$  gegenüber RyR\*-Sham unter Kontrollbedingungen (nur DMSO), § $P < 0.05$  gegenüber der Kontrollgruppe mit DMSO (weiße Balken), § $P < 0.05$  gegenüber der K201-behandelten Gruppe (blaue Balken).

## 4 Diskussion

### **4.1 Pharmakologische Stabilisierung des RyR2 mittels K201 und Dantrolen**

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass K201 und Dantrolen die diastolische (spontane) SR  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung in Herzmuskelzellen mit einer  $\text{RyR2}^{\text{R4496C+/-}}$  Mutation bei Druckbelastung reduzieren. Beide RyR2 Stabilisatoren verringerten die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 und damit das SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck in der  $\text{RyR2}^{\text{R4496C+/-}}$  Sham und den beiden TAC-Gruppen auf beinahe normale Werte. Dies zeigte sich in einer Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz, die in beiden TAC-Gruppen (WT und  $\text{RyR2}^{\text{R4496C+/-}}$ ) den SR  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt erhöhte. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass K201 den mutierten  $\text{RyR2}^{\text{R4496C+/-}}$  stabilisiert (Sedej et al. 2010). In dieser Arbeit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass K201 die angeborene  $\text{RyR2}^{\text{R4496C+/-}}$  Fehlregulation auch unter erhöhten Drucklast (die erworbene RyR2 Dysfunktion hervorruft) normalisiert. Interessanterweise wurde das SR  $\text{Ca}^{2+}$  Leck durch K201 stärker verringert als durch Dantrolen. Dieser Unterschied in der RyR2 Stabilisierung unterliegt den unterschiedlichen Bindungsstellen der beiden Stabilisatoren im Bezug auf die Bindungsstellen zwischen Domänen des RyR2 (Suetomi et al. 2011): Dantrolen bindet an die Region am N-terminalen Ende des RyR2 (Segment zwischen den Aminosäuren 601-620) (Kobayashi et al. 2009), während K201 bindet an die zentral Domäne des RyR2 (Segment zwischen den Aminosäuren 2114-2149). (Yamamoto et al. 2008) Die Behandlung mit K201 und Dantrolen hat die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark-Frequenz, sowie die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase in den WT-Sham Zellen nicht verändert. Dies lässt vermuten, dass beide Substanzen nur gestörte Bindungsstellen zwischen den Domänen des RyR2 zu stabilisieren vermögen.

## **4.2 Einfluss der RyR2 Stabilisierung auf die zelluläre Ca<sup>2+</sup> Homöostase und Genese der Herzinsuffizienz**

Erhöhtes SR Ca<sup>2+</sup> Leck über den RyR2 und reduzierte SR Ca<sup>2+</sup> Aufnahme durch die SERCA-2a führt zur Abnahme des SR Ca<sup>2+</sup> Gehaltes und einer Erhöhung der diastolischen intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration bei der Hypertrophie und der Herzinsuffizienz. (Bers et al. 2003) Die RyR2<sup>R4496C+/-</sup> Herzen sind strukturell normal und zeigen ein erhöhtes SR Ca<sup>2+</sup> Leck unter normalen Bedingungen. (Fernández-Velasco et al. 2009; Sedej et al. 2010) Diese hereditäre RyR2 Dysfunktion führt unter katecholaminergen Stress zu erhöhten diastolischen Ca<sup>2+</sup> Konzentrationen im Zytosol und erleichtert das Auftreten von bidirektionalen Tachykardien und Kammerflimmern. (Cerrone et al. 2005) Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Kombination der erworbenen (druckinduzierten) und der angeborenen RyR2 Dysfunktion zu stärkerer Dysregulation der SR Ca<sup>2+</sup> Freisetzung und intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Homöostase führt im Vergleich zu erworbene oder angeborene RyR2 Dysfunktion alleine. Dies zeigte sich als Zunahme des SR Ca<sup>2+</sup> Lecks begleitend mit reduzierten Ca<sup>2+</sup>-Transient Amplituden und verminderten SR Ca<sup>2+</sup> Gehalt.

Die Stabilisierung des RyR2 hat den Anstieg in den Ca<sup>2+</sup>-Transient Amplituden verhindert. K201 und Dantrolen allerdings verbesserten die Ca<sup>2+</sup> Homöostase indem sich nach der Behandlung der SR Ca<sup>2+</sup> Gehalt erhöhte. Das reduzierte Ca<sup>2+</sup> Leck verhindert den Ca<sup>2+</sup> Verlust aus dem SR und führt zu einer niedrigen intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration während der Diastole. Das verbessert folglich die diastolische Funktion und myokardiale Relaxation. (Toischer et al. 2010) Neben dem positiven Einfluss auf die Kontraktilität könnten K201 und Dantrolen, durch die Stabilisierung der Ca<sup>2+</sup> Homöostase, auch die Progredienz der pathologischen Umbildungsprozesse am Herzen (kardiales Remodelling) positiv beeinflussen. In einem anderen CPVT Mausmodell (RyR2<sup>R176Q+/-</sup>) wurde gezeigt, dass es zwischen dem kardialen Remodelling und der RyR2 Dysfunktion einen kausalen Zusammenhang gibt. (van Oort et al. 2010) Der Anstieg der SR Ca<sup>2+</sup> Freisetzung durch den mutierten RyR2<sup>R176Q+/-</sup> beschleunigte die Entstehung der Hypertrophie durch die Aktivierung des Calcineurin/NFAT Signalweges. Unsere Ergebnisse bestätigten, dass ein subklinisches Ca<sup>2+</sup> Leck aus dem SR ins Zytosol über den RyR2<sup>R4496C+/-</sup> unter Hypertonie (ausgelöst durch transversale aortale Konstriktion, TAC) zu einer Beschleunigung der Progression des Remodellings führt (Sedej et al., 2014). Die in Zusammenhang mit dieser

Arbeit stehenden In-vivo Versuche zeigten, dass eine kontinuierliche Gabe von K201 die Dilatation des linken Ventrikel in RyR2<sup>R4496C+/-</sup> Mäusen mit zusätzlicher Druckbelastung des Herzens verhinderte. (Sedej et al. 2014) Die Überlebensrate der Mäuse sechs Wochen nach TAC wurde ebenso durch die Gabe von K201 deutlich verbessert (am Leben waren 83% von K201-behandelten RyR2<sup>R4496C+/-</sup> Mäuse versus 31% Vehikel-behandelten RyR2<sup>R4496C+/-</sup> Mäuse). (Sedej et al. 2014) Die Versuche mit K201 (und Dantrolen) zeigen als Proof-of-Concept, dass eine gezielte pharmakologische Intervention zur Reduktion des SR Ca<sup>2+</sup> Lecks Morbidität und Mortalität in einem Krankheitsmodell für Herzinsuffizienz verbessern kann.

### **4.3 Klinische Relevanz der Arbeit**

Eine veränderte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Homöostase stellt bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz eine zentrale Rolle dar. (Hasenfuss & Pieske 2002; Meyer et al. 1995; Houser & Margulies 2003) Viele Patienten mit einer Herzinsuffizienz haben eine arterielle Hypertension als zugrundeliegenden Risikofaktor oder Komorbidität. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte diastolische Ca<sup>2+</sup> Freisetzung aus dem SR bei zusätzlicher Druckbelastung des Herzens eine kausale Rolle in der Pathogenese der Druck-induzierten Herzinsuffizienz darstellt. Im Falle einer ungünstigen Kombination von angeborenen und einer erworbenen SR Ca<sup>2+</sup> Freisetzungsstörung über RyR2 könnte es bei manchen Patienten zu einem raschen Fortschreiten des kardialen Remodellings (vermehrte Fibrose, erhöhte Hypertrophie und Dilatation) kommen. Alle derzeitigen Medikamente, die zur Therapie der Herzinsuffizienz verwendet werden behandeln nur die Symptome. Patienten mit Herzinsuffizienz würden von Therapeutika wie K201 und potenziell Dantrolen, die das Remodelling und die Progression der Herzinsuffizienz kausal anhalten können, profitieren. Dennoch finden sich für K201 nur drei eingetragene klinische Studien aus den Jahren 2008 und 2010 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Die Ergebnisse sind bis dato noch nicht veröffentlicht (Stand Dezember 2014, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Für Dantrolen findet sich keine klinische Studie im Zusammenhang mit linksventrikulärer Hypertrophie oder Herzinsuffizienz.

#### **4.4 Limitation**

In Betracht an Ergebnissen aus wenigen klinischen Studien, lässt sich auch mit unserer zellulären Studie nicht klären inwieweit die beiden RyR Stabilisatoren Dantrolen und K201 mit dem RyR1 der Skelettmuskulatur interagieren würden. Diese Interaktion könnte deutliche Nebenwirkungen hervorrufen und den Einsatz der RyR2 Stabilisatoren bei der Therapie der Herzinsuffizienz, der Arrhythmien oder auch hereditären RyR2 Dysfunktionen einschränken.

Mit unserer Studie konnten wir ebenso nicht klären welchen Einfluss die Stabilisierung des RyR2 auf die angrenzenden Signalwege (z. B. Hypertrophie-Signalwege) und welche post-translationale Mechanismen liegen dem SR Ca<sup>2+</sup> Leck zu Grunde (Phosphorylierung des RyR2 über CaMKII und PKA, Oxidierung, Nitrosylierung).

Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter dem Titel „Subclinical abnormalities in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release promote eccentric myocardial remodeling and pump failure death in response to pressure overload. Sedej S, Schmidt A, Denegri M, Walther S, Matovina M, Arnstein G, Gutsch EM, Windhager I, Ljubojević S, Negri S, Heinzl FR, Bisping E, Vos MA, Napolitano C, Priori SG, Kockskämper J, Pieske B. in *Journal of the American College of Cardiology* im Jahr 2014 veröffentlicht (PMID: 24315909).

## 5 Literaturverzeichnis

- Ai, X. et al., 2005. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circulation research*, 97(12), pp.1314–22.
- Baddeley, D. et al., 2009. Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), pp.22275–80.
- Belevych, A.E. et al., 2011. The relationship between arrhythmogenesis and impaired contractility in heart failure: role of altered ryanodine receptor function. *Cardiovascular research*, 90(3), pp.493–502.
- Berk, B.C., Fujiwara, K. & Lehoux, S., 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of clinical investigation*, 117(3), pp.568–75.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), pp.517–29.
- Bers, D.M., 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, pp.380–7.
- Bers, D.M., 2002a. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circulation research*, 90(1), pp.14–7.
- Bers, D.M., 2002b. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), pp.198–205.
- Bers, D.M., 2014. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annual review of physiology*, 76, pp.107–27.
- Bers, D.M., 2004. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 37(2), pp.417–29.
- Bers, D.M., Eisner, D. a & Valdivia, H.H., 2003. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> and heart failure: roles of diastolic leak and Ca<sup>2+</sup> transport. *Circulation research*, 93(6), pp.487–90.
- Beuckelmann, D.J., Näbauer, M. & Erdmann, E., 1992. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation*, 85(3), pp.1046–55.
- Bleumink, G.S. et al., 2004. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *European heart journal*, 25(18), pp.1614–9.
- Burlew, B.S. & Weber, K.T., 2002. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz*, 27(2), pp.92–8.

- Cerrone, M. et al., 2005. Bidirectional ventricular tachycardia and fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodine receptor. *Circulation research*, 96(10), pp.e77–82.
- Cheng, H. et al., 1996. Calcium sparks and  $[Ca^{2+}]_i$  waves in cardiac myocytes. *The American journal of physiology*, 270(1 Pt 1), pp.C148–59.
- Cheng, H., Lederer, W.J. & Cannell, M.B., 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5134), pp.740–4.
- Chien, K.R., 1999. Stress Pathways and Heart Failure Minireview. *Cell*, 98(5), pp.555–558.
- Cohn, J.N., Ferrari, R. & Sharpe, N., 2000. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(3), pp.569–82.
- Curran, J. et al., 2010. Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 49(1), pp.25–32.
- Damy, T. et al., 2004. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet*, 363(9418), pp.1365–7.
- Drazner, M.H., 2011. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation*, 123(3), pp.327–34.
- Du, G.G. et al., 2002. Topology of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), pp.16725–30.
- Fearnley, C.J., Roderick, H.L. & Bootman, M.D., 2011. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(11), p.a004242.
- Fernández-Velasco, M. et al., 2009. Increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation research*, 104(2), pp.201–9, 12p following 209.
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. & Ramesh, V., 1999. Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophysical journal*, 77(3), pp.1528–39.
- Frohlich, E.D., 2001. Fibrosis and ischemia: the real risks in hypertensive heart disease. *American journal of hypertension*, 14(6 Pt 2), p.194S–199S.
- Ganau, A. et al., 1992. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 19(7), pp.1550–8.

- Giannini, G. et al., 1995. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *The Journal of cell biology*, 128(5), pp.893–904.
- Hasenfuss, G. et al., 1994. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation research*, 75(3), pp.434–42.
- Hasenfuss, G. et al., 1999. Relationship between Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*, 99(5), pp.641–8.
- Hasenfuss, G. & Pieske, B., 2002. Calcium cycling in congestive heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(8), pp.951–69.
- Hayashi, T. et al., 2009. Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca<sup>2+</sup> signaling in the heart. *Journal of cell science*, 122(Pt 7), pp.1005–13.
- Houser, S.R. & Margulies, K.B., 2003. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circulation research*, 92(4), pp.350–8.
- Hu, P. et al., 2003. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(3), pp.H1261–9.
- Hunt, D., Jones, P. & Wang, R., 2007. K201 (JTV519) suppresses spontaneous Ca<sup>2+</sup> release and ryanodine binding to RyR2 irrespective of FKBP12.6 association. *The Biochemical ...*, 404(3), pp.431–438.
- Ikemoto, N. & Yamamoto, T., 2002. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, pp.d671–83.
- Inoue, M. & Bridge, J.H.B., 2005. Variability in couplon size in rabbit ventricular myocytes. *Biophysical journal*, 89(5), pp.3102–10.
- Janse, M.J., 2004. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovascular research*, 61(2), pp.208–17.
- Jiang, D. et al., 2005. Enhanced store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release and channel sensitivity to luminal Ca<sup>2+</sup> activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circulation research*, 97(11), pp.1173–81.
- Jiang, D. et al., 2004. RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release (SOICR). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), pp.13062–7.
- Kaneko, N., 1994. New 1,4-benzothiazepine derivative, K201, demonstrates cardioprotective effects against sudden cardiac cell death and intracellular calcium blocking action. *Drug Development Research*, 33(4), pp.429–438.

- Kaneko, N. & Matsuda, R., 2009. Pharmacological characteristics and clinical applications of K201. *Current clinical ...*, 4(2), pp.126–131.
- Kimura, J. et al., 1999. Effects of a novel cardioprotective drug, JTV-519, on membrane currents of guinea pig ventricular myocytes. *Japanese journal of pharmacology*, 79(3), pp.275–81.
- Knollmann, B.C. & Roden, D.M., 2008. A genetic framework for improving arrhythmia therapy. *Nature*, 451(7181), pp.929–36.
- Kobayashi, S. et al., 2010. Dantrolene, a Therapeutic Agent for Malignant Hyperthermia, Inhibits Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in a RyR2R2474S/+ Knock-In Mouse Model. *Circulation Journal*, 74(12), pp.2579–2584.
- Kobayashi, S. et al., 2009. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(21), pp.1993–2005.
- Kubo, H. et al., 2001. Patients with end-stage congestive heart failure treated with beta-adrenergic receptor antagonists have improved ventricular myocyte calcium regulatory protein abundance. *Circulation*, 104(9), pp.1012–8.
- Lahat, H. et al., 2001. A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *American journal of human genetics*, 69(6), pp.1378–84.
- Lederer, J.W. et al., 2004. Ca<sup>2+</sup> sparks in heart muscle. *Journal of muscle research and cell motility*, 25(8), pp.602–3.
- Leenhardt, A. et al., 1995. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation*, pp.1512–1519.
- Lehnart, S.E. et al., 2005. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*, 123(1), pp.25–35.
- Levy, D. et al., 1996. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 275(20), pp.1557–62.
- Li, L. et al., 1998. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *The American journal of physiology*, 274(4 Pt 2), pp.H1335–47.
- Liao, R., Podesser, B.K. & Lim, C.C., 2012. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 303(2), pp.H156–67.
- Liu, N. et al., 2006. Arrhythmogenesis in Catecholaminergic Polymorphic. *Circulation research*, 99(3), pp.292–298.

- Lloyd-Jones, D.M. et al., 2002. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 106(24), pp.3068–72.
- London, B. & Krueger, J.W., 1986. Contraction in voltage-clamped, internally perfused single heart cells. *The Journal of general physiology*, 88(4), pp.475–505.
- López-López, J.R. et al., 1994. Local, stochastic release of Ca<sup>2+</sup> in voltage-clamped rat heart cells: visualization with confocal microscopy. *The Journal of physiology*, 480 ( Pt 1, pp.21–9.
- Lou, Q., Janardhan, A. & Efimov, I.R., 2012. Remodeling of calcium handling in human heart failure. *Advances in experimental medicine and biology*, 740, pp.1145–74.
- Loughrey, C.M. et al., 2007. K201 modulates excitation-contraction coupling and spontaneous Ca<sup>2+</sup> release in normal adult rabbit ventricular cardiomyocytes. *Cardiovascular research*, 76(2), pp.236–46.
- Maier, L.S. et al., 2003. Transgenic CaMKII $\delta$  overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circulation research*, 92(8), pp.904–11.
- Marks, A.R., 2013. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *The Journal of clinical investigation*, 123(1), pp.46–52.
- Marks, A.R., Marx, S.O. & Reiken, S., 2002. Regulation of ryanodine receptors via macromolecular complexes: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *Trends in cardiovascular medicine*, 12(4), pp.166–70.
- Marx, S.O. et al., 2001. Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circulation research*, 88(11), pp.1151–8.
- Marx, S.O. et al., 2000. PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *Cell*, 101(4), pp.365–376.
- Maxwell, J.T., Domeier, T.L. & Blatter, L. a, 2012. Dantrolene prevents arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> release in heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 302(4), pp.H953–63.
- McLenachan, J.M. & Dargie, H.J., 1990. Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy. Relationship to coronary artery disease, left ventricular dysfunction, and myocardial fibrosis. *American journal of hypertension*, 3(10), pp.735–40.
- McMurray, J.J. V & Pfeffer, M.A., 2005. Heart failure. *Lancet*, 365(9474), pp.1877–89.
- Meyer, M. et al., 1995. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 92(4), pp.778–84.
- Mochizuki, M. et al., 2007. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca<sup>2+</sup> leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(16), pp.1722–32.

- Mosterd, A. et al., 1999. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *European heart journal*, 20(6), pp.447–55.
- Nakai, J. et al., 1990. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS letters*, 271(1-2), pp.169–77.
- Oda, T. et al., 2005. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation*, 111(25), pp.3400–10.
- Van Oort, R.J. et al., 2010. Accelerated development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy and dysfunction in an RyR2-R176Q knockin mouse model. *Hypertension*, 55(4), pp.932–8.
- Otsu, K. et al., 1990. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 265(23), pp.13472–83.
- Packer, M., 1985. Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation*, 72(4), pp.681–5.
- Pieske, B. et al., 1999. Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circulation research*, 85(1), pp.38–46.
- Pogwizd, S.M. & Bers, D.M., 2004. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends in cardiovascular medicine*, 14(2), pp.61–6.
- Priori, S.G. et al., 2001. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 103(2), pp.196–200.
- Reiken, S., Lacampagne, A., et al., 2003. PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *The Journal of cell biology*, 278(6), pp.919–28.
- Reiken, S., Gaburjakova, M., et al., 2003. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *The Journal of biological chemistry*, 278(1), pp.444–53.
- Sacherer, M. et al., 2012. JTV519 (K201) reduces sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak and improves diastolic function in vitro in murine and human non-failing myocardium. *British journal of pharmacology*, 167(3), pp.493–504.
- Sedej, S. et al., 2010. Na<sup>+</sup>-dependent SR Ca<sup>2+</sup> overload induces arrhythmogenic events in mouse cardiomyocytes with a human CPVT mutation. *Cardiovascular Research*, 87(1), pp.50–9.
- Sedej, S. et al., 2014. Subclinical abnormalities in sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release promote eccentric myocardial remodeling and pump failure death in response to pressure overload. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(15), pp.1569–79.

- Sehgal, S. & Drazner, M.H., 2007. Left ventricular geometry: does shape matter? *American heart journal*, 153(2), pp.153–5.
- Suetomi, T. et al., 2011. Mutation-linked defective interdomain interactions within ryanodine receptor cause aberrant Ca<sup>2+</sup> release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 124(6), pp.682–94.
- Takeshima, H. et al., 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*, 339(6224), pp.439–45.
- Terentyev, D. et al., 2008. Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in chronic heart failure. *Circulation research*, 103(12), pp.1466–72.
- Toischer, K. et al., 2010. K201 improves aspects of the contractile performance of human failing myocardium via reduction in Ca<sup>2+</sup> leak from the sarcoplasmic reticulum. *Basic research in cardiology*, 105(2), pp.279–87.
- Weber, K.T., 2000. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Current opinion in cardiology*, 15(4), pp.264–72.
- Wehrens, X.H.T. et al., 2004. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation research*, 94(6), pp.e61–70.
- Yamaguchi, N. et al., 2007. Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca release channel. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), pp.1344–53.
- Yamamoto, T. et al., 2008. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation*, 117(6), pp.762–72.
- Yano, M., Yamamoto, T., et al., 2005. Abnormal ryanodine receptor function in heart failure. *Pharmacology & therapeutics*, 107(3), pp.377–91.
- Yano, M. et al., 2008. Defective Ca<sup>2+</sup> cycling as a key pathogenic mechanism of heart failure. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 72 Suppl A, pp.A22–30.
- Yano, M. et al., 2003. FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation*, 107(3), pp.477–84.
- Yano, M. et al., 2006. Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, 3(1), pp.43–52.
- Yano, M., Ikeda, Y. & Matsuzaki, M., 2005. Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure. *Journal of Clinica Investigation*, 115(3), pp.556–64.
- Yano, M. & Okuda, S., 2014. Does a ripple of Ca(2+) leak develop into a rogue wave that can trigger pathological hypertrophy? *Journal of the American College of Cardiology*, 63(15), pp.1580–2.

Zeiss, C., LSM 510 META Laser Scanning Mikroskop, Broschüre.

Zhang, L. et al., 1997. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *The Journal of biological chemistry*, 272(37), pp.23389–97.

Zhang, T. et al., 2003. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circulation research*, 92(8), pp.912–9.

Zorzato, F. et al., 1990. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 265(4), pp.2244–56.