

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Institut für Pharmakologie und Toxikologie

**Elektrophysiologische Untersuchungen zur Regulation des
kardialen Kalziumkanals $Ca_v1.2$ über den Ca^{2+} /CaM/CaMKII-
Signalweg**

Katharina Friederike Köstner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann, i.R.
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. St. Engelhardt

Die Dissertation wurde am 07.02.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2012 angenommen.

Abstract

The cardiac L-type calcium channel $Ca_v1.2$ is crucial in regulating intracellular calcium concentration. Inactivation by calcified Calmodulin and facilitation by activation of Calmodulin kinase II (CaMKII) offer two opposing means of altering Calcium influx via $Ca_v1.2$. The influence of CaMKII was examined using knock-in mutation of the CaMKII phosphorylation sites S1512/S1570 in a mouse model. Isolated cardiomyocytes showed a negative shift in voltage-dependent inactivation, a slowed recovery from inactivation and a decreased voltage-dependent facilitation (VDF). A CaMKII inhibitor reduced VDF in the cardiomyocytes of the control group to the same extent. These results support the notion that CaMKII-dependent phosphorylation at S1512 and S1570 mediates facilitation in cardiomyocytes.

Zusammenfassung

Die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration über den kardialen Kalziumkanal $Ca_v1.2$ ist von großer physiologischer Bedeutung. $Ca_v1.2$ kann durch kalziumgebundenes Calmodulin inaktiviert oder durch Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) facilitiert werden. Der Einfluss der CaMKII konnte mittels Mutation ihrer Phosphorylierungsstellen S1512/S1570 im Mausmodell untersucht werden. Isolierte Kardiomyozyten dieser Mäuse zeigten eine negative Verschiebung spannungsabhängiger Inaktivierung, eine Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung und eine Verminderung spannungsabhängiger Facilitierung. Letztere Art der Facilitierung wurde in Kardiomyozyten von Kontrolltieren durch einen CaMKII-Inhibitor um dasselbe Ausmaß vermindert. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass CaMKII-abhängige Phosphorylierung der Serine 1512 und 1570 Facilitierung von $Ca_v1.2$ in Kardiomyozyten ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	V
Protokollverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI

Inhaltsverzeichnis

I EINLEITUNG	1
1.1 Spannungsabhängige Kalziumkanäle	2
1.2 L-Typ Kalziumkanäle	4
1.3 Autoregulation von L-Typ Kalziumkanälen	6
1.4 Die Kalzium-/Calmodulinabhängige Kinase II	9
1.5 Kardiale Kalziumkanäle	10
1.6 Der spannungsabhängige Kalziumkanal $Ca_v1.2$	11
1.7 Fragestellung	12
II MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Material und Bezugsquellen	13
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	13
2.1.2 <i>Lösungen zur Isolierung und Kultivierung von Kardiomyozyten</i>	15
2.1.3 <i>Lösungen für elektrophysiologische Messungen</i>	17
2.1.4 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 <i>Isolierung von Kardiomyozyten</i>	19
2.2.2 <i>Kultivierung von Kardiomyozyten</i>	21
2.2.3 <i>Die Patch-Clamp-Technik</i>	22
2.2.4 <i>Die Whole-Cell-Konfiguration</i>	23
2.2.5 <i>Messstand</i>	26
2.2.6 <i>Messlösungen</i>	27
2.2.7 <i>Messpipetten</i>	28
2.2.8 <i>Versuchsdurchführung</i>	29
2.2.9 <i>Messprotokolle</i>	30
2.2.10 <i>Datenanalyse</i>	31
2.3 Versuchstiere	32

III ERGEBNISSE	33
3.1 Kinetik der Aktivierung	33
3.1.1 Zellgröße	33
3.1.2 Strom-Spannungs-Beziehung	34
3.2 Kinetik der Inaktivierung	38
3.2.1 Steady-State-Inaktivierung	38
3.2.2 Erholung von der Inaktivierung	40
3.3 Fazilitierung	44
3.3.1 Frequenzabhängige Fazilitierung	44
3.3.2 Spannungsabhängige Fazilitierung	49
3.4 KN-93	52
IV DISKUSSION	54
4.1 Fazilitierung und Inaktivierung	55
4.2 CaMKII-unabhängige Fazilitierung	57
4.3 Kardiales Aktionspotential und EKG	58
4.4 Strukturelle Herzerkrankungen und Arrhythmien	63
4.5 Bedeutung der Regulation von Ca _v 1.2	67
4.6 Ausblick	68
V ZUSAMMENFASSUNG	69
VI LITERATURVERZEICHNIS	71
VII PUBLIKATION	78
VIII ANHANG	79
Danksagung	79
Lebenslauf	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Kalziumtransport ventrikulärer Kardiomyozyten	2
Abbildung 1-2	Systematik spannungsabhängiger Kalziumkanäle	3
Abbildung 1-3	Aufbau eines spannungsabhängigen Kalziumkanals	4
Abbildung 1-4	Struktur der α_1-Untereinheit eines durch hohe Spannung aktivierten Kalziumkanals	5
Abbildung 1-5	Autoregulationsmechanismen kardialer L-Typ Kalziumkanäle ...	6
Abbildung 1-6	Kalziumabhängige und spannungsabhängige Inaktivierung	7
Abbildung 1-7	Fazilitierung	8
Abbildung 1-8	Kardiale Kalziumkanäle	10
Abbildung 2-1	Isolierung der Kardiomyozyten	21
Abbildung 2-2	Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik	23
Abbildung 2-3	Ersatzschaltbild der Whole-Cell-Konfiguration	24
Abbildung 2-4	Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers	25
Abbildung 2-5	Messapparatur	26
Abbildung 2-6	Messlösungen	27
Abbildung 2-7	Messpipetten	28
Abbildung 3-1	Die SF-Mutation beeinflusste die Kapazität der Kardiomyozyten nicht signifikant	34
Abbildung 3-2	Die SF-Mutation hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Strom-Spannungs-Beziehung	36
Abbildung 3-3	Die Kurve für die Steady-State-Inaktivierung der SF Kardiomyozyten wurde negativ verschoben	39
Abbildung 3-4	Bei einem Haltepotential von -80 mV zeigten die Kurven beider Genotypen für die Erholung von der Inaktivierung einen nahezu identischen Verlauf	41
Abbildung 3-5	Bei einem Haltepotential von -40 mV war die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung der SF Kardiomyozyten signifikant erhöht	42
Abbildung 3-6	Der Anteil des Reststroms nach unterschiedlichen Zeitspannen unterschied sich zwischen Ctr und SF Kardiomyozyten nicht ..	45

Abbildung 3-7	I_{Ca} beim ersten Puls nach einer Ruhephase war in SF Kardiomyozyten signifikant kleiner als in Ctr Kardiomyozyten - Beispiel	46
Abbildung 3-78	I_{Ca} beim ersten Puls nach einer Ruhephase war in SF Kardiomyozyten signifikant kleiner als in Ctr Kardiomyozyten - Statistik	46
Abbildung 3-9	Der durch repetitive Depolarisationen hervorgerufene integrierte I_{Ca} ist in SF Kardiomyozyten in Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten leicht reduziert.	47
Abbildung 3-10	Frequenzabhängige Fazilitierung fand unter intrazellulärer Perfusion von BAPTA nicht statt	48
Abbildung 3-11	Spannungsabhängige Fazilitierung war in SF Kardiomyozyten signifikant kleiner als in Ctr Kardiomyozyten - Beispiel	50
Abbildung 3-12	Spannungsabhängige Fazilitierung war in SF Kardiomyozyten signifikant kleiner als in Ctr Kardiomyozyten - Statistik	51
Abbildung 3-13	KN-93 verhinderte spannungsabhängige Fazilitierung der Ctr Kardiomyozyten - Beispiel	52
Abbildung 3-14	KN-93 verhinderte spannungsabhängige Fazilitierung der Ctr Kardiomyozyten - Statistik	53
Abbildung 4-1	Aktionspotentiale isolierter Kardiomyozyten von Ctr- und SF-Mäusen bei 1 Hz und 5Hz	59
Abbildung 4-2	Verkürzung der QT-Zeit der SF-Mäuse bei hohen Frequenzen.	60
Abbildung 4-3	Verlängerung der TP-Strecke der SF-Mäuse bei hohen Frequenzen	60
Abbildung 4-4	Die SF-Mutation hat keinen Einfluss auf die mittlere Herzfrequenz der Mäuse unter Ruhebedingungen	61
Abbildung 4-5	Die SF-Mutation hat keinen Einfluss auf die Verkürzung des Ventrikels unter Ruhebedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalin	62
Abbildung 4-6	Vermuteter Mechanismus zwischen CaMKII-Aktivierung, kardialer Hypertrophie und Herzfehler	64
Abbildung 4-7	Vermuteter Mechanismus zwischen struktureller Herzerkrankung, Arrhythmien und plötzlichem Herztod	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1	Die Kinetik der Aktivierung von I_{Ca} unterschied sich zwischen Ctr Kardiomyozyten und SF Kardiomyozyten nicht	37
Tabelle 3-2	Steady-State-Inaktivierung, Erholung von der Inaktivierung unter verschiedenen Bedingungen und Inaktivierung von I_{Ca} bei Ctr Kardiomyozyten und SF Kardiomyozyten	43

Protokollverzeichnis

Protokoll 3-1	Strom-Spannungs-Beziehung	35
Protokoll 3-2	Steady-State-Inaktivierung	38
Protokoll 3-3	Erholung von der Inaktivierung A	40
Protokoll 3-4	Erholung von der Inaktivierung B	41
Protokoll 3-5	Frequenzabhängige Fazilitierung	44
Protokoll 3-6	Spannungsabhängige Fazilitierung	49

Abkürzungsverzeichnis

AIP	<i>autocamtide-2 related inhibitory peptide</i>
Ca ²⁺	Kalziumionen
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
Ca ²⁺ /CaM	kalziumgebundenes Calmodulin
CaM	Calmodulin
CaMKII	kalzium-/calmodulinabhängige Kinase II
Ca _v	spannungsabhängiger Kalziumkanal
CDF	kalziumabhängige Fazilitierung (<i>calcium dependent facilitation</i>)
CDI	kalziumabhängige Inaktivierung (<i>calcium dependent inactivation</i>)
C _m	Kapazität der Membran
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
Ctr	Kontrollen (<i>controls</i>)
EAD	frühe Nachdepolarisationen (<i>early afterdepolarisation</i>)
G _{max}	maximale Ionenleitfähigkeit
I _{Ca}	Kalziumeinstrom
I _{max}	maximaler Ioneneinstrom
IQ-Motiv	Isoleucin-Glutamin-Motiv
HVA	durch hohe Spannung aktiviert (<i>high voltage activated</i>)
HCN	<i>hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated cation</i>
HP	Haltepotential
k	Faktor für Steigung der Kurve
LVA	durch niedrige Spannung aktiviert (<i>low voltage activated</i>)
LTCC	L-Typ Kalziumkanal (<i>I-type calcium channel</i>)
OPA	Operationsverstärker
QT _c	für die Frequenz korrigierte QT-Zeit
R _m	Widerstand der Membran
R _s	Serienwiderstand

Abkürzungsverzeichnis

R_f	Rückkopplungswiderstand
RyR	Ryanodinrezeptor
SF	Mutanten (<i>sine facilitation</i>)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
U_{aus}	Ausgangsspannung
U_{pip}	Pipettenpotential
U_{soll}	Kommandopotential
$V_{0.5}$	halb-maximales Aktivierungspotential
V_{rev}	Umkehrpotential
VDI	spannungsabhängige Inaktivierung (<i>voltage dependent inactivation</i>)
VDF	spannungsabhängige Fazilitierung (<i>voltage dependent facilitation</i>)

I. Einleitung

Kalziumionen (Ca^{2+}) sind ubiquitär vorkommende Signalmoleküle, die an der Übertragung elektrischer Signale verschiedener Zellarten beteiligt sind. Durch Ca^{2+} werden intrazellulär Vorgänge wie Kontraktion, Sekretion, synaptische Transmission und Genexpression vermittelt (Catteral, 2000; Lacinova, 2005). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wird unter anderem über spannungsabhängige Kalziumkanäle (Ca_v) reguliert. Eine Depolarisation der Zellmembran führt zur Öffnung dieser Kanäle. Hormone, Proteinkinasen und -phosphatasen, sowie Toxine und Pharmaka beeinflussen diesen Vorgang (Hofmann et al., 1999; Catteral et al., 2003).

Im Herzmuskel spielt Ca^{2+} eine entscheidende Rolle bei der Erregung und Kontraktion der Kardiomyozyten. Während der Plateauphase des Aktionspotentials werden Ca_v aktiviert und bewirken einen Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle (I_{Ca}). Der Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zur Aktivierung von Ryanodinrezeptoren (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Daraufhin wird Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steigt weiter an (Abbildung 1-1). Die Kombination aus I_{Ca} in die Zelle und daraus folgender Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR führt zu einem Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 0,1 μM auf 1 μM . Über eine direkte Aktivierung der Myofilamente durch Ca^{2+} kommt es schließlich zu einer Kontraktion der Kardiomyozyten. Durch Transport von Ca^{2+} aus der Zelle und zurück in das SR kommt es zur Abnahme von $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Dissoziation von Ca^{2+} von dem Myofilament Troponin bewirkt die Relaxation der Zelle. Veränderungen in der Funktion der Ca_v des Herzens können Störungen der kardialen Signalübertragung verursachen und klinisch als Herzrhythmusstörungen oder Herzinsuffizienz symptomatisch werden (Bers, 2002).

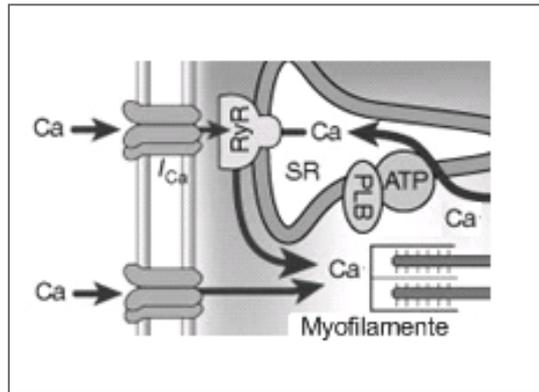


Abbildung 1-1 (modifiziert nach Bers, 2002) **Kalziumtransport ventrikulärer Kardiomyozyten.**

Während des kardialen Aktionspotentials gelangen Kalziumionen (Ca^{2+}) über spannungsabhängige Kalziumkanäle (Ca_v) in die Zelle und führen zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (linke Bildhälfte). Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) führt zur Bindung von Ca^{2+} an Myofilamente und dadurch zur Kontraktion. Zur Relaxation kommt es durch ein Absinken von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter anderem über den Transport von Ca^{2+} aus dem Zytosol in das SR (rechte Bildhälfte). ATP = ATPase, PLB = Phospholamban.

1.1 Spannungsabhängige Kalziumkanäle

In Abhängigkeit ihres Aktivierungspotentials werden Ca_v in zwei Hauptgruppen eingeteilt: durch hohe Spannung aktivierte (*high voltage activated*, HVA) Ca_v und durch niedrige Spannung aktivierte (*low voltage activated*, LVA) Ca_v (Yaari et al., 1987; Lacinova, 2005) (Abbildung 1-2).

Im glatten Muskel, sowie Herz- und Skelettmuskel zeichnen sich Ca_v durch ein hohes Aktivierungspotential, eine große Leitfähigkeit und eine langsame spannungsabhängige Inaktivierung aus. Diese HVA Ca_v werden über cAMP-abhängige Phosphorylierung von Proteinen reguliert. Die Kanäle lassen sich durch klassische Kalziumkanalblocker wie Dihydropyridine (z.B. Nifedipin), Phenylalkylamine (z.B. Verapamil) und Benzodiazepine (z.B. Diltiazem) hemmen (Reuter, 1983). Wegen ihrer langen Öffnungszeit mit Barium als Ladungsträger (*long lasting*) werden sie als L-Typ Kanäle (*l-type calcium channel*, LTCC) bezeichnet (Nowicky et al., 1985). LTCC sind auch an der Hormonfreisetzung (neuro-)endokriner Zellen (Milani et al., 1990) und der Genexpression (Deisseroth et al., 1996; Dolmetsch et al., 2001), sowie synaptischen Integration von Neuronen (Bean, 1989) beteiligt.

Zu den HVA Ca_v zählen weiterhin P/Q-, N-, und R-Typ Kanäle. Sie lassen sich im Gegensatz zu LTCC nicht durch klassische Kalziumkanalantagonisten hemmen und kommen vor allem in Neuronen, aber auch in Herzmuskelzellen und endokrinen Zellen vor. Ihre Spannungsabhängigkeit und Inaktivierungszeit liegt zwischen denen der L-Typ HVA Ca_v und der LVA Ca_v (Nowycky et al., 1985).

Im Vergleich zu HVA Ca_v aktivieren LVA Ca_v bei einem negativeren Membranpotential, inaktivieren schneller und zeigen eine geringere Leitfähigkeit. Für klassische Kalziumantagonisten sind sie nicht sensitiv. Sie werden wegen ihrer transienten Kinetik auch als T-Typ Kanäle bezeichnet (Nowycky et al., 1985).

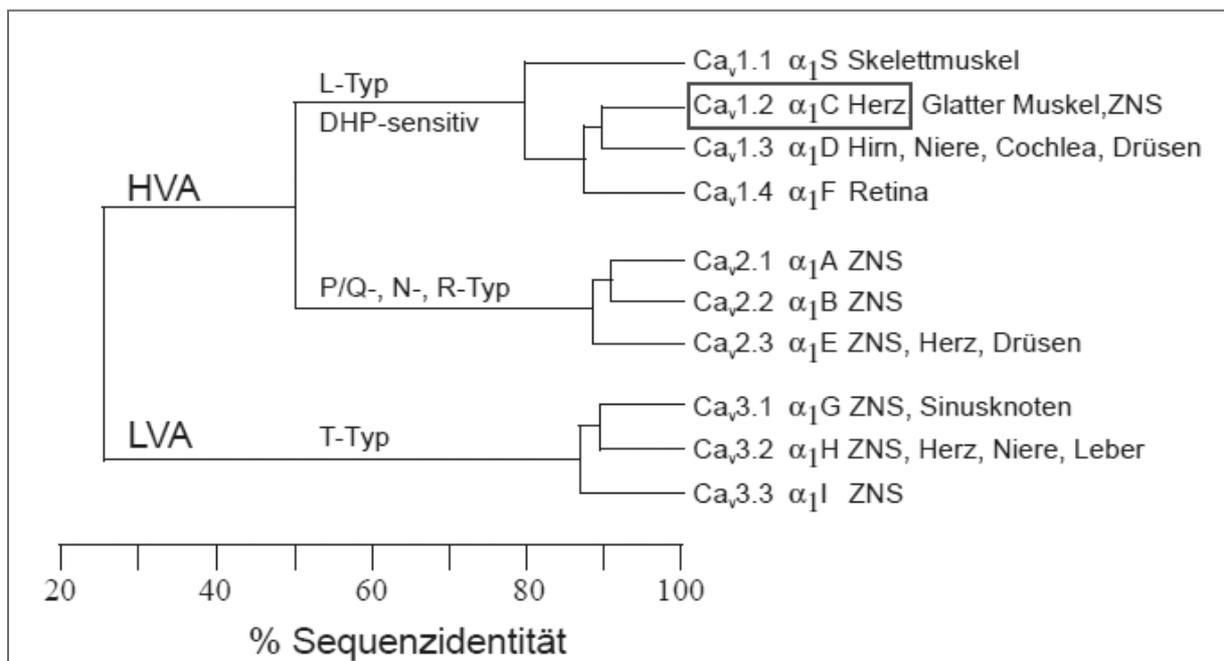


Abbildung 1-2 (modifiziert nach Klugbauer et al., 2002): **Systematik spannungsabhängiger Kalziumkanäle.**

Dargestellt sind die beiden Hauptgruppen der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (Ca_v): durch hohe Spannung aktivierte (high-voltage-activated, HVA) Ca_v und durch niedrige Spannung aktivierte (low-voltage-activated, LVA) Ca_v . Sie werden in die Unterfamilien Ca_v1 , Ca_v2 und Ca_v3 unterteilt. Die Klassifizierung erfolgte anhand genetischer Vergleiche der Sequenzidentität der α_1 -Untereinheiten. Der L-Typ Kalziumkanal (LTCC) $Ca_v1.2$ ist der wichtigste Ca_v des Herzens.

1.2 L-Typ Kalziumkanäle

LTCC sind Proteinkomplexe, die sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzen. Die α_1 -Untereinheit bildet die Pore des Kanals und stellt den für die Funktion des Kanals wichtigsten Bereich dar (Abbildung 1-3). Diese Untereinheit reicht möglicherweise alleine aus, um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden (Bosse et al.; Perez-Reyes et al., 1989; Welling et al., 1993). Die Hilfsuntereinheiten β , $\alpha_2\delta$ und γ wirken modulierend auf die Expression des Kanals, die Kinetik und Amplitude von I_{Ca} und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung (Welling et al., 1992).

Die α_1 -Untereinheit besteht aus vier homologen Domänen (I - IV), welche sich jeweils aus sechs Transmembransegmenten (S1 - S6) zusammensetzen. S4 stellt den Spannungssensor dar. Der Bereich zwischen S5 und S6 bildet die Pore. Eine kurze Schleife zwischen S5 und S6 formt den Selektivitätsfilter. Zwischen den Domänen I und II ist die Bindungsstelle für die β -Untereinheit lokalisiert (Hofmann et al., 1999) (Abbildung 1.4). Auch die Bindungsstellen der Kalziumkanalblocker befinden sich im Bereich der α_1 -Untereinheit (Schuster et al., 1996; Striessnig, 1999).

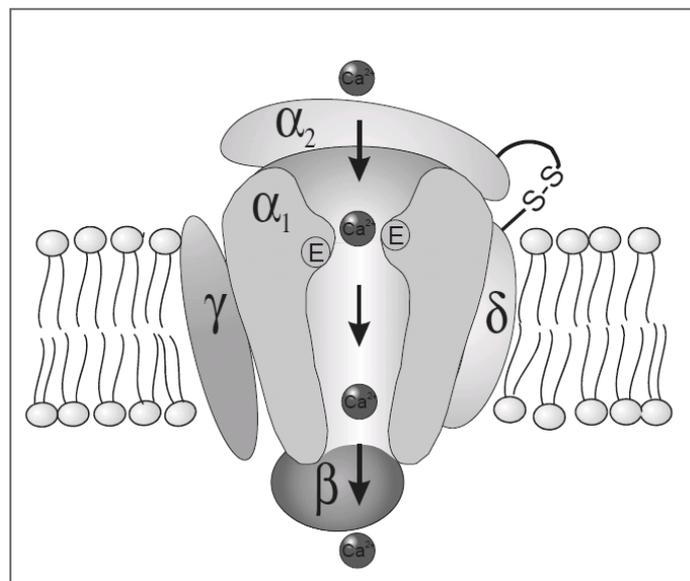


Abbildung 1-3 (übernommen aus Klugbauer et al., 2002): **Aufbau eines spannungsabhängigen Kalziumkanals.**

Bis zu fünf Untereinheiten bilden einen heterooligomeren Komplex. Die wichtige α_1 -Untereinheit umfasst die Pore, den Selektivitätsfilter, den Spannungssensor und die Bindungsstellen der Kalziumkanalblocker.

Einleitung

Am intrazellulären Carboxyterminus befinden sich mehrere für die Regulation des Kanals wichtige Aminosäuresequenzen (Zühlke and Reuter, 1998). Das Isoleucin-Glutamin-Motiv (IQ-Motiv) liegt 148 Aminosäuren carboxyterminal des Segments 6 der Domäne IV und besteht aus 18 Aminosäuren. Die Bindung des Kalziumsensors Calmodulin (CaM) an das IQ-Motiv ist Bestandteil der Autoregulation des Kanals (Zühlke et al., 1999; Zühlke et al., 2000). CaM ändert nach der Bindung von Ca^{2+} seine Konformation und kann so mit dem IQ-Motiv des Kalziumkanals interagieren (Peterson et al., 1999). Wie Mutationsstudien zeigten sind spezifische Aminosäuren innerhalb des IQ-Motivs für diese Interaktion entscheidend (Zühlke and Reuter, 1998; Zühlke et al., 2000). Daneben spielt die Interaktion zwischen CaM und dem IQ-Motiv eine Rolle bei der Regulation der Gentranskription (Dolmetsch et al., 2001). Einen weiteren Kalziumsensors stellt das weiter aminoterminal gelegene EF-Hand-Motiv dar (Babitch, 1990), welches von den beiden Phosphorylierungsstellen S1512 und S1570 flankiert wird (Erxleben et al., 2006; Lee et al., 2006) (Abbildung 1-4).

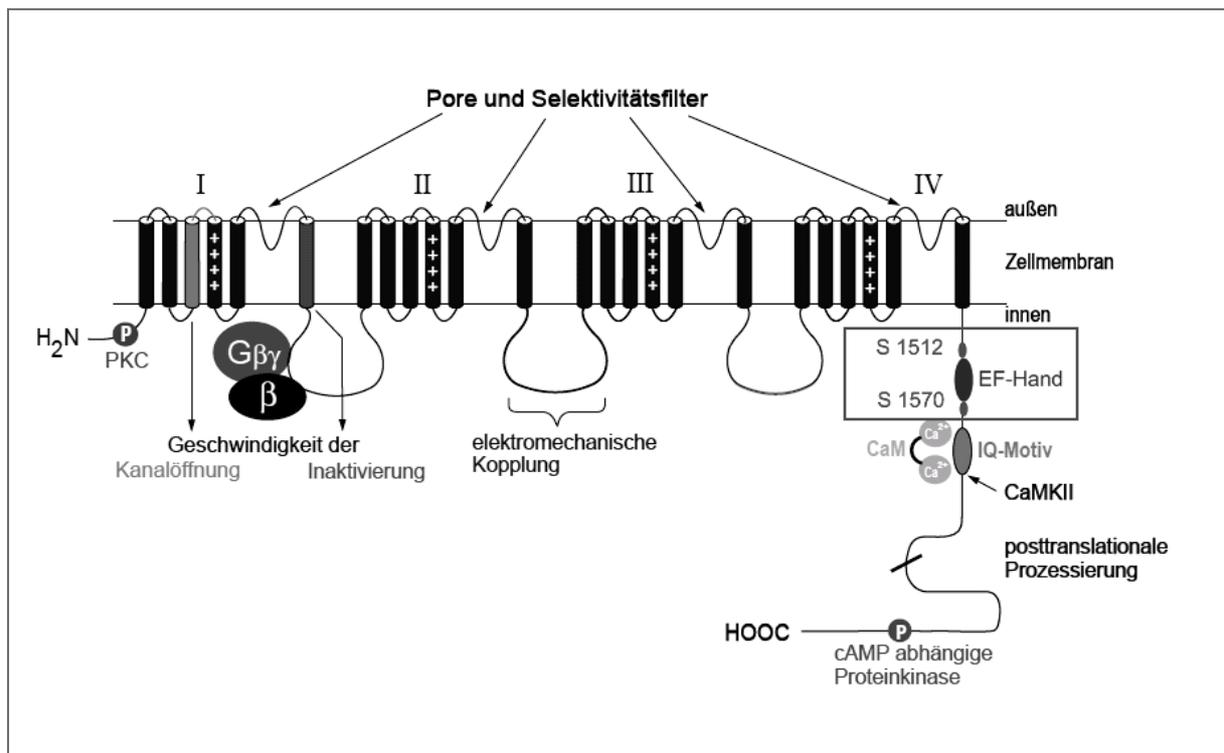


Abbildung 1-4 (modifiziert nach Klugbauer et al., 2002): **Struktur der α_1 -Untereinheit eines durch hohe Spannung aktivierten Kalziumkanals.**

Vier Domänen (I-IV) bestehen aus jeweils sechs Transmembransegmenten (S1-S6). Am intrazellulären Carboxyterminus befindet sich das Isoleucin-Glutamin-Motiv (IQ-Motiv), welches Calmodulin (CaM) bindet. Die Phosphorylierungsstellen der kalzium-/calmodulinabhängigen Kinase II (CaMKII), die Serine 1512 und 1570, flankieren das EF-Hand-Motiv.

1.3 Autoregulation von L-Typ Kalziumkanälen

LTCC unterliegen positiver Regulation, Fazilitierung, und negativer Regulation, Inaktivierung. Diese stellen gegensätzliche, aktivitätsabhängige Regulationsmechanismen dar. Die Bindung von CaM an das IQ-Motiv am carboxyterminalen Ende der α_1 -Untereinheit der LTCC beeinflusst beide Arten der Autoregulation (Peterson et al., 1999; Zühlke et al., 1999; Zühlke et al., 2000; DeMaria et al., 2001; Van Petegem et al., 2005; Poomvanicha et al., 2011). Einerseits kann kalziumgebundenes CaM ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) in Abhängigkeit von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ LTCC inaktivieren (*calcium dependent inactivation*, CDI). Andererseits kann $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ über die Aktivierung der $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -abhängigen Kinase II (CaMKII) zu einer Vergrößerung von I_{Ca} führen (*calcium dependent facilitation*, CDF). Beide Formen der Autoregulation kommen nebeneinander vor. Die Mechanismen der Autoregulation sind in Abbildung 1-5 veranschaulicht.

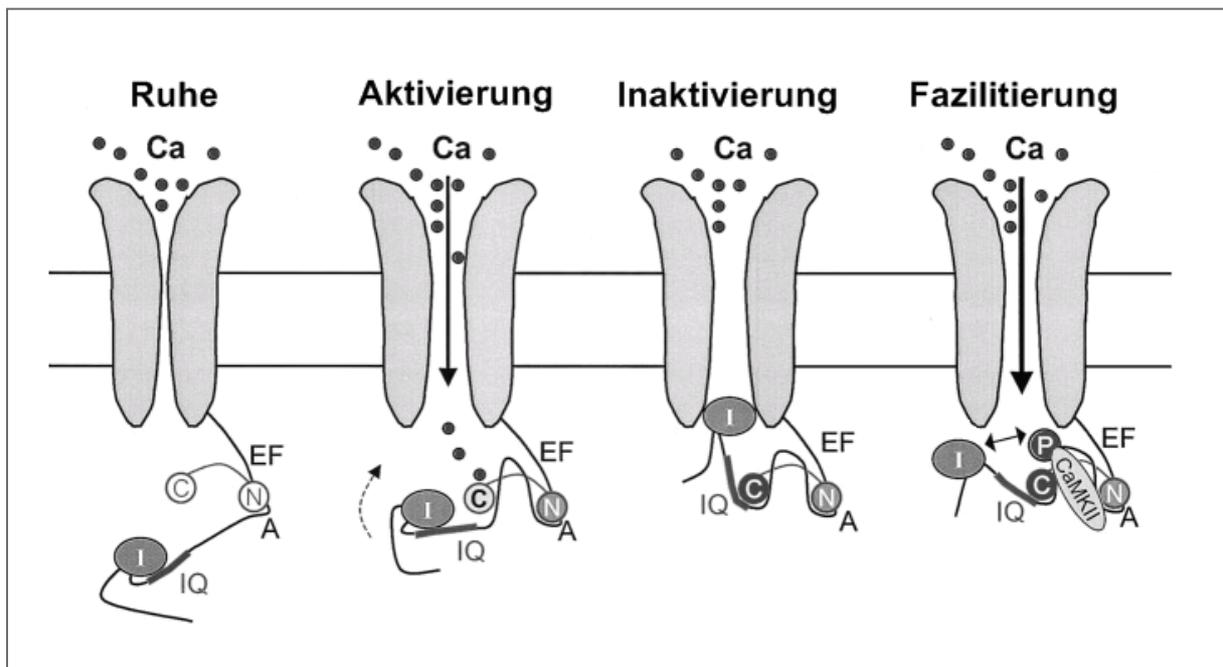


Abbildung 1-5 (modifiziert nach Maier and Bers, 2002): **Autoregulationsmechanismen kardialer L-Typ Kalziumkanäle.**

In Ruhe ist der Kanal geschlossen. Während der Depolarisation kommt es zum Kalziumeinstrom (I_{Ca}) in die Zelle. Intrazelluläre Kalziumionen (Ca^{2+}) binden Calmodulin (CaM) und führen zur Inaktivierung des Kanals. Zusätzlich phosphoryliert die Kalzium-/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) den Kanal, verlangsamt so die Inaktivierung und führt zur Fazilitierung.

Durch Inaktivierung des Kanals kann die Zelle vor einer Überladung mit Ca^{2+} geschützt werden. Denn ein übermäßiger I_{Ca} in die Zelle wirkt toxisch. Inaktivierung als Folge einer anhaltenden Depolarisation wird als spannungsabhängige Inaktivierung (*voltage dependent inactivation*, VDI) bezeichnet. Zur separaten Untersuchung von VDI, unabhängig von CDI, kann in Experimenten Barium als Ladungsträger verwendet werden (Abbildung 1-6).

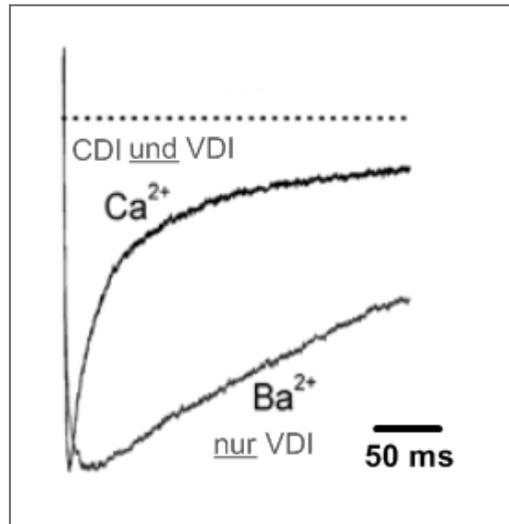


Abbildung 1-6 (modifiziert nach Lee et al., 2006): **Kalziumabhängige und spannungsabhängige Inaktivierung.**

Mit Kalziumionen (Ca^{2+}) als Ladungsträger können kalziumabhängige Inaktivierung (calcium dependent inactivation, CDI) und spannungsabhängige Inaktivierung (voltage dependent inactivation, VDI) untersucht werden. Eine isolierte Darstellung von VDI ist mit Bariumionen (Ba^{2+}) als Ladungsträger möglich. Der Kalziumstrom (I_{Ca}) über den spannungsabhängigen Kalziumkanal $\text{Ca}_v1.2$ wurde in Whole-Cell-Technik in HEK 293 Zellen gemessen.

Als Folge einer Serie repetitiver Depolarisationen (Noble and Shimoni, 1981a; Lee, 1987) oder einer Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch eine starke Depolarisation (*voltage dependent facilitation*, VDF) (Noble and Shimoni, 1981b) kommt es zu einer Vergrößerung von I_{Ca} (Abbildung 1-7). Fazilitierung stellt einen der seltenen positiven Feedback-Mechanismen der Signaltransduktion dar. Der Zustand des Kanals während der Fazilitierung wird als *mode2* bezeichnet. Im Gegensatz zu *mode0* und *mode1* ist *mode2* durch längere Öffnungszeiten und eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals gekennzeichnet (Pietrobon and Hess, 1990; Kleppisch et al., 1994; Dzhura et al., 2000).

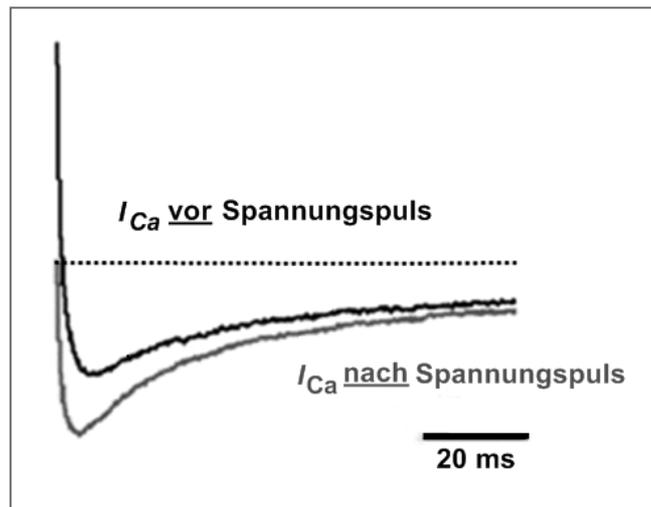


Abbildung 1-7 (modifiziert nach Lee et al., 2006): **Fazilitierung**.

Fazilitierung bewirkt eine Vergrößerung des Kalziumeinstroms (I_{Ca}). Dargestellt sind die Stromspuren vor (schwarz) und nach (grau) einem depolarisierenden Spannungspuls. I_{Ca} über den spannungsabhängigen Kalziumkanal $Ca_v1.2$ wurde in Whole-Cell-Technik in HEK 293 Zellen gemessen.

CDF beruht auf Calmodulin und/oder der Phosphorylierung des Kanals durch die CaMKII (McCarron et al., 1992; Anderson et al., 1994; Xiao et al., 1994; Yuan and Bers, 1994; Dzhura et al., 2000). Als Phosphorylierungsstellen der CaMKII wurden in in-vitro Studien die das EF-Hand-Motiv flankierenden Serine 1512 und 1570 der α_1 -Untereinheit identifiziert (Erleben et al., 2006; Lee et al., 2006). Eine Mutation der Serine 1512/1570 zu Alaninen hemmt CDF nahezu vollständig und erhöht CDI leicht (Lee et al., 2006). Voraussetzung für CDF ist neben I_{Ca} ein intakter Bereich um das IQ-Motiv am Carboxyterminus des Kanals (Anderson et al., 1994; Dzhura et al., 2000; Hudmon et al., 2005; Peterson et al., 1999; Wu et al., 2001; Yuan and Bers, 1994; Zühlke et al., 1999; Zühlke et al., 2000). Eine Mutation des Isoleucins des IQ-Motivs zu Alanin verhindert CDI, beeinflusst CDF jedoch nicht. Eine Mutation zu Glutamat schaltet hingegen beide Regulationsmechanismen aus (Zühlke et al., 2000). Dies zeigt den engen Zusammenhang zwischen CDI und CDF.

1.4 Die kalzium-/calmodulinabhängige Kinase II

Die CaMKII ist eine multifunktionelle Serin/Threonin-Kinase, welche in allen Geweben vorkommt. Sie kann unterschiedliche Substrate phosphorylieren und diese dadurch in ihrer Funktion verändern. Das regulatorische Protein CaM ist für die Aktivität der Kinase entscheidend. Bei einem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ und einer Bindung von Ca^{2+}/CaM an die regulatorische Domäne der CaMKII kommt es zu einer Konformationsänderung der Kinase. Die katalytische Domäne gewinnt Zugang zum Substrat und kann dieses phosphorylieren. Durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*) beeinflusst die Kinase die Transkription von Genen längerfristig (Hook and Means, 2001).

Ein weiteres Substrat der CaMKII ist die Kinase selbst. Durch Autophosphorylierung wird CaMKII unabhängig von der Ca^{2+}/CaM -Bindung aktiviert. Gleichzeitig wird die Aktivität der Ca^{2+}/CaM -Bindung gesteigert und so der Bedarf an Ca^{2+} reguliert (Meyer et al., 1992).

Die kardiale Isoform der CaMKII kann durch organische Inhibitoren wie KN-62 und KN-93 (Sumi et al., 1991) kompetitiv gehemmt werden. Außerdem existieren Peptidinhibitoren wie AIP (Autocamtide-2 related inhibitory peptide) (Ishida et al., 1995). Dephosphorylierung durch Phosphatasen führt zu ihrer vollständigen Inaktivierung (Maier and Bers, 2002; Zhang and Brown, 2004).

Im Herzmuskel phosphoryliert CaMKII in Abhängigkeit von Ca^{2+} verschiedene Transportproteine für Ca^{2+} . Hierzu zählen neben Ryanodinrezeptoren (Witcher et al., 1991; Hain et al., 1995) und Phospholamban (Davis et al., 1983) vor allem LTCC (Anderson et al., 1994). Es wurde beschrieben, dass die Kinase am Carboxyterminus der α_1 -Untereinheit in der Nähe des IQ-Motivs an den LTCC $Ca_v1.2$ gebunden vorliegt. Zusätzlich interagiert CaMKII mit verschiedenen intrazellulären Domänen der α_1 -Untereinheit (Hudmon et al., 2005). Im Einklang hiermit wurde die das EF-Hand-Motiv flankierenden Serine 1512 und 1570 im Bereich der α_1 -Untereinheit von $Ca_v1.2$ als Phosphorylierungsstellen der CaMKII identifiziert (Erxleben et al., 2006; Lee et al., 2006).

1.5 Kardiale Kalziumkanäle

Kardiomyozyten exprimieren neben L-Typ auch R-Typ und T-Typ Kalziumkanäle (Ono and Iijima, 2010). Der wichtigste Vertreter der Gruppe der LTCC ist $Ca_v1.2$. Dieser Kanal ist für die elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten entscheidend (Bers, 2002). LTCC sind nicht nur für die Funktion ventrikulärer Kardiomyozyten, sondern auch für die Schrittmacherfunktion des Sinusknotens wichtig. Atriale Kardiomyozyten exprimieren den LTCC $Ca_v1.3$, dessen Deletion zu Bradykardien und Arrhythmien führt (Platzer et al., 2000). Auch der R-Typ Kalziumkanal $Ca_v2.3$ wurde in atrialen Kardiomyozyten nachgewiesen (Piedras-Rentería et al., 1997) (Abbildung 1-8). T-Typ Kalziumkanäle kommen in unterschiedlicher Verteilung in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten, einschließlich Purkinje- und Schrittmacherzellen vor (Bers and Perez-Reyes, 1999). Die häufigsten kardialen Isoformen sind $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ (Ono and Iijima, 2010). Ihre Expression ist während der Herzentwicklung und unter pathologischen Zuständen wie kardialer Hypertrophie erhöht (Nuss and Houser, 1993; Vassort et al., 2006).

Untereinheit	Gewebe	Phänotyp
$Ca_v1.2$	<u>Herz</u> , glatter M., ZNS Glatter Muskel Hippocampus β -Zellen des Pankreas	Embryonal letal (<14.5 p.c.) Reduzierte Darmperistaltik, Dilatation der Gefäße, reduzierter Blasentonus Lernen und Gedächtnis beeinträchtigt Erste Phase der Insulinfreisetzung stark reduziert
$Ca_v1.3$	ZNS, Cochlea, <u>Herz</u> Drüsen, glatter M.	Taubheit, Arrhythmie, Bradykardie
$Ca_v2.3$	ZNS, <u>Herz</u> , Drüsen	Reduzierte somatische inflammatorische Schmerzantwort, veränderte Glucosehomöostase

Abbildung 1-8 (modifiziert nach Klugbauer et al., 2002): **Kardiale Kalziumkanäle.**

Die Tabelle gibt einen Überblick über die wichtigsten kardialen Kalziumkanäle, das Vorkommen dieser Kanäle in weiteren Geweben und die mit Fehlfunktionen dieser Kanäle einhergehenden Symptome. $Ca_v1.2$ ist der für die Funktion ventrikulärer Kardiomyozyten bedeutenste Kalziumkanal.

1.6 Der spannungsabhängige Kalziumkanal Ca_v1.2

Der Nachweis von Ca_v1.2 gelang außer im Herzen (Hofmann et al., 1999; Bohn et al., 2000; Seisenberger et al., 2000; Xu et al., 2003) im ZNS (Hell et al., 1993; Moosmang et al., 2005), im Pankreas (Schulla et al., 2003), im glatten Muskel von Blutgefäßen (Moosmang et al., 2003) und in der Harnblase (Wegener et al., 2004).

Ca_v1.2 ist die funktionell relevante LTCC Isoform für Lern- und Gedächtnisprozesse im Hippocampus (Moosmang et al., 2005) und den Erwerb eines Angstgedächtnisses über den Amygdala-Thalamus-Signalweg (Langwieser et al., 2010). Gewebsspezifische Deletion von Ca_v1.2 im ZNS beeinträchtigt die Funktion des limbischen Systems. In den β-Zellen des Pankreas führt eine Deletion von Ca_v1.2 über eine verminderte Insulinfreisetzung zur Glukoseintoleranz (Schulla et al., 2003). Inaktivierung von Ca_v1.2 im glatten Muskel reduziert die Darmperistaltik, dilatiert Gefäße durch einen verminderten Einfluss von Angiotensin II, sowie einem Ausbleiben des Bayliss-Effekts (Moosmang et al., 2003) und vermindert den Blasentonus (Wegener et al., 2004).

Die Funktion von Ca_v1.2 bei der Herzentwicklung wird durch dynamische Expression reguliert (Xu et al., 2003). Die vollständige Deletion von Ca_v 1.2 ist embryonal letal. Ca_v1.2 *knock-out* Mäuse sterben vor Tag 14,5 postcoitum, verfügen zuvor jedoch über funktionierende Herzzellen (Seisenberger et al., 2000). Eine Deletion des Carboxyterminus der α₁-Untereinheit von Ca_v1.2 führt im Mausmodell postpartal zu letalem Herzversagen. Der trunkierte Kanal wird in Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen unterschiedlich exprimiert (Domes et al., 2011; Fu et al., 2011).

Um die Regulation von LTCC *in vivo* untersuchen zu können, wurde eine *knock-in* Mauslinie generiert, bei der Ca_v1.2 nicht vollständig deletiert war. Dazu wurde selektiv in den Regulationsmechanismus von Ca_v1.2 eingegriffen. Durch die Mutation der Phosphorylierungsstellen der CaMKII von Serin zu Alanin entstand eine lebensfähige Mauslinie (*sine facilitation*, SF-Mäuse) (Blaich et al., 2010).

1.7 Fragestellung

Die Regulation von $Ca_v1.2$ ist von großer Bedeutung. I_{Ca} über $Ca_v1.2$ ist für die Kopplung von Erregung und Kontraktion in Kardiomyozyten entscheidend. Unter pathologischen Bedingungen wie einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer und der QT-Zeit, spielt I_{Ca} eine Rolle bei der Entstehung von Arrhythmien. In diesem Zusammenhang wird die Dysregulation von $Ca_v1.2$ diskutiert.

An der Regulation von $Ca_v1.2$ ist der $Ca^{2+}/CaM/CaMKII$ -Signalweg beteiligt. Negative Regulation durch Inaktivierung kann vor einer exzessiven Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ schützen, während positive Regulation durch Fazilitierung I_{Ca} kurzfristig erhöhen kann. Wenn die kardiale Repolarisation gestört ist, kann CaMKII in Kardiomyozyten als proarrhythmisches Signal wirken (Anderson, 2004).

Die funktionelle Signifikanz der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung von $Ca_v1.2$ kann mit Hilfe eines *knock-in* Maus-Modells untersucht werden. Bisher blieb die Rolle der Phosphorylierungsstellen Serin 1512 und Serin 1570 für die Fazilitierung von $Ca_v1.2$ *in vivo* unklar. Die Mutation der Serine zu Alaninen wirkt sich auf die Tiere *in vivo* und auf ihre Zellen *in vitro* aus. Durch Vergleich dieser Mäuse (SF, *sine facilitation*) mit Kontrolltieren (Ctr) können Rückschlüsse auf die Regulation von $Ca_v1.2$ gezogen werden.

Mit elektrophysiologischen Untersuchungen von Kardiomyozyten wurden folgende Fragestellungen verfolgt:

- 1) Unterscheiden sich SF Kardiomyozyten und Ctr Kardiomyozyten grundlegend in der Kinetik von I_{Ca} ?
- 2) Welchen Einfluss hat die SF-Mutation auf die Inaktivierung von $Ca_v1.2$?
- 3) Welchen Einfluss hat die SF-Mutation auf die Fazilitierung von $Ca_v1.2$?
- 4) Wie wirkt sich ein CaMKII-Inhibitor auf die Fazilitierung von Ctr Kardiomyozyten im Vergleich zu SF Kardiomyozyten aus?

II. Material und Methoden

2.1 Materialien und Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES): Roth, Karlsruhe
2,3-Butanedione-monoxime (BDM): Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA): Roth, Karlsruhe
Bovine Calf Serum (BCS): Invitrogen, Karlsruhe
Cäsiumchlorid (CsCl): Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO): Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4): Roth, Karlsruhe
Ethanol (EthOH): Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA): Merck, Darmstadt
Glukose: Roth, Karlsruhe
Glutamin: Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumbikarbonat (KHCO_3): Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl): Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4): Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl_2): Merck, Darmstadt
Laminin: BD Biosciences, Heidelberg
Magnesiumadenosintriphosphat (MgATP): Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat (MgSO_4): Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl): Merck, Darmstadt
Minimum Essential Medium (MEM): Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumbicarbonat (NaHCO_3): Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl): Roth, Karlsruhe
Natriumguanosintriphosphat (Na_2GTP): Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4): Roth, Karlsruhe
Penicillin: Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): Eigenherstellung

Phosphokreatin: Sigma-Aldrich, Steinheim

Taurine: Sigma-Aldrich, Steinheim

Triethanolamin (TEA): Roth, Karlsruhe

Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA): Gibco-BRL, Karlsruhe

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung: Roth, Karlsruhe

Narkoselösung:

Ketavet (Ketaminhydrochlorid, 100 mg/ml): Pfizer, Karlsruhe

Rampun (2 % Xylazin): Bayer, Leverkusen

Vetranquil (1 % Azepromazimaleat): Albrecht, Aulendorf

NaCl Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%: B.Braun, Melsungen

Heparinlösung:

Heparin-Natrium (25.000 I.E./5 ml): B.Braun, Melsungen

NaCl Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%: B.Braun, Melsungen

Enzyme:

Liberase Blendzyme 1 (0,25 mg/ml): Roche, Mannheim

Collagenase CLS-2 (1 mg/ml): Worthington, Berlin

Protease P-5147 (0,06 mg/ml): Sigma-Aldrich, Steinheim

CaMKII-Inhibitor:

KN-93: Calbiochem, Darmstadt

2.1.2 Lösungen zur Isolierung und Kultivierung von Kardiomyozyten

Perfusionspuffer (Vorrat)

113 mM NaCl
4,7 mM KCl
0,6 mM KH_2PO_4
0,6 mM Na_2HPO_4
1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,032 mM Phenolrot
12 mM NaHCO_3
10 mM KHCO_3
10 mM HEPES
30 mM Taurine

Perfusionspuffer

0,98 x Perfusionspuffer (Vorrat)
10 mM BDM
5,5 mM Glukose

Verdauungspuffer

1 x Perfusionspuffer
0,14 mg/ml Trypsin
12,5 μM CaCl_2

Stopp-Puffer 1

1 x Perfusionspuffer
10% BCS
12,5 μM CaCl_2

Stopp Puffer 2

1 x Perfusionspuffer

5% BCS

12,5 μ M CaCl₂

Platierungsmedium

0.9 x MEM

5% BCS

10 mM BDM

100 U/ml Penicillin

2 mM L-Glutamin

Kulturmedium

1 x MEM

0,1 mg/ml BSA

100 U/ml Penicillin

2 mM L-Glutamin

2.1.3 Lösungen für elektrophysiologische Messungen

Stammlösungen

1 M NaCl

0,1 M CaCl₂ x 6 H₂O

0,1 M MgCl₂H₂O

Extrazellulärlösung

137 mM NaCl

25 mM CsCl₂

1,8 mM CaCl₂

0,5 mM MgCl₂

10 mM HEPES

10 mM Glukose

Intrazellulärlösung

120 mM CsCl₂

10 mM TEA

5 mM Phosphokreatin

1 mM Na₂GTP

1 mM MgATP

10 mM HEPES

1 mM EGTA

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Borosilikat-Glaskapillaren (mit Filament, 1,5 mm/1,17 mm): BioMedical Instruments, Zöllnitz

Deckgläser (12mm): Menzel, Braunschweig

Einmalstripetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml): Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

Einmalspritzen Omnifix F Solo (1 ml): B.Braun, Melsungen

Einmalspritzen Injekt (5 ml, 10 ml, 20 ml): B.Braun, Melsungen

Kanülen Sterican grau (0,04 x 2 cm): B.Braun, Melsungen

Kulturflaschen (75 cm²): Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

Kulturschalen (10 cm, 24-well): Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

Pasteur-Pipetten: Roth, Karlsruhe

Petrischalen (9,2 cm, unbeschichtet): Sarstedt, Nümbrecht

Petrischalen (6 cm, unbeschichtet): Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl, ungestopft): Sarstedt, Nümbrecht

Präparationsbesteck: FST, Heidelberg

Reaktionsgefäße (2,0 ml): Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäße (15 ml): Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

Reaktionsgefäße (50 ml): Renner, Dannstadt

Sterilfilter (0,2 µ): Renner, Dannstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Kardiomyozyten

Ventrikuläre Kardiomyozyten wurden, wie in "Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart" (AfCS Procedure protocol PP000000125, v1 2002) beschrieben, isoliert.

Die Lösungen wurden steril filtriert und bei -80°C gelagert. Der Perfusionspuffer wurde auf 35 ml, der Verdauungspuffer auf 45 ml, der Stopp-Puffer 1 auf 4 ml und das Stopp-Puffer 2 auf 11 ml aliquotiert. Das Platierungsmedium und das Kulturmedium wurden wöchentlich neu angesetzt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Aliquots von 20 mg Collagenase und 1,2 mg Protease wurden in fester Form bei -80°C gelagert.

Vor Beginn der Herzzellpräparation wurden die Lösungen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Eine Petrischale mit Platierungsmedium und zwei Petrischalen mit Kulturmedium wurden im Wärmeschrank bei 37°C und 2 % CO_2 inkubiert. 90 mg Liberase wurden in 3 ml H_2O gelöst, auf 500 μl aliquotiert (je 15 mg) und bei -80°C gelagert. Alternativ wurden nach Shioya (Shioya, 2007) die Reinsubstanzen verwendet.

Dem Versuchstier wurden 0,2 ml einer Lösung aus 0,1 ml Heparin und 0,4 ml NaCl 0,9% intraperitoneal injiziert (250 Units/ Maus). Nach 10 Minuten folgten 0,15 ml einer Narkoselösung aus 0,4 ml Ketamin, 0,4 ml Rampun, 0,1 Vetranquil und 2,1 ml NaCl 0,9%. Zur Untersuchung der Narkosetiefe wurden Muskelreflexe geprüft und gegebenenfalls Narkosemittel nachinjiziert.

Bei entsprechender Narkosetiefe wurde der Brustkorb geöffnet, das noch schlagende Herz entnommen und in einer Petrischale mit auf 37°C erwärmten PBS gegeben. Unter dem Mikroskop wurde die Aorta gekürzt und so kanüliert, dass die Koronargefäße über ihre Ostien oberhalb der Aortenklappe durchspült wurden.

Diese Position wurde mit einem Faden sowie einer Klemme fixiert. Das kanülierte Herz wurde nun mit dem Perfusionssystem verbunden (Abbildung 2-1 A). Die Lösungen wurden im Verlauf der Perfusion auf 37°C aufgewärmt. Das Herz wurde drei Minuten lang mit Perfusionspuffer durchspült. Anschließend wurde es je nach Größe etwa zehn Minuten lang mit Verdauungspuffer und 15 mg Liberase Blendzyme bzw. 20 mg Collagenase und 1,2 mg Protease verdaut bis es ein typisches Aussehen erhielt und sich mit Pinzetten leicht auseinander reißen ließ.

Das fertig verdaute Herz wurde in eine kleine Petrischale mit 2,5 ml Verdauungspuffer (ohne Enzym) gegeben. Mit spitzen Pipetten wurde das Herz in kleine Fetzen zerrupft und das Herzgewebe mit einer Stripette resuspendiert bis es dissoziiert war.

Daraufhin wurde das Herz in ein 15 ml Falcon überführt, 2,5 ml Stopp-Puffer 1 dazugegeben und erneut resuspendiert. Nach zehn Minuten wurde der Überstand abgenommen, so dass ein Niederschlag zurückblieb. Der Überstand wurde in ein neues Falcon gegeben, um ihn eine Minute bei 1000 rpm zu zentrifugieren. Der neue Überstand wurde verworfen, so dass ein zweiter Niederschlag zurückblieb.

Die beiden Niederschläge wurden mit insgesamt 10 ml Stopp-Puffer 2 resuspendiert und in eine Petrischale überführt, um die Kalziumkonzentration langsam zu erhöhen. Im Abstand von jeweils vier Minuten wurden zuerst 100 µl CaCl₂ (10 mM), dann erneut 100 µl CaCl₂ (10 mM), danach 30 µl CaCl₂ (100 mM) und schließlich 50 µl CaCl₂ (100 mM) hinzugefügt und so die Kalziumkonzentration auf etwa 1mM erhöht.

Die Lösung wurde in einem 15 ml Falcon überführt. Nach zehn Minuten wurde der Überstand abgenommen und eine Minute bei 1000 rpm zentrifugiert. Dieser Überstand wurde verworfen. Die beiden Niederschläge wurden mit insgesamt 5 ml Platingmedium resuspendiert.

Abschließend konnte mit Platingmedium auf die gewünschte Konzentration von 25.000 Zellen/ml verdünnt werden.

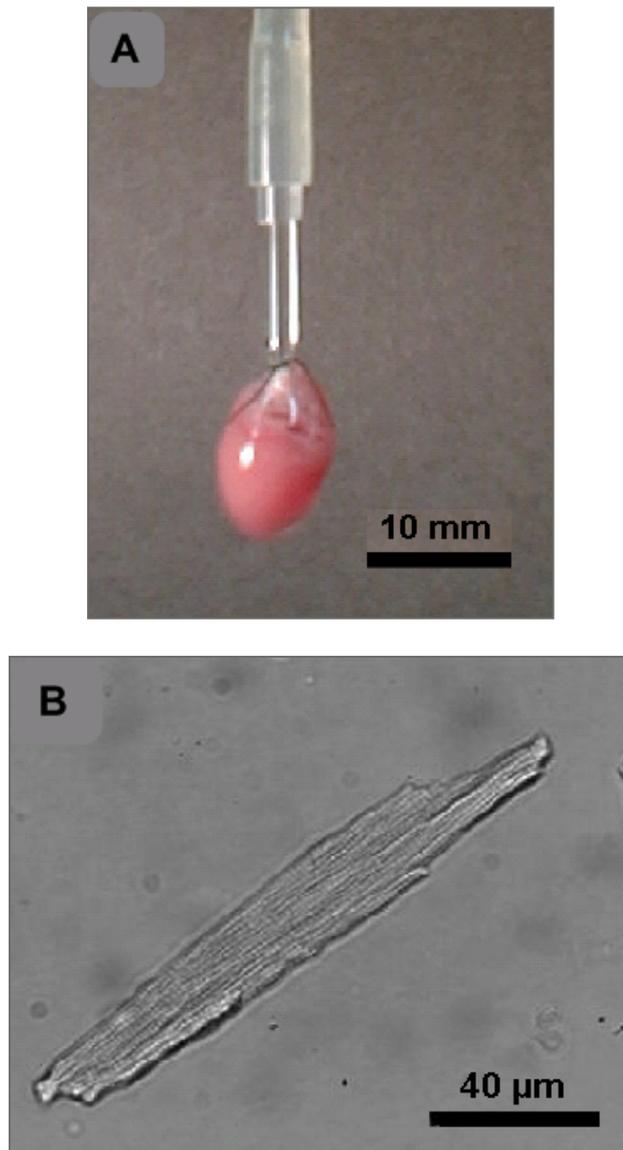


Abbildung 2-1 (modifiziert nach Shioya, 2007): **Isolierung der Kardiomyozyten.**

- A) Das mit der Perfusionsapparatur verbundene Herz.
- B) Isolierter Kardiomyozyt unter dem Mikroskop (40fache Vergrößerung).

2.2.2 Kultivierung von Kardiomyozyten

In einer 24-Loch-Platte wurden 20 Glasplättchen mit je 0,5 ml einer Lösung aus 10 ml auf Eis gekühlten PBS und 50 µl auf Eis aufgetautem Laminin beschichtet. Nach zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 2 % CO₂ konnte die Lösung abgesaugt und pro Loch jeweils 1 ml der Kardiomyozyten Lösung ausgesät werden. Nach einer weiteren Stunde wurden die Glasplättchen mit jeweils 0,5 ml des Kulturmediums gespült und in jeweils 1 ml des Kulturmediums kultiviert. Die Zellen (Abbildung 2-1 B) wurden im Brutschrank bei 37°C und 2% CO₂ aufbewahrt.

2.2.3 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik zur Erforschung der Eigenschaften und Funktion von Ionenkanälen wurde 1976 von Ernst Neher und Bert Sakmann eingeführt (Neher and Sakmann B., 1976). Für die Entwicklung dieser Technik erhielten Neher und Sakmann 1991 den Nobelpreis für Medizin.

Eine dünne, mit Elektrolytlösung gefüllte Messpipette wird an eine Zelle herangeführt. Im Bereich der entsprechenden Zellmembran, des Patches, wird über ein Schlauchsystem ein Unterdruck ausgeübt. Durch die Verbindung der Membran mit der Pipette entsteht ein elektrischer Widerstand zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung, der Giga-seal. Dadurch wird das abgegrenzte Membranareal mit den darin enthaltenen Ionenkanälen vom Rest der Membran physikalisch und elektrisch isoliert. Ein Strom durch einen Ionenkanal im Bereich des Patches fließt nun durch die Pipette und wird durch eine Elektrode in der Pipettenlösung registriert.

Durch Verstärkung des Signals über einen speziellen Rückkopplungsverstärker ist es möglich, die Aktivität einzelner Ionenkanäle zu messen. Diese Konfiguration wird *cell-attached* bezeichnet (Abbildung 2-2 A).

Durch Vergrößerung des Unterdrucks oder durch Anlegen kurzer Spannungimpulse kann der Patch geöffnet werden und so die ganze Zellmembran in der *whole-cell* genannten Konfiguration abgeleitet werden (Abbildung 2-2 B). Durch Mittelung vieler gleichzeitig aktiver Kanäle erhält man das Strommuster einer Zelle.

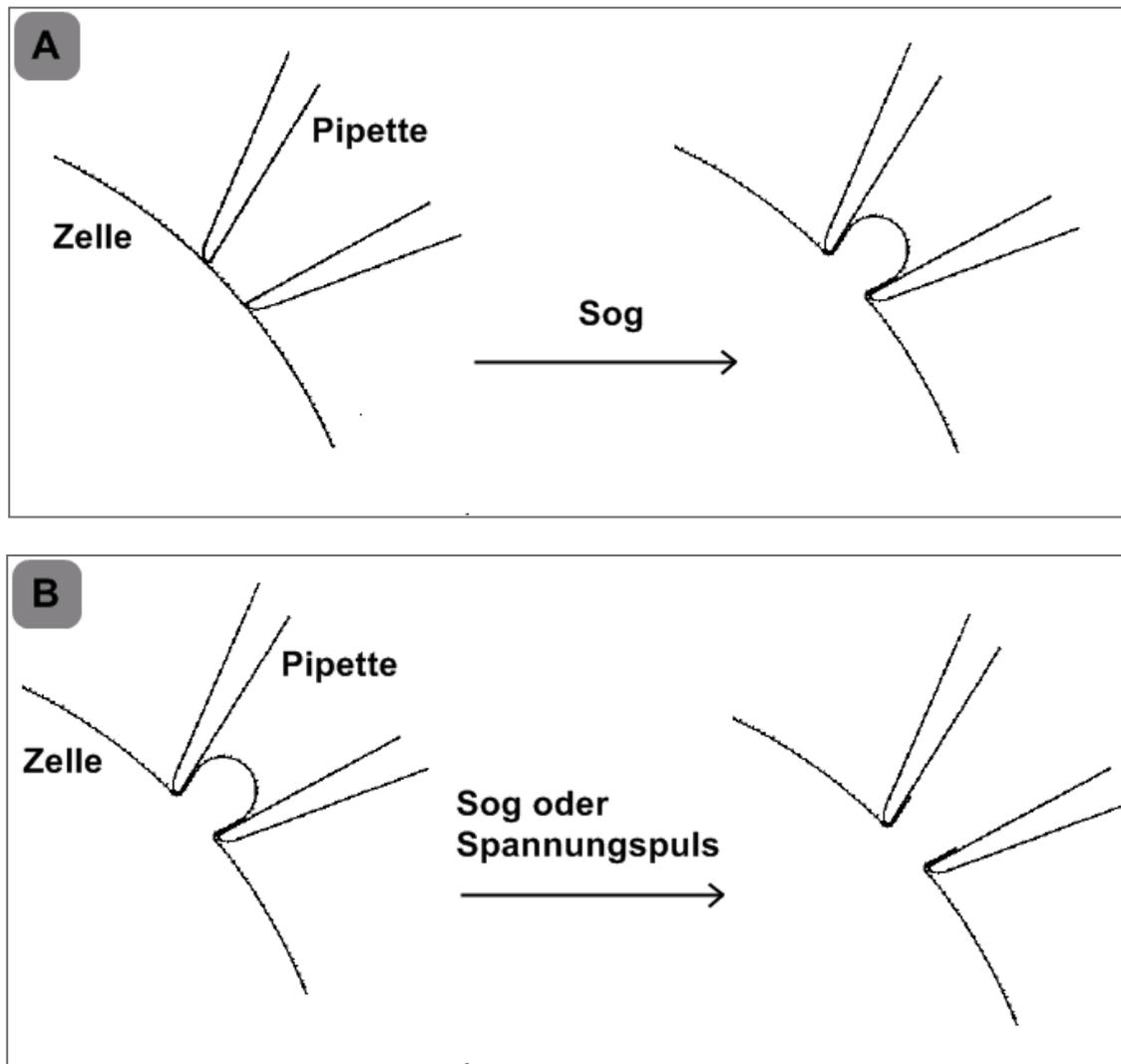


Abbildung 2-2 (modifiziert nach Hamill et al., 1981): **Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik.**

- A) Cell-Attached-Konfiguration: Ein kleiner Membranbereich (Patch) wird in die Pipette gesogen, so dass ein Gigaseal zwischen Pipettenspitze und Zellmembran entsteht.
- B) Whole-Cell-Konfiguration: Die Membran unterhalb der Pipette reißt durch Sog oder einen Spannungspuls ein.

2.2.4 Die Whole-Cell-Konfiguration

Die Whole-Cell-Konfiguration erfasst die gesamte Membran einer Zelle. Das Potential der Zelle wird durch das Kommandopotential (U_{soll}) vorgegeben. In Abhängigkeit von der Leitfähigkeit der Membran muss ein bestimmter Strom in die Zelle injiziert werden. Dieser Kompensationsstrom gibt Auskunft über die Membranleitfähigkeit.

Die Zellmembran lässt sich durch ihren Widerstand (R_m) und ihre Kapazität (C_m) beschreiben. Zwischen dem Inneren der Pipette und dem Zellinneren liegt der in

Serie zu R_m geschaltete Serienwiderstand (R_s) (Abbildung 2-3). Das Einsaugen von Membran- und Zellbestandteilen während des Einreißens der Membran erhöht R_s . Die Ladungsmenge des Stroms, der injiziert werden muss, ist von C_m abhängig. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs und damit die Geschwindigkeit der Spannungsänderung hängen von R_s ab.

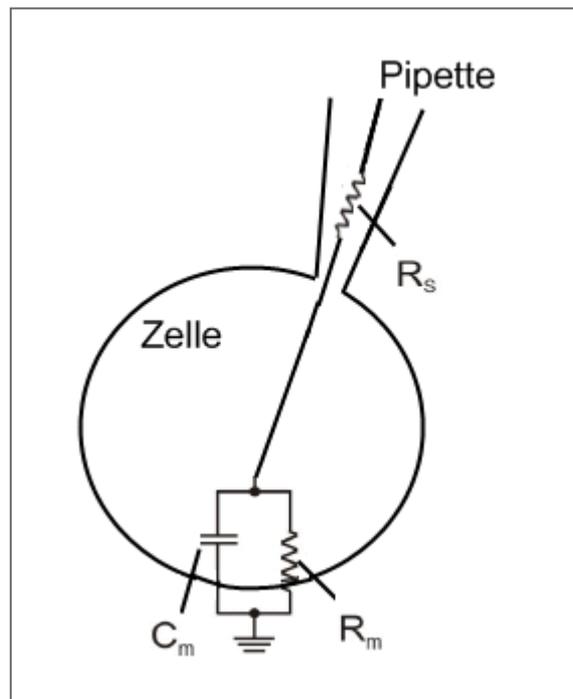


Abbildung 2-3 (modifiziert nach Numberger and Draghun): **Ersatzschaltbild der Whole-Cell-Konfiguration.**

Der Serienwiderstand (R_s) liegt zwischen der Messelektrode der Pipette und dem Zytosol der Zelle. Der Widerstand (R_m) und die Kapazität der Membran (C_m) definieren die elektrischen Eigenschaften der Membran.

Der Operationsverstärker (OPA) gleicht über die Ausgangsspannung (U_{aus}) die Spannungen des Pipettenpotentials (U_{pip}) und U_{soll} aus. U_{aus} bewirkt einen Strom über den Rückkopplungswiderstand (R_f) (Abbildung 2-4). Der dabei entstehende Kompensationsstrom entspricht dem Ladestrom der Spannungsänderung. Mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes lässt sich der über die Zellmembran fließende Strom über diese Spannungsänderung am bekannten R_f berechnen.

Bei der Kapazitätskompensation wird vorübergehend ein Strom in die Pipette geleitet und erscheint deswegen nicht mehr im Strom-Spannungs-Wandler. Ein Verstärker kompensiert Ladeströme auf Pipettenhalter, Pipette und der Zelle selbst. Schnelle

kapazitive Ströme entstehen unter anderem durch die Elektronenwanderung der Patch-Elektrode. Langsame kapazitive Ströme werden durch C_m hervorgerufen. Computergesteuerte Verstärker schließen automatisch von der Kompensation auf die Zellkapazität. Die Kapazität einer Zellmembran beträgt stets etwa $1 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$. Sie ist der Membranfläche proportional. Deswegen kann man von der Kapazität auf die Größe einer Zelle schließen (Numberger and Draghun).

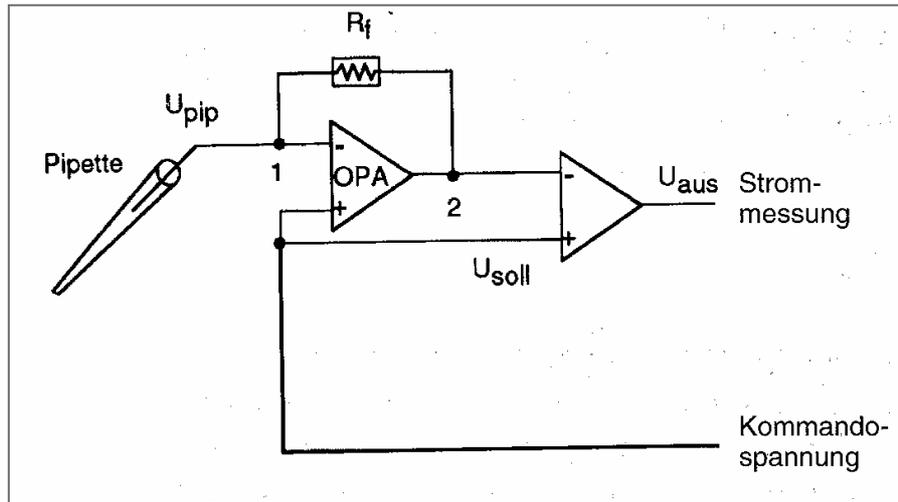


Abbildung 2-4 (übernommen aus Numberger and Draghun): **Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers.**

Der Operationsverstärker (OPA) gleicht das Potential der Pipette (U_{pip}) und das Kommandopotential (U_{soll}) aus. Die Ausgangsspannung (U_{aus}) ist proportional zum Strom. R_f = Rückkopplungswiderstand.

2.2.5 Messstand

Die Messapparatur bestand aus Verstärker (EPC9, HEKA Electronic, Lambrecht) mit Vorverstärker, PC, Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit Videoanlage und mechanischem Mikromanipulator. Die Anlage stand auf einem Tisch mit Dämpfern, die Schwingungen durch Erschütterungen der Umgebung verminderten. Ein Faraday'scher Käfig schirmte gegen Hintergrundrauschen ab. Die Messkammer war auf dem Objektstisch des Mikroskops angebracht (Abbildung 2-5). Über ein schnelles Perfusionssystem konnten pharmakologisch wirksame Substanzen appliziert werden. Eine Pumpe saugte überstehende Lösung ab. Es wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Die Referenzelektrode befand sich in der mit Extrazellulärlösung durchspülten Messkammer, die Messelektrode in der mit Intrazellulärlösung gefüllten Messpipette. Der Silberdraht der Messelektrode wurde regelmäßig chloriert. Die Signale wurden mit EPC9 verstärkt und mit HEKA PULSE and PULSEFIT (HEKA Electronic, Lambrecht) aufgenommen, digitalisiert und gespeichert. Die Daten wurden bei 4 - 20 kHz und bei 1,3 - 6,7 kHz gefiltert.

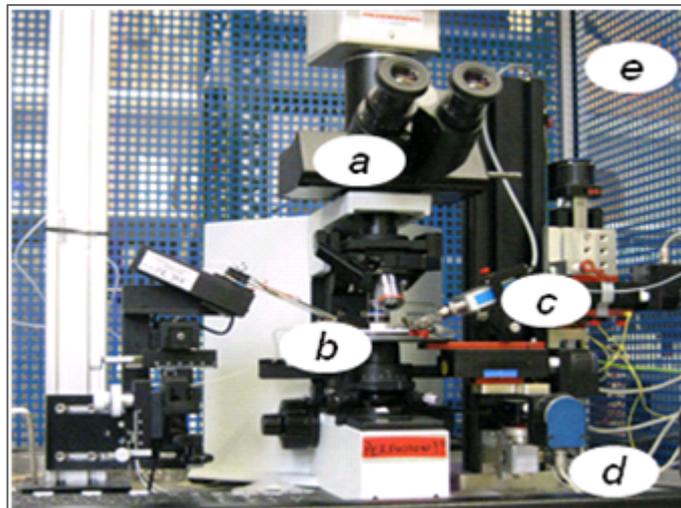


Abbildung 2-5: **Messapparatur** des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der TU München.

Das Mikroskop (a) umfasste den Objektstisch (b), auf dem die Messkammer stand. Seitlich davon befand sich der Mikromanipulator (c) mit dem Vorverstärker und dem Messpipettenhalter. Die Messapparatur war auf einem schwingungsgedämpften Tisch (d) in einem Faraday'schen Käfig (e) befestigt.

2.2.6 Messlösungen

Die Chemikalien der Stammlösungen waren in entsprechenden Volumina entionisiertem Wasser bei Raumtemperatur gelöst. Die Lösungen wurden autoklaviert und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Zusammensetzung der Extra- und Intrazellulärlösungen erfolgte nach Anderson (Dzhura et al., 2000) (Abbildung 2-6). Cäsium ersetzte Kalium. TEA blockierte Kaliumkanäle. HEPES pufferte den pH. EGTA wirkte als Kalziumchelator. Der pH-Wert der Extrazellulärlösung wurde mit CsOH auf 7,4 eingestellt. Sie wurde wöchentlich neu angesetzt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Der pH-Wert der Intrazellulärlösung wurde mit CsOH auf 7,2 eingestellt. Anschließend wurde sie auf 10 ml aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

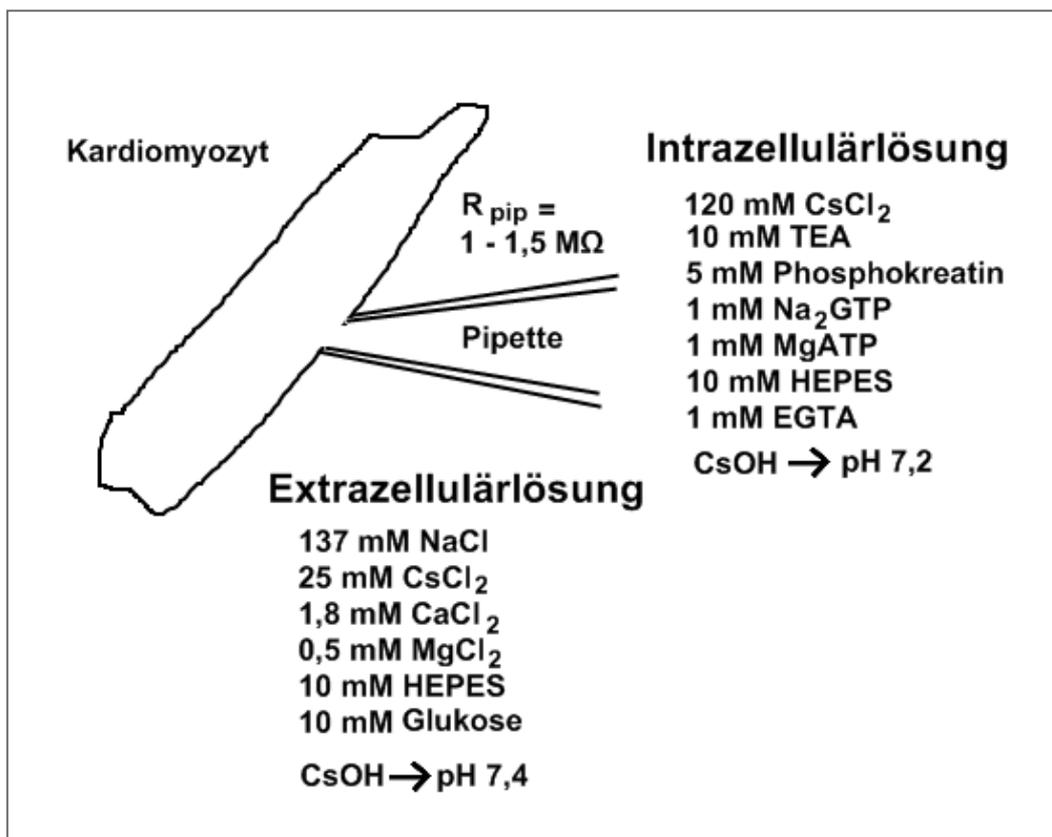


Abbildung 2-6: **Messlösungen**

Schematisch dargestellt ist der Versuchsaufbau einer Ableitung in Whole-Cell-Konfiguration mit den Zusammensetzungen der Messlösungen. R_{pip} = Widerstand der Pipette.

2.2.7 Messpipetten

Die Messpipetten wurden mit Hilfe eines horizontalen Pipettenziehgeräts (DMZ Universal Puller, Zeitz-Instrumente, Augsburg) aus dünnwandigem Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm; Innendurchmesser 1,17 mm) gezogen. Das Glas wurde bei höherer Hitze vorgezogen, in der Heizspirale rezentriert und dann bei niedriger Hitze auseinandergezogen (Abbildung 2-7). Durch Veränderungen der Parameter des Heiz- und Ziehmechanismus ließen sich die Größe der Pipettenöffnung und damit der elektrische Widerstand der Pipette beeinflussen. Die Widerstände der mit Intrazellulärlösung gefüllten Messpipetten lagen zwischen 1 und 1,5 M Ω .

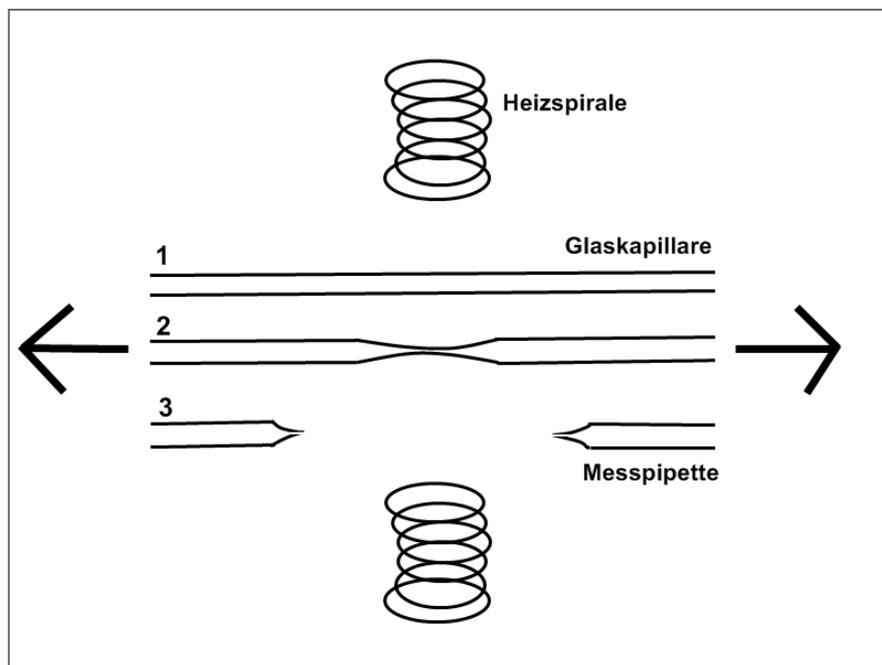


Abbildung 2-7: **Messpipetten**

Schematisch dargestellt ist die Funktionsweise eines horizontalen Pipettenziehgeräts. Eine Glaskapillare (1) wurde unter der Hitze einer Heizspirale auseinandergezogen (2), so dass dabei zwei Messpipetten entstanden (3).

2.2.8 Versuchsdurchführung

Alle Messungen wurden in Whole-cell-Technik bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Pipette wurde zur Hälfte mit Intrazellulärlösung gefüllt und in die Extrazellulärlösung eingetaucht. In dieser befanden sich die Zellen auf einem mit Laminin beschichteten Glasplättchen.

Ein Überdruck wurde an das Ende der Pipette angelegt und die Pipettenspitze unter Beobachtung über einen an das Mikroskop angeschlossenen Monitor langsam der Zelle genähert. Beim Kontakt mit der Zelle wurde unter leichtem Sog eine Verbindung zwischen der Pipette und der Zellmembran erzeugt. Dadurch entstand zwischen der Intrazellulärlösung im Pipetteninneren und der Extrazellulärlösung in der Messkammer ein hochohmiger elektrischer Widerstand, der Gigaohm, und so die Cell-Attached-Konfiguration.

Die schnelle kapazitive Komponente wurde kompensiert. Erneutes Saugen führte zum Aufreißen der Zellmembran und dadurch zur Whole-Cell-Konfiguration. Die langsame kapazitive Komponente wurde nun kompensiert und gleichzeitig die in Relation dazu stehende Größe der Zelle in pF berechnet. Anschließend wurden die Messungen anhand der unten aufgeführten Messprotokolle durchgeführt.

2.2.9 Messprotokolle

Für die Messung der Strom-Spannungs-Beziehung wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV mit einer Frequenz von 0,2 Hz in 10 mV-Schritten für 100 ms auf Potentiale von -80 mV bis +50 mV depolarisiert (Protokoll 3-1, Seite 35).

Das Protokoll der Steady-State-Inaktivierung begann mit einem 2000 ms langen Inaktivierungspuls auf Werte von -50 mV bis 0 mV. Direkt darauf folgte der Kontrollpuls mit einem Vorpuls von 50 ms bei -40 mV zur Inaktivierung von Natriumkanälen und dem eigentlichen Puls von 200 ms bei 0 mV (Protokoll 3-2, Seite 38).

Zur Messung der Erholung von der Inaktivierung wurde mit einem 2000 ms langen Puls bei Protokoll 3-3 und 200 ms langen Puls bei Protokoll 3-4 inaktiviert. Diesem Puls ging wiederum ein 50 ms lange Puls bei -40 mV zur Inaktivierung von Natriumkanälen voran. Auf ein unterschiedlich langes Pulsintervall zwischen 10 ms und 2800 ms bei -80 mV bei Protokoll 3-3 und bei -40 mV bei Protokoll 3-4 folgte der Kontrollpuls. Dieser entsprach dem zuvor bei der Steady-State-Inaktivierung beschriebenen Kontrollpuls (Protokoll 3-3, Seite 40; Protokoll 3-4, Seite 41).

Das Messprotokoll der frequenzabhängigen Fazilitierung nach Bers wurde der Publikation (Picht et al., 2007) entnommen. Der Puls entsprach dem bei der Steady-State-Inaktivierung beschriebenen Kontrollpuls. Dieser wurde 20fach mit einer Frequenz von 0,5 Hz wiederholt (Protokoll 3-5, Seite 44).

Die Messung der spannungsabhängigen Fazilitierung begann mit einem Testpuls, der dem Kontrollpuls der Steady-State-Inaktivierung entsprach. Nach 10 s bei -80 mV schloss sich ein Vorpuls von 200 ms bei +80 mV an. Daraufhin folgte im variablen Abstand ein Kontrollpuls. Dies war der gleiche Puls wie zu Beginn des Protokolls. Die Abstände betragen 50 ms (20Hz), 100 ms (10 Hz), 200 ms (5 Hz), 400 ms (2,5 Hz), 1000 ms (1 Hz), 2000 ms (0,5 Hz) und 2800 ms (circa 0,3 Hz) (Protokoll 3-6, Seite 49).

2.2.10 Datenanalyse

Die elektrophysiologischen Daten wurden mit der Software ORIGIN (v6. 1052, Microcal, MA, USA) ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Auf statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen Student T-Tests für unverbundene Stichproben geprüft. Die Nullhypothese wurde bei $p < 0.05$ verworfen, sofern nicht anders angegeben. Signifikante Änderungen sind in den Abbildungen mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Die Kinetik der Aktivierung von I_{Ca} wurde mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion aus den Werten der Strom-Spannungs-Beziehung berechnet:

$$I = G_{max} * (V - V_{rev}) / (1 + \exp((V_{0.5} - V) / k)).$$

Dabei ist I der maximale Einwärtsstrom beim entsprechenden Testpotential V , G_{max} die maximale Leitfähigkeit für Ca^{2+} , $V_{0.5}$ das halb-maximale Aktivierungspotential, V_{rev} das Umkehrpotential und k ein Kurvenfaktor.

Für die Auswertung der Daten der Steady-State-Inaktivierung wurde das halb-maximale Inaktivierungspotential ($V_{0.5}$) mit einer Boltzmann-Funktion berechnet:

$$I/I_{max} = (1 - A) / ((1 + \exp((V_{pre} - V_{0.5}) / k)) + A).$$

Dabei ist I/I_{max} das Verhältnis des maximalen Einwärtsstrom zur Amplitude des maximalen Stroms (I_{max}) am entsprechenden Potential (V_{pre}), k ist ein Kurvenfaktor und A ist die gesättigte Höhe von I/I_{max} .

Die Werte für die Erholung von der Inaktivierung wurden mit einer monoexponentiellen Funktion ausgewertet: $I_2 = I_1 + Max * (1 - \exp(-x / \tau_{recov}))$.

Die Amplitude von I_{Ca} beim zweiten Puls (I_2) wird als Anteil der Amplitude von I_{Ca} beim ersten Puls (I_1) ausgedrückt.

Die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 der Inaktivierung von I_{Ca} wurden von repräsentativen Stromspuren mit einem integrierten zweifach exponentiellen Verfahren der PULSEFIT Software berechnet.

2.3 Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München. Die Tierzucht und die Versuche mit den Tieren wurden entsprechend der geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden Ctr- und SF-Mäuse beider Geschlechter in einem Alter von 6 bis 18 Wochen verwendet.

Bei den SF-Mäusen handelte es sich um *knock-in* Mutanten der CaMKII-Phosphorylierungsstellen S1512 und S1570 der α_1 -Untereinheit des $\text{Ca}_v1.2$ mit dem Genotyp $\text{Ca}_v1.2^{\text{S1512A/S1570A}}$ auf beiden Allelen. Sie wurden mit Ctr-Mäusen mit dem Genotyp $\text{Ca}_v1.2^{\text{wt/wt}}$ verglichen. Homozygote SF-Mäuse waren lebensfähig, fruchtbar und die Verteilung der Genotypen ihrer Nachfahren folgte dem Mendel'schen Gesetz mit einem Verhältnis von 1:2:1 (Wildtyp, 26,7 %; Heterozygote, 48,7%; SF, 24,7%) (Fischer, 2009).

III. Ergebnisse

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Frage nach der Rolle der CaMKII bei der Fazilitierung von $Ca_v1.2$. Um die Auswirkungen der Mutation der Phosphorylierungsstellen der CaMKII auf die Funktion von $Ca_v1.2$ zu charakterisieren, wurden Kardiomyozyten von SF-Mäusen und Kontrolltieren isoliert. Diese Kardiomyozyten wurden in Patch-Clamp-Technik in Whole-Cell-Konfiguration elektrophysiologisch untersucht. Mit speziellen Pulsprotokollen wurde $Ca_v1.2$ aktiviert, inaktiviert oder fazilitiert, so dass sich ein Bild der Regulation des Kanals ergeben hat.

Zunächst wurden die Auswirkungen der SF-Mutation auf die Kinetik von I_{Ca} analysiert. Dafür wurde die Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung bestimmt.

3.1 Kinetik der Aktivierung

Zur Grundcharakterisierung der Aktivierung des Kanals wurden der maximale Kalziumeinstrom (I_{max}) und die Strom-Spannungs-Beziehung ermittelt. Dabei wurde die Amplitude von I_{Ca} auf die Zellgröße bezogen, um die Stromdichte zu erhalten. Aus diesen Daten wurden dann die Parameter für die Kinetik der Aktivierung berechnet.

3.1.1 Zellgröße

Ein Maß für die Zellgröße ist die Kapazität der Zellmembran, da sie proportional zur Fläche der Zellmembran ist ($1 \text{ pF} \approx 1 \text{ } \mu\text{m}^2$). Die Kapazität betrug bei den Kardiomyozyten der Kontrolltiere $120 \pm 6.5 \text{ pF}$ ($n = 15$) und bei den Kardiomyozyten der SF-Mäuse $117 \pm 13 \text{ pF}$ ($n = 11$) (Abbildung 3-1). Die Kardiomyozyten beider Genotypen besaßen demnach eine gewöhnliche Zellgröße. Daraus folgt, dass die SF-Mutation keinen Einfluss auf die Zellgröße hatte.

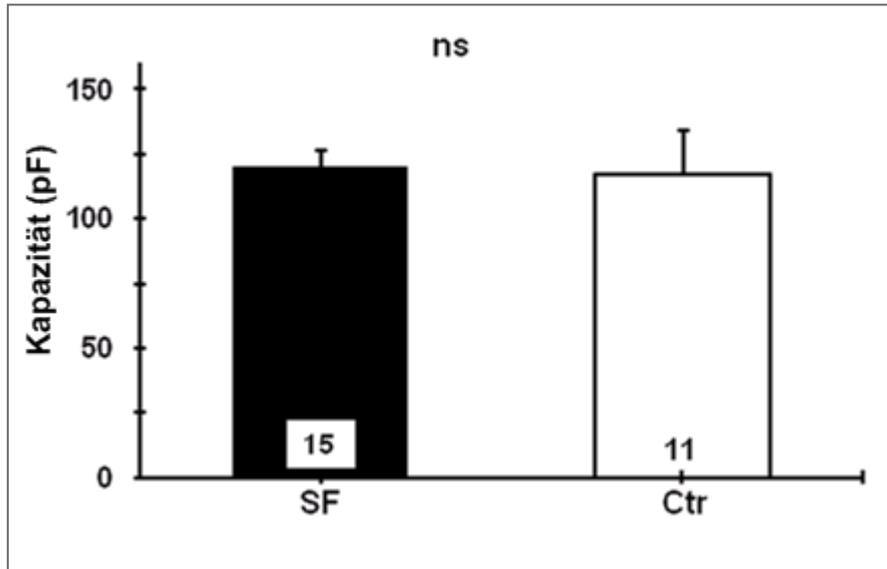


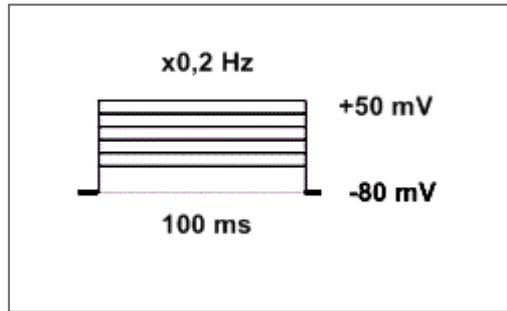
Abbildung 3-1: Die SF-Mutation beeinflusste die Kapazität der Kardiomyozyten nicht signifikant.

Die Kapazität der Zelle ist proportional zur Fläche der Zellmembran ($1 \text{ pF} \approx 1 \mu\text{m}^2$). Die Zellkapazität wurde aufgrund der Kompensation durch einen computergesteuerten Verstärker bestimmt. Ctr, n = 15; SF, n = 11; ns = nicht signifikant.

3.1.2 Strom-Spannungs-Beziehung

Werden die Stromamplituden bei verschiedenen Testspannungen gemessen, ergibt sich hieraus die Strom-Spannungs-Beziehung. Sie beschreibt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von I_{Ca} .

Durch ein negatives Haltepotential von -80 mV wurden alle Kanäle in den geschlossenen Zustand versetzt. Ein positiver Spannungspuls führte zur Öffnung eines Teils der Kanäle. Die dabei gemessene Stromamplitude beschreibt die Öffnung der Kanäle. Ausgehend vom Haltepotential bei -80mV wurde mit einer Frequenz von $0,2 \text{ Hz}$ in 10 mV -Schritten für 100 ms auf Potentiale von -40 mV bis $+50 \text{ mV}$ depolarisiert (Protokoll 3-1).



Protokoll 3-1: **Strom-Spannungs-Beziehung**

Um die Strom-Spannungs-Beziehung zu messen, wurde ausgehend vom Ruhepotential bei -80 mV die Spannung mit einer Frequenz von 0,2 Hz in Zehnerschritten bis auf +50 mV erhöht. Der Puls war jeweils 100 ms lang.

Die Amplitude von I_{Ca} wurde auf die Zellkapazität bezogen und stellte so ein Maß für die Dichte der Kalziumkanäle dar. Die Einheit der Stromdichte beträgt pA/pF. Die maximalen Werte für I_{Ca} wurden bei einer Spannung von 10 mV gemessen (Abbildung 3-2). Der maximale Kalziumeinstrom (I_{max}) betrug bei den Ctr Kardiomyozyten $-4,0 \pm 0,8$ pA/pF ($n = 6$) und bei den SF Kardiomyozyten $-3,7 \pm 0,4$ pA/pF ($n = 7$) (Tabelle 3-1). Die SF-Mutation hatte folglich keinen signifikanten Einfluss auf I_{max} .

Insgesamt zeigte die Strom-Spannungs-Beziehung beider Gruppen einen gewöhnlichen Verlauf. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Ctr und SF Kardiomyozyten (Abbildung 3-2).

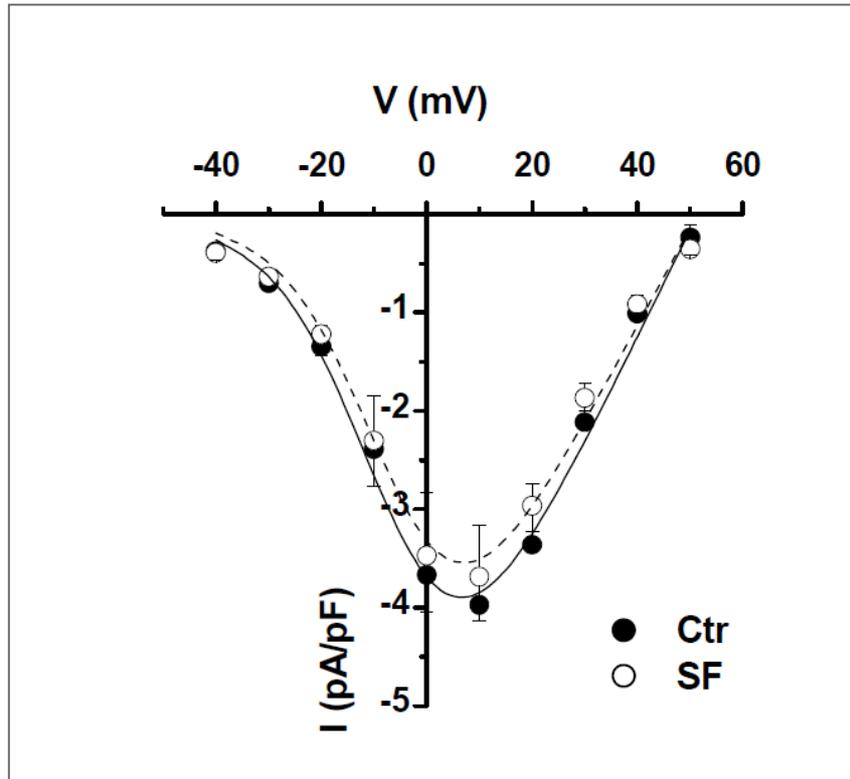


Abbildung 3-2: Die SF-Mutation hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Strom-Spannungs-Beziehung.

Die Größe des Kalziumeinstroms (I_{Ca}) unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant. Die Abbildung zeigt Mittelwerte nach Berechnung der Kurve mittels Boltzman-Funktion (siehe 2.2.10, Seite 31). Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-1 verwendet. Ctr, $n = 6$; SF, $n = 7$.

Die sich aus der Strom-Spannungs-Beziehung ergebenden Parameter wie das halbmaximale Aktivierungspotential ($V_{0.5}$), das Umkehrpotential (V_{rev}), die maximale Leitfähigkeit für Ca^{2+} (G_{max}) und der Steilheitsfaktor k unterschieden sich zwischen beiden Genotypen nicht (Tabelle 3-1). $V_{0.5}$ kennzeichnet das Potential, bei dem die Hälfte aller Kanäle aktiviert ist. V_{rev} ist das Gleichgewichtspotential, bei dem die Ionenflüsse über den Kanal im Gleichgewicht sind und deswegen kein Nettoionenfluss stattfindet. G_{max} stellt die maximale Leitfähigkeit einer Zelle für Ca^{2+} bezogen auf die Zellgröße dar. Der Faktor k ist ein Maß für die Steigung der Kurve und beschreibt die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Spannung.

Ergebnisse

	I_{\max} (pA/pF)	$V_{0.5}$ (mV)	k (mV)	V_{rev} (mV)	G_{\max} (pS/pF)
Ctr (n = 6)	-4.0 ± 0.8	-5.9 ± 0.6	9.4 ± 0.52	51.4 ± 1.5	0.11 ± 0.02
SF (n = 7)	-3.7 ± 0.4	-5.4 ± 2.0	9.0 ± 0.92	51.4 ± 1.0	0.10 ± 0.01

Tabelle 3-1: Die Kinetik der Aktivierung von I_{ca} unterschied sich zwischen Ctr und SF Kardiomyozyten nicht.

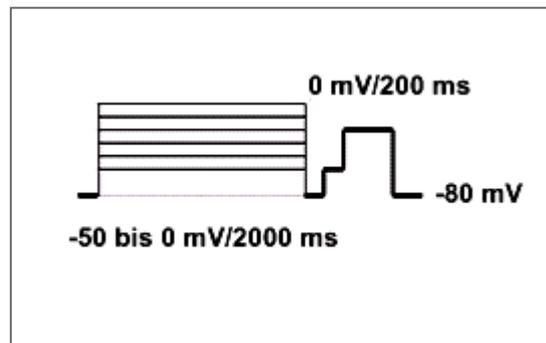
In der Tabelle sind die in der Abbildung 3-2 veranschaulichten Ergebnisse zusammengefasst: Die Werte wurden aus den Strom-Spannungs-Beziehungen mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion berechnet (siehe 2.2.10, Seite 31). I_{\max} ist der maximalen Einwärtsstroms, $V_{0.5}$ das halb-maximale Aktivierungspotential, k ein Kurvenfaktor, V_{rev} das Umkehrpotential und G_{\max} die maximale Leitfähigkeit für Ca^{2+} .

3.2 Kinetik der Inaktivierung

Inaktivierung stellte einen negativen Autoregulationsmechanismus von LTCC dar. Die Kinetik der Inaktivierung wurde unter Steady-State-Bedingungen beobachtet. Zudem wurde untersucht, wie sich I_{Ca} von der Inaktivierung des Kanals erholte.

3.2.1 Steady-State-Inaktivierung

Protokoll 3-2 folgend wurde die Steady-State-Inaktivierung untersucht. Auf unterschiedlich depolarisierende Vorpulse zwischen -50 mV und 0 mV folgte ein Sprung auf ein Testpotential von 0 mV.



Protokoll 3-2: **Steady-State-Inaktivierung.**

Das Ruhepotential lag bei -80 mV. Die 2000 ms langen Vorpulse (V_{pre}) waren variabel in der Höhe der Spannung. Nacheinander wurde die Spannung in Zehnerschritten von -50 auf 0 mV erhöht. Das Potential beim zweiten 200 ms langen Puls betrug 0 mV. Zuvor führten 50 ms bei -40 mV zur Inaktivierung von Natriumkanälen, deren Strom die Messungen gestört hätte.

Die Steady-State-Inaktivierung beschreibt die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung. Zusammen mit der Strom-Spannungs-Beziehung stellt sie die Spannungsabhängigkeit der Offen- und Geschlossen Zustände des Kanals dar.

Die beiden Genotypen zeigten Unterschiede in der Inaktivierung unter Steady-State-Bedingungen. Die Kurve der Inaktivierung unter Steady-State-Bedingungen war bei SF Kardiomyozyten im Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten zu negativeren Werten verschoben wurden (Abbildung 3-3). Die halbmaximale Inaktivierung unter Steady-State-Bedingungen ($V_{0.5}$) betrug bei Ctr Kardiomyozyten $-25 \pm 0,2$ mV und bei SF Kardiomyozyten $-29 \pm 1,6$ mV (Abbildung 3-3, Tabelle 3-2). Dieser Unterschied war signifikant.

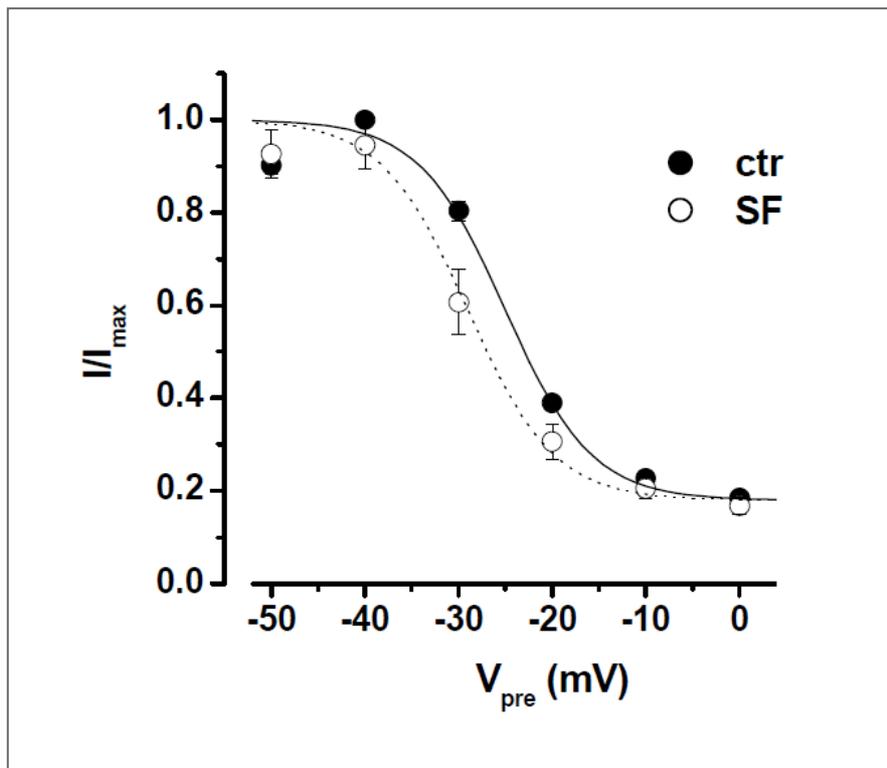
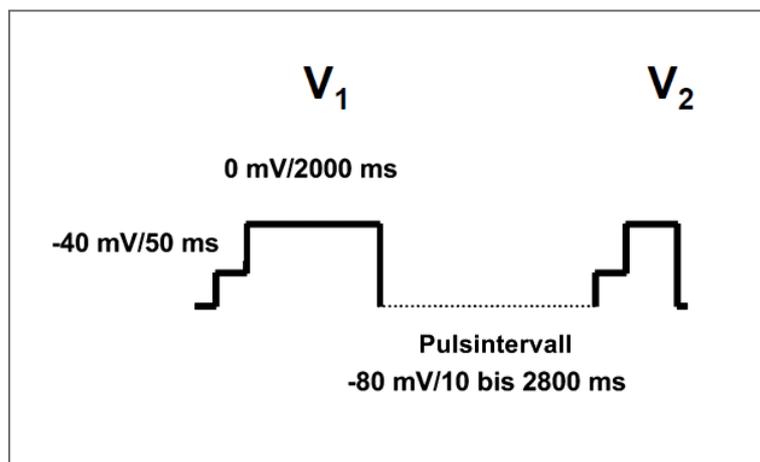


Abbildung 3-3: Die Kurve für die Steady-State-Inaktivierung der SF Kardiomyozyten wurde negativ verschoben.

Die relative Höhe des durch den zweiten Puls hervorgerufenen Einwärtsstroms (I/I_{\max}) wurde als Funktion von V_{pre} dargestellt. $V_{0.5}$ wurde mit einer Boltzmann Gleichung berechnet (siehe 2.2.10, Seite 31). Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-2 verwendet. Ctr, $n = 7$; SF, $n = 5$; $p < 0.05$.

3.2.2 Erholung von der Inaktivierung

Um die Erholung von der Inaktivierung zu messen, wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet (Protokoll 3-2 und Protokoll 3-3). Jeweils der erste Puls des Protokolls diente der Inaktivierung des Kanals. Anschließend wurde gemessen wie sich I_{Ca} von dieser Inaktivierung erholte. Die beiden Protokolle unterschieden sich in der Länge des ersten Pulses und in der Höhe der Spannung des Intervalls zwischen den beiden Pulsen.



Protokoll 3-3: Erholung von der Inaktivierung A.

Der erste Puls (V_1) war 2000 ms lang, die Spannung betrug 0 mV. Die darauf folgende Testspannung (V_2) bei 0 mV dauerte 200 ms. Wie im Protokoll 3-2 wurden vor den eigentlichen Pulsen Natriumkanäle inaktiviert. Die Länge des Intervalls bei -80 mV zwischen beiden Pulsen variierte. Die Abstände betragen 10 ms, 20 ms, 40 ms, 100 ms, 200 ms, 400 ms, 2000 ms und 2800 ms.

Die Erholung von der Inaktivierung zeigte bei Ctr und SF Kardiomyozyten einen nahezu identischen Verlauf, wenn ein Haltepotential von -80 mV verwendet wurde (Abbildung 3-4). Bei beiden Genotypen erholte sich I_{Ca} nach der Inaktivierung im Vergleich zum Ausgangswert maximal um das 1,16fache (Ctr $1,16 \pm 0,09$; SF $1,16 \pm 0,06$) (Tabelle 3-2). Die Kurven konnten mit einer einzigen, für beide Genotypen identischen Zeitkonstante angepasst werden.

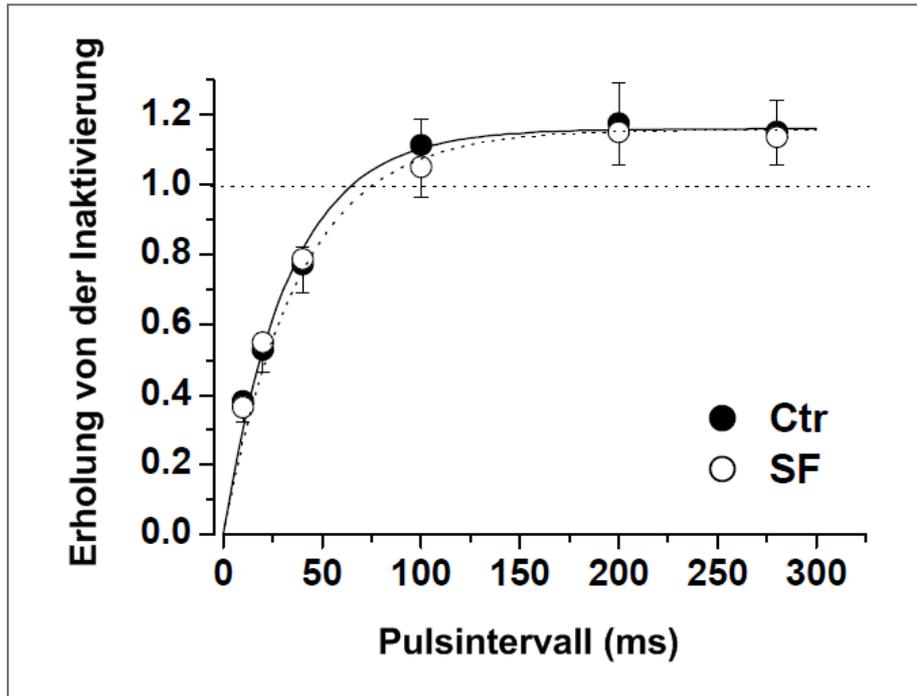
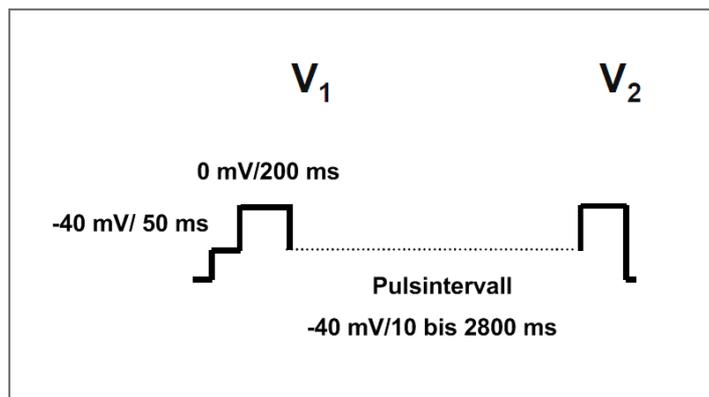


Abbildung 3-4: Bei einem Haltepotential von -80 mV zeigten die Kurven beider Genotypen für die Erholung von der Inaktivierung einen nahezu identischen Verlauf.

V_1 führte zur Inaktivierung von I_{Ca} . Durch V_2 konnte die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung gemessen werden. Die Spitze von I_{Ca} der Erholung wurde gegen I_{Ca} während des Zwischenpulsintervalls aufgetragen (siehe 2.2.10, Seite 31). Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-3 verwendet. Ctr, $n = 8$; SF, $n = 7$.



Protokoll 3-4: Erholung von der Inaktivierung B.

Im Unterschied zu Protokoll 3-2 betrug bei diesem Protokoll die Länge des ersten Pulses (V_1) 200 ms bei einer Spannung von 0 mV. Die darauf folgende Testspannung (V_2) dauerte ebenfalls 200 ms bei 0 mV. Das Intervall zwischen V_1 und V_2 variierte in seiner Länge bei einer Spannung von -40 mV. Die Abstände betragen 10 ms, 20 ms, 40 ms, 100 ms, 200 ms, 400 ms, 2000 ms und 2800 ms. Wie im Protokoll 3-2 wurden vor V_1 durch einen Vorpuls bei -40 mV Natriumkanäle inaktiviert. Dieser Vorpuls fehlte vor V_2 , da die Spannung zu diesem Zeitpunkt von vornherein bei -40 mV lag.

Ergebnisse

Bei einem Potential von -40 mV im Intervall zwischen den beiden Pulsen verlangsamte die SF-Mutation den Zeitverlauf der Erholung von der Inaktivierung signifikant. Die Zeitkonstante τ_{recovery} wurde durch die SF-Mutation fast verdoppelt. Sie betrug in Ctr Kardiomyozyten 362 ± 60 ms und in SF Kardiomyozyten 584 ± 20 ms (Abbildung 3-5, Tabelle 3-2).

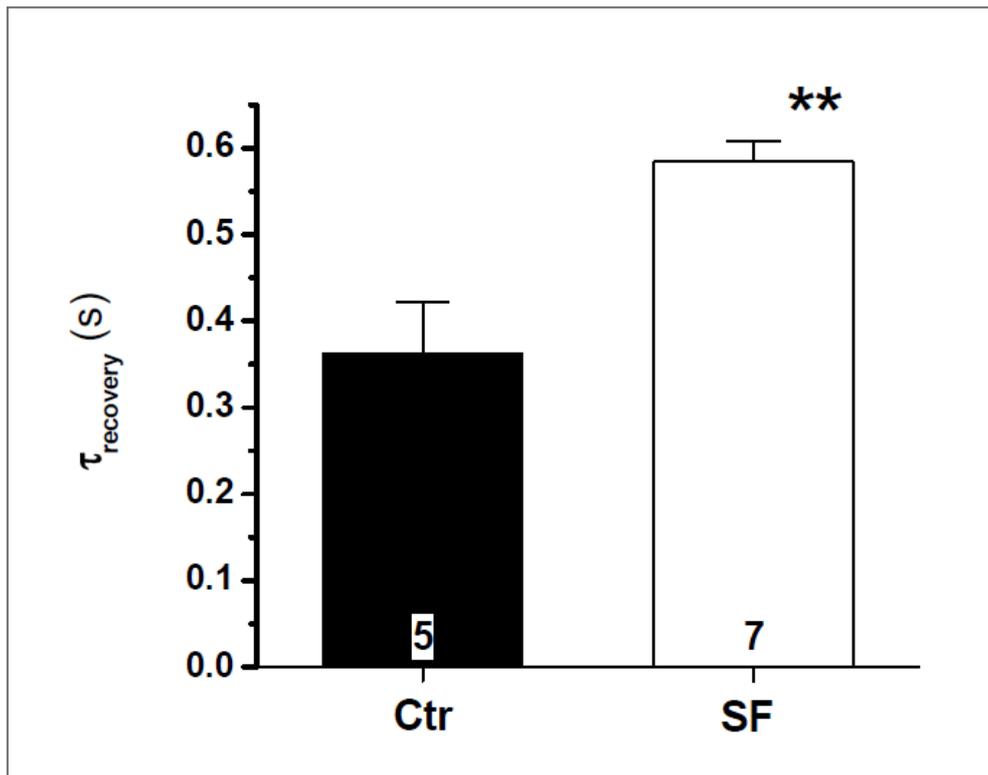


Abbildung 3-5: Bei einem Haltepotential von -40 mV war die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung der SF Kardiomyozyten signifikant erhöht.

Der Zeitverlauf der Erholung von der Inaktivierung war bei SF Kardiomyozyten verlangsamt. Für diese Messungen wurde Protokoll 3-4 verwendet. Ctr, $n = 5$; SF, $n = 7$; ** $p < 0.01$.

Diese Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung trat ohne signifikante Veränderungen der Zeitkonstanten der Inaktivierung während der Depolarisation ($\tau_{1\text{inak}}$ und $\tau_{2\text{inak}}$) auf (Tabelle 3-2).

Ergebnisse

	Steady-State-Inaktivierung			Erholung von der Inaktivierung				Inaktivierung	
	$V_{0.5}$ (mV)	k (mV)	A	Max	τ_{recov} (ms)	Max	τ_{recov} (ms)	$\tau_{1\text{inak}}$ (ms)	$\tau_{2\text{inak}}$ (ms)
Ctr	-24.9 ± 0.2	5.2 ± 0.4	0.13 ± 0.03	1.16 ± 0.09	33 ± 3.5	1.15 ± 0.1	362 ± 60	18.4 ± 1.0	77.7 ± 5.7
SF	$-29 \pm 1.6^*$	4.6 ± 0.2	0.18 ± 0.02	1.16 ± 0.06	38 ± 8.4	1.39 ± 0.1	$584 \pm 24^{**}$	16.2 ± 1.3	66.3 ± 5.2

Tabelle 3-2: **Steady-State-Inaktivierung, Erholung von der Inaktivierung unter verschiedenen Bedingungen und Inaktivierung von I_{Ca} bei Ctr und SF Kardiomyozyten.**

In der Tabelle sind die in den Abbildungen 3-3 bis 3-5 veranschaulichten Ergebnisse zusammengefasst: Das halb-maximale Inaktivierungspotential ($V_{0.5}$) wurde mit einer Boltzmann-Funktion berechnet (siehe 2.2.10, Seite 31). k ist ein Kurvenfaktor und A ist die gesättigte Höhe von I/I_{max} . Ctr, n = 7; SF, n = 5; *p < 0.05;

Die Werte für die Erholung von der Inaktivierung wurden mit einer monoexponentiellen Funktion ausgewertet (siehe 2.2.10, Seite 31). τ_{recov} ist eine Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung. Ctr, n = 8; SF, n = 7 (-80 mV); Ctr, n = 6; SF, n = 7 (-40 mV);

** signifikant unterschiedlich von Ctr bei p < 0.01;

$\tau_{1\text{inak}}$ und $\tau_{2\text{inak}}$ sind Zeitkonstanten der Inaktivierung von I_{Ca} (siehe 2.2.10, Seite 31).

Ctr, n = 16; SF, n = 12.

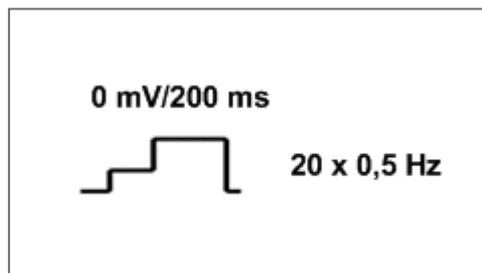
Aus diesen Versuchen folgt, dass die SF-Mutation nicht nur die Steady-State-Inaktivierung, sondern auch die Erholung von der Inaktivierung veränderte. Die SF-Mutation verschob die halb-maximale Inaktivierung unter Steady-State-Bedingungen zu negativeren Werten und verlangsamte die Erholung von der Inaktivierung bei einem Haltepotential von -40 mV ohne die Zeitkonstanten der Inaktivierung während der Depolarisation zu verändern.

3.3 Fazilitierung

Fazilitierung stellt einen positiven Autoregulationsmechanismus von LTCC dar. Durch repetitive Depolarisationen kommt es zur frequenzabhängigen Fazilitierung. Spannungsabhängig kann Fazilitierung durch eine starke Depolarisation hervorgerufen werden.

3.3.1 Frequenzabhängige Fazilitierung

Über die Kalziummenge, die den Kanal nach einer Serie von Depolarisationen passiert, kann frequenzabhängige Fazilitierung gemessen werden. Hierfür wurde der im Protokoll 3-5 beschriebene Puls mit einer Frequenz von 0,5 Hz 20fach wiederholt.



Protokoll 3-5: **Frequenzabhängige Fazilitierung.**

Ein Puls wurde mit einer Frequenz von 0,5 Hz 20fach wiederholt. Die Länge des Pulses betrug 200 ms, die Spannung lag bei 0 mV. Zuvor wurde der Natriumstrom durch einen 50 ms langen Puls auf -40 mV inhibiert.

Ein Anstieg der den Kanal passierenden Kalziummenge kann durch eine Veränderung Zeitkonstante der Inaktivierung, des Spitzenstroms oder beider Parameter veranschaulicht werden.

Die Zeitkonstante der Inaktivierung wurde durch die SF-Mutation nicht beeinflusst. Der Anteil des Reststroms am Gesamtstrom wurde nach unterschiedlichen Zeitspannen bestimmt, um das Ausmaß der Inaktivierung von I_{Ca} zu ermitteln. Es ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen feststellen (Abbildung 3-6, Tabelle 3-1). Dies lässt vermuten, dass die SF-Mutation die Inaktivierung von I_{Ca} nach einem einzelnen Puls nicht signifikant veränderte.

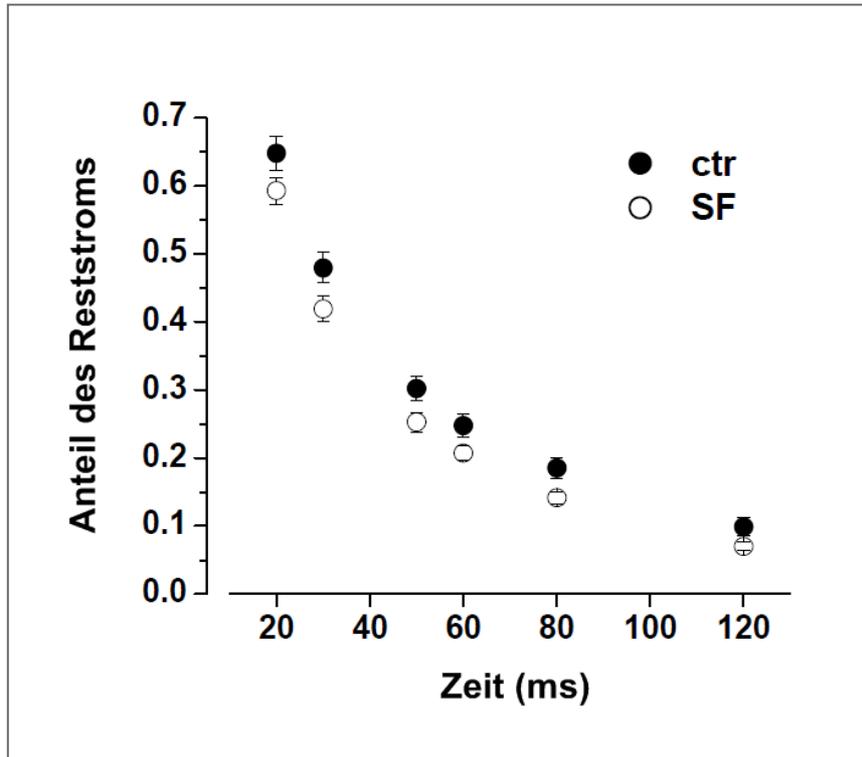


Abbildung 3-6: Der Anteil des Reststroms nach unterschiedlichen Zeitspannen unterschied sich zwischen Ctr und SF Kardiomyozyten nicht.

Das Ausmaß der Inaktivierung von I_{Ca} wurde durch den Anteil des Reststroms am Gesamtstrom nach unterschiedlichen Zeitspannen dargestellt. Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-5 verwendet. Ctr, n = 17; SF, n = 11.

Durch die SF-Mutation wurden der Spitzenstrom und damit die den Kanal passierende Kalziummenge verändert. I_{Ca} in Folge einer Depolarisation nach einer Ruhephase von über einer Minute bei -80 mV (Protokoll 3-5) war in SF Kardiomyozyten signifikant kleiner als in Ctr Kardiomyozyten. In Abbildung 3-7 sind als Beispiel zwei Stromspuren eines SF Kardiomyozyten und eines Ctr Kardiomyozyten übereinandergelegt. Abbildung 3-8 zeigt die Statistik von je zehn Messungen beider Genotypen.

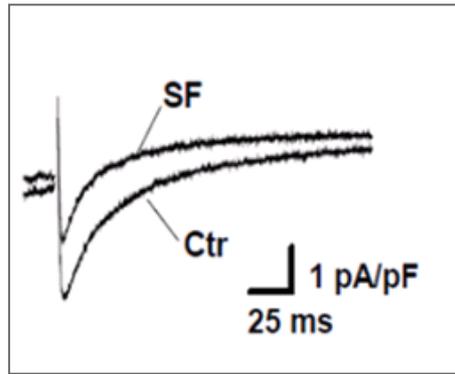


Abbildung 3-7: I_{Ca} beim ersten Puls nach einer Ruhephase war in SF Kardiomyozyten signifikant kleiner als in Ctr Kardiomyozyten - Beispiel.

Zwei repräsentative Stromspuren eines SF Kardiomyozyten und eines Ctr Kardiomyozyten. Eine Ruhephase von mindestens einer Minute bei -80 mV ging voraus. Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-5 verwendet.

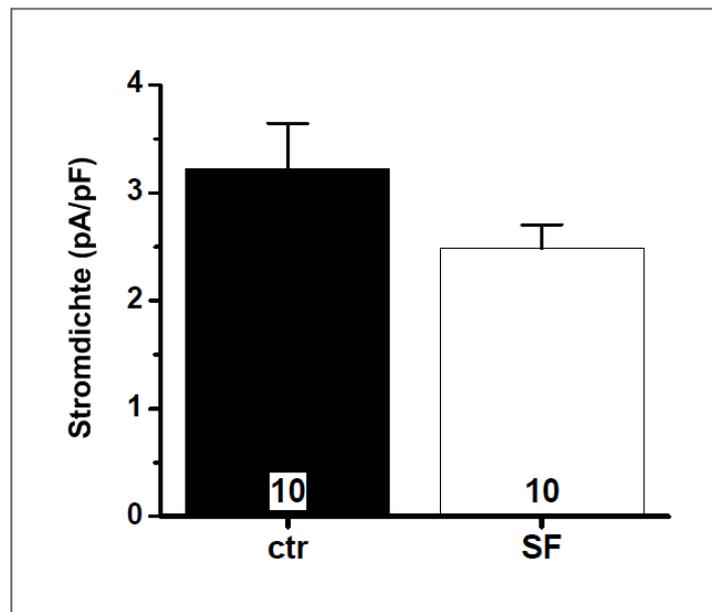


Abbildung 3-8: I_{Ca} beim ersten Puls nach einer Ruhephase war in SF Kardiomyozyten signifikant kleiner als in Ctr Kardiomyozyten - Statistik.

Mittelwert der Amplitude von I_{Ca} bezogen auf die Zellgröße. Eine Ruhephase von mindestens einer Minute bei -80 mV ging voraus. Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-5 verwendet.

SF, n = 10; Ctr, n = 10.

Ergebnisse

Die Kalziummenge die nach repetitiven Depolarisationen mit einer Frequenz von 0,5 Hz $Ca_v1.2$ passiert, war in SF Kardiomyozyten im Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten leicht reduziert (Abbildung 3-9). Für diese Berechnung wurden die Werte für I_{Ca} einer Zelle integriert und auf die Größe der Zelle bezogen. Die Kalziummenge, die durch den Kanal strömt, lässt sich als Fläche unter der Kurve von I_{Ca} veranschaulichen.

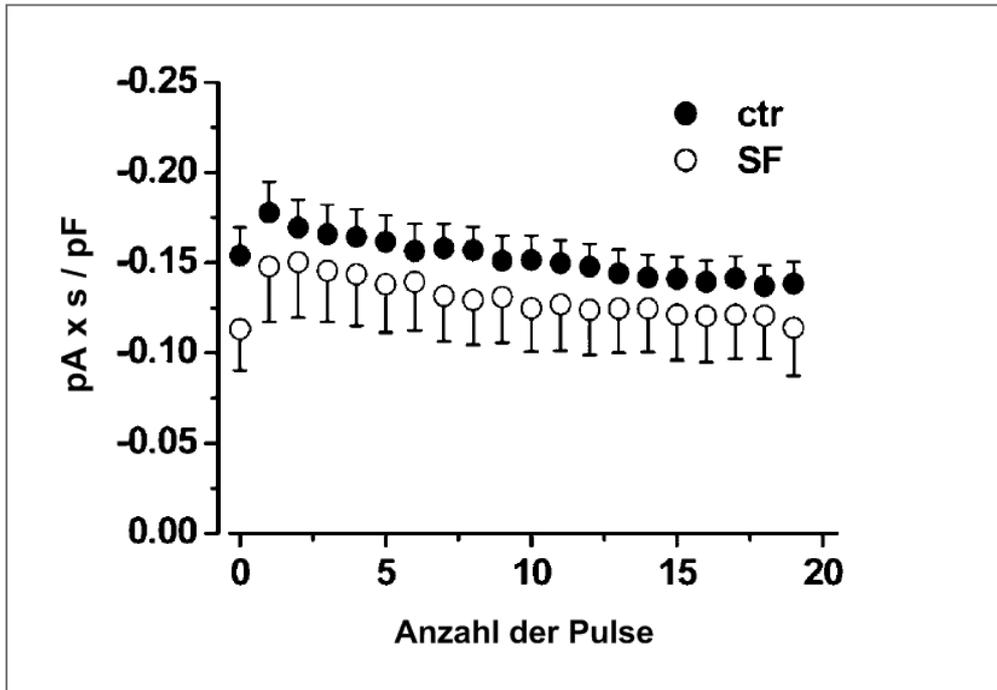


Abbildung 3-9: Der durch repetitive Depolarisationen hervorgerufene integrierte I_{Ca} war in SF Kardiomyozyten im Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten leicht reduziert.

SF Kardiomyozyten zeigten einen verminderten Spitzenstrom während der ersten Depolarisation. Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-5 verwendet. SF, n = 10; Ctr, n = 11.

Diese Art der Faszilitierung wurde nach intrazellulärer Perfusion mit dem Kalziumchelator BAPTA (10 mM) unterbunden (Abbildung 3-10). Dies zeigt, dass frequenzabhängige Faszilitierung als Form der CDF auf Ca^{2+} als Ladungsträger angewiesen ist.

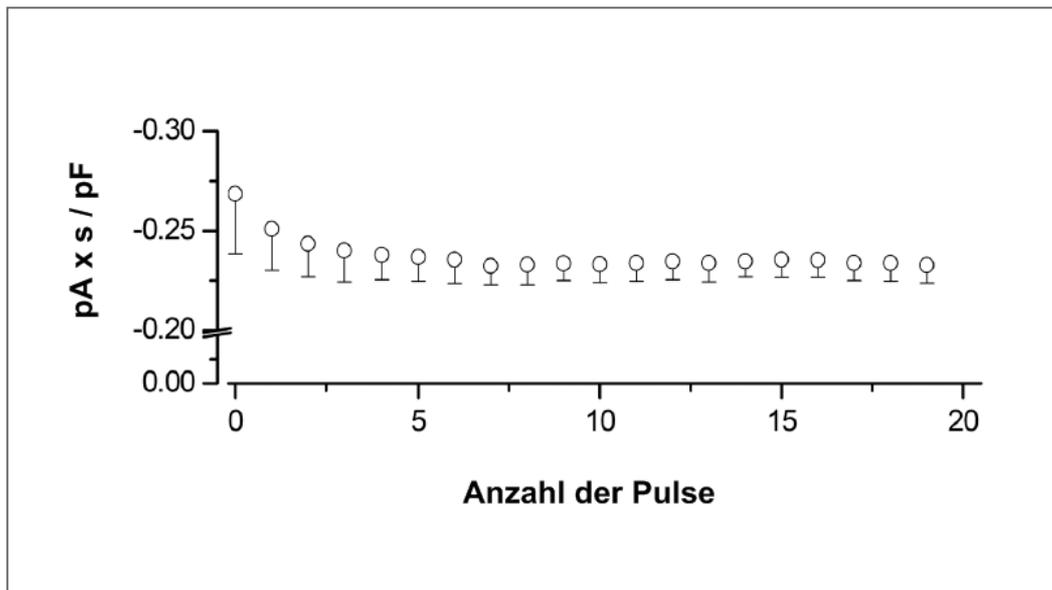


Abbildung 3-10: **Frequenzabhängige Fazilitierung fand unter intrazellulärer Perfusion von BAPTA nicht statt.**

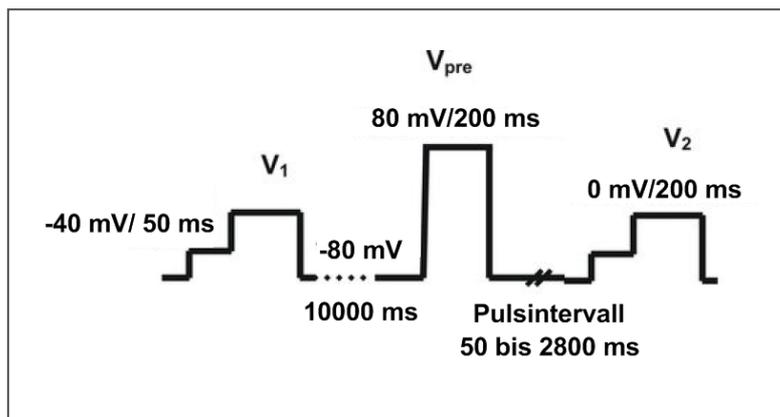
Der Spitzenstrom wurde auf den Spitzenstrom beim ersten Puls (100%) bezogen. Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-5 verwendet. Ctr mit $n = 3$.

Die Zeitkonstante der Inaktivierung von I_{Ca} unterschied sich nach einem einzelnen Puls zwischen den beiden Genotypen nicht. Der Spitzenstrom von I_{Ca} war in SF Kardiomyozyten in Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten reduziert. Dadurch war auch die den Kanal passierenden Kalziummenge, veranschaulicht als Fläche unter der Kurve von I_{Ca} , leicht reduziert.

Insgesamt war bei dieser Art der Fazilitierung der Effekt der SF-Mutation geringer als bei der im Folgenden beschriebenen VDF.

3.3.2 Spannungsabhängige Fazilitierung

Mit Protokoll 3-6 wurde Fazilitierung spannungsabhängig hervorgerufen. Nach einem Vorpuls von 200 ms bei +80 mV wurde das Haltepotential für unterschiedliche Intervalle auf -80 mV zurückgeführt bevor der eigentliche Testpuls folgte. Die Abstände im Pulsintervall betragen 50 ms, 100 ms, 200 ms, 400 ms, 1000 ms, 2000 ms und 2800 ms.



Protokoll 3-6: Spannungsabhängige Fazilitierung.

Der erste Puls (V_1) hatte eine Länge von 200 ms bei einer Spannung von 0 mV. Darauf folgte ein Intervall von 1000 ms bei einem Haltepotential von -80 mV. Nach einem 200 ms langen Vorpuls (V_{pre}) bei +80 mV wurde das Haltepotential für einen Intervall unterschiedlicher Länge auf -80 mV zurückgeführt. Die Abstände betragen 50 ms, 100 ms, 200 ms, 400 ms, 1000 ms, 2000 ms und 2800 ms. Der abschließende Puls (V_2) entspricht in Länge und Höhe der Spannung V_1 . Dem ersten und letzten Puls gingen jeweils ein 50 ms langer Puls bei -40 mV zur Inaktivierung von Natriumkanälen voraus.

Bei einem Pulsintervall von 100 ms war VDF in SF Kardiomyozyten im Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten signifikant reduziert. Dies ist in Abbildung 3-11 anhand einzelner Stromspuren beider Genotypen veranschaulicht.

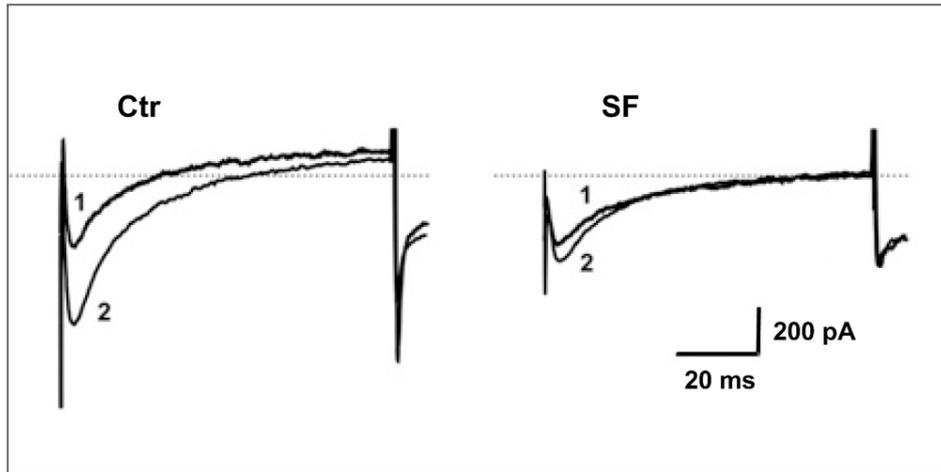


Abbildung 3-11: **Spannungsabhängige Fazilitierung war in SF Kardiomyozyten signifikant kleiner als in Ctr Kardiomyozyten - Beispiel.**

Dargestellt sind Stromspuren beider Genotypen vor (1) und nach (2) einem depolarisierenden Puls bei einem Pulsintervall von 100 ms (Protokoll 3-6). Spannungsabhängige Fazilitierung (VDF) von I_{Ca} war bei SF Kardiomyozyten (rechts) im Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten (links) signifikant reduziert.

Bei einem Intervall von 200 ms verdoppelte sich I_{Ca} der Ctr Kardiomyozyten beinahe (Abbildung 3-12). Ein Pulsintervall von 200 ms entspricht einer Herzfrequenz von 5 Hz. Dieser Wert liegt im Bereich der normalen Herzfrequenz einer Maus von 5 bis 10 Hz (300 bis 600/min).

Durch einer Verlängerung des Intervalls auf 400 ms und 1000 ms verringerte sich I_{Ca} wieder. Bei einer weiteren Verlängerung des Intervalls auf 2000 ms und 2800 ms ging I_{Ca} fast auf den Ausgangswert zurück.

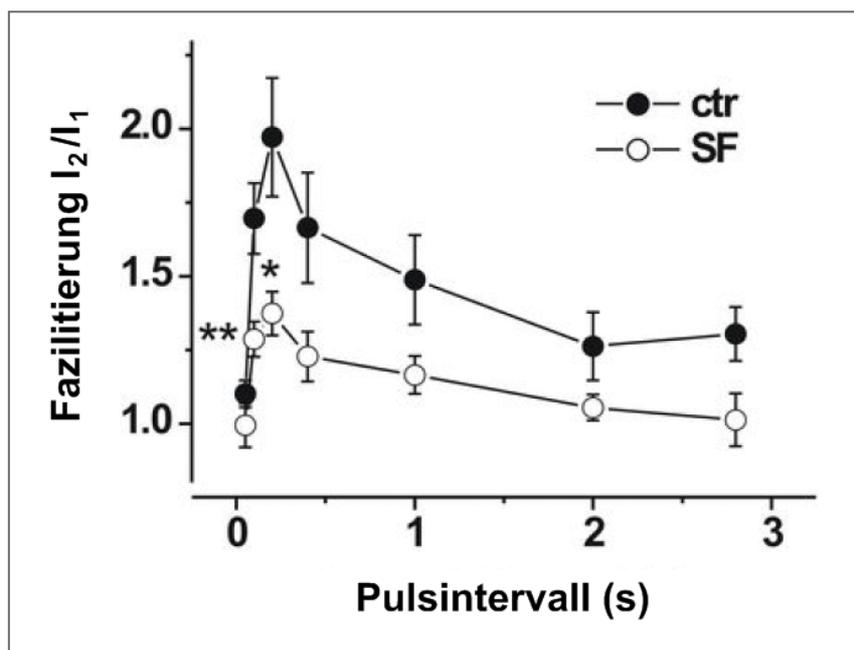


Abbildung 3-12: **Spannungsabhängige Fazilitierung war in SF Kardiomyozyten signifikant kleiner als in Ctr Kardiomyozyten - Statistik.**

Die spannungsabhängige Fazilitierung (VDF) von I_{Ca} wurde bei kurzen Intervallen bei SF Kardiomyozyten im Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten signifikant reduziert. Fazilitierung wurde als Verhältnis der Spitzenströme (I_2/I_1) während V_2 und V_1 berechnet. Die Abstände im Pulsintervall betragen 50 ms, 100 ms, 200 ms, 400 ms, 1000 ms, 2000 ms und 2800 ms. Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-6 verwendet. Ctr, n = 10; SF, n = 9; * p < 0.05, ** p < 0.01.

Insgesamt war VDF in SF Kardiomyozyten in Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten bei kurzen Zwischenpulsintervallen signifikant reduziert. Die Phosphorylierung der Serine 1512/1570 durch CaMKII ist nur in Kardiomyozyten der Kontrolltiere, nicht aber in Kardiomyozyten der Mutanten möglich. Folglich unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass diese Phosphorylierungsstellen für VDF notwendig sind.

3.4 KN-93

Um den Einfluss der Phosphorylierung von $Ca_v1.2$ auf CDF weiter zu überprüfen, wurde VDF beider Genotypen mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 untersucht. Hierfür wurde KN-93 über eine Superfusionseinrichtung in die Extrazellulärlösung gegeben. Eine Reduktion der Fazilitierung bei den Ctr Kardiomyozyten, nicht aber bei den SF Kardiomyozyten, würde in Ergänzung zu den Experimenten aus Versuch 3.3 die wichtige Rolle der CaMKII bei CDF bestätigen. Abbildung 3-13 zeigt jeweils eine Messung der VDF von I_{Ca} in Ctr Kardiomyozyten ohne und mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93. In Vergleich mit Abbildung 3-11 wird deutlich, dass sich I_{Ca} unter KN-93 durch ein depolarisierendes Pulsprotokoll nicht mehr vergrößerte. Daraus folgt, dass KN-93 VDF in Ctr Kardiomyozyten verhinderte.

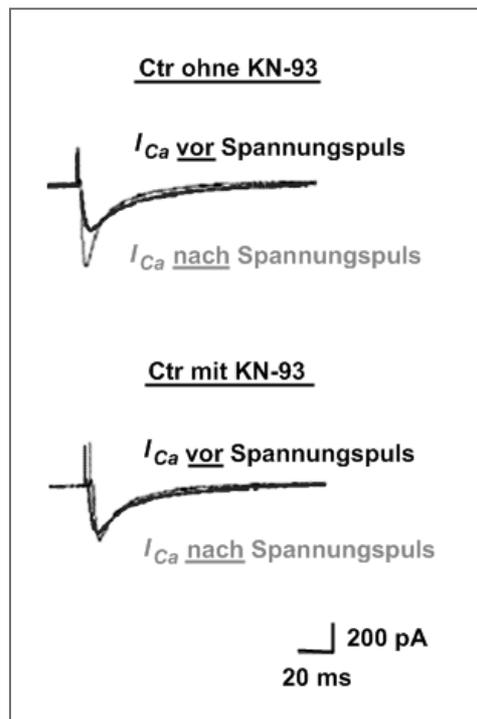


Abbildung 3-13: **KN-93 verhinderte spannungsabhängige Fazilitierung der Ctr Kardiomyozyten - Beispiel.**

Ohne Vorbehandlung mit KN-93 (oben) kam es in Ctr Kardiomyozyten zur spannungsabhängigen Fazilitierung. I_{Ca} nach einem depolarisierenden Puls (grau) war im Gegensatz zum Referenzstrom davor (schwarz) vergrößert. Nach Vorbehandlung mit $0,5 \mu\text{M}$ KN-93 (unten) wurde spannungsabhängige Fazilitierung von I_{Ca} der Ctr Kardiomyozyten auf das Level der SF Kardiomyozyten reduziert. Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-6 mit einem konstanten Pulsintervall von 100 ms verwendet. Beispiel zweier Stromspuren für Ctr und SF Kardiomyozyten.

Aus der Statistik der Messungen in Abbildung 3-14 wird deutlich, dass der CaMKII-Inhibitor KN-93 VDF von I_{Ca} in Ctr Kardiomyozyten auf das gleiche Niveau wie in SF Kardiomyozyten reduzierte.

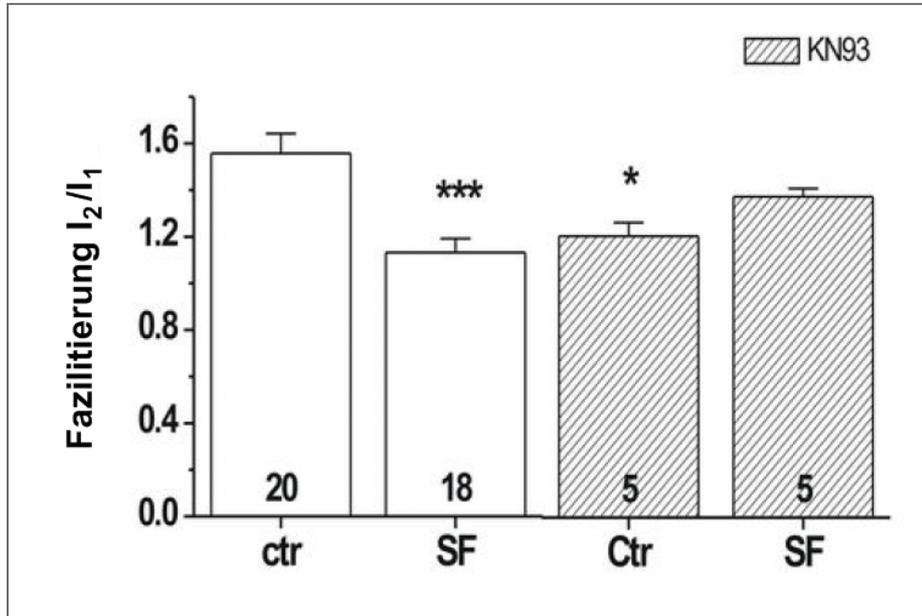


Abbildung 3-14: KN-93 verhinderte spannungsabhängige Fazilitierung der Ctr Kardiomyozyten - Statistik.

Im Vergleich mit Ctr Kardiomyozyten ohne Vorbehandlung mit KN-93 reduzierte KN-93 spannungsabhängige Fazilitierung von Ctr (* $p < 0.02$) und SF (***) $p < 0.001$) Kardiomyozyten um das gleiche Ausmaße. Für diese Messungen wurde das Protokoll 3-6 mit einem konstanten Pulsintervall von 100 ms verwendet. Ctr, $n = 20$; SF, $n = 18$; Ctr mit KN-93, $n = 5$; SF mit KN-93, $n = 5$.

KN-93 verminderte VDF von I_{Ca} der SF Kardiomyozyten aber nicht weiter. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass weitere CaMKII-abhängige Phosphorylierungsstellen für VDF benötigt werden.

IV. Diskussion

Für die Regulation von I_{Ca} über LTCC in Kardiomyozyten ist $[Ca^{2+}]_i$ entscheidend. Ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ führt zu gegensätzlichen, aktivitätsabhängigen Regulationsmechanismen: Fazilitierung und Inaktivierung. Eine Voraussetzung sowohl für CDF, als auch für CDI ist die Bindung von CaM an das IQ-Motiv am Carboxyterminus der α_1 -Untereinheit des Kanals (Zühlke and Reuter, 1998; Peterson et al., 1999; Zühlke et al., 1999; Zühlke et al., 2000; DeMaria et al., 2001; Van Petegem et al., 2005; Poomvanicha et al., 2011). CDF von LTCC beruht auf CaM und/oder der Aktivität der CaMKII. Dieser als *mode2* genannten Zustand ist durch längere Öffnungszeiten und eine hohe Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals gekennzeichnet (Dzhura et al., 2000).

In vitro Versuche identifizierten die Serine 1512 und 1570 am Carboxyterminus der α_1 -Untereinheit des $Ca_v1.2$ als Phosphorylierungsstellen der CaMKII (Erxleben et al., 2006; Lee et al., 2006). Eine Mutation dieser Serine zu Alaninen hemmte *in vitro* CDF nahezu vollständig und erhöht CDI leicht (Lee et al., 2006). Die Mechanismen der Regulation von LTCC durch CaMKII und der Interaktion zwischen CaMKII und dem IQ-Motiv *in vivo* sind komplex. Bislang konnte die funktionelle Signifikanz der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung von $Ca_v1.2$ nicht *in vivo* untersucht werden. Die Generierung einer *knock-in* Mauslinie für die Phosphorylierungsstellen der CaMKII ermöglichte es diesen Regulationsmechanismus von $Ca_v1.2$ *in vivo* zu untersuchen. Durch Mutation der Phosphorylierungsstellen der CaMKII entstand die lebensfähige SF-Mauslinie (Fischer, 2009). Dieser Eingriff in den Regulationsmechanismus von $Ca_v1.2$ wirkte sich auf die Tiere *in vivo* und auf ihre Zellen *in vitro* aus. Durch elektrophysiologische Untersuchungen der Kardiomyozyten der SF-Mäuse konnten Rückschlüsse auf die Regulation von $Ca_v1.2$ gezogen werden.

4.1 Fazilitierung und Inaktivierung

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Versuche unterstützen die Hypothese, dass CaMKII-abhängige Phosphorylierung für Ca^{2+} /CaM-abhängige Fazilitierung kardialer $\text{Ca}_v1.2$ Kanäle essentiell ist. *Dzhura et al* belegten, dass eine konstitutiv aktive CaMKII die Einzelkanalaktivität von LTCC vergrößert (Dzhura et al., 2000). Im Einklang hiermit zeigten diese Ergebnisse, dass Phosphorylierung von S1512 und S1570 durch CaMKII für CDF notwendig ist und maximale VDF ermöglicht.

Die Mutation der beiden Serine hatte keine Auswirkungen auf die Kinetik der Aktivierung von I_{Ca} . Die Strom-Spannungsbeziehung war in SF Kardiomyozyten in Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten unverändert.

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurde in SF Kardiomyozyten zu negativeren Potentialen verschoben. I_{Ca} wurde in SF Kardiomyozyten in Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten schon bei negativeren Potentialen inaktiviert. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde bereits gezeigt, dass die Hemmung der CaMKII eine negative Verschiebung der VDI verursacht (Jiang et al., 2008; Vinogradova et al., 2000).

In SF Kardiomyozyten führt eine Verstärkung der Inaktivierung zu einer Verminderung der Fazilitierung. Dies bestätigt die Hypothese, dass eine verminderte Inaktivierung die Hauptdeterminante der Fazilitierung ist (Guo and Duff H. J., 2003). Nach diesem negativen Feedback-Modell ruft die Kalziumfreisetzung bei jeder Depolarisation eine Inaktivierung von I_{Ca} hervor und beeinflusst so das Ausmaß der nächsten Kalziumfreisetzung. Eine Verminderung dieses negativen Regulationsmechanismus vergrößert I_{Ca} .

Die SF-Mutation beeinflusste nicht nur die Inaktivierung, sondern auch die Erholung von der Inaktivierung. Diese ist eine weitere wichtige Determinante der Verfügbarkeit von Kanälen (Guo and Duff H. J., 2006). Im CaMKII *knock-out* Mausmodell erholte sich I_{Ca} nur verzögert von einer Inaktivierung (Xu et al., 2010). *Guo et al* zeigten, dass $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Erholung von der Inaktivierung verlangsamt, während CaMKII diese verstärkt (Guo and Duff H. J., 2006). Auf diesem Weg kompensiert CaMKII den negativen Effekt einer erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf die Erholung von der Inaktivierung bei hohen Herzfrequenzen. Entsprechend war die Erholung von der Inaktivierung in SF

Kardiomyozyten verlangsamt. Diese Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung trat ohne signifikante Veränderungen der Zeitkonstanten der Inaktivierung während der Depolarisation auf. Daraus folgt, dass die SF-Mutation CDI nicht signifikant beeinflusste. CDI und CDF sind eng miteinander verknüpft, beruhen aber auf unterschiedlichen, unabhängigen strukturellen Mechanismen.

Indem CaMKII die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu positiveren Potentialen verschiebt und die Erholung von der Inaktivierung verstärkt, wird $Ca_v1.2$ aktiviert (Guo and Duff H. J., 2006). In SF Kardiomyozyten inaktivierte I_{Ca} schon bei negativeren Potentialen und erholte sich langsamer von der Inaktivierung.

Frequenzabhängige Fazilitierung ist kalziumabhängig und wurde durch intrazelluläre Perfusion mit BAPTA verhindert. Die Amplitude der ersten Depolarisation nach einer Ruhephase bei -80 mV war in SF Kardiomyozyten reduziert. Dies deutet daraufhin, dass in ventrikulären Kardiomyozyten eine basale CaMKII-Aktivität besteht, die in SF Kardiomyozyten reduziert ist. Ähnliches wurde bereits von Sinusknotenzellen berichtet. Eine basale CaMKII-Aktivität scheint für die Entstehung von Schrittmacher-Aktionspotentialen notwendig zu sein. Denn eine Hemmung der CaMKII lässt die Aktivität der Sinusknotenzellen vollständig ausfallen (Vinogradova et al., 2000).

In SF Kardiomyozyten war die Amplitude von I_{Ca} bei der ersten Depolarisation reduziert, während die Inaktivierung von I_{Ca} während der Depolarisation unverändert blieb. Dies sind die beiden Determinanten der Kalziummenge, die $Ca_v1.2$ bei frequenzabhängiger Fazilitierung passiert. Integration von I_{Ca} bei einer gesteigerten Depolarisationsfrequenz zeigte entsprechend in SF Kardiomyozyten eine reduzierte den Kanal passierende Kalziummenge im Vergleich mit Ctr Kardiomyozyten.

VDF von I_{Ca} reduzierte sich in SF Kardiomyozyten um fast die Hälfte, wenn nach einem depolarisierenden Puls das Haltepotential für 200ms auf -80 mV zurückgeführt wurde. Hieraus folgt, dass Phosphorylierung von S1512/1570 eine Voraussetzung für maximale VDF ist. Diese Phosphorylierung erfolgt durch CaMKII. Denn eine Inhibierung der CaMKII reduzierte VDF in Ctr Kardiomyozyten auf das gleiche Niveau wie in SF Kardiomyozyten, ohne VDF der SF Kardiomyozyten weiter zu verringern. CaMKII-abhängige Phosphorylierung der Serine 1512/1570 ist ein entscheidender Mechanismus der Fazilitierung von I_{Ca} .

4.2 CaMKII-unabhängige Fazilitierung

Die Mutation von S1512 und S1570 verhinderte CDF und VDF nicht vollständig. Daher müssen weitere Vorgänge an der Fazilitierung von I_{Ca} beteiligt sein.

Die Regulation von LTCC an anderen Untereinheiten des Kanals wurde bereits beschrieben. So ist die Phosphorylierung der neuronalen β_{2a} -Untereinheit an CDF beteiligt (Grueter et al., 2006; Abiria and Colbran, 2010) und ermöglicht durch variable Expression während der Embryonalentwicklung die Anpassung an sich ändernde Anforderungen des Myokards (Link et al., 2009). Dies könnte zusätzlich zur Phosphorylierung der Serine der α_1 -Untereinheit zu CDF beitragen. Durch unterschiedliche Expression der Untereinheiten in verschiedenen Geweben kann gewebsspezifisch Fazilitierung vermittelt werden.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit dem Inhibitor KN-93 deuten darauf hin, dass CaMKII an diesen zusätzlichen Regulationsmechanismen nicht beteiligt ist. Denn KN-93 reduzierte VDF von I_{Ca} in SF Kardiomyozyten nicht weiter. Daher ist es unwahrscheinlich, dass für VDF zusätzliche CaMKII-abhängige Phosphorylierungsstellen benötigt werden.

Der übrigbleibende Teil von CDF wird deswegen vermutlich direkt durch CaM verursacht, wie bereits beschrieben wurde (Peterson et al., 1999; Zühlke et al., 1999; Zühlke et al., 2000; DeMaria et al., 2001; Wu et al., 2001).

4.3 Kardiales Aktionspotential und EKG

Die physiologische Rolle der Fazilitierung von I_{Ca} ist nicht komplett geklärt. Durch Fazilitierung könnte die durch CDI verursachte verminderte Verfügbarkeit von Kalziumkanälen bei hohen Herzfrequenzen ausgleichen, um I_{Ca} bei gesteigerter Herzaktivität unter Belastung hoch zu halten (Maier and Bers, 2002). Im gesunden Myokard kommt es bei einer Steigerung der Herzfrequenz im Rahmen des Bowditch-Mechanismus zu einer Vergrößerung von I_{Ca} . Der Bowditch-Mechanismus beschreibt eine Steigerung der Kontraktilität der Kardiomyozyten bei steigender Herzfrequenz. Dadurch kann die Auswurfleistung des Herzens bei hohen Frequenzen stabil gehalten werden. Als Ursache für diesen Mechanismus wurde CDF von LTCC beschrieben (Anderson et al., 1994).

In Kardiomyozyten von Ratten kommt es bei einer erhöhten Herzfrequenz zu einer Aktionspotentialverlängerung. An dieser frequenzabhängigen Modulation kardialer Aktionspotentiale sind LTCC beteiligt (Fauconnier et al., 2003; Keating and Sanguinetti, 2001). In Abhängigkeit der Herzfrequenz verursachte die SF-Mutation Veränderungen der elektrischen Erregung des Herzens. Bei einer Frequenz von 1 Hz war die Aktionspotentialdauer isolierter Kardiomyozyten von SF-Mäusen in Vergleich zu Kontrolltieren signifikant verringert. Eine Steigerung der Frequenz auf 5 Hz führte zu einer Aktionspotentialverlängerung in Kardiomyozyten beider Genotypen, welche bei den Ctr Kardiomyozyten jedoch signifikant größer ausfiel (Abbildung 4-1). Die frequenzabhängige Modulation kardialer Aktionspotentiale wird demnach von der SF-Mutation beeinflusst.

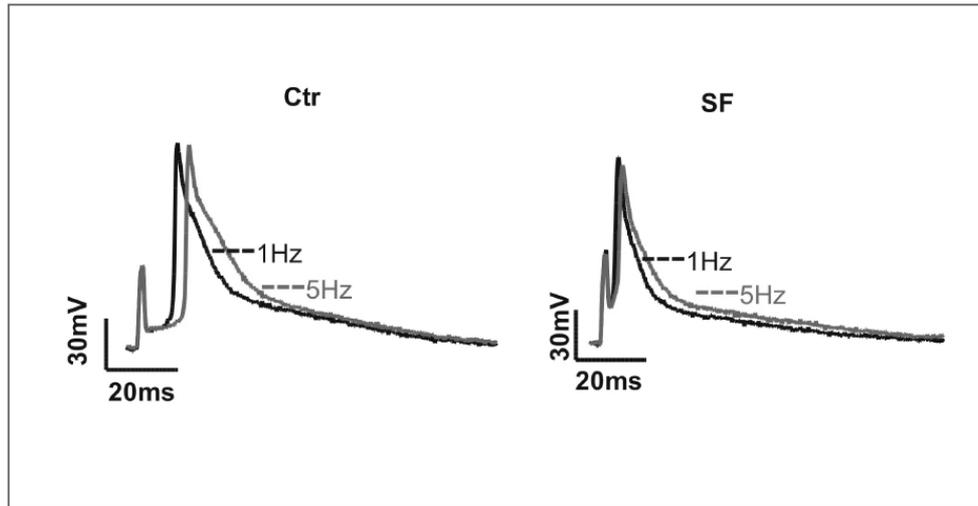


Abbildung 4-1 (Blaich et al., 2010): **Aktionspotentiale isolierter Kardiomyozyten von Ctr- und SF-Mäusen bei 1 Hz und 5 Hz.**

Die Dauer des Aktionspotentials bei 1 Hz (schwarz) war in Kardiomyozyten von SF-Mäusen (rechts) im Gegensatz zu Kardiomyozyten von Ctr-Mäusen (links) verkürzt. Bei einer Steigerung der Frequenz auf 5 Hz (grau) vergrößerte sich die Aktionspotentialdauer bei den Ctr-Mäusen (links) stärker als bei den SF-Mäusen (rechts). Ctr, n= 9, SF, n = 8; $p < 0.05$.

Kardiale Aktionspotentiale lassen sich *in vivo* mit Hilfe des EKGs untersuchen. Der QRS-Komplex entspricht dabei der Depolarisation und die T-Welle der Repolarisation ventrikulärer Kardiomyozyten. Die QT-Zeit gibt die intraventrikuläre Erregungsdauer wider und nimmt mit zunehmender Herzfrequenz ab. Da die Aktionspotentialdauer ventrikulärer Kardiomyozyten mit der QT-Zeit korreliert (Keating and Sanguinetti, 2001), müsste die QT-Zeit bei SF-Mäusen verkürzt sein. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden bei frei laufenden Mäusen beider Genotypen EKGs bei unterschiedlichen Herzfrequenzen aufgezeichnet.

Bei einer niedrigen Herzfrequenz von 440/min unterschieden sich QT-Zeit und TP-Strecke zwischen Ctr- und SF-Mäusen nicht. Wurde die Herzfrequenz jedoch auf Werte zwischen 630/min und 700/min gesteigert, war die QT-Zeit der SF-Mäuse signifikant reduziert (Abbildung 4-2). Die für die Frequenz korrigierte QT-Zeit (QT_c) war bei SF-Mäusen ebenfalls signifikant reduziert.

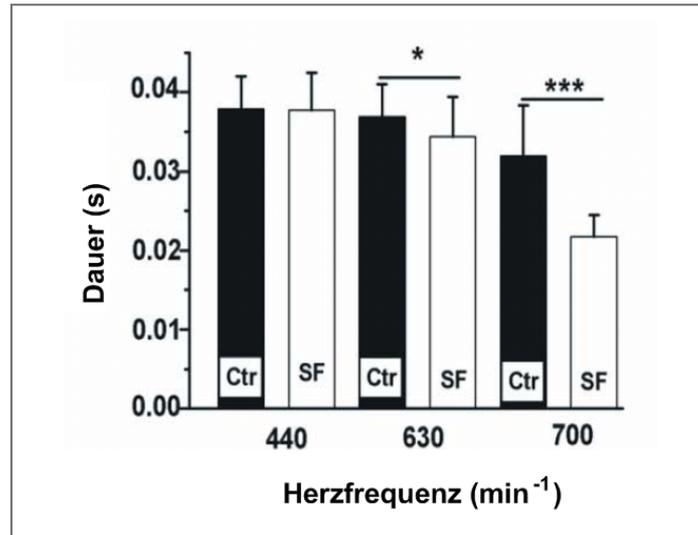


Abbildung 4-2 (Blaich et al., 2010): Verkürzung der QT-Zeit der SF-Mäuse bei hohen Frequenzen.

Signifikant verkürzte QT-Zeit der SF-Mäuse bei Frequenzen von 630 und 700/min.

n = 40 EKGs/Frequenz (440, 630 und 700/min) von vier Mäusen/Genotyp (Ctr- und SF-Mäuse);

* p < 0.05, *** p < 0.001.

Die TP-Strecke als an die Repolarisation anschließende elektrische Diastole war bei SF-Mäusen signifikant verlängert (Abbildung 4-3).

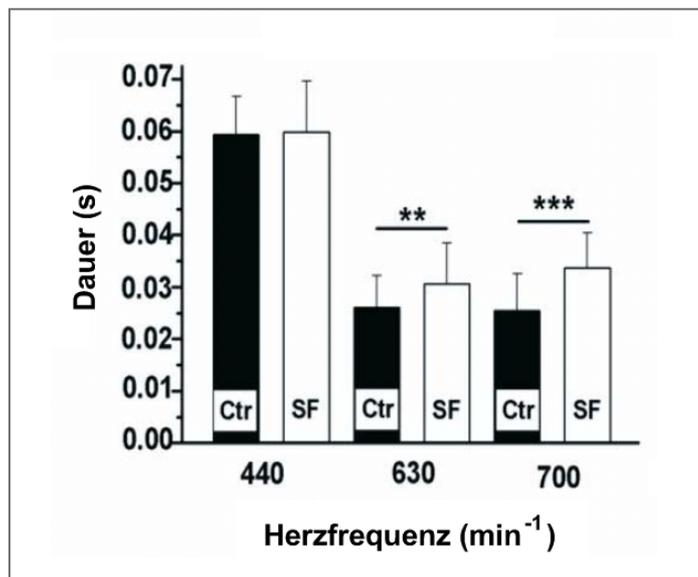


Abbildung 4-3 (Blaich et al., 2010): Verlängerung der TP-Strecke der SF-Mäuse bei hohen Frequenzen.

Signifikant verlängerte TP-Strecke der SF-Mäuse bei Frequenzen von 630 und 700/min.

n = 40 EKGs/Frequenz (440, 630 und 700/min) von vier Mäusen/Genotyp (Ctr- und SF-Mäuse);

** p < 0.01, *** p < 0.001.

Die Verkürzung der QT-Zeit und die Verlängerung der TP-Strecke der SF-Mäuse glichen einander so weit aus, dass die mittlere Herzfrequenz bei Mäusen beider Genotypen gleich war (Abbildung 4-4).

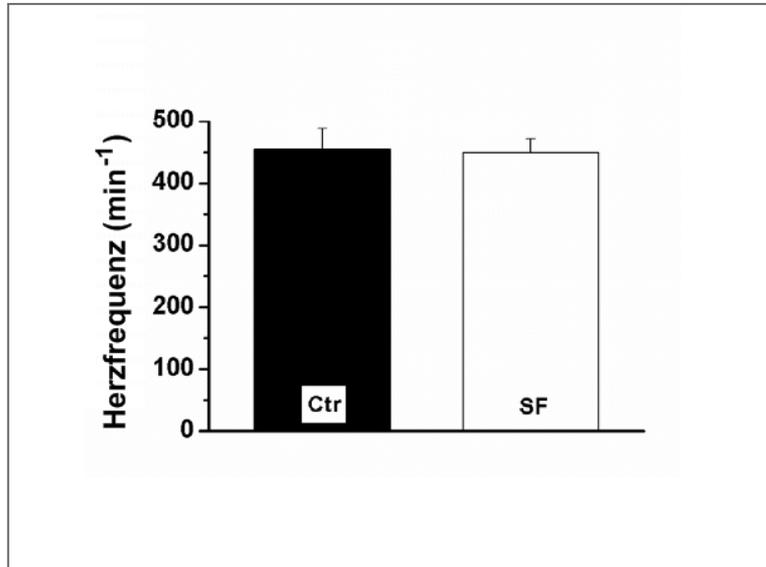


Abbildung 4-4 (Blaich et al., 2010): **Die SF-Mutation hat keinen Einfluss auf die mittlere Herzfrequenz der Mäuse unter Ruhebedingungen.**

Im Vergleich mit Ctr-Mäusen bleibt die telemetrisch über eine Woche gemessene Herzfrequenz der SF-Mäuse im Mittel unverändert, da die verkürzte QT-Zeit der SF-Mäuse durch eine verlängerte TP-Strecke ausgeglichen wurde.

Die Herzen der SF-Mäuse zeigten sich bei *in vivo* Untersuchungen nicht in ihrer Funktion gestört. Messungen der Verkürzung des Ventrikels während der Kontraktion waren in Ctr- und SF-Mäusen identisch. Auch eine pharmakologische Stimulation mit Isoprenalin führte zu keinem Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Blaich et al., 2010) (Abbildung 4-5).

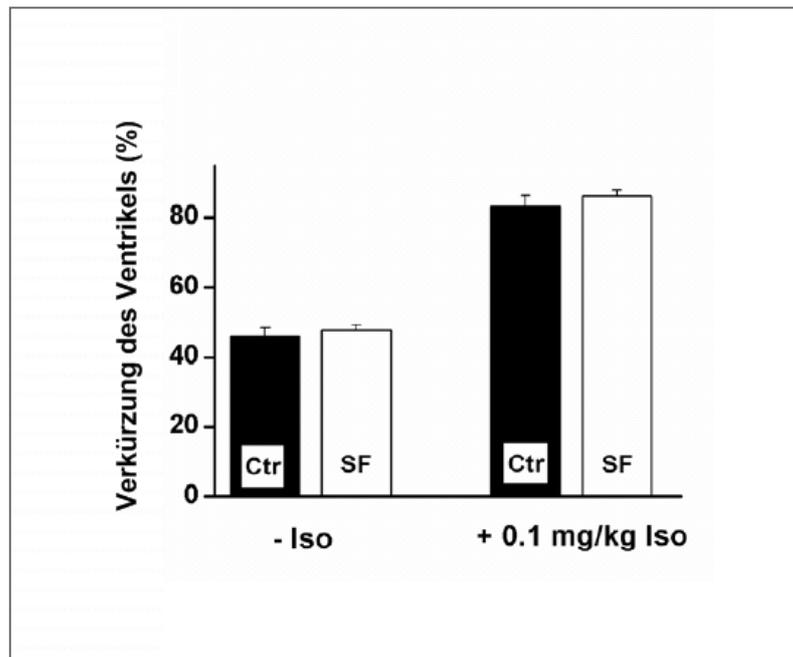


Abbildung 4-5 (Blaich et al., 2010): Die SF-Mutation hat keinen Einfluss auf die Verkürzung des Ventrikels unter Ruhebedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalin.

Weder unter Ruhebedingungen, noch nach pharmakologischer Stimulation mit Isoprenalin (Iso) bestand ein Unterschied in der prozentualen Verkürzung des linken Ventrikels im Vergleich zum Ausgangswert vor Kontraktion.

Diese Effekte auf die QT-Zeit bei erhöhten Herzfrequenzen lassen sich durch eine Reduktion von CDF bei gleich bleibender CDI in SF-Mäusen erklären. Die Mutanten können die verminderte Verfügbarkeit von Kalziumkanälen bei hoher Herzfrequenz nicht durch Fazilitierung ausgleichen. Das Herz kann sich möglicherweise nicht an starke Belastungen anpassen, weil I_{Ca} bei gesteigerter Herzaktivität unter Belastung nicht hoch gehalten werden kann.

4.4 Strukturelle Herzerkrankung und Arrhythmien

Störungen der intrazellulären Kalziumhomöostase werden mit der Entstehung von strukturellen Herzerkrankungen in Verbindung gebracht. Als Beispiel aus der Pharmakotherapie verhindern Kalziumkanalblocker kardiales Remodelling, Organschaden und kardiale Hypertrophie unabhängig von ihrer blutdrucksenkenden Wirkung (Feron et al., 1996).

Mit Hilfe eines CaMKII-Überexpressionsmodells konnte der Zusammenhang zwischen erhöhter CaMKII-Aktivität und der Entstehung von kardialer Hypertrophie und Dysfunktion untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass eine erhöhte nukleäre Aktivität der CaMKII auf dem in Abbildung 4-6 beschriebenen Weg eine kardiale Hypertrophie auslöst. Eine erhöhte Aktivität der cytoplasmatischen CaMKII verändert die intrazelluläre Kalziumhomöostase über die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR. Ein übermäßiger I_{Ca} aus den Kalziumspeichern in das Zytoplasma ist für Zellen toxisch. In der Folge kommt es zur Apoptose von Kardiomyozyten und kardialer Dysfunktion (Zhang and Brown, 2004). Im Mausmodell schützt die Hemmung der CaMKII vor der Entstehung einer strukturellen Herzerkrankung (Zhang et al., 2005).

Die CaMKII-abhängige Regulation von $\text{Ca}_v1.2$ spielt demnach eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von strukturellen Herzerkrankungen, welche wiederum über die Aktivierung der CaMKII zu Rhythmusstörungen führen können.

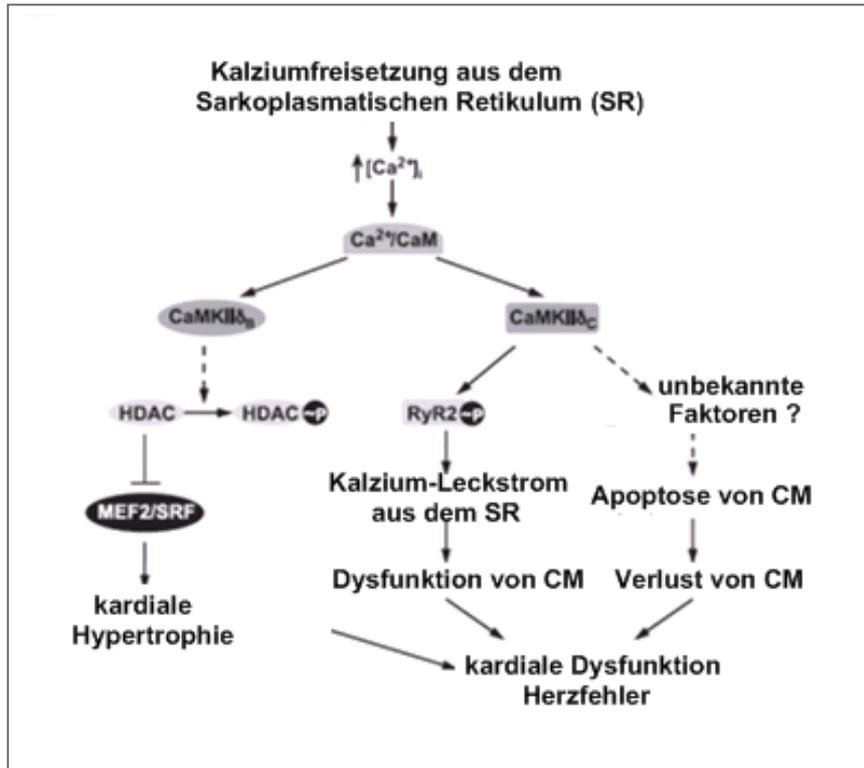


Abbildung 4-6 (modifiziert nach Zhang and Brown, 2004): **Vermuteter Mechanismus zwischen CaMKII-Aktivierung, kardialer Hypertrophie und Herzfehler.**

Eine Aktivierung der CaMKII führt über den MEF2/SRF-Signalweg zur Hypertrophie und über Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), sowie Apoptose von Kardiomyozyten (CM) zur kardialen Dysfunktion.

[Ca²⁺]_i = intrazelluläre Kalziumkonzentration, Ca²⁺/CaM = kalziumgebundenes Calmodulin, CaMKII = Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II, CaMKII_δ = nukleäre Isoform der CaMKII, CaMKII_ε = cytoplasmatische Isoform der CaMKII, HDAC = Histon-Deacetylase Klasse II, InsP3 = Inositol-1,4,5-Triphosphate, MEF2 = Myozyten-Verstärkungs-Faktor 2, RyR = Ryanodinrezeptor, SR = Sarkoplasmatisches Retikulum, SRF = Serum-Response-Faktor.

Ein möglicher Mechanismus zwischen struktureller Herzerkrankung und Arrhythmien ist in Abbildung 4-7 beschrieben. Im geschädigten Myokard kommt es durch eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer und damit einhergehender Vergrößerung von I_{Ca} zur Aktivierung der CaMKII (Anderson et al., 1998). Eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der LTCC steigert I_{Ca} weiter und begünstigt die Entstehung von Nachdepolarisationen (*early afterdepolarisations*, EAD) und Arrhythmien. Auf diesen Weg kann CaMKII in Kardiomyozyten als proarrhythmischer Signal wirken, wenn die kardiale Repolarisation gestört ist (Anderson, 2004).

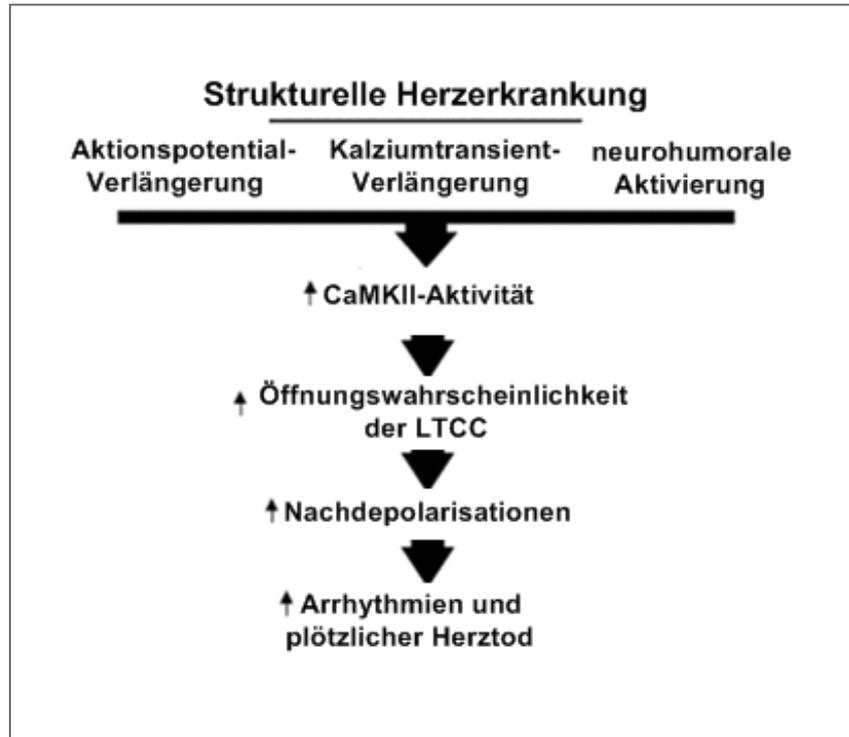


Abbildung 4-7 (modifiziert nach Anderson, 2004): **Vermuteter Mechanismus zwischen struktureller Herzerkrankung, Arrhythmien und plötzlichem Herztod.**

Veränderungen im Rahmen einer Herzerkrankung bewirken über eine erhöhte Aktivität der CaMKII eine vermehrte Öffnung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen (LTCC). Die dadurch entstehenden frühen Nachdepolarisationen (EAD) können zur Arrhythmien und plötzlichem Herztod führen.

Die Bedeutung der CaMKII bei der Entstehung von Arrhythmien wird am Beispiel des Timothy Syndroms deutlich, welches durch Gain-of-function Mutationen der α_1 -Untereinheit von $\text{Ca}_v1.2$ verursacht wird. Durch einen Kalziumüberschuss der Kardiomyozyten kommt es zur Verlängerung der QT-Zeit. Der übermäßige I_{ca} wird zumindest teilweise auf eine Störung der VDI zurückgeführt (Splawski et al., 2004; Splawski et al., 2005). Im Tiermodell des Timothy Syndroms zeigten Kardiomyozyten von Ratten einen Verlust der VDI von I_{ca} , eine erhöhte CaMKII-Aktivität und einen für das Timothy Syndrom typischen Phänotyp mit Aktionspotentialverlängerungen, gesteigerter Fazilitierung und EADs. Diese proarrhythmischen Effekte ließen sich durch einen CaMKII-Inhibitor umkehren (Thiel et al., 2008).

Der spezifische Verlust der Regulation von $Ca_v1.2$ durch CaMKII bei SF-Mäusen könnte Arrhythmien entgegenwirken. *Wu et al.* untersuchten ein Mausmodell mit einer im Gegensatz zu den SF-Mäusen überexprimierten, im Herzen normalerweise nicht vorkommenden CaM-Kinase (Wu et al., 2002). Der gegenteilige Ansatz führte dabei auch zu gegenteiligen Ergebnissen. In Kardiomyozyten dieser Mäuse war die Offenwahrscheinlichkeit von $Ca_v1.2$ erhöht. Eine gesteigerte Offenwahrscheinlichkeit von LTCC war bereits zuvor von geschädigten menschlichen Kardiomyozyten beschrieben wurde (Schröder et al., 1998). Die Überexpression der CaM-Kinase ruft eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer und der QT-Zeit hervor. Diese Verlängerung der QT-Zeit wirkt bei hohen Herzfrequenzen proarrhythmisch. Entsprechend zeigten die Mäuse neben Zeichen einer kardialen Hypertrophie auch Rhythmusstörungen. Eine Hemmung der CaMKII normalisiert die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle, sowie die Aktionspotentialdauer und verhinderte Arrhythmien. Dies deutet darauf hin, dass die beschriebenen elektrischen Phänomene durch eine erhöhte Aktivität der CaMKII und einer daraus folgenden vermehrten CDF von $Ca_v1.2$ verursacht wurden (Wu et al., 2002). In SF-Mäusen könnte der Verlust der Regulation von $Ca_v1.2$ dem proarrhythmischen Potential von CaMKII-induzierten QT-Zeit-Verlängerungen bei hohen Herzfrequenzen entgegenwirken. Die Regulation von $Ca_v1.2$ über die Phosphorylierung von S1512/S1570 durch CaMKII stellt damit einen wichtigen Teil des arrhythmogenen Teufelskreises dar.

4.5 Bedeutung der Regulation von Ca_v1.2

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in westlichen Industrienationen dar. Laut Statistischem Bundesamt war Herzinsuffizienz im Jahr 2010 die dritthäufigste Todesursache in Deutschland.

Bei der Entstehung von strukturellen Herzerkrankungen, sowie Arrhythmien wurde der Regulation von Ca_v1.2 durch die CaMKII eine besondere Rolle zugeschrieben. So wurde eine erhöhte Aktivität der CaMKII mit kardialer Hypertrophie und Dysfunktion (Zhang and Brown, 2004), sowie Aktionspotentialverlängerung, gestörter intrazellulärer Kalziumhomöostase und Arrhythmien in Zusammenhang gebracht (Anderson, 2004; Peterson et al., 1999).

Im Mausmodell wirkt die Hemmung der CaMKII protektiv auf die Entstehung struktureller Herzerkrankungen (Zhang et al., 2005). Mäuse mit einer Herzhypertrophie durch eine erhöhte Aktivität von CaMK werden durch den CaMKII-Inhibitor KN-93 vor Arrhythmien geschützt (Wu et al., 2002).

CaMKII stellt damit ein therapeutisches Ziel für strukturelle und arrhythmische Herzerkrankungen dar. Zudem können sich aus der Untersuchung CaMKII-abhängiger Signalwege therapeutische Konsequenzen für weitere genetisch bedingte Kalziumkanalerkrankungen ergeben. Aus diesen Gründen ist die Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen, auf denen diese Erkrankungen beruhen, von außerordentlicher Bedeutung.

4.6 Ausblick

Im Anschluss an diese elektrophysiologischen Untersuchungen der Kardiomyozyten der SF-Mäuse ist die Untersuchung der klinischen Auswirkungen der SF-Mutation im Mausmodell von Interesse. Unter mechanischer oder pharmakologischer Belastung können Arrhythmien in Ctr- und SF-Mäusen induziert und mittels EKG-Untersuchungen identifiziert werden. Die Herz-Kreislauf-Funktion kann mit Blutdruckmessungen weiter untersucht werden.

Relevant sind auch die Untersuchungen des Herzgewebes von SF-Mäusen in Hinblick auf Zeichen einer Herzhypertrophie und der Vergleich der strukturellen Veränderungen mit dem Gewebe von Ctr-Mäusen. Hierfür können Gewebeschnitte verwendet und Herzmarker-Gene bestimmt werden.

Auf zellulärer Ebene sind die Expression und Aktivität der CaMKII, sowie die Kalziumverteilung von Bedeutung. Phosphorylierungsexperimente sollten zeigen, dass der Carboxyterminus von Ca_v1.2 der SF-Mäuse nicht phosphoryliert vorliegt und sich durch CaMKII nicht phosphorylieren lässt.

Dies würde betätigen, dass S1515/1570 *in vivo* die Phosphorylierungsstellen der CaMKII sind und die elektrophysiologischen Experimente mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 unterstreichen.

Von möglicher therapeutischer Relevanz sind weitere Untersuchungen mit CaMKII-Inhibitoren an Ctr-Mäusen und ihr Vergleich mit SF-Mäusen.

V. Zusammenfassung

Die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) durch spannungsabhängige Kalziumkanäle ist von großer physiologischer Bedeutung. Am Herzen spielen Kalziumionen (Ca^{2+}) eine entscheidende Rolle bei der Erregung und Kontraktion der Kardiomyozyten. Störungen in der Funktion des kardialen L-Typ Kalziumkanals (*l-type calcium channel*, LTCC) $Ca_v1.2$ können zu strukturellen Herzerkrankungen und Arrhythmien führen.

LTCC unterliegen positiver Regulation, Fazilitierung, und negativer Regulation, Inaktivierung. Diese stellen gegensätzliche, aktivitätsabhängige Regulationsmechanismen des Kalziumeinstroms (I_{Ca}) dar. Die Bindung von Calmodulin (CaM) an das Isoleucin-Glutamin-Motiv (IQ-Motiv) am carboxyterminalen Ende der Untereinheit der LTCC beeinflusst beide Arten der Autoregulation. Kalziumabhängige Fazilitierung (*calcium dependent facilitation*, CDF) beruht auf CaM und/oder der Aktivität der kalzium-/calmodulinabhängigen Kinase II (CaMKII). Der Zustand des Kanals während der Fazilitierung wird als *mode2* bezeichnet. Er ist durch lange Öffnungszeiten und eine hohe Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals gekennzeichnet. Ein Komplex aus Ca^{2+} und CaM soll die CaMKII aktivieren und durch Phosphorylierung des Kanals zur Fazilitierung führen. Als Phosphorylierungsstellen wurden die Serine 1512 und 1570 am Carboxyterminus von $Ca_v1.2$ identifiziert.

Die Generierung einer *knock-in* Mauslinie ermöglichte es die Regulationsmechanismen von LTCC *in vivo* zu untersuchen. Durch Mutation der Phosphorylierungsstellen der CaMKII von Serin zu Alanin entstand eine lebensfähige Mauslinie (*sine facilitation*, SF-Mäuse) Bei hohen Herzfrequenzen war die QT-Zeit der SF-Mäuse signifikant verkürzt. Die Effekte auf die QT-Zeit können durch eine Reduktion von CDF bei gleich bleibender kalziumabhängiger Inaktivierung (*calcium dependent inactivation*, CDI) in SF-Mäusen erklärt werden.

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik lassen sich die Eigenschaften und Funktion von Ionenkanälen erforschen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden isolierte Kardiomyozyten von SF-Mäusen und Kontrolltieren (Ctr) in Whole-Cell-Technik elektrophysiologisch untersucht.

Die Kardiomyozyten beider Genotypen zeigten eine normale Zellgröße und I_{Ca} . Die Strom-Spannungs-Beziehung und die sich daraus ergebenden Parameter wie das halb-maximale Aktivierungspotential, das Umkehrpotential und die maximale Kalziumleitfähigkeit unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nicht.

Die SF-Mutation verschob die spannungsabhängige Inaktivierung (*voltage dependent inactivation*, VDI) zu negativeren Potentialen und verlangsamte die Erholung von der Inaktivierung, wodurch weniger Kanäle für eine Aktivierung zugänglich waren.

Frequenzabhängige Fazilitierung wurde mit einem Protokoll repetitiver Depolarisationen gemessen. Die erste Depolarisation nach einer Ruhephase führte in SF Kardiomyozyten im Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten zu einem signifikant kleineren I_{Ca} . Die Inaktivierungskonstanten unterschieden sich nicht. Dies deutet darauf hin, dass die SF-Mutation kalziumabhängige Inaktivierung (*calcium dependent inactivation*, CDI) nicht signifikant beeinflusst. Die Kalziummenge, die den Kanal passiert, war in den SF Kardiomyozyten gegenüber den Ctr Kardiomyozyten leicht vermindert. Da diese Art der Fazilitierung von Ca^{2+} als Ladungsträger abhängt, wurden die Effekte durch intrazelluläre Perfusion mit dem Kalziumchelator BAPTA verhindert.

Als Folge einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch eine starke Depolarisation kommt es zur spannungsabhängigen Fazilitierung (*voltage dependent facilitation*, VDF). VDF wurde in SF Kardiomyozyten im Vergleich zu Ctr Kardiomyozyten deutlich vermindert. Der CaMKII-Inhibitor KN-93 reduzierte VDF in Ctr Kardiomyozyten auf dasselbe Niveau wie in SF Kardiomyozyten.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass CaMKII-abhängige Phosphorylierung von S1512/1570 des $Ca_v1.2$ Fazilitierung von I_{Ca} am Herzen ermöglicht.

VI. Literaturverzeichnis

Abiria, S.A., and Colbran, R.J. (2010). CaMKII associates with CaV1.2 L-type calcium channels via selected beta subunits to enhance regulatory phosphorylation. *J Neurochem* *112*, 150-161.

Anderson, M.E. (2004). Calmodulin kinase and L-type calcium channels; a recipe for arrhythmias? *Trends Cardiovasc Med* *14*, 152-161.

Anderson, M.E., Braun, A.P., Schulman, H., and Premack, B.A. (1994). Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca⁽²⁺⁾-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* *75*, 854-861.

Anderson, M.E., Braun, A.P., Wu, Y., Lu, T., Wu, Y., Schulman, H., and Sung, R.J. (1998). KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* *287*, 996-1006.

Babitch, J. (1990). Channel hands. *Nature* *346*, 321-322.

Bean, B.P. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* *340*, 153-156.

Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* *415*, 198-205.

Bers, D.M., and Perez-Reyes, E. (1999). Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* *42*, 339-360.

Blaich, A., Welling, A., Fischer, S., Wegener, J.W., Köstner, K., Hofmann, F., and Moosmang, S. (2010). Facilitation of murine cardiac L-type Cav1.2 channel is modulated by Calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 10285-10289.

Bohn, G., Moosmang, S., Conrad, H., Ludwig, A., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2000). Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett* *481*, 73-76.

Bosse, E., Bottlender, R., Kleppisch, T., Hescheler, J., Welling, A., Hofmann, F., and Flockerzi, V. Stable and functional expression of the calcium channel alpha 1 subunit from smooth muscle in somatic cell lines. *Embo J* *11*, 2033-2038.

Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 521-555.

Catterall, W.A., Striessnig, J., Snutch, T.P., and Perez-Reyes, E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* *55*, 579-581.

Davis, B.A., Schwartz, A., Samaha, F.J., and Kranias, E.G. (1983). Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* *258*, 13587-13591.

Deisseroth, K., Bito, H., and Tsien, R.W. (1996). Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* *16*, 89-101.

- DeMaria, C.D., Soong, T.W., Alseikhan, B.A., Alvania, R.S., and Yue, D.T. (2001). Calmodulin bifurcates the local Ca²⁺ signal that modulates P/Q-type Ca²⁺ channels. *Nature* 411, 484-489.
- Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M., and Greenberg, M.E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294, 333-339.
- Domes, K., Ding, J., Lemke, T., Blaich, A., Wegener, J., Brandmayr, J., Moosmang, S., and Hofmann, F. (2011). Truncation of murine CaV1.2 at Asp-1904 results in heart failure after birth. *286*, 33863-33871.
- Dzhura, I., Wu, Y., Colbran, R.J., Balsler, J.R., and Anderson, M.E. (2000). Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol* 2, 173-177.
- Erxleben, C., Liao, Y., Gentile, S., Chin, D., Gomez-Algria, C., Mori, Y., Birnbauer, L., and Armstrong, D.L. (2006). Cyclosporin and Timothy syndrome increase mode 2 gating of CaV1.2 calcium channels through aberrant phosphorylation of S6 helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3932-3937.
- Fauconnier, J., Bedut, S., Guennec, J.Y., Babuty, D., and Richard, S. (2003). Ca²⁺ current-mediated regulation of action potential by pacing rate in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 57, 670-680.
- Feron, O., Salomone, S., and Godfraind, T. (1996). Action of the calcium channel blocker lacidipine on cardiac hypertrophy and endothelin-1 gene expression in stroke-prone hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 118, 659-664.
- Fischer, S. (2009). Analyse der Regulation von Kalziumkanälen über den Ca²⁺/CaM/CaMKII-Signalweg durch konditionale Mutagenese im Mausmodell. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (München).
- Fu, Y., Westenbroek, R., Yu, F., Clark, J.3., Marshall, M., Scheuer, T., and Catterall, W. (2011). Deletion of the distal C terminus of CaV1.2 channels leads to loss of beta-adrenergic regulation and heart failure in vivo. *J Biol Chem* 286, 12617-12626.
- Grueter, C.E., Abiria, S.A., Dzhura, I., Wu, Y., Ham, A.J., Mohler, P.J., Anderson, M.E., and Colbran, R.J. (2006). L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Mol Cell* 23, 641-650.
- Guo, J., and Duff H. J. (2003). Inactivation of I_{Ca-L} is the major determinant of use-dependent facilitation in rat cardiomyocytes. *J Physiol* 547, 797-805.
- Guo, J., and Duff H. J. (2006). Calmodulin kinase II accelerates L-type Ca²⁺ current recovery from inactivation and compensates for the direct inhibitory effect of [Ca²⁺]_i in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 574, 509-518.
- Hain, J., Onoue, H., Mayrleitner, M., Fleischer, S., and Schindler, H. (1995). Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem* 270, 2074-2081.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.
- Hell, J.W., Westenbroek, R.E., Warner, C., Ahljianian, M.K., Prystay, W., Gilbert, M.M., Snutch, T.P., and Catterall, W.A. (1993). Identification and differential

- subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *Nat Cell Biol* 123, 949-962.
- Hofmann, F., Lacinova, L., and Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol biochem Pharmacol* 139, 33-87.
- Hook, S.S., and Means, A.R. (2001). Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 471-505.
- Hudmon, A., Schulman, H., Kim, J., Maltez, J.M., Tsien, R.W., and Pitt, G.S. (2005). CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *J Cell Biol* 171, 537-547.
- Ishida, A., Kameshita, I., Okuno, S., Kitani, T., and Fujisawa, H. (1995). A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 806-812.
- Jiang, X., Lautermilch, N.J., Watari, H., Westenbroek, R.E., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2008). Modulation of CaV2.1 channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 341-346.
- Keating, M.T., and Sanguinetti, M.C. (2001). Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104, 569-580.
- Kleppisch, T., Pedersen, K., Strubing, C., Bosse-Doenecke, E., Flockerzi, V., Hofmann, F., and Hescheler, J. (1994). Double-pulse facilitation of smooth muscle alpha 1-subunit Ca²⁺ channels expressed in CHO cells. *Embo J* 13, 2502-2507.
- Klugbauer, N., Specht, V., and Welling, A. (2002). Spannungsabhängige Kalziumkanäle: Neue Einblicke mit Hilfe transgener Mausmodelle. *Bio Spektrum* 8, 704-707.
- Lacinova, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24, Suppl 1 1-78.
- Langwieser, N., Christel, C.J., Kleppisch, T., Hofmann, F., Wotjak, C.T., and Moosmang, S. (2010). Homeostatic switch in hebbian plasticity and fear learning after sustained loss of Cav1.2 calcium channels. *J Neurosci* 30, 8367-8375.
- Lee, K.S. (1987). Potentiation of the calcium-channel currents of internally perfused mammalian heart cells by repetitive depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3941-3945.
- Lee, T.S., Karl, R., Moosmang, S., Lenhardt, P., Klugbauer, N., Hofmann, F., Kleppisch, T., and Welling, A. (2006). Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* 281, 25560-25567.
- Link, S., Meissner, M., Held, B., Beck, A., Weissgerber, P., Freichel, M., and Flockerzi, V. (2009). Diversity and developmental expression of L-type calcium channel beta2 proteins and their influence on calcium current in murine heart. *J Biol Chem* 284, 30129-30137.
- Maier, L.S., and Bers, D.M. (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939.

- McCarron, J.G., McGeown, J.G., Reardon, S., Ikebe, M., Fay, F.S., and Walsh, J.V., Jr. (1992). Calcium-dependent enhancement of calcium current in smooth muscle by calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature* 357, 74-77.
- Meyer, T., Hanson, P.I., Stryer, L., and Schulman, H. (1992). Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *256*, 1199-1202.
- Milani, D., Malgaroli, A., Guidolin, D., Fasolato, C., Skaper, S.D., Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1990). Ca²⁺ channels and intracellular Ca²⁺ stores in neuronal and neuroendocrine cells. *Cell Calcium* 11, 191-9.
- Moosmang, S., Haider, N., Klugbauer, N., Adelsberger, H., Langwieser, N., Müller, J., Stiess, M., Marais, E., Schulla, V., and Lacinova, L., et al. (2005). Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* 26, 9883-9892.
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J* 22, 6027-6034.
- Neher, E., and Sakmann B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Noble, S., and Shimoni, Y. (1981a). The calcium and frequency dependence of the slow inward current 'staircase' in frog atrium. *J Physiol* 310, 57-75.
- Noble, S., and Shimoni, Y. (1981b). Voltage-dependent potentiation of the slow inward current in frog atrium. *J Physiol* 310, 77-95.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., and Tsien, R.W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *316*, 440-443.
- Numberger, M., and Draguhn, A. Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag 1996.
- Nuss, H.B., and Houser, S.R. (1993). T-type Ca²⁺ current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ Res* 73, 777-782.
- Ono, K., and Iijima, T. Cardiac T-type (2010). Ca(2+) channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 48, 65-70.
- Perez-Reyes, E., Kim, H.S., Lacerda, A.E., Horne, W., Wei, X.Y., Rampe, D., Campbell, K.P., Brown, A.M., and Birnbaumer, L. (1989). Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* 340, 233-236.
- Peterson, B.Z., DeMaria, C.D., and Yue, D.T. (1999). Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22, 549-58.
- Picht, E., DeSantiago, J., Huke, S., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R., and Bers, D.M. (2007). CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits frequency-dependent acceleration of relaxation and Ca²⁺ current facilitation. *J Mol Cell Cardiol* 42, 196-205.
- Piedras-Rentería, E., Chen, C., and Best, P. (1997). Antisense oligonucleotides against rat brain alpha1E DNA and its atrial homologue decrease T-type calcium current in atrial myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14936-14941.
- Pietrobon, D., and Hess, P. (1990). Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. *Nature* 346, 651-655.

- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca₂ Channels. *Cell* 102, 89-97.
- Poomvanicha, M., Wegener, J., Blaich, A., Fischer, S., Domes, K., Moosmang, S., and Hofmann, F. (2011). Facilitation and Ca²⁺-dependent inactivation are modified by mutation of the Ca(v)1.2 channel IQ motif. 286, 26702-26707.
- Reuter, H. (1983). Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 301, 569-574.
- Schröder, F., Handrock, R., Beuckelmann, D.J., Hirt, S., Hullin, R., Priebe, L., Schwinger, R.H., Weil, J., and Herzig, S. (1998). Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 98, 969-976.
- Schulla, V., Renström, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X.J., Laux, D., Lundquist, I., and Magnuson, M.A., et al. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca²⁺ channel null mice. *Embo J* 22, 3844-3854.
- Schuster, A., Lacinova, L., Klugbauer, N., Ito, H., Birnbaumer, L., and Hofmann, F. (1996). The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *Embo J* 15, 2365-2370.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kühbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., and Hofmann, F. (2000). Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* 275, 39193-39199.
- Shioya, T. (2007). A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *J Physiol* 576, 327-335.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F.B., Beggs, A.H., Sanguinetti, M.C., and Keating, M.T. (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8089-8096.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Sharpe, L.M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P.J., Joseph, R.M., and Condouris, K., et al. (2004). Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119, 19-31.
- Striessnig, J. (1999). Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell Physiol Biochem* 9, 242-269.
- Sumi, M., Kiuchi, K., Ishikawa, T., Ishii, A., Hagiwara, M., Nagatsu, T., and Hidaka, H. (1991). The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 968-975.
- Thiel, W.H., Chen, B., Hund, T.J., Koval, O.M., Purohi, A., Song, L.S., Mohler, J.P., and Anderson, M.E. (2008). Proarrhythmic defects in Timothy syndrome require calmodulin kinase II. *Circulation* 118, 2225-2234.
- Van Petegem, F., Chatelain, F.C., and Minor, D.L., Jr. (2005). Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca²⁺/calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1108-1115.

- Vassort, G., Talavera, K., and Alvarez, J.L. (2006). Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium* 40, 205-220.
- Vinogradova, T.M., Zhou, Y.Y., Bogdanov, K.Y., Yang, D., Kuschel, M., Cheng, H., and Xiao, R.P. (2000). Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II activation. *Circ Res* 87, 760-767.
- Wegener, J.W., Schulla, V., Lee, T.S., Koller, A., Feil, S., Feil, R., Kleppisch, T., Klugbauer, N., Moosmang, S., and Welling, A., et al. (2004). An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB J* 18, 1159-1161.
- Welling, A., Felbel, J., Peper, K., and Hofmann, F. (1992). Hormonal regulation of calcium current in freshly isolated airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 262, 351-359.
- Welling, A., Kwan, Y.W., Bosse, E., Flockerzi, V., Hofmann, F., and Kass, R.S. (1993). Subunit-dependent modulation of recombinant L-type calcium channels. Molecular basis for dihydropyridine tissue selectivity. *Circ Res* 73.
- Witcher, D.R., Kovacs, R.J., Schulman, H., Cefali, D.C., and Jones, L.R. (1991). Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 266, 11144-11152.
- Wu, Y., Dzhura, I., Colbran, R.J., and Anderson, M.E. (2001). Calmodulin kinase and a calmodulin-binding 'IQ' domain facilitate L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes by a common mechanism. *J Physiol* 535, 679-687.
- Wu, Y., Temple, J., Zhang, R., Dzhura, I., Zhang, W., Trimble, R., Roden, D.M., Passier, R., Olson, E.N., and Colbran, R.J., et al. (2002). Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106, 288-293.
- Xiao, R.P., Cheng, H., Lederer, W.J., Suzuki, T., and Lakatta, E.G. (1994). Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9659-9663.
- Xu, L., Lai, D., Cheng, J., Lim, H.J., Keskanokwong, T., Backs, J., Olson, E., and Wang, Y. (2010). Alterations of L-type calcium current and cardiac function in CaMKII{delta} knockout mice. *Circ Res* 107, 398-407.
- Xu, M., Welling, A., Papparisto, S., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2003). Enhanced expression of L-type Cav1.3 calcium channels in murine embryonic hearts from Cav1.2-deficient mice. *J Biol Chem* 278, 40837-40841.
- Yaari, Y., Hamon, B., and Lux, H.D. (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235, 680-2.
- Yuan, W., and Bers, D.M. (1994). Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 267, 982-993.
- Zhang, R., Khoo, M.S., Wu, Y., Yang, Y., Grueter, C.E., Ni, G., Price, E.E. Jr, Thiel, W., Guatimosim, S., and Song, L.S., et al. (2005). Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 11, 409-417.
- Zhang, T., and Brown, J.H. (2004). Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63, 476-486.

Zühlke, R.D., and Reuter, H. (1998). Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3287-3294.

Zühlke, R.D., Pitt, G.S., Deisseroth, K., Tsien, R.W., and Reuter, H. (1999). Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399, 159-162.

Zühlke, R.D., Pitt, G.S., Tsien, R.W., and Reuter, H. (2000). Ca²⁺-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca²⁺ channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(alpha)1C subunit. *J Biol Chem* 275, 21121-21129.

VII. Publikation

Blaich, A., Welling, A., Fischer, S., Wegener, J.W., **Köstner, K.**, Hofmann, F., and Moosmang, S. (2010). Facilitation of murine cardiac L-type Cav1.2 channel is modulated by Calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 10285-10289.