

**Einfluss der Proteinkinase A und der
Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
auf den Reperfusionsschaden und die
Funktion des Sarkoplasmatischen
Retikulums in isolierten Kardiomyozyten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Woste-Seewald, Alexandra, geb. Woste

aus Mönchengladbach

Gießen (2020)

Aus der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Gießen
Abteilung für Kardiologie und Angiologie

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. C. Hamm

Gutachter: PD Dr. Yaser Abdallah

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 29. September 2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1	Einleitung	1
1.1	Ischämie, Reperfusion und Reperfusionsschaden	1
1.1.1	Akuter Myokardinfarkt	1
1.1.2	Der myokardiale Reperfusionsschaden	1
1.1.3	Der akute myokardiale Reperfusionsschaden der Herzmuskelzellen	3
1.1.4	Ansätze in der Reperfusionstherapie	6
1.2	Die Rolle der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II und der Proteinkinase A in der Ischämie/Reperfusion	8
1.3	Ziele der Arbeit	12
2	Material	13
2.1	Chemikalien	13
2.2	Häufig verwendete Medien und Puffer	15
2.2.1	Zellkulturmedien	15
2.2.2	Perfusionsmedien	16
2.2.3	Inkubationsmedien	17
2.3	Geräte und Laborbedarf	17
2.3.1	Zellkultur und Herzmuskelzellisolierung	17
2.3.2	Fluoreszenzmessungen	18
2.3.3	Anoxie-Reoxygenationsexperimente	18

2.3.4	Weitere Geräte	19
2.3.5	Verbrauchsmaterialien	19
3	Methoden	21
3.1	Herzmuskelzellisolierung	21
3.1.1	Versuchstiere	21
3.1.2	Präparation ventrikulärer Herzmuskelzellen	21
3.1.3	Zellkultur	23
3.2	Anoxie-Reoxygenationsversuche	23
3.2.1	Versuchsaufbau	23
3.2.2	Video-Imaging-System für fluoreszenzmikroskopische Messungen	23
3.2.3	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration	25
3.2.4	Nekrosemessung	25
3.2.5	Experimentelles Protokoll	25
3.2.6	Messparameter	27
3.3	Statistik	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Zeitverlauf der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration und der Zelllänge unter Hypoxie und Reoxygenation	28
4.1.1	Exemplarischer Verlauf des zytosolischen Calciums unter simulierter Anoxie und Reoxygenation	28

4.1.2	Repräsentativer Verlauf des zytosolischen Calciums unter simulierter Reoxygenation	29
4.2	Vergleich zwischen einer Proteinkinase A-Inhibierung und einer Inhibierung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II	30
4.2.1	Einfluss auf die Zelllänge	30
4.2.2	Einfluss auf die Amplitude der zytosolischen Ca ²⁺ -Oszillationen	31
4.2.3	Einfluss auf die Frequenz der zytosolischen Ca ²⁺ -Oszillationen	32
4.2.4	Einfluss auf das Ausmaß der Nekrose	33
4.3	Einfluss einer β-adrenergen Stimulation auf Zelllänge, zytosolische Ca²⁺- Oszillationen, Nekrose und das Sarkoplasmatische Retikulum	34
4.3.1	Einfluss auf die Zelllänge	34
4.3.2	Einfluss auf die Amplitude der zytosolischen Ca ²⁺ -Oszillationen	35
4.3.3	Einfluss auf die Frequenz der zytosolischen Ca ²⁺ -Oszillationen	36
4.3.4	Einfluss auf das Ausmaß der Nekrose	37
4.3.5	Wirkung einer β -adrenergen Stimulation auf die Ca ²⁺ -Speicherkapazität des Sarkoplasmatischen Retikulums	38
5	Diskussion	39
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	39
5.2	Auswirkungen auf den myokardialen Reperfusionsschaden durch Beeinflussung der PKA und der CaMK II	40
5.2.1	Inhibition der PKA und der CaMK II	40
5.2.2	Aktivierung der PKA und der CaMK II	42

5.3	Klinischer Ausblick	49
6	Zusammenfassung	50
7	Summary	51
8	Literaturverzeichnis	52
9	Publikationsverzeichnis	71
10	Erklärung	72
11	Danksagung	73

Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AIP	CaMK II-Inhibitor-Peptid
AKAP	a kinase anchoring proteins
AM	Acetoxymethylester
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butanedione monoxime
BisAA	Bisacrylamid
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CaMK II	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat

CCD Kamera	Charge-coupled Device Kamera
CCT	Kreatin-Karnitin-Taurin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm ²	Quadratzentimeter
CoCl ₂	Cobaltchlorid
Csp A	Cyclosporin A
CyP-D	Cyclophilin D
DHPR	Dihydropyridinrezeptoren
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(beta-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetat
EPAC	cAMP - aktiviertes Austauschprotein
et al.	und andere
g	Gramm
Gs	stimulierendes G-Protein
GSK 3β	Glykogensynthase-Kinase 3β
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Wasserstoff-Ionen
HCl	Salzsäure

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-
	Ethansulfonsäure
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IU	Internationale Einheiten
K ⁺	Kalium-Ionen
KB-R7943	2-(2-(4(nitrobenyloxy)phenyl)ethyl)iso-
	thiourea methanesulphonate
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kont	Kontrolle
l	Liter
M	Mol/Liter
mA	Milliampère
mAKAP	muscle A kinase anchoring protein
MCU	mitochondrialer Ca ²⁺ -Uniporter
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute/n
mm	Millimeter
mM	Millimol/Liter

ml	Milliliter
MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts- Transitions- Pore
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol/Liter
µl	Mikroliter
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium-Ionen
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NAR	Noradrenalin
NCE	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
nm	Nanometer
nM	Nanomol/Liter
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PDE	Phosphodiesterase
PDE 4D3	Phosphodiesterase 4D3

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PK II	Proteinkinase II
PLB	Phospholamban
PP	Diphosphat
PPC	pharmakologisches Preconditioning
PCI	perkutane Koronarintervention
r.E.	relative Einheiten
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinases
ROS	reactive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodin-Rezeptor
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SDS	Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SNS	sympathisches Nervensystem
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomet
U/ml	Units/Milliliter
VASP	Vasodilatator-stimulierendes Phosphoprotein
$\times g$	x-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
% (vol/vol)	Volumenprozent (volume per volume)
% (wt/vol)	Gewichtsprozent (weight per volume)

1 Einleitung

1.1 Ischämie, Reperfusion und Reperfusionsschaden

1.1.1 Akuter Myokardinfarkt

Aktuelle Aufzeichnungen des Statistischen Bundesamtes Deutschlands 2019 zeigen, dass Herz-/Kreislauf-Erkrankungen – wie auch in den Jahren zuvor - zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland zählen (ca. 37 % aller Todesfälle). Einem zu dieser Krankheitsgruppe zählenden akuten Myokardinfarkt erlagen knapp 47.000 Personen. Durch Verschluss der Koronararterien mit folgender Mangel durchblutung des Myokards kommt es zu einer Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung der Herzmuskelzellen. Dadurch ist die aerobe Energiegewinnung in den Mitochondrien der Kardiomyozyten nicht mehr möglich. Das kontraktile Gewebe, und somit das Herz, ist nicht mehr in der Lage, seine Pumpfunktion aufrecht zu halten. Für das Überleben der Erkrankten ist nun das schnelle Wiedereröffnen der verschlossenen Koronararterien, die Reperfusion, Therapie der Wahl, um das noch nicht in Mitleidenschaft gezogene Gewebe zu schützen. Aber nicht nur die Ischämie ist an dem Gewebsuntergang in dem infarzierten Areal des Myokards beteiligt. Frühere Studien haben gezeigt, dass durch die Reperfusion Prozesse in Gang gesetzt werden, die zusätzliche, negative Auswirkungen auf das Myokard haben und dieses schädigen können (Braunwald et al., 1985, Piper et al., 2004; Moens et al., 2005). Dieser in der postischämischen Reperfusion entstehende Schaden wird als „myokardialer Reperfusionsschaden“ bezeichnet (Downey, 1990; Piper et al., 1998; Garcia-Dorado, 2004; Halestrap et al., 2004).

1.1.2 Der myokardiale Reperfusionsschaden

Die Entwicklung des akuten Myokardinfarkts vollzieht sich in einem engen Zeitfenster, so dass die Nekrose des Myokards in den meisten Fällen etwa 3 Stunden nach dem Verschluss des Gefäßes das volle Ausmaß angenommen hat (Burke und Virmani, 2007; Thiene und Basso, 2010; Basso et al., 2010). Wird zeitnah die Reperfusion eingeleitet, kann ein möglicher transmuraler Myokardinfarkt verhindert werden, und das Ausmaß der Nekrose bleibt auf subendokardiale Areale limitiert.

Umgekehrt kann die Reperfusion nicht den gewünschten Effekt erzielen aufgrund des in der ischämischen Phase entstandenen mikrovaskulären Schadens und der Obstruktion. Es handelt sich um das „no-reflow-Phänomen“ (Basso et al., 2010), das Scheitern, ein ischämisches Gebiet nach Wiedereröffnung des Gefäßverschlusses mit Blut zu versorgen (Niccoli et al. 2009). Bedingt ist dies durch Anschwellen des Endothels, die Obstruktion des Gefäßlumens sowie äußere Kompression und wird verstärkt durch distale Embolisation (Basso et al., 2010). Aus dem Eintreten und dem Ausmaß dieses „no-reflow-Phänomens“ können ungünstige klinische Folgen wie anhaltende linksventrikuläre Dysfunktionen oder Arrhythmien u.a. resultieren (Chan et al., 2011).

Die Nekrose der Kardiomyozyten als Folge eines ischämischen Schadens, wie er bei einem Herzinfarkt auftreten kann, ist charakterisiert durch Hyperkontraktur der Zellen mit darauffolgender Ruptur des Sarkolems und dem Ausschütten des intrazellulären Inhalts (Siegmund et al., 1992; Piper et al., 2006; Hotchkiss et al., 2009). Nekrotische Zellen wirken hochgradig stimulierend auf das Immunsystem und führen sowohl zu einer Infiltration inflammatorischer Zellen als auch zu einer Zytokinproduktion (Frangogiannis et al., 2002; Kakkar und Lefer, 2004; Oyama et al., 2004; Hotchkiss et al., 2009; Eltzschig und Eckle, 2011). Duerr et al. (2011) führten Ischämie-/Reperfusionsexperimente an Mausmodellen durch und darauffolgende histopathologische Untersuchungen ergaben, dass es 3 Tage nach der Reperfusion im Infarktgebiet zur Bildung einer Granulationsfront kommt. Das Granulationsgewebe beinhaltet u.a. Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen, die über Wachstumsfaktoren und Zytokine die Fibroblastenproliferation induzieren und den Stoffwechsel der extrazellulären Matrix regulieren (Ganz 1993; Frangogiannis et al., 2000 & 2002). Fibroblasten produzieren Kollagen, und so entsteht 7 Tage nach Reperfusion kompaktes, kollagenreiches Narbengewebe (Frangogiannis et al., 2002; Duerr et al., 2011). Auch die Vaskulatur wird in Mitleidenschaft gezogen. In den Endothelzellen steigt während der Ischämie die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Zytosolisches Ca^{2+} und die Reenergetisierung der Endothelzelle während der Reperfusion induzieren eine Aktivierung des kontraktilen Apparates durch Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten. Infolge der Kontraktion entstehen interzelluläre Spalten im Endothel und die Barrierefunktion wird geschädigt (al-Haboubi et al., 1995; Schäfer et al., 2003; Gündüz & Kasseckert et al., 2006). Die endotheliale Permeabilität steigt und verursacht eine ödematöse Schwellung des reperfundierten

Gewebes (Noll et al., 1995; Dagenais et al., 1997; Gündüz & Kasseckert et al., 2006; Kasseckert et al., 2009).

1.1.3 Der akute myokardiale Reperfusionsschaden der Herzmuskelzellen

In dieser Arbeit wird besonderes Augenmerk auf die akuten Geschehnisse des Reperfusionsschadens in Kardiomyozyten und seiner Protektion auf zellulärer Ebene gelegt. Im Zellmodell ist dieser Schaden vor mehr als 2 Dekaden beschrieben worden und äußert sich als „Kontraktionsbandennekrosen“ im isolierten Herzen, die durch Hyperkontraktionen der Kardiomyozyten verursacht werden (Ganote, 1983). Dabei spielt die Ca^{2+} -Homöostase eine entscheidende Rolle (Ladilov et al., 1999; Schäfer et al., 2001; Piper et al., 2004). Unter ischämischen Bedingungen verarmen die Herzmuskelzellen an Substraten und Sauerstoff. Die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien zur Energiegewinnung kommt zum Erliegen, und die Kardiomyozyten sind auf die anaerobe Energiegewinnung angewiesen. Dabei führt die anaerobe Glykolyse durch die Anhäufung von Laktat zu einer zunehmenden Azidifizierung des Gewebes (Owens et al., 1996). Der anhaltende Sauerstoffmangel und die fortschreitende Reduktion des pH-Wertes sind verantwortlich dafür, dass letztlich auch die anaerobe ATP-Synthese zum Erliegen kommt. Durch das Energiedefizit können ATP-abhängige Prozesse nicht weiter unterhalten werden. Das hat u.a. die Inaktivierung der Na^+/K^+ -ATPase zur Folge, die K^+ aktiv in die Zelle hinein und Na^+ hinaus befördert (Ladilov et al., 1995). Da jedoch Na^+ über zahlreiche Na^+ -Kanäle und den Na^+/H^+ -Austauscher der Zellmembran in die Zelle gelangt, akkumuliert Na^+ im Zytosol (Anderson et al., 1990; Pike et al., 1993). Somit wird der transsarkolemmale Na^+ -Gradient reduziert und im Folgenden der „reverse mode“ des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCE) aktiviert. Folglich wird Na^+ im Austausch gegen Ca^{2+} in den Extrazellulärraum befördert, und es kommt zur intrazellulären Ca^{2+} -Überladung (Haigney et al., 1992; Ladilov et al., 1999; Schäfer et al., 2001). Diese hohe zytosolische Ca^{2+} -Konzentration führt normalerweise zur Überaktivierung einiger Ca^{2+} -abhängiger, schädlicher Prozesse wie z.B. die Überaktivierung des kontraktilen Apparates. Während der Ischämie schützt aber die herrschende Azidose die Zelle vor einer Überaktivierung dieser Prozesse, da diese unter erniedrigtem pH-Wert verlangsamt ablaufen.

Durch diesen Azidose-vermittelten Schutz kann die o.g. Überaktivierung der Aktin-Myosin-Interaktion des kontraktiven Apparates gedämpft werden (Piper et al., 1998). Mit Beginn der Reperfusion endet die Azidose und somit auch der Schutz der Zelle, was in dieser Phase in einer Überaktivierung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse resultiert. Zudem entsteht im ischämischen Myokard eine Kontraktur vom „Rigor-Typ“, die durch niedrige zytosolische ATP-Spiegel ($< 100 \mu\text{M}$) initiiert wird (Nichols und Lederer, 1990). Der dadurch entstehende Querbrückenmechanismus verursacht zwar für sich allein betrachtet keine großen strukturellen Schäden, bereitet aber den Weg für weitere reperfusionsinduzierte Schädigungen (Piper et al., 2004).

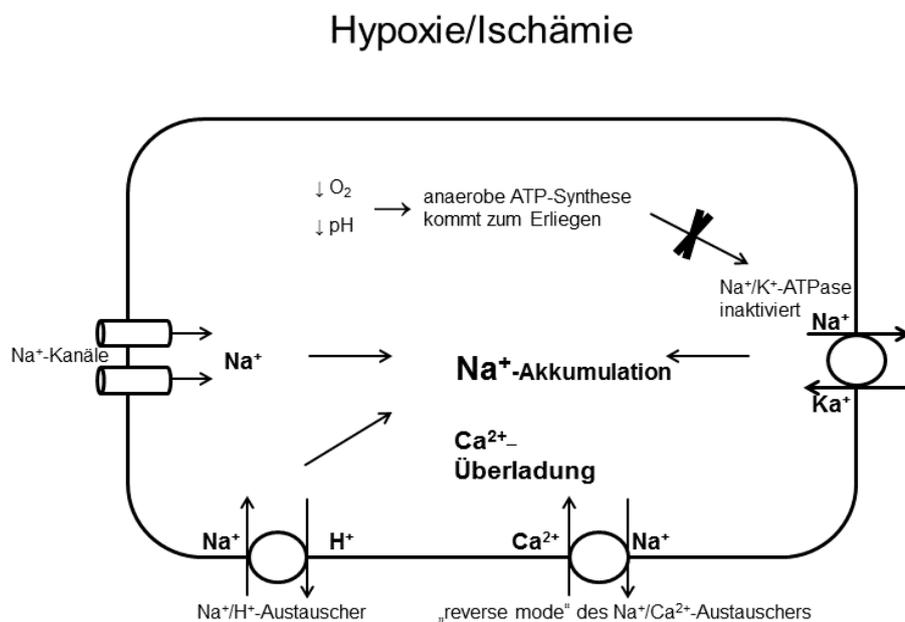


Abb. 1.1.3 a) Schematische Darstellung der zytosolischen Na^+ - und Ca^{2+} -Überladung unter ischämischen Bedingungen.

führen. Es bildet sich eine sogenannte „Kontraktionsbandennekrose“ (Ganote, 1983). Die Ca^{2+} -Oszillationen des Zytosols verursachen nicht nur eine Hyperkontraktur, sondern induzieren in der frühen Phase der Reperfusion die Aufnahme von Ca^{2+} ins Mitochondrium via mitochondrialem Calcium Uniporter (MCU) (Halestrap et al., 2004; Maack et al., 2006; Piper et al., 2008; Abdallah et al., 2011). Die Ca^{2+} -Überladung der Mitochondrien gilt als eine der wichtigsten Ursachen für die Öffnung unspezifischer mitochondrialer Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP) (Halestrap et al., 2004; Maack et al., 2006). Die MPTP liegen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran und sind aus verschiedenen Proteinen zusammengesetzt. Die Öffnung der MPTP steigert die Permeabilität der inneren Membran der Mitochondrien erheblich; sie wird dann für Moleküle bis 1,5 kDa durchlässig. Infolge dessen kommt es u.a. zu einem Membranpotentialkollaps, der einen Elektronentransport unmöglich macht, so dass die Atmungskette zum Erliegen kommt (Halestrap et al., 1998; Halestrap et al., 2004). Folgen sind zum einen die Abgabe von Cytochrom C in den intermembranären Spalt, wodurch u.a. die Apoptose eingeleitet wird. Zum anderen wird die oxidative Phosphorylierung inhibiert und u.a. Phospholipasen, Nukleasen und Proteasen aktiviert, was zum nekrotischen Zelltod führen kann (Halestrap et al., 2004).

1.1.4 Ansätze in der Reperfusionstherapie

Einige in vivo- und in vitro-Studien zeigen vielversprechende Ansätze, um durch Eingriffe in der frühen Reperfusionphase den Reperfusionsschaden zu reduzieren. Beispielsweise kann 2,3-Butanedione monoxime (BDM) durch eine direkte Blockade der Myofibrillen der Hyperkontraktur vorbeugen (Siegmond et al., 1991; Garcia-Dorado et al., 1992).

Versuche mit einem Inhibitor des reverse mode des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, 2-(2-4((nitrobenzyloxy)phenyl)ethyl)isothiourea methanesulphonate (KB-R7943), zeigten, dass dieser einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol zu Beginn der Reperfusion verringert. Dadurch wird weniger Ca^{2+} ins SR aufgenommen, und die Ca^{2+} -Oszillationen werden schwächer, da weniger Ca^{2+} zwischen SR und Zytosol verschoben wird (Inserate et al., 2002). Somit kommt es auch zu einer Abnahme der Hyperkontraktur (Schäfer et al., 2001). In diesem Zusammenhang wird zudem diskutiert, ob durch KB-R7943 auch die mitochondriale Ca^{2+} -Überladung gedämpft und so eine MPTP-Öffnung verhindert werden kann (Griffiths und Halestrap, 1993).

Auch die Aktivierung spezieller Signalkaskaden ist in den letzten Jahren in den Fokus der Protektion gegen den Reperfusionsschaden gerückt. Darunter versteht man verschiedene Proteinkinasen wie z.B. die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase G (PKG), wobei bei beiden Kinasen die Aktivierung protektiv wirkt (Piper et al., 2008). Endpunkt des PI3K-PKG-Signalweges ist eine Phospholamban-vermittelte SERCA-Aktivierung (Abdallah et al., 2005 & 2006). Durch diese Aktivierung der SERCA wird verstärkt Ca^{2+} in das SR aufgenommen und so die zytosolische Ca^{2+} -Überladung und die Ca^{2+} -Oszillationen reduziert.

Auf gleiche Weise beeinflusst auch eine Aktivierung der PKA die zytosolische Ca^{2+} -Homöostase mit dem Ziel der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR (Lindemann et al., 1983; James et al. 1989; Shannon et al., 2001; Bers, 2002).

Vergleichbare Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Oszillationen findet man durch eine Inhibition der sich in der Membran des SR befindlichen Ryanodin-Rezeptoren. Ryanodin ist in der Lage, die Ryanodin-Rezeptoren des SR zu blockieren, so dass Ca^{2+} nicht aus dem SR in das Zytosol freigesetzt wird und die Ca^{2+} -Oszillationen unterdrückt werden (Siegmond et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit im Hinblick auf die Protektion gegen den Reperfusionsschaden bietet die Inhibition der MPTP-Öffnung. Diese Öffnung findet nur unter pathophysiologischen Zuständen wie Ischämie/Reperfusion statt. Als Trigger sind u.a. Ca^{2+} und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bekannt. Durch Cyclosporin A (Csp A), einem spezifischen und direkten Inhibitor der MPTP, kann die Porenöffnung gehemmt werden (Halestrap et al., 2004; Oka et al., 2008). Der physiologisch impermeable Status der mitochondrialen Membran kann unter Csp A-Einfluss nicht in eine unspezifische Pore konvertieren, da Csp A die Bindung eines weiteren Effektors und somit die MPTP-Öffnung inhibiert und die Zelle vor den negativen Folgen dieser MPTP-Öffnung schützt (Halestrap et al., 2004). Piot et al. führten 2008 eine klinische Studie über den Effekt von Cyclosporin an Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt durch. Hier war die Gabe von Csp während der Reperfusion mit einer Reduktion der Infarktgröße verbunden.

Auch ein niedriger pH-Wert wirkt kardioprotektiv (Halestrap et al., 2002 & 2003). Außerdem schützt die Azidose in der frühen Phase der Reperfusion die Zellen, indem sie die Aktivität der Ryanodin-Rezeptoren stark verringert, wodurch die Ca^{2+} -

Freisetzung aus dem SR ins Zytosol deutlich reduziert wird (Ladilov et al., 1995; Schäfer et al., 2000).

1.2 Die Rolle der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II und der Proteinkinase A in der Ischämie/Reperfusion

Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMK II) ist eine Serin/Threonin-Kinase. Diese besteht aus 12 Monomeren (Tobimatsu et al., 1989; Kolodziej et al., 2000). Jedes Monomer setzt sich aus einer katalytischen, N-terminalen Domäne mit einer Substrat- und ATP-Bindungsstelle und einer regulatorischen, C-terminalen Domäne mit einer Calmodulin (CaM)-Bindungsstelle zusammen (Zhang und Brown, 2004). Die Bindung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes an die regulatorische Untereinheit induziert eine Konformationsänderung der Kinase, so dass die Blockade der Substratbindungsstelle an der katalytischen Region aufgehoben und das Enzym aktiviert wird.

Einerseits wird die Möglichkeit diskutiert, dass eine über β -adrenerge Stimulation gesteigerte Ca²⁺-Konzentration zur Aktivierung der CaMK II führt (Wu et al., 2006; Saucerman und Bers, 2008), andere Autoren schlagen eine Aktivierung durch das cAMP-aktivierte Austauschprotein (cAMP activated exchange protein [EPAC]) - völlig PKA/Ca²⁺-unabhängig - vor (Métrich et al., 2008; Oestreich et al., 2009). Unabhängig der Aktivierung steht am Ende der Signalkaskade der CaMK II eine Beeinflussung partiell derselben Zieltargets wie durch die PKA, d.h. ein Signalweg parallel zur PKA. Zu nennen wären u.a. die L-Typ-Ca²⁺-Kanäle, Phospholamban (PLB) und die Ryanodin-Rezeptoren (RyR) (Grimm und Brown, 2010). Ebenso demonstrierten Hartzell und Glass 1984 in in vitro Versuchen die Phosphorylierung des Myosin-Bindungsproteins-C sowohl durch die PKA als auch durch die CaMK II.

Die Proteinkinase A (PKA) ist ein Schlüsselenzym im Organismus, das zahlreiche verschiedene regulatorische Funktionen und Wirkungen ausübt. Es handelt sich hierbei um ein tetrameres Holoenzym, bestehend aus 2 regulatorischen R- und 2 katalytischen C-Untereinheiten (Heinrich et al., 2014). Dabei sind 2 Formen (RI und RII) der R-Untereinheit bekannt (Zakhary et al., 1999; Ruehr et al., 2004). Im inaktiven Zustand sind die C-Untereinheiten mit ihren aktiven Zentren an die R-Untereinheiten gebunden

und werden somit blockiert. Die PKA wird durch steigende cAMP-Spiegel aktiviert. Je zwei Moleküle des second messengers cAMP binden an die Substratbindungsstellen der regulatorischen Untereinheit. Infolge dessen kommt es zu einer allosterischen Konformationsänderung des Enzymkomplexes, d.h. die katalytischen Untereinheiten dissoziieren, und die PKA geht in ihre aktive Form über. Jetzt sind die C-Untereinheiten in der Lage, Substrate an spezifischen Serin- oder Threoninresten zu phosphorylieren (Manni et al., 2008; Heinrich et al., 2014).

Die Signaltransduktion von spezifischen Reizen wie z.B. dem Katecholamin Noradrenalin bis hin zur Aktivierung der PKA durch eine Steigerung des cAMP-Gehaltes erfolgt über β -adrenerge Rezeptoren, die an transmembranäre, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden und dadurch nachfolgende Adenylatzyklase aktivieren (Maier und Bers, 2002; Wehrens et al., 2004; Zaccolo, 2006). Durch Phosphodiesterasen (PDEs) wird cAMP abgebaut und so die cAMP-Kinase reguliert (Conti, 2000; Houslay und Adams, 2003). Dadurch, dass die PKA eine so große Vielfalt an Targets besitzt und an vielen verschiedenen Signalkaskaden beteiligt ist, ist eine Kompartimentierung der cAMP/PKA-Signalwirkung an verschiedenen subzellulären Orten unabdingbar (Edwards und Scott, 2000). Eine wichtige Rolle hierbei spielen die „A kinase anchoring proteins“ (AKAPs), die die PKA an spezifischen intrazellulären Orten in der Nähe von spezifischen Targets verankern (Colledge und Scott, 1999; Tasken und Aandahl, 2004; Langeberg und Scott, 2005).

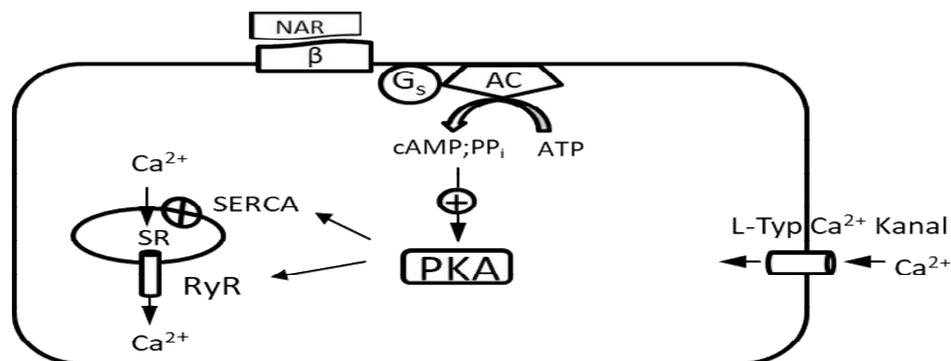


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Signaltransduktion bis zur Aktivierung einiger Zieltargets der PKA (NAR = Noradrenalin, β = β -adrenerger Rezeptor, G_s = stimulierendes G-Protein, AC = Adenylatzyklase, PKA = Proteinkinase A, SR = Sarkoplasmatisches Retikulum, SERCA = Ca^{2+} -ATPase des SR, RyR = Ryanodin-Rezeptor), modifiziert nach Heinrich et al., 2014

Phospholamban wird durch die cAMP-abhängige Kinase phosphoryliert. Dadurch wird die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des SR und folglich die Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} in das SR erhöht. So kommt es zu einer beschleunigten Relaxation des zuvor kontrahierten Herzmuskels (Lindemann et al., 1983; Zhang et al., 1995; Heinrich et al., 2014).

Das SR, das Myofilamente und Mitochondrien umschließt, fungiert als kurzfristiger Ca^{2+} -Speicher und als Ca^{2+} -Freisetzungsstätte (Bers, 2001). Calsequestrin und Calreticulin sind Ca^{2+} -bindende Proteine innerhalb des SR (Li et al., 2002; Beard et al., 2004). Calsequestrin ist am Ryanodin-Rezeptor (RyR) des SR verankert und reguliert dessen Aktivität, d.h. die Abgabe von Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol, in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration des SR. Daher spielt Calsequestrin eine Hauptrolle in der Ca^{2+} -Homöostase (Beard et al., 2004). Ebenso hat auch Calreticulin u.a. eine Ca^{2+} -regulierende Funktion (Li et al., 2002).

In Ventrikeln von Säugetieren spielt das SR eine zentrale Rolle bei der elektromechanischen Kopplung. Dabei depolarisiert ein Aktionspotential die sarkolemmale Membran und führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom vom Extra- in den Intrazellularraum via spannungsregulierter Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran der Herzmuskelzellen (Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) oder L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle genannt). Über eine Phosphorylierung durch die PKA kann die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser spannungsregulierten Ca^{2+} -Kanäle zusätzlich erhöht werden. Durch die steigende Ca^{2+} -Konzentration im Zellinneren werden ihrerseits RyR aktiviert, die an der terminalen Zisterne des SR lokalisiert sind, und Ca^{2+} strömt auch aus dem SR in das Zellinnere. Dieser Vorgang wird als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bezeichnet (Bers, 2002).

Zudem beeinflusst die PKA das Myosin-Bindungsprotein-C und übt dadurch einen positiv inotropen Effekt aus, denn Troponin C bindet Ca^{2+} , und dadurch kommt es letztendlich zu einer stärkeren Anbindung von Myosin an Aktin, die die Muskelkontraktion ermöglicht. Die Phosphorylierung von Troponin I reduziert die Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente und beschleunigt dadurch die Relaxation (Lindemann et al., 1983; Zhang et al., 1995; Heinrich et al., 2014).

Maier zeigt 2009 in isolierten Rattenherzen die Auswirkungen eines pharmakologischen Preconditioning (PPC) und eine damit verbundene Protektion gegen den Reperfusionsschaden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine präischämische Stimulation der β -Adrenozeptoren mit Isoproterenol PKA-vermittelt ist. Zu dieser Schlussfolgerung kommt er, da bereits in Maier et al. 2009 gezeigt wurde, dass

eine Inhibition der PKA mit H89 zu einer Aufhebung der Kardioprotektion führt. Obwohl bereits diverse Arbeiten auf eine protektive Wirkung einer β -adrenergen Stimulation im Reperfusionsgeschehen hinweisen, sind noch viele Fragen unbeantwortet.

Micoogullari aus unserer Arbeitsgruppe zeigte 2014, dass eine β -adrenerge Rezeptor-Aktivierung während der Reperfusion zu einer Reduktion der reperfusionsinduzierten Hyperkontraktur und Nekrose führt. Dies erfolgt durch eine Verminderung von Frequenz und Amplitude zytosolischer Ca^{2+} -Oszillationen. Er machte 2014 mittels Western-Blots Untersuchungen über den Phosphorylierungsstatus von PLB und RyR. Der Phosphorylierungsstatus von PLB war in der kritischen Phase der Reperfusion reduziert und konnte durch eine PKA-Aktivierung signifikant gesteigert werden. Somit hat er eine gesteigerte Aktivität des SRs nachgewiesen. Dadurch wird vermehrt Ca^{2+} ins SR aufgenommen und die Ca^{2+} -Oszillationen werden reduziert. Folglich werden die Kardiomyozyten gegen den Reperfusionsschaden geschützt. Der Phosphorylierungsstatus von RyR blieb in Micoogullaris Versuchsreihe sowohl unter ischämischen Bedingungen als auch in der Reperfusion und in der Reperfusion während einer PKA-Aktivierung unverändert. Er schlussfolgert dementsprechend, dass die PKA-Aktivierung während der Reperfusion im Zellmodell keinen Einfluss auf die RyR-Aktivität hat.

In Abgrenzung zu Micoogullaris Untersuchungen sind die Auswirkungen einer PKA-respektive einer CaMK II-Inhibierung im Vergleich zu einer PKA-Aktivierung während der Reperfusion auf zellulärer Ebene, d.h. z.B. auf den Ca^{2+} -Haushalt und die davon abhängigen Mechanismen, noch weitgehend ungeklärt. Es stellt sich die Frage, in wie weit das SR durch die Kinasen modifiziert werden kann und mögliche kardioprotektive Effekte unterstützt.

1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich der Auswirkungen einer PKA- und einer CaMK II-Beeinflussung während der Reperfusion auf den myokardialen Reperfusionsschaden. Am Modell ischämisch-reperfundierter, isolierter Kardiomyozyten wurden beide Kinasen in einer Reihe von Versuchen inhibiert. Zudem wurde eine β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol vorgenommen. Analysiert wurde, ob die Beeinflussung der Kinasen zu Beginn der Reperfusion Auswirkungen hat auf:

- 1) das Ausmaß der Hyperkontraktur und Nekrose als Ausdruck des Reperfusionsschadens
- 2) die zytosolische Ca^{2+} -Homöostase
- 3) die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums als Speicherorganell für das zytosolische Ca^{2+}

2 Material

2.1 Chemikalien

Häufig verwendete Chemikalien

Albumin (aus Rinderserum)	RocheApplied Science,Mannheim
bisBenzimide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Deoxy-D-Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Glukose	Merck, Darmstadt
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumcyanid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Schweiz
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kollagenase, Typ CLS II,(322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Laminin	RocheApplied Science,Mannheim
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199	Biochrom, Berlin
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein

Propidiumiodid

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Perfusionsexperimente

Calcein-AM

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat

Merck, Darmstadt

Fura-2-AM, (1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-

6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(2'-amino-

5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat

Invitrogen, Karlsruhe

H-89 (N-(2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl)-5-

Isoquinolinesulfonamide.2HCL)

Enzo Life Sciences, Lörrach

(+/-)-Isoproterenol, (1-(3`4`-Dihydroxyphenyl)-2-

Isopropylaminoethanol; Isopropylarterenol)

Sigma-Aldrich, St. Louis
(USA)

Koffein

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

KN-93 (N-[2-[N-(4-Chlorocinnamyl)-N-methyl-aminomethyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzenesulfonamide phosphate salt, N-[2-[[[3-(4'-Chlorophenyl)-2-propenyl]methylamino]methyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4'-methoxybenzenesulfonamide phosphate salt)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

N₂

Linde, München

2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

2.2.1 Zellkulturmedien

CCT-Medium:

Medium 199+

HEPES 3,6 g/l

Kreatin 5 mM

Karnitin 2 mM

Taurin 5 mM

Das CCT-Medium wurde mit NaOH auf pH 7,4 titriert.

Vorplattierungsmedium:

CCT-Medium+

Laminin 0,5 µg/ml

Penicillin 100 IU/ml

Streptomycin 10 µg/ml

Ausplattierungsmedium:

CCT-Medium

Penicillin 100 IU/ml

Streptomycin 10 µg/ml

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 Perfusionsmedien

Die in unseren Experimenten verwendeten Perfusionsmedien werden im Folgenden beschrieben.

Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Normoxiemedium):

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	125,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	1,0
HEPES	25,0
Glukose	2,5

Die Lösung wurde bei 37°C mit NaOH auf pH 7,4 titriert.

Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Anoxiemedium):

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	125,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	1,0
HEPES	25,0

Die Lösung wurde bei 37°C mit NaOH auf pH 6,4 titriert.

Das Hypoxiemedium wurde nach Zusatz von Cystein (830 µM) gemäß der von Allshire et al. (1987) beschriebenen Methode im Dampfdruckkochtopf für 60 Minuten bei 2 bar und 120°C autoklaviert.

2.2.3 Inkubationsmedien

Zur metabolischen Inhibierung und anschließenden Nekrosemessung wurden die Zellkulturschalen mit folgenden Medien vorbehandelt:

Normoxisches Inkubationsmedium

Dabei wurde die normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung verwendet. Diese wurde zur Simulation der Normoxie und der Reperfusion eingesetzt.

Anoxisches Inkubationsmedium

Hierfür wurden 50 ml der anoxischen HEPES-gepufferten Tyrode-Lösung mit 2-Deoxy-D-Glukose (10 mM bzw. 50 mM) und Kaliumcyanid (5 mM bzw. 25 mM) versetzt.

2.3 Geräte und Laborbedarf

2.3.1 Zellkultur und Herzmuskelzellisolierung

Brutschrank	Kendro, Hanau
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Gewebehacker	Harvard Apparatus über Hugos Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Langendorff-Apparatur	Eigenbau Physiologisches Institut JLU Gießen
Mikroskop	Olympus, Hamburg TMS-F, Nikon, Japan
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Eickenmeyer, Tuttlingen

Sterilbank

Kendro, Hanau

2.3.2 Fluoreszenzmessungen

CCD Kamera

TILL Photonics, Gräfelfing

Computer-Software

TILL Photonics, Gräfelfing

Dichroid-Spiegel

Olympus, Hamburg

Emissionsfilter

Olympus, Hamburg

Inverses Mikroskop

Olympus, Hamburg

Monochromator

TILL Photonics, Gräfelfing

Xenon-Lampe

TILL Photonics, Gräfelfing

2.3.3 Anoxie-Reoxygenationsexperimente

Dampfdruckkochtopf

All American, Canada

Druckstabile Glasgefäße mit

verschießbarem Deckel

Bormioli Rocco, Italien

Edelstahlkapillaren

Alltech, Unterhaching

Gasdichte Schläuche

Kahlensee, Gießen

Gasventile

Kahlensee, Gießen

Peristaltikpumpe

Gilson-Abimed, Langenfeld

Perfusionskammer

Eigenbau, Physiologisches Institut
JLU Giessen

2.3.4 Weitere Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Hamiltonspritze (100 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Heizblock	Techne, Burkhardtsdorf
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Inkubator	Kendro, Hanau
Pestler	Kontes, Vineland, USA
Perfusionsheizung	Eigenbau, Physiologisches Institut JLU Gießen
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weinheim
Schüttler, Typ: WT 12	Biometra, Göttingen
Vortexer	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Haraeus, Hanau

2.3.5 Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen, Typ Falcon 3001	Becton Dickinson, Heidelberg
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Parafilm ®	PECHINEY Plasic Packaging, Menasha, USA

Pellet Pestle ®	Kontes, Vineland, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Röhrchen, 10 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 50 ml, Typ: Falcon: 352070	Becton Dickinson, Heidelberg
Trockenpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Zellkulturschalen, Typ: Falcon 353001	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber, Typ: Falcon 353087	Becton Dickinson, Heidelberg

3 Methoden

3.1 Herzmuskelzellisolierung

3.1.1 Versuchstiere

In dem beschriebenen Modell wurden ventrikuläre Herzmuskelzellen von adulten, 200-300g schweren Wistar-Ratten isoliert. Diese Tiere wurden eigens im Physiologischen Institut der JLU Giessen gezüchtet und erhielten freien Zugang zu Nahrung (ALTRONIN) und Wasser.

3.1.2 Präparation ventrikulärer Herzmuskelzellen

Die Isolierung der Kardiomyozyten wurde nach der von Piper et al. (Piper et al., 1982) beschriebenen Methode durchgeführt.

Folgende Lösungen wurden dabei verwendet:

Ca²⁺-Stammlösung:

Substanz	Konzentration in mM
CaCl ₂	100,0

Powell-Medium:

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	110,0
NaHCO ₃	25,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
Glukose	11,0

Kollagenasepuffer:

Substanz	Menge
Powell-Medium	50 ml
Kollagenase	20 mg
Ca ²⁺ - Stammlösung	12,5 µl

Die Ratten wurden unter Ethernarkose durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde der Brustraum eröffnet und zunächst das Perikard entfernt. Nach Anhebung von Herz und Lunge wurden diese Organe durch einen Scherenschlag vom Organismus getrennt. Anschließend wurden Herz und Lunge in eiskalte isotonische NaCl-Lösung gelegt. In dieser Lösung liegend wurde das Herz von Lunge sowie Geweberesten freipräpariert und anschließend mit der Aorta an die Langendorff-Apparatur angehängt. Das Herz wurde kurzzeitig mit Powell-Medium perfundiert, um Blutreste in den Koronarien auszuwaschen. Im Anschluss daran wurde rezirkulierend für ca. 25 min mit 50 ml Kollagenasepuffer perfundiert. Dann nahm man eine Trennung der Ventrikel von den Vorhöfen vor, um das Ventrikelgewebe mechanisch mit Gewebehacker und dann manuell mit Skalpell zu zerkleinern. Als Nächstes erfolgte die Inkubation des Gewebes für 5 min bei 37°C in Kollagenasepuffer. Nun konnte der Zellbrei mit einer 5ml-Pipette vorsichtig auf- und abpipettiert werden, um die Mazeration der Herzmuskelzellen zu begünstigen. Zur Entfernung noch vorhandener Zellaggregate erfolgte die Filtration der Suspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße) und dann die Zentrifugation dieser Suspension bei 25×g für 3 min. Das entstandene Pellet, das 200 µM CaCl₂ enthält, wurde in Powell-Medium aufgenommen. Anschließend wurde es erneut bei 25×g für 2 min zentrifugiert und in 400 µM CaCl₂ enthaltendes Powell-Medium aufgenommen. Die Suspension wurde gemäß der Anzahl der zu präparierenden Herzen auf zuvor mit Powell-Medium befüllte Reagenzgläser verteilt. Nach nochmaliger Zentrifugation bei 25×g für 1 min entstand eine Zellpopulation aus ca. 70-80 % stäbchenförmigen, vitalen Kardiomyozyten.

3.1.3 Zellkultur

Die Kulturschalen, die die Glasdeckgläschen beinhalteten, wurden mit Vorplattierungsmedium beschickt, um eine bessere Anheftung der Zellen an die Deckgläschen zu ermöglichen. Über Nacht wurden die Kulturschalen im Brutschrank aufbewahrt. Am Folgetag wurde das Vorplattierungsmedium kurz vor dem Ausplattieren abgesaugt, damit das bei der Präparation zuletzt gewonnene Pellet – vermisch mit Ausplattierungsmedium (24 ml pro Herz) - auf die vorplattierten Kulturschalen verteilt werden konnte. Im Anschluss daran erfolgte eine zweistündige Phase der Anheftung bei 37°C, nach der das Ausplattierungsmedium erneuert wurde, so dass tote, abgerundete und nicht haftende Kardiomyozyten ausgewaschen wurden. Somit verblieb eine Kultur, die zu ca. 90% aus lebenden, stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand.

3.2 Anoxie-Reoxygenationsversuche

3.2.1 Versuchsaufbau

Die Kardiomyozyten haften auf Deckgläschen, die für die Anoxie-Reoxygenationsversuche in eine Perfusionskammer eingebaut wurden. Danach wurde diese Kammer gasdicht verschlossen und die Temperatur innerhalb der Kammer konstant auf 37°C gehalten. Die entsprechenden Anoxie- bzw. Reoxygenationsmedien wurden mittels Peristaltikpumpe mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min über Edelstahlkapillaren durch die Kammer gepumpt und umspülten die Kardiomyozyten. Das Anoxiemedium wurde während des gesamten Versuchszeitraumes mit 100% N₂ begast.

3.2.2 Video-Imaging-System für fluoreszenzmikroskopische Messungen

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Messungen durchgeführt. Das von einer Xenonlampe entsandte Anregungslicht wurde mittels eines Monochromators gefiltert und die zum Fluoreszenzfarbstoff, mit dem die Kardiomyozyten beladen waren, entsprechende Wellenlänge ausgewählt. Die ausgewählte Wellenlänge wurde mit Hilfe eines Dichroid-Spiegels auf die Kardiomyozyten in die Perfusionskammer gelenkt. Der

Fluoreszenzfarbstoff wurde angeregt, und das emittierte Licht erreichte durch den Dichroid-Spiegel und einen Emissionsfilter eine an einen Computer angeschlossene Kamera, die das eingehende Signal aufzeichnete. Die Daten wurden mit einer TILL Photonics-Software (TillVision) ausgewertet.

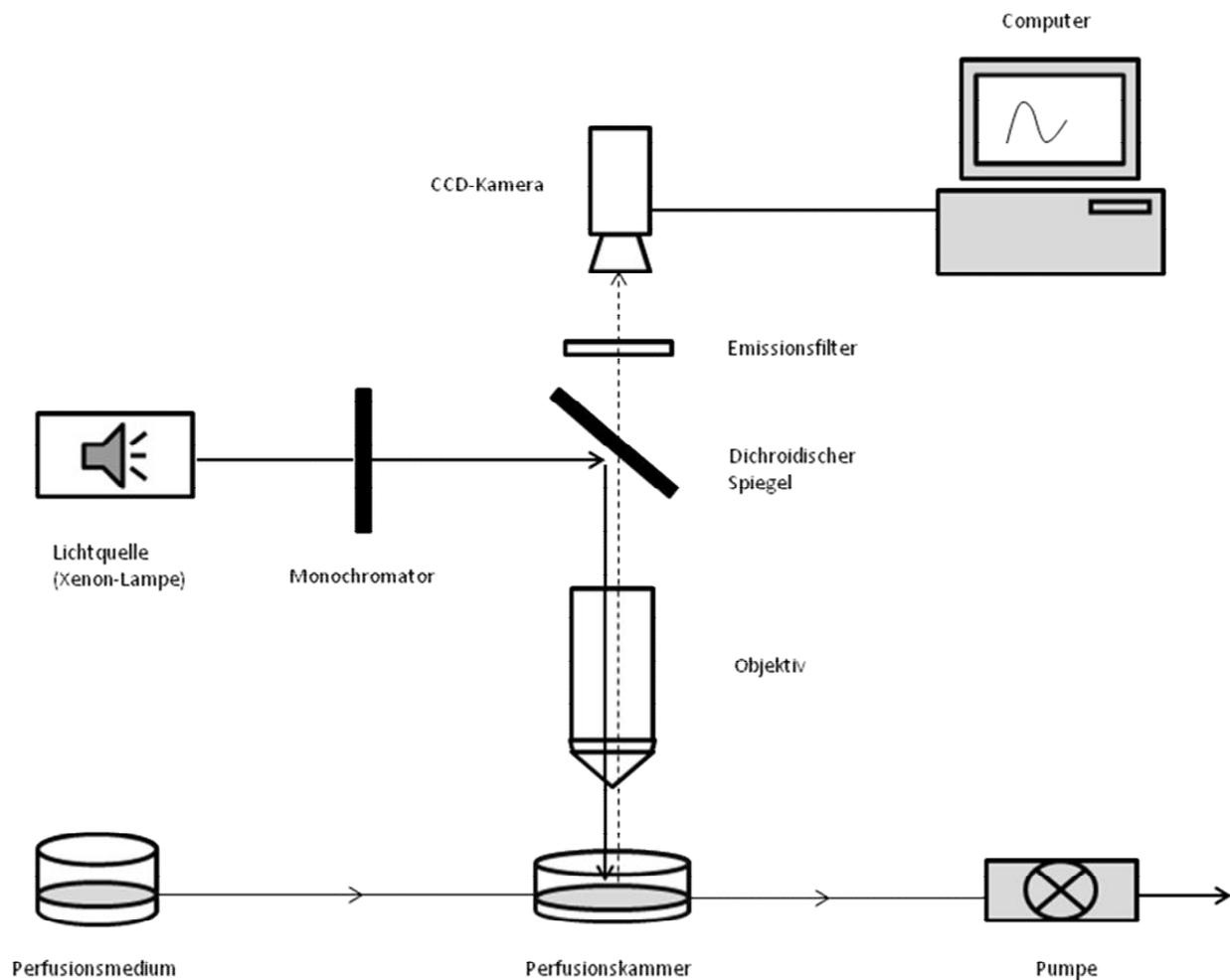


Abb. 3.2.2 Vereinfachte schematische Darstellung des Video-Imaging-Mikroskops. Durchgezogener Pfeil: Strahlengang des Anregungslichts. Gestrichelter Pfeil: von den Fluoreszenzfarbstoff-beladenen Kardiomyozyten emittiertes Licht

3.2.3 Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

Die Detektion der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erfolgt mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Die Kardiomyozyten wurden mit FURA-2-AM, einem Fluoreszenzfarbstoff, in einer Konzentration von 0,625 µM/L in CCT-Medium beladen und 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Zellen mit CCT-Medium, und sie wurden weitere 15 min nachinkubiert. FURA-2-AM ist ein Acetoxymethylester, der die Zellmembran überwinden kann. Intrazellulär wird die Acetoxymethyl-Gruppe durch Esterasen abgespalten, und das geladene Molekül kann die Zellmembran nicht mehr überwinden. Die Anregung von Fura-2-AM erfolgte mit den Wellenlängen 340 und 380 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Die Daten der Fura-2-Messungen werden als Ratio (340 nm/380 nm) in relativen Einheiten (r.E.) wiedergegeben.

In einer Reihe von Experimenten mittels Koffein haben wir die Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR untersucht. Koffein wurde in einer Konzentration von 10 mM/L am Ende der Reperfusion gegeben. Koffein aktiviert die Ryanodin-Rezeptoren des SR und bewirkt eine maximale Freisetzung des im SR gespeicherten Ca²⁺ ins Zytosol. Dieser transiente Anstieg wird als Koffein-Peak bezeichnet, er wurde gemessen und in % wiedergegeben.

3.2.4 Nekrosemessung

Bei der Nekrosemessung waren die Kulturschalen mit den Kardiomyozyten einer 80-minütigen Hypoxie ausgesetzt und wurden dann 30 Minuten mit dem jeweils zu untersuchenden Stoff reoxygeniert. Im Anschluss wurden sie mit den Farbstoffen Propidiumiodid und bisBenzimide inkubiert. Die intakte Zellmembran lebender Zellen ist für Propidiumiodid impermeabel. Es kann ausschließlich in nekrotische Zellen eindringen und färbt diese und ihre Zellkerne.

3.2.5 Experimentelles Protokoll

Um Ischämie und Reperfusion zu simulieren, wurden die Kardiomyozyten zunächst 60 Minuten lang mit Hypoxiemedium und unmittelbar danach 20 Minuten lang mit

Reoxygenationsmedium perfundiert. Während der einzelnen Versuche wurden in den letzten 5 Minuten der Ischämie und in der gesamten Reoxygenation verschiedene Aktivatoren oder Inhibitoren eingesetzt, die in nachfolgender Tabelle näher beschrieben sind. Isoproterenol wurde in Micoogullaris Untersuchungen in den Konzentrationen 100 nM und 10 nM verwendet. In der hier vorliegenden Arbeit wurden für Isoproterenol Experimente zur Zelllänge mit 1 µM, 100 nM und 10 nM durchgeführt, bei anschließenden Untersuchungen wurden 10 nM verwendet.

Die Firma Enzo Life Sciences empfiehlt beispielsweise für H89 in ihrem Datenblatt (abgerufen 08/2019) einen Konzentrationsbereich zwischen 30 und 100 µM für kultivierte Zellen, in vorliegender Arbeit wurden 50 µM verwendet. In vielen Studien über KN 93 findet man Konzentrationsbereiche zwischen 1 und 10 µM (Wagner et al., 2011; Warren et al. 2017 u.a.). In dieser Untersuchungsreihe ist KN 93 in einer Konzentration von 5 µM angewandt worden.

Substanz	Konzentration	Eigenschaften
H 89	50 µM	Inhibitor der PKA
KN 93	5 µM	Selektiver Ca ²⁺ /Calmodulin-abh. PK II-Inhibitor
Isoproterenol	10 nM	Aktivator der PKA, steigert die cAMP-Produktion

3.2.6 Messparameter

Parameter	Methode	Einheit
Zelllänge	Zelllängenmessung	% der endanoxischen Länge
Zytosolisches Ca ²⁺	FURA-2	Relative Einheiten
Ca ²⁺ -Oszillationen	FURA-2	Anzahl der Oszillationen/min
Nekrose	Propidiumiodidfärbung	% aller gezählten Zellen

3.3 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte +/- SEM von n verschiedenen Experimenten wiedergegeben.

Statistische Vergleiche wurden durch einfache Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für post-hoc Analysen durchgeführt. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Zeitverlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unter Ischämie und Reperfusion

4.1.1 Exemplarischer Verlauf des zytosolischen Calciums unter Ischämie und Reperfusion

Während der Ischämie kommt es in den Kardiomyozyten zu einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung. Die Abb. 4.1.1 (A) zeigt exemplarisch den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle – dargestellt als Fura-2-Ratio in relativen Einheiten - unter ischämischen Bedingungen.

Die Abb. 4.1.1 (B) stellt den in der Reperfusion zu beobachtenden Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration unter Kontrollbedingungen dar. Diese zytosolische Ca^{2+} -Kinetik lässt sich in zwei Phasen untergliedern: Zu Beginn der Reperfusion kommt es zu einer rapiden Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol, da dieses ins SR aufgenommen wird (1.Phase). In der 2. Phase treten hochfrequente zytosolische Ca^{2+} -Oszillationen auf, bedingt durch repetitive Aufnahme des Ca^{2+} aus dem Zytosol ins SR und Abgabe des Ca^{2+} aus dem SR ins Zytosol. Simultan zum Auftreten der Ca^{2+} -Oszillationen entwickeln die Zellen eine irreversible Hyperkontraktur. Diese Hyperkontraktur charakterisiert den akuten myokardialen Reperfusionsschaden.

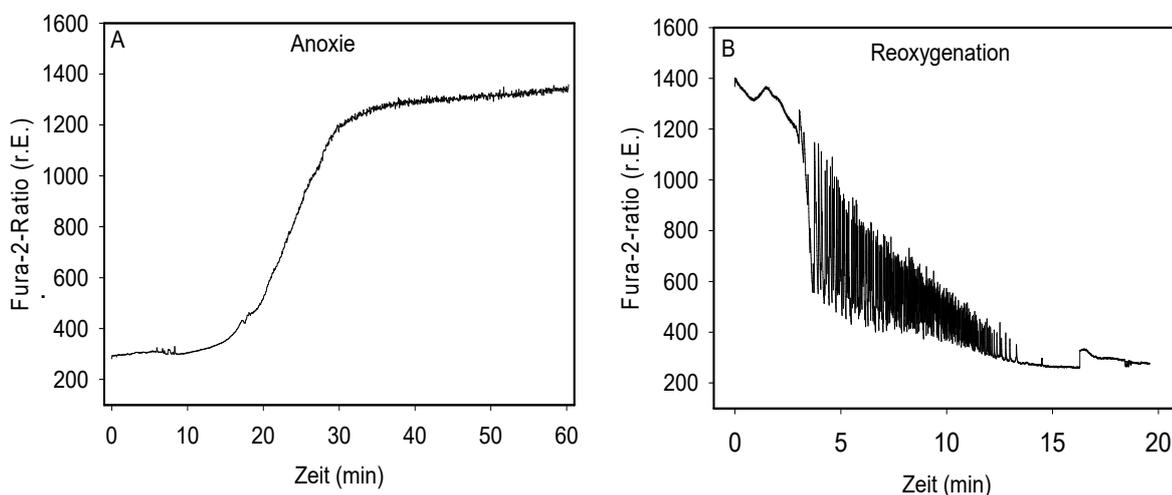


Abb. 4.1.1 Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Fura-2-Ratio in relativen Einheiten) unter Kontrollbedingungen links während der Ischämie und rechts während der Reperfusion.

4.1.2 Verlauf der zytosolischen Calcium-Konzentration unter Reperfusion

Die Abb. 4.1.2 veranschaulicht die Unterschiede der zytosolischen Ca^{2+} -Kinetik während der Reperfusion zwischen Kontrollbedingungen (A) und unter dem Einfluss von Isoproterenol 10 nM (B). Eine deutliche Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen tritt durch die Behandlung mit Isoproterenol auf.

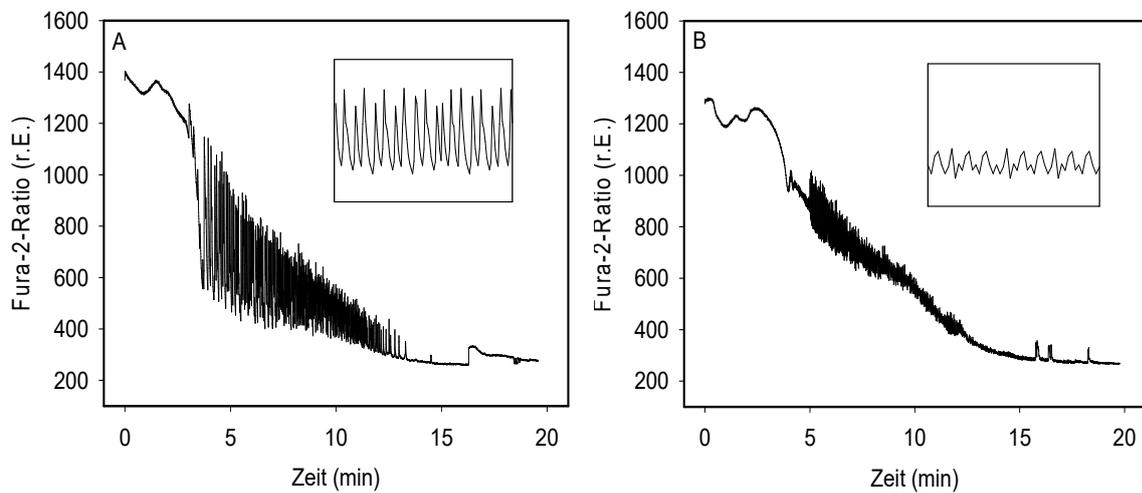


Abb. 4.1.2 Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Fura-2-Ratio in relativen Einheiten) unter Kontrollbedingungen links und mit Isoproterenol (10 nM) rechts während der Reperfusion. Die Ausschnittsvergrößerungen beider Bilder sind zwischen der 7. und 8. Minute gewählt.

4.2 Vergleich zwischen dem Einfluss einer Inhibierung der Proteinkinase A und einer Inhibierung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II auf die Entwicklung der Hyperkontraktur und die Calcium-Kinetik in der Reperfusion

4.2.1 Einfluss auf die Zelllänge

In einer Reihe von Experimenten wurden die Wirkungen einer PKA- und CaMK II-Inhibierung auf das Ausmaß der Hyperkontraktur untersucht. Die Abb. 4.2.1 zeigt die Zellverkürzung nach 15 Minuten Reperfusion. In diesem Protokoll wurden sowohl H89 (50 µM), ein Inhibitor der PKA, als auch KN 93 (5µM), ein selektiver Ca²⁺/Calmodulin-abhängiger Protein-Kinase II-Inhibitor, angewandt. Die Abb. zeigt, dass sich die Zellen nach der Reperfusion unter Kontrollbedingungen um ca. 40 % ihrer endischämischen Länge verkürzen und somit eine Hyperkontraktur aufweisen. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass H89 und KN 93 das Ausmaß der Hyperkontraktur signifikant verstärken. Beide Inhibitoren haben zu einer vergleichbaren Hyperkontraktur geführt.

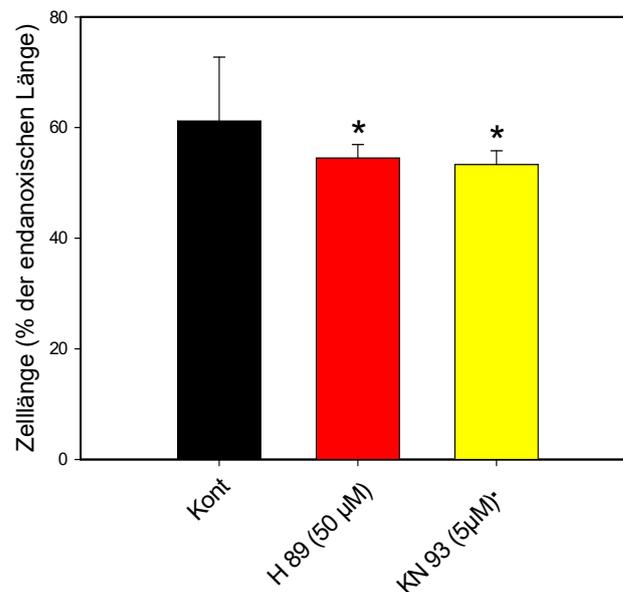


Abb. 4.2.1 Zelllänge in % der endischämischen Länge nach 15 Minuten Reperfusion unter Kontrollbedingungen (n=28), in Gegenwart des PKA-Inhibitors H89 (50 µM, n=28) und des CaMK II-Inhibitors KN 93 (5 µM, n=24). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n ≥ 11, * p < 0,05 vs. Kontrolle).

4.2.2 Einfluss auf die Amplitude der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen

Simultan zu den Längenmessungen wurde die Wirkung der Inhibitoren auf die Ca²⁺-Oszillationen untersucht. Die Abb. 4.2.2 zeigt die Ca²⁺-Amplitude nach 10 Minuten Reperfusion. Wie abgebildet ist, verstärken die Inhibitoren H89 und KN 93 die Amplitude der Ca²⁺-Oszillationen signifikant. Zu erkennen ist, dass der Effekt bei H89 signifikant stärker ist als bei KN 93.

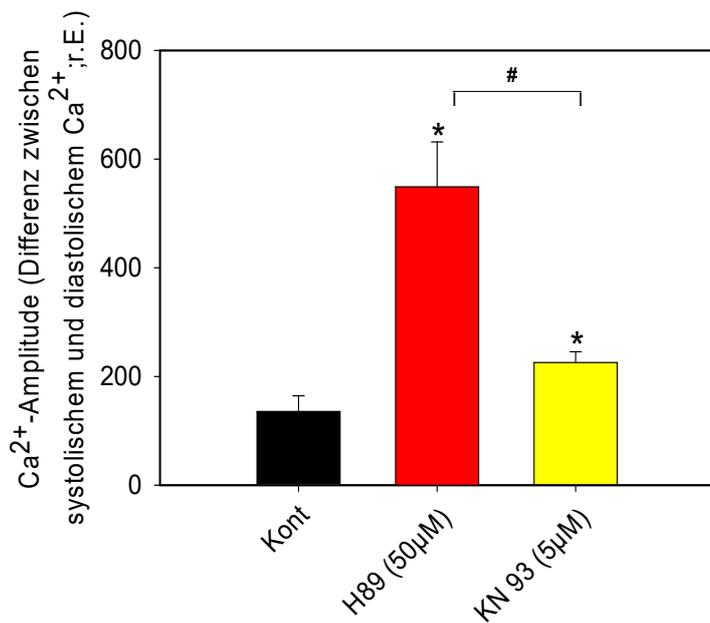


Abb. 4.2.2 Einfluss von H89 (50 µM, n=11) und KN 93 (5µM, n=22) auf die Ca²⁺-Amplitude nach 10 Minuten Reperfusion im Vergleich zu Kontrollbedingungen (n= 18). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n ≥ 11, * p < 0,05 vs. Kontrolle, # p < 0,05 vs. H89 oder KN 93).

4.2.3 Einfluss auf die Frequenz der zytosolischen Ca²⁺Oszillationen

Die beschriebene Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Amplitude geht mit einer Verstärkung der Frequenz der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen einher. Die Abb. 4.2.3 (A) stellt den Verlauf der während der Reperfusion auftretenden Ca²⁺-Oszillationen exemplarisch dar. Die Applikation von H89 weist zwischen der 3. und 6. Minute der Reoxygenation eine Frequenzerhöhung um knapp das Achtfache auf, KN 93 erhöhte die Oszillationsfrequenz um mehr als das Vierfache. In Abb. 4.2.3 (B) sind die Maxima der Ca²⁺-Oszillationen während der Reperfusion dargestellt.

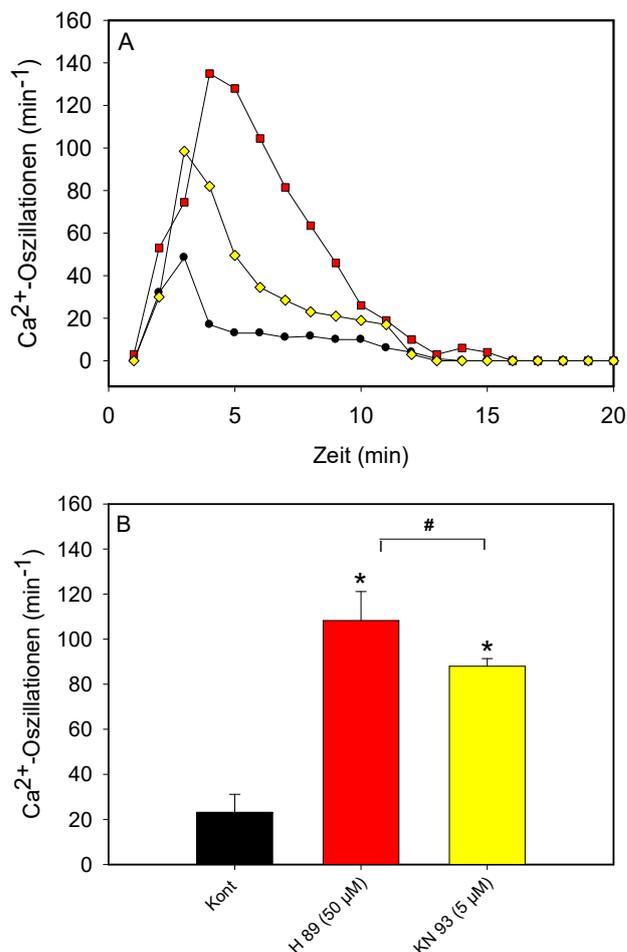


Abb. 4.2.3 A: Exemplarischer Verlauf der Ca²⁺-Oszillationen (min⁻¹) während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen (-●-) und in Anwesenheit von H 89 [50 µM] (-□-) versus KN 93 [5 µM] (-◇-).

B: Darstellung der Maxima der Ca²⁺-Oszillationen zwischen der 3. und 6. Minute der Reperfusion. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n ≥ 11, * p < 0,05 vs. Kontrolle, # p < 0,05 vs. H89 oder KN 93).

4.2.4 Einfluss auf das Ausmaß der Nekrose

Die Abb. 4.2.4 zeigt, dass der Anteil der nekrotischen Zellen unter Kontrollbedingungen bei ca. 20 % liegt. Der PKA-Inhibitor H89 erhöht die Anzahl nekrotischer Zellen auf 60 %. Die Anwesenheit des CaMK II-Inhibitors KN 93 führt zu einem Nekroseanteil von knapp 30 %.

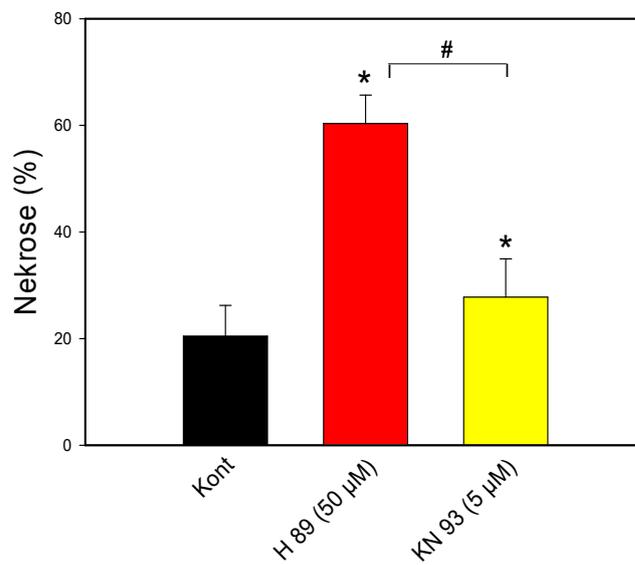


Abb. 4.2.4 Anteil nekrotischer Zellen unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von H 89 [50 µM] versus KN 93 [5µM]. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n ≥ 12 Experimente pro Bedingung, * p < 0,05 vs. Kontrolle, # p < 0,05 vs. H89 oder KN 93).

4.3 Einfluss einer β -adrenergen Stimulation auf Zelllänge, zytosolische Ca^{2+} - Oszillationen, Nekrose und das sarkoplasmatische Retikulum

4.3.1 Einfluss auf die Zelllänge

Zunächst wurde in einer Reihe von Experimenten die Wirkung der PKA-Aktivierung auf das Ausmaß der Hyperkontraktur untersucht. Um die PKA zu aktivieren, wurde der β -adrenerge Rezeptoragonist Isoproterenol während der Reperfusion jeweils in verschiedenen Konzentrationen appliziert. Die Abb. 4.3.1 zeigt die Zellverkürzung nach 15 Minuten Reperfusion. In diesem Protokoll wurde Isoproterenol 10 nM/L, 100 nM/L und 1 μ M/L angewandt. Die Abb. zeigt, dass sich die Zellen unter Kontrollbedingungen um knapp 40 % ihrer endanoxischen Länge verkürzen und somit eine Hyperkontraktur aufweisen. Isoproterenol reduziert das Ausmaß der Zellverkürzung in allen drei Konzentrationen signifikant, am deutlichsten jedoch bei 10 nM. Für die nächsten Experimente wurde diese Konzentration angewandt.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen der Dissertation von Herrn Micoogullari.

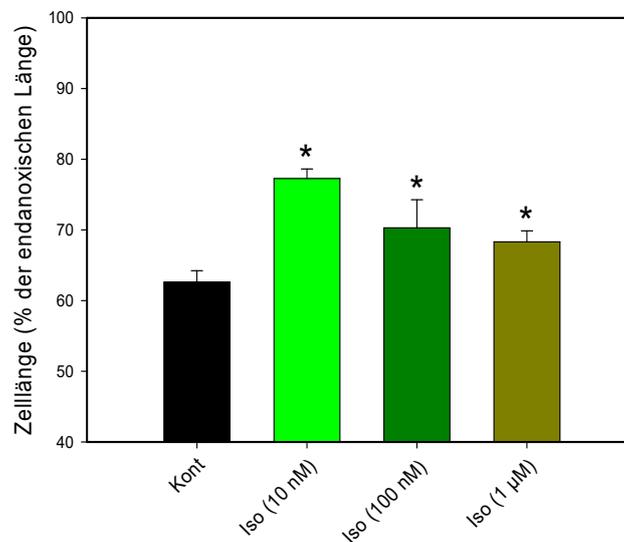


Abb. 4.3.1 Zelllänge in % der endischämischen Länge während der ersten 15 Minuten der Reperfusion unter Kontrollbedingungen (n=70) und in Gegenwart des PKA-Aktivators Isoproterenol (Iso) (10 nM - n=30, 100 nM - n=21, 1 μ M - n=61). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n \geq 21, * p < 0,05 vs. Kontrolle).

4.3.2 Einfluss auf die Amplitude der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen

Simultan zu den Längenmessungen wurde die Wirkung von Isoproterenol auf die Ca^{2+} -Oszillationen untersucht. Die Abb. 4.3.2 zeigt die Ca^{2+} -Amplitude nach 10 Minuten Reperfusion. Wie zu sehen ist, verringert Isoproterenol diese Oszillationen signifikant.

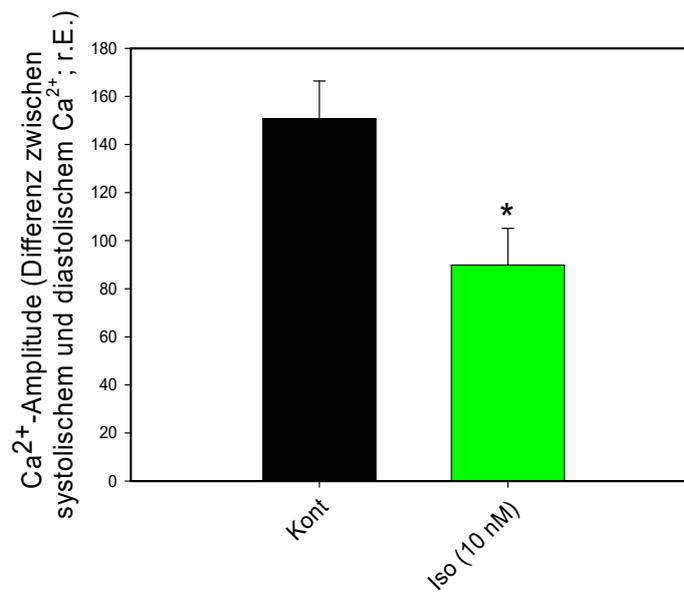


Abb. 4.3.2 Einfluss von Isoproterenol (Iso) (10 nM, n=49) auf die Ca^{2+} -Amplitude nach 10 Minuten Reperfusion im Vergleich zu Kontrollbedingungen (n=71). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n \geq 49, * p < 0,05 vs. Kontrolle).

4.3.3 Einfluss auf die Frequenz der zytosolischen Ca²⁺Oszillationen

Die beschriebene Reduktion der zytosolischen Ca²⁺-Amplitude geht mit einer Abnahme der Frequenz der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen einher. Die Abb. 4.3.3 (A) stellt den Verlauf der während der Reperfusion auftretenden Ca²⁺-Oszillationen exemplarisch dar. In Abb. 4.3.3 (B) sind die Maxima der Ca²⁺-Oszillationen während der Reperfusion exemplarisch dargestellt.

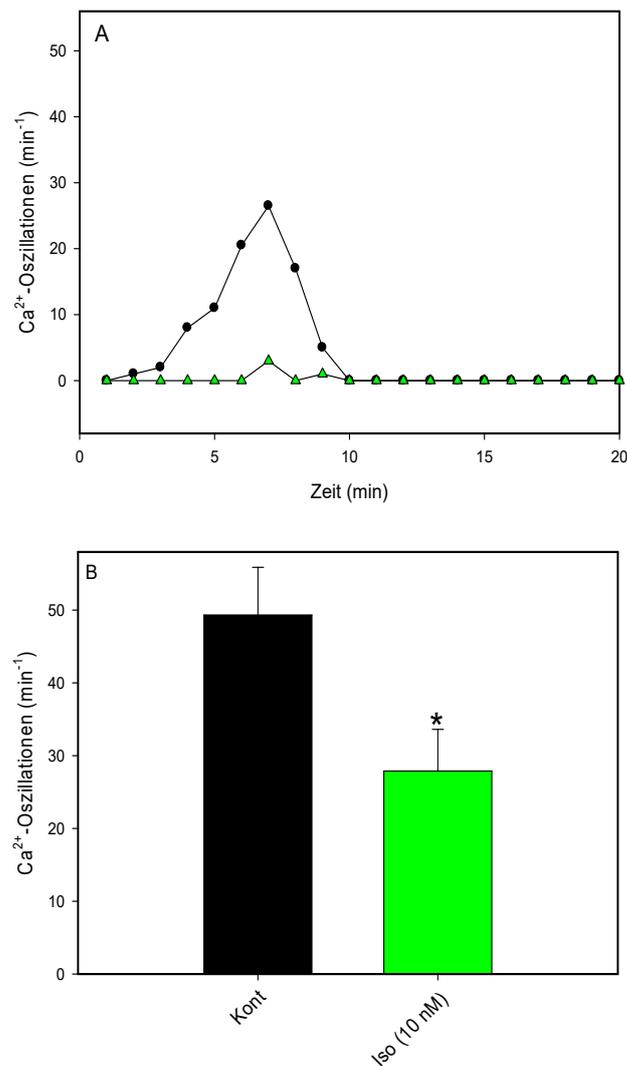


Abb. 4.3.3 A: Exemplarischer Verlauf der Ca²⁺-Oszillationen (min⁻¹) während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen (●) und in Anwesenheit von Isoproterenol (Δ).

B: Darstellung der Maxima der Ca²⁺-Oszillationen zwischen der 5. und 8. Minute (kritische Phase) der Reperfusion. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n ≥ 46, * p < 0,05).

4.3.4 Einfluss auf das Ausmaß der Nekrose

Die Abb. 4.3.4 zeigt, dass der Anteil der nekrotischen Zellen unter Kontrollbedingungen bei fast 40% liegt. Der PKA-Aktivator Isoproterenol reduziert die Nekrose signifikant auf ca. 10%.

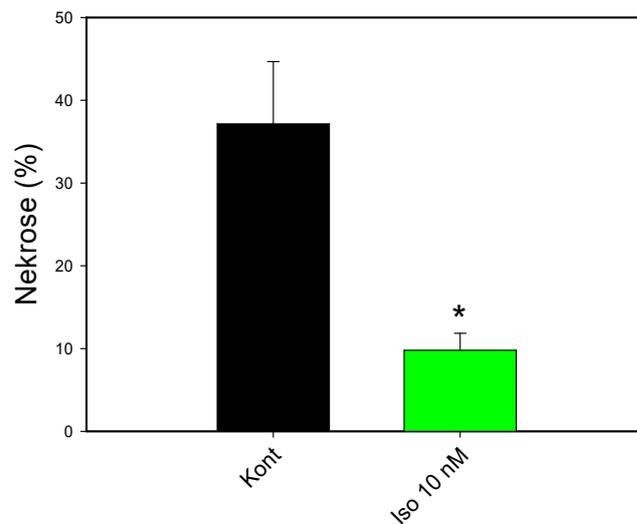


Abb. 4.3.4 Anteil nekrotischer Zellen nach Nekrosemessung unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Isoproterenol 10 nM. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 15$ Experimente pro Bedingung, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

4.3.5 Wirkung einer β -adrenergen Stimulation auf die Speicherkapazität des Sarkoplasmatischen Retikulums

Um den Speicherstatus des SR zu untersuchen, wurde nach ca. 20 Minuten Reperfusion dem Reperfusionsmedium Koffein zugefügt. Dadurch kam es zu einem transienten Anstieg der Fura-2-Ratio, der einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration widerspiegelt. Koffein bewirkt eine maximale Freisetzung des im SR gespeicherten Ca^{2+} durch Aktivierung der Ryanodin-Rezeptoren des SR (Lukyanenko et al., 2001).

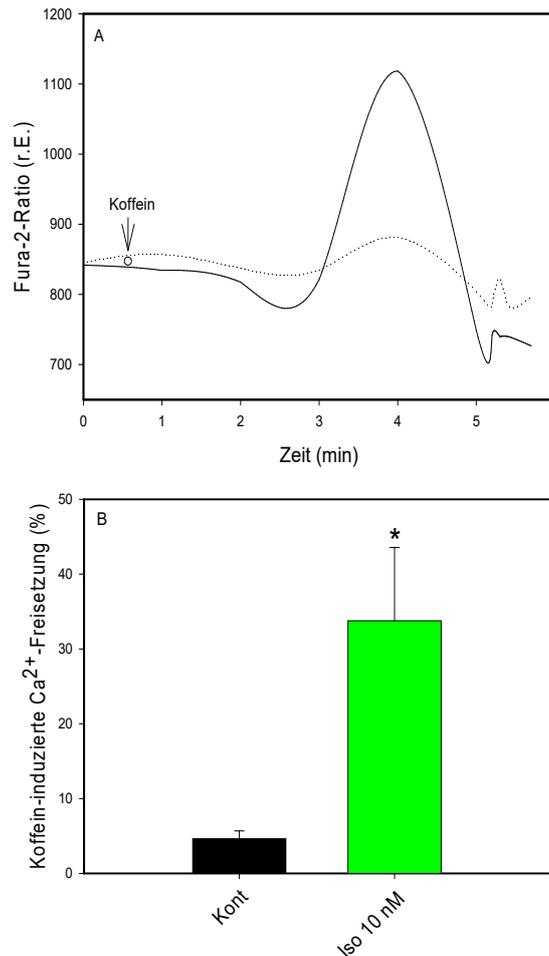


Abb. 4.3.5 A: Exemplarischer Verlauf des zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs nach Koffeingabe (10 mM) am Ende der 20-minütigen Reperfusion unter Kontrollbedingungen (...) und in Gegenwart von Isoproterenol [10 nM] (—).

B: Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR nach Koffeingabe (10 mM) am Ende der 20-minütigen Reperfusion unter Kontrollbedingungen (n=18) und in Gegenwart von Isoproterenol (10 nM, n=10). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n \geq 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, die Auswirkungen der Proteinkinase A und der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II im Ischämie-/Reperfusionsgeschehen zu vergleichen und in den Kontext vorpublizierter Befunde zu stellen. Hierzu wurde ein Zellmodell isolierter Kardiomyozyten verwendet, in dem Ischämie und Reperfusion simuliert wurden. Die ischämieinduzierte zytosolische Ca^{2+} -Überladung und die reperfusionsinduzierte Wiederaufnahme der Energieproduktion führen in den Kardiomyozyten zu Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase und zur Hyperkontraktur bis hin zum nekrotischen Zelltod. Daher dienen neben den zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen und der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration die Zelllänge sowie die Nekrose als Messparameter für den zellulären Schaden. Zusätzlich wurde die Ca^{2+} -Speicherkapazität des SR untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass

- 1) sowohl eine Inhibierung der PKA durch H89 als auch eine Inhibierung der CaMK II durch KN 93 den myokardialen Reperfusionsschaden auf zellulärer Ebene verstärken.
- 2) eine β -adrenerge Stimulation durch Isoproterenol über eine Verminderung der reperfusionsinduzierten Ca^{2+} -Oszillationen und konsekutiver Reduktion der Hyperkontraktur und Nekrose protektiv wirkt. Dies konnte bereits bei Micoogullari 2014 beobachtet werden. Vermutlich können sowohl die PKA als auch die CaMK II verantwortlich dafür gemacht werden können.
- 3) die Protektion vor dem Reperfusionsschaden durch die PKA-Aktivierung scheinbar über eine erhöhte Ca^{2+} -Speicherung in das SR vermittelt wird. Das entspricht den 2014 von Herrn Micoogullari publizierten Befunden.

5.2 Auswirkungen auf den myokardialen Reperfusionsschaden durch Beeinflussung der PKA und der CaMK II

5.2.1 Inhibition der PKA und der CaMK II

Um den Einfluss einer Proteinkinase A – und einer Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II-Inhibierung im Anoxie-/Reperfusionsgeschehen zu untersuchen, wurden H89, ein PKA-Inhibitor, und KN 93, ein CaMK II-Inhibitor, während der Reperfusion eingesetzt. H89 wurde in einer Konzentration von 50 µM, KN 93 in einer Konzentration von 5 µM angewandt. Die Konzentrationen wurden in Anlehnung an Literatur- und Herstellerangaben gewählt (siehe Experimentelles Protokoll, Seite 25 f.).

Zu Beginn der Versuchsreihe diente die Zelllänge als Schädigungsparameter der Reperfusion auf zellulärer Ebene. Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibierung beider Kinasen eine Hyperkontraktur zur Folge hat.

Nekrosemessungen zeigen, dass sowohl der Inhibitor der PKA als auch der Inhibitor der CaMK II den Anteil nekrotischer Zellen an der Gesamtzellzahl deutlich erhöhen. Um zu untersuchen, ob Veränderungen des Ca²⁺-Haushalts für die schädigenden Einflüsse verantwortlich sind, wurden Ca²⁺-Oszillationsmessungen durchgeführt. Es kam durch die Inhibition der PKA durch H89 während der Reperfusion zu einer starken Steigerung der Amplitude der Ca²⁺-Oszillationen. KN 93 verursachte ebenso einen Amplitudenanstieg. Auch die Oszillationsfrequenz wies deutlich höhere Werte bei H89 auf, KN 93 erhöhte jedoch auch die Frequenz der Ca²⁺-Oszillationen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass beide Kinasen dieselben Zieltargets besitzen und durch ihre Inhibition dieselben Effekte ausgelöst werden. Herr Micoogullari fand 2014 in Kinaseaktivitätsassays heraus, dass die PKA-Aktivität unter Kontrollbedingungen in der Ischämie bis hin zur kritischen Phase der Reperfusion (5. Min.) bis auf ein basales Niveau absinkt. Im vorliegenden Fall einer Inhibition der PKA bzw. der CaMK II könnte man schlussfolgern, dass hier die ohnehin schon verminderte Aktivität der Kinasen noch weiter gehemmt wird. Dementsprechend wird das basale Niveau noch weiter unterschritten.

Die hohen Ca²⁺-Oszillationen sind der Auslöser für die Hyperkontraktur. Die Ca²⁺-Oszillationen mit hohen Ca²⁺-Spitzenkonzentrationen verursachen jedoch nicht nur die Entstehung einer irreversiblen Zellverkürzung, sondern können auch die Aufnahme von Ca²⁺ in das Mitochondrium über den MCU induzieren (Halestrap et al., 2004; Maack et al., 2006; Piper et al., 2008; Abdallah et al., 2011). Die Ca²⁺-Überladung der

Mitochondrien ist eine der wichtigsten Ursachen für die MPTP-Öffnung (Halestrap et al., 2004). Diese kann letztlich zum nekrotischen Zelltod führen (Halestrap et al., 2004). Demnach bietet auch die Inhibition der Porenöffnung Möglichkeiten zur Protektion vor dem myokardialen Reperfusionsschaden, so dass ein Zusammenhang zwischen den Zellorganellen SR und Mitochondrium besteht und die Wechselwirkung zwischen den Ca^{2+} -Oszillationen und der MPTP die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur und Nekrose der Kardiomyozyten begünstigt (Abdallah et al., 2011).

Im vorliegenden Fall könnte auch hier die veränderte Ca^{2+} -Homöostase ursächlich verantwortlich gemacht werden für die Induktion des nekrotischen Zelltodes. Der Anstieg der Ca^{2+} -Oszillationen könnte auf eine Beeinflussung der SERCA zurückzuführen sein. Die reduzierte Aufnahme und Speicherung von zytosolischem Ca^{2+} in das SR könnten durch eine erhöhte Verfügbarkeit der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der Auslöser für den myokardialen Reperfusionsschaden sein. Diese Tatsache stünde im Einklang mit den Ergebnissen von Herrn Micoogullari 2014. Er hat durch die PKA-Aktivierung mit Isoproterenol eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von PLB festgestellt, was zu einer erhöhten SERCA-Aktivität und infolge dessen zu einer erhöhten Ca^{2+} -Speicherung ins SR führt.

Hussain et al. untersuchten 1999 die Effekte des PKA-Inhibitors H89 auf die Ca^{2+} -Regulation an isolierten Kardiomyozyten von Frettchen. Sie stellten ebenso durch Fluoreszenzmessungen fest, dass die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR in Anwesenheit von H89 reduziert war. Ihre Versuche legen nahe, dass H89 einen direkten inhibitorischen Effekt auf die SERCA ausübt. Somit unterstützen diese Ergebnisse die vorliegende Arbeit, d.h. die Inhibierung der PKA durch H89 bedingt über Beeinflussung der SERCA den myokardialen Reperfusionsschaden. Auch Blazev et al. berichteten 2001 über die Inhibierung der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR durch H89.

Picht et al. (2007) verwendeten in Versuchen mit transgenen Mäusen das CaMK II-Inhibitor-Peptid (AIP) und zeigten durch Inhibierung der CaMK II ebenso eine reduzierte SERCA-Aktivität u.a. AIP hemmt die Stimulation der SERCA und damit auch die frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation des Herzmuskels während der Diastole.

5.2.2 Aktivierung der PKA und der CaMK II

Maier et al. zeigten 2009 in einem pharmakologischen Preconditioning (PPC)-Modell, dass eine präischämische β -Adrenozeptorstimulation mit Isoproterenol einen kardioprotektiven Effekt auf die postischämische Funktionserholung erzielt und somit eine wesentliche Rolle im isolierten Herzmodell spielt. Im Hinblick auf Interventionen in der Reperfusion konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Interventionen, die auf eine Beeinflussung der zellulären Ca^{2+} -Kontrolle abzielen, die Hyperkontraktur reduzieren können. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung der PKG durch zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP)-vermittelte Stimuli (Abdallah et al., 2005, 2006). Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase können u. a. NO-Donatoren sein, Aktivatoren der partikulären Guanylatzyklase bspw. Atriales natriuretisches Peptid (ANP). Ziel einer Aktivierung der PKG ist die Phosphorylierung von PLB. Daraus resultiert eine gesteigerte SERCA-Aktivität (siehe Abb. 5.2.2.1). Folglich kommt es zu einer beschleunigten zytosolischen Ca^{2+} -Erholung, da Ca^{2+} vermehrt im SR gespeichert werden kann. Infolge dessen werden die zytosolische Ca^{2+} -Überladung und die Ca^{2+} -Oszillationen in der frühen Phase der Reperfusion reduziert (Hempel et al., 1997; Padilla et al., 2000; Insette et al., 2000; Abdallah et al., 2005, 2006). Auch die entsprechenden Stimuli der PKA beeinflussen den Phosphorylierungsstatus von PLB unter normoxischen Bedingungen mit dem Ziel der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR (Lindemann et al., 1983; Heinrich et al., 2014). Micoogullari aktivierte 2014 in seinen Ischämie-Reperfusionsexperimenten die PKA mit Isoproterenol und fand einen kardioprotektiven Effekt via Verstärkung der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR heraus. Während der Ischämie und der kritischen Phase der Reperfusion, d.h. zwischen 5. und 8. Minute, sank die PKA-Aktivität bis auf ein basales Niveau, konnte aber durch Zugabe von Isoproterenol signifikant ansteigen. Er bewies via Western-Blots die gesteigerte Phosphorylierung von PLB während der Reperfusion durch eine PKA-Aktivierung.

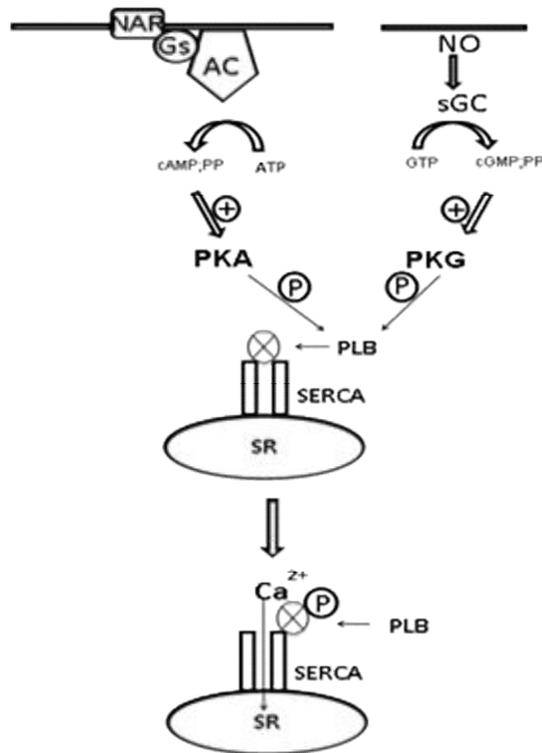


Abb. 5.2.2.1 Schematische Darstellung der SERCA-Regulierung durch PLB (NAR = Noradrenalin, Gs = stimulierendes G-Protein, AC = Adenylatzyklase, NO = Stickstoffmonoxid, sGC = lösliche Guanylatzyklase, ATP = Adenosintri-phosphat, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, GTP = Guanosintri-phosphat, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, PP = Diphosphat, SR = Sarkoplasmatisches Retikulum, SERCA = Ca²⁺-ATPase des SR, PKA = Proteinkinase A)

Um die Rolle der PKA im Ischämie-/Reperfusionsgeschehen zu untersuchen, wurde zunächst Isoproterenol während der Reperfusion eingesetzt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Isoproterenol in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 1 µM das Ausmaß der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur reduziert. Am eindrucksvollsten ist die Reduktion der Hyperkontraktur jedoch bei 10 nM. Dies wurde

in der Arbeit von Herrn Micoogullari beobachtet. Somit wurden weitere Versuche mit dieser Konzentration durchgeführt.

Die PKA-Aktivierung infolge β -adrenerger Stimulation und darauffolgender Steigerung des cAMP-Spiegels führt u. a. zur Phosphorylierung der RyR (Bers, 2002) und zur Phosphorylierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, was deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht (Bean et al., 1984; Yue et al., 1990). Dies müsste zu einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen, da es zu einer Ca^{2+} -Freisetzung via RyR aus dem SR und via L-Typ Ca^{2+} -Kanal von extrazellulär ins Zytosol kommt. Ein Effekt der PKA-Aktivierung auf das SR im Reperfusionsgeschehen ist aber auch die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB), was eine gesteigerte SERCA-Aktivität zur Folge hat (Lindemann et al., 1983; James et al. 1989; Shannon et al., 2001; Bers, 2002). Daraus resultiert eine gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR während der Reperfusion. Das beschleunigt die Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration während der Diastole und erhöht den Gehalt an Ca^{2+} im SR (Kranias et al., 1985). Möglicherweise kommt es so zu einer Gleichgewichtsverschiebung des Ca^{2+} -Gehaltes zugunsten des SR (Xiao et al., 2006). In dieser Versuchsreihe scheint eine β -adrenerge Stimulation die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR zu begünstigen.

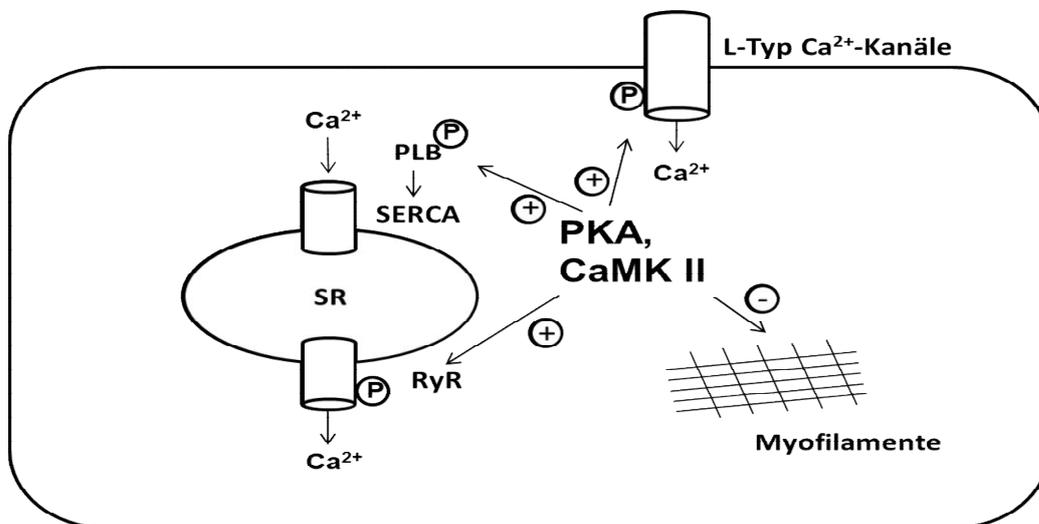


Abb. 5.2.2.2 Schematische Darstellung verschiedener Targets der Proteinkinase A (PKA) und der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMK II). (PLB = Phospholamban, SERCA = Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, SR = Sarkoplasmatisches Retikulum, RyR = Ryanodin-Rezeptoren)

Zur Feststellung, ob der PKA-vermittelte Schutz auf eine veränderte Calciumhomöostase zurückgeführt werden kann, wurden die Calciumtransienten untersucht und sowohl die Amplitude als auch die Anzahl der reperfusionsinduzierten Ca^{2+} -Oszillationen bestimmt. Es zeigte sich, dass eine PKA-Aktivierung durch Isoproterenol in der Reperfusion tatsächlich zu einer deutlichen Reduktion der Frequenz und der Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen führte.

Ein weiteres Indiz für den kardioprotektiven Effekt von Isoproterenol ist die signifikante Abnahme des Anteils nekrotischer Zellen. Diese Tendenz spiegelt sich auch in der Abnahme der Hyperkontraktur wider, die der Nekrose vorausgeht, und kann mit der Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen begründet werden.

Um zu überprüfen, ob die Speicherkapazität des SR für Ca^{2+} -Ionen durch einen Aktivator der PKA beeinflusst wird, wurde in der vorliegenden Arbeit Koffein (10 mM) eingesetzt und nach der Reperfusion appliziert. Koffein aktiviert die Ryanodin-Rezeptoren des SR und bewirkt eine maximale Freisetzung des dort gespeicherten Ca^{2+} (Lukyanenko et al., 2001). Anschließend ist der Koffein-induzierte Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} messbar. Anhand der vorgelegten Ergebnisse wird deutlich, dass durch die Aktivierung der PKA eine erhöhte Sequestration von Ca^{2+} in das SR stattfindet. Die hier erzielten Ergebnisse repräsentieren wiederum die Ergebnisse der Versuchsreihe von Herrn Micoogullari und deuten darauf hin, dass die β -adrenerge Stimulation die Speicherkapazität des SR beeinflusst und die Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden durch eine erhöhte Ca^{2+} -Speicherung in das SR vermittelt wird.

Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen während der Reperfusion und die daraus resultierende Reduktion der Hyperkontraktur und der Nekrose durch Aktivierung mit Isoproterenol auf eine erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR zurückzuführen sind. Unterstützt wird die Aussage durch die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Koffein, da nach Koffeinapplikation signifikant mehr Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt wurde als unter Kontrollbedingungen. Das bedeutet, dass die zytosolische Ca^{2+} -Erholung durch eine Rückspeicherung von Ca^{2+} in das SR vermittelt wird.

Auch Davia et al. zeigten protektive Effekte durch verstärkte SERCA-Aktivität. Sie führten 2001 an adulten Kardiomyozyten von lebenden Kaninchen virale Transfektionen mit einem Adenovirus durch und analysierten die Effekte einer SERCA2a-Überexpression. Sie fanden heraus, dass eine Überexpression der SERCA2a sowohl zu einer Reduktion des Zelltodes und einer Reduktion

arrhythmischer Kontraktionen als auch zu einer Verbesserung der systolischen und diastolischen Funktion führt.

Pediaditakis et al. fanden 2010 heraus, dass eine PKA-Aktivierung im Zytosol der Rattenleber durch cGMP und cAMP während der Reperfusion die Ca^{2+} -induzierte MPTP-Öffnung in den Mitochondrien hemmt und den darauffolgenden Zelltod reduziert.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass eine Inhibition der PKA durch H 89 und eine Inhibition der CaMK II durch KN 93 den Reperfusionsschaden verstärken. Die Aktivierung der PKA durch Isoproterenol hingegen reduziert den Reperfusionsschaden. Dieser Effekt wurde durch vermehrte Ca^{2+} -Speicherung in das SR induziert. Obwohl in der Literatur diskutiert wird, dass durch eine PKA-Aktivierung der Influx von Ca^{2+} in das Zytosol via L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und RyR gesteigert wird, nimmt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration aufgrund der gesteigerten SERCA-Aktivität und einer Netto-Speicherung von Ca^{2+} in das SR ab. Diese Befunde stehen auch im Einklang mit den Ergebnissen von Micoogullari aus unserer Arbeitsgruppe (2014). Seine Western-Blots zeigen, dass der Phosphorylierungsstatus von PLB durch eine PKA-Aktivierung erhöht ist, der Phosphorylierungsstatus von RyR jedoch unverändert bleibt.

Die funktionelle Auswirkung einer PKA-abhängigen RyR-Phosphorylierung auf die Abgabe von Ca^{2+} aus dem SR in intakten Kardiomyozyten ist bis heute noch unklar und wird kontrovers diskutiert. Xiao et al. (2007) zeigen, dass die PKA in Anwesenheit von Ca^{2+} im SR einzelne RyR-Kanäle aktiviert, aber keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit durch zytosolisches Ca^{2+} hat. Sie berichten über die Neigung zur spontanen Ca^{2+} -Abgabe während der Ca^{2+} -Überladung des SR. Reiken et al. (2003) und Wehrens et al. (2003 & 2004) fanden heraus, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR-Kanäle nach β -adrenerger Stimulation in Kardiomyozyten der Maus bei einer bestimmten luminalen (Ca^{2+} -Konzentration im SR) und zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen erhöht ist im Vergleich zu nicht stimulierten Herzen. Ferrero et al. (2007) zeigen, dass die CaMK II-abhängige RyR-Phosphorylierung, aber nicht die PKA-abhängige Phosphorylierung, verantwortlich ist für die durch β -adrenerge Stimulation erhöhte Kanalaktivität. Die PKA-abhängige RyR-Phosphorylierung ist nicht an der schnellen Ca^{2+} -Abgabe aus dem SR beteiligt, sondern steigert die langsame Ca^{2+} -Abgabe aus dem SR.

Aus den vorliegenden Erkenntnissen könnte abgeleitet werden, dass durch β -adrenerge Stimulation trotz Aktivierung der RyR-Kanäle die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR

überwiegt. Sowohl die Verfügbarkeit von Ca^{2+} im Zytosol als auch die Freisetzung aus dem SR werden reduziert. Vermutlich sind die PKA und die CaMK II für die gesteigerte Aufnahme von Ca^{2+} in das SR und für die verringerte Freisetzung aus dem SR verantwortlich.

Zudem ist in der Reperfusion eine Inaktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle durch eine zytosolische Ca^{2+} -Überladung im Sinne einer Autoinhibition denkbar, die den ausschließlichen Ca^{2+} -Shift zwischen Zytosol und SR unterstützen würde. Es kommt durch die PKA-Aktivierung zu einer deutlichen Reduktion der Frequenz und der Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen. Diese Oszillationen sind Auslöser der Hyperkontraktur der Kardiomyozyten und unsere Ergebnisse zeigen, dass über die Verminderung der reperfusionsinduzierten Ca^{2+} -Oszillationen die konsekutive Zellverkürzung signifikant reduziert werden konnte.

Die vorliegende Arbeit legt dar, dass die Aktivierung der PKA durch Isoproterenol und die indirekte Aktivierung der CaMK II kardioprotektiv wirken. Beide Kinasen beeinflussen partiell dieselben Zieltargets. Doch es stellt sich nun zum einen die Frage, ob der vorangeschaltete Mechanismus der β -adrenergen Stimulation auch Parallelen aufweist und beide Kinasen aktiviert und zum anderen, ob sich die PKA und die CaMK II gegenseitig beeinflussen. Mika et al. fanden 2015 heraus, dass die CaMK II ebenso wie die PKA durch β -adrenerge Stimulation aktiviert wird, wobei die CaMK II - Aktivität basale und β -adrenerg aktivierte cAMP-Level hemmt. Diese Effekte werden zum Teil durch Phosphodiesterasen (PDEs) reguliert; in Kardiomyozyten von Nagetieren sind dafür vorwiegend PDE4s verantwortlich. Dadurch entsteht eine negative Rückkopplung, die zur Unterstützung der cAMP/CaMK II – Homöostase notwendig ist.

Während die CaMK II direkt durch Ca^{2+} reguliert wird, wird ihre Aktivität indirekt durch cAMP reguliert (Grimm and Brown, 2010). Als Antwort auf eine β -adrenerge Stimulation aktiviert EPAC (cAMP-aktiviertes Austauschprotein) die CaMK II (Oestreich et al., 2007, 2009; Pereira et al., 2007, 2013; Metrich et al. 2009). Somit wird cAMP über einen doppelt negativen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert, bei dem ein cAMP-Anstieg die PDE4s via PKA oder EPAC/CaMK II aktiviert. Das fördert wiederum die Verminderung von cAMP im Sinne der eben beschriebenen cAMP/CaMK II-Homöostase.

Grimm und Brown beschreiben 2010 die Aktivierung der CaMK II via β -adrenerge Mechanismen. Wegener et al. (1989) und Huke & Bers (2008) demonstrieren den nach

β -adrenerger Stimulation erhöhten Phosphorylierungsstatus von Phospholamban und vom Ryanodinrezeptor Typ 2 an spezifischen Substratbindungsstellen, die auf die CaMK II und nicht auf die PKA zurückzuführen sind. Experimente mit dem PKA-Inhibitor H89 an isolierten, perfundierten Rattenherzen zeigen, dass für die Phosphorylierung der spezifischen Substratbindungsstellen von Phospholamban (Threonin 17) und vom Ryanodinrezeptor Typ 2 (Serin 2815) die Aktivierung der PKA nötig ist (Said et al., 2002; Ferrero et al. 2007). Somit wird vermutet, dass die PKA der CaMK II in der Signalkaskade vorgeschaltet sein könnte. Diese PKA-Abhängigkeit der CaMK II-Aktivierung als Antwort auf eine β -adrenerge Stimulation bedeutet wiederum nicht zwangsläufig, dass die Zieltargets beider Kinasen parallel phosphoryliert werden, sondern unabhängig voneinander reguliert werden können (Grimm & Brown, 2010). Wang et al. berichten 2004, dass eine chronisch β -adrenerge Stimulation einen Shift von der PKA- zur CaMK II - Abhängigkeit verursacht, und zwar zeitabhängig. Nach Kurzzeit- (10 min) und Langzeit- (24 Std) -Stimulation mit Norepinephrin wurde bei Messungen auf zellulärer Ebene festgestellt, dass bei Langzeitstimulation vorwiegend der CaMK II-Signalweg dominiert, bei Kurzzeitstimulation der cAMP/PKA-Signalweg. Unabhängig von der zeitlichen Länge der β -adrenergen Stimulation kam es zu positiv inotropen (Steigerung der Kontraktionskraft) und positiv lusitropen (Steigerung der Relaxationsfähigkeit) Effekten am Herzmuskel. Ein weiterer Aspekt ist die Möglichkeit der Autophosphorylierung der CaMK II nach β -adrenerger Stimulation, so dass die Kinase in einen autonomen, Ca^{2+} -unabhängigen Zustand konvertiert (Baltas et al., 1997). Somit wird nochmals die Wichtigkeit der Aktivierung sowohl der PKA als auch der CaMK II nach β -adrenerger Stimulation im Hinblick auf die Therapie des akuten Myokardinfarktes unterstrichen.

5.3 Klinischer Ausblick

Nach einem Myokardinfarkt kann es – je nach Größe und Ausdehnung der ischämischen Läsionen – zur Reduktion der myokardialen Pumpfunktion (Herzinsuffizienz) kommen. In Folge von Anpassungsvorgängen des Organismus auf die Schädigung wird das sympathische Nervensystem (SNS) zur Unterstützung der Kontraktilität des Herzens chronisch überaktiviert (Lakatta, 2004; Wehrens et al., 2004, 2005). Aber genau diesen Effekt will man bei Herzinsuffizienz vermeiden, da die anhaltende Aktivierung des SNS maladaptive Veränderungen hervorruft (Marks et al., 2002). Kardiale, β -adrenerge Rezeptoren werden desensibilisiert, und es kommt zu progressiven, kardialen Dysfunktionen (Bristow et al., 1982; Lakatta, 2004; Wehrens et al., 2005). Daher setzt man seit der Entdeckung von Propranolol durch Sir James Black in den 60ern des letzten Jahrhunderts Beta-Blocker bei Patienten mit Herzinsuffizienz ein. Bei diesen Medikamenten handelt es sich um kompetitive Inhibitoren der Katecholamine, die in den Herzmuskelzellen β -adrenerge Rezeptoren blockieren und negativ inotrop und chronotrop auf das Herz wirken (Spoladore et al., 2010). Beta-Blocker senken die Herzarbeit und damit den Sauerstoffbedarf (Spoladore et al., 2010). Wie die vorliegende Arbeit zeigt, lässt sich auf zellulärer Ebene durch endogene Aktivierung der Proteinkinase A nur in den ersten Minuten der Reoxygenation eine zusätzliche Protektion vor dem myokardialen Reperfusionsschaden erzielen. In dieser Arbeit steht die hyper-akute, nicht die langfristige Behandlung eines durch Ischämie mit nachfolgender Wiederherstellung des Blutflusses entstandenen Reperfusionsschadens im Fokus. Bisher sind keine klinischen Studien an Patienten über den Einsatz von Aktivatoren der PKA in der akuten Reperfusionstherapie nach einem Myokardinfarkt bekannt. Dabei wäre die lokale Applikation solcher Aktivatoren via perkutaner Koronarintervention (PCI) möglich, um etwaige systemische Nebenwirkungen zu vermeiden.

6 Zusammenfassung

Laut Angaben des Statistischen Bundesamtes zählt der Myokardinfarkt - wie auch in den Jahren zuvor - erneut zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Therapie der Wahl ist das schnelle Wiedereröffnen der verschlossenen Koronararterien, die Reperfusion, die jedoch zu einem „myokardialen Reperfusionsschaden“ führt. Nicht nur die Aktivierung der PKA, sondern auch die Beeinflussung der CaMK II versprechen potentielle Ansätze in der myokardialen Reperfusionstherapie.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, die Auswirkungen einer PKA- und einer CaMK II-Beeinflussung während der Reperfusion auf den myokardialen Reperfusionsschaden zu untersuchen und zu vergleichen und zum anderen die dafür verantwortlichen zellulären Mechanismen herauszufinden. Hierzu wurde ein Modell hypoxisch-reoxygenerter isolierter Kardiomyozyten verwendet, in dem zuerst in einer Reihe von Versuchen beide Kinasen inhibiert wurden. Anschließend wurde mit Isoproterenol eine β -adrenerge Stimulation zur Aktivierung der PKA simuliert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl eine Inhibition der PKA durch H89 als auch eine Inhibition der CaMK II durch KN 93 den myokardialen Reperfusionsschaden auf zellulärer Ebene verstärken.

Eine Aktivierung der PKA durch Isoproterenol schützt die Kardiomyozyten vor dem Reperfusionsschaden. Dieser protektive Effekt ist auf eine Verminderung der reperfusionsinduzierten Ca^{2+} -Oszillationen und konsekutiver Reduktion der Hyperkontraktur und Nekrose zurückzuführen. Die Protektion vor dem Reperfusionsschaden wird über eine erhöhte Ca^{2+} -Speicherung in das Sarkoplasmatische Retikulum vermittelt.

Folglich ist in kommenden klinischen Studien zur akuten Reperfusionstherapie nach einem Myokardinfarkt die Applikation von Aktivatoren der PKA via perkutaner Koronarintervention (PCI) möglich, um etwaige systemische Nebenwirkungen zu verhindern.

7 Summary

According to the Federal Statistical Office, myocardial infarction is one of the most frequent causes of death in Germany. The preferred therapy is rapid reperfusion of the closed coronary arteries which however in itself leads to “myocardial reperfusion injury”. Not only does the influence of PKA but also that of CaMK II promise potential approaches to prevent heart failure after myocardial infarction.

The aim of the present study was to examine and compare the effects of PKA and CaMK II during reperfusion in the setting of reperfusion injury on the one hand and to identify the responsible cellular mechanisms on the other hand. For this purpose a model of hypoxic-reoxygenation on isolated cardiomyocytes was used in which both kinases were first inhibited in a series of experiments. Subsequently, a β -adrenergic stimulation with Isoproterenol was applied to activate the PKA.

The results of the present study show that inhibition of PKA by H89 as well as of CaMK II by KN 93 lead to an increase of myocardial reperfusion injury on cellular level. An activation of PKA by Isoproterenol protects the cardiomyocytes against reperfusion injury. This protective effect is due to a decrease in reperfusion induced Ca^{2+} -oscillations with consecutive reduction in hypercontracture and necrosis. The protection against reperfusion injury is established by an increased Ca^{2+} -storage into the sarcoplasmic reticulum.

For therapy of reperfusion injury after myocardial infarction it is possible to apply activators of PKA via percutaneous coronary intervention (PCI) in order to prevent systemic adverse effects.

8 Literaturverzeichnis

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, Schäfer M, Schlüter KD, Piper HM, Schäfer C (2005).

Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury.

Cardiovasc Res. 66:123-131.

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM Schäfer C (2006).

Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage.

Cardiovasc Res. 70:346-353.

Abdallah Y, Iraqi W, Said M, Kasseckert SA, Shahzad T, Erdogan A, Neuhof C, Gündüz D, Schlüter KD, Piper HM, Reusch HP, Ladilov Y (2011).

Interplay between Ca (2+) cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes.

J Cell Mol Med. 10.1111/j.1582-4934.2010.01249.x.

Anderson SE, Murphy E, Steebergen C, London RE, Cala PM (1990).

Na⁺/H⁺ exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca. Am J Physiol. 259 (6 Pt 1):C940-8.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005).

Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition.

Circulation. 111, 194-197

Baltas LG, Karczewski P, Bartel S, Krause EG (1997).

The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase is activated in response to beta-adrenergic stimulation and becomes Ca²⁺-independent in intact beating hearts.

FEBS Lett. 409(2):131-6.

Basso C, Rizzo S, Thiene G (2010).

The metamorphosis of myocardial infarction following coronary recanalization.

Cardiovasc Pathol. 19(1):22-8.

Bean BP, Nowycky MC, Tsien RW (1984).

Beta-adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells.
Nature. 307(5949):371-5.

Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF (2004).

Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle.
Prog Biophys Mol Biol. 85(1):33-69.

Bers DM (2001).

Excitation-Contraction Coupling and Contractile Force.
Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic

Bers DM (2002).

Cardiac excitation-contraction coupling.
Nature. 415 (6868):198–205.

Blazev R, Hussain M, Bakker AJ, Head SI, Lamb GD (2001).

Effects of the PKA inhibitor H-89 on excitation-contraction coupling in skinned and intact skeletal muscle fibres.
J Muscle Res Cell Motil. 22(3):277-86.

Braunwald E, Kloner RA (1985).

Myocardial reperfusion: a double-edged sword?
J Clin Invest. 76(5):1713-9.

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982).

Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts.
N Engl J Med. 307(4):205-11.

Burke AP, Virmani R (2007).

Pathophysiology of acute myocardial infarction.
Med Clin North Am. 91(4):553-72.

Chan W, Stub D, Clark DJ, Ajani AE, Andrianopoulos N, Brennan AL, New G, Black A, Shaw JA, Reid CM, Dart AM, Duffy SJ (2011).

Usefulness of transient and persistent no reflow to predict adverse clinical outcomes following percutaneous coronary intervention.

Am J Cardiol. 109(4):478-85.

Colledge M, Scott JD (1999).

AKAPs: from structure to function.

Trends Cell Biol. 9(6):216-21.

Conti M (2000).

Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells.

Mol Endocrinol. 14(9):1317-27.

Dagenais F, Cartier R, Hollmann C, Buluran J (1997).

Calcium-channel blockers preserve coronary endothelial reactivity after ischemia-reperfusion.

Ann Thorac Surg. 63(4):1050-6.

Davia K, Bernobich E, Ranu HK, del Monte F, Terracciano CM, MacLeod KT, Adamson DL, Chaudhri B, Hajjar RJ, Harding SE (2001).

SERCA2A overexpression decreases the incidence of aftercontractions in adult rabbit ventricular myocytes.

J Mol Cell Cardiol. 33(5):1005-15.

Dodge-Kafka KL, Kapiloff MS (2006).

The mAKAP signaling complex: integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways.

Eur J Cell Biol. 85(7):593-602.

Downey JM (1990).

Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion.

Annual Review of Physiology. Vol. 52: 487-504

Duerr GD, Elhafi N, Bostani T, Ellinger J, Swieny L, Kolobara E, Welz A, Dewald O (2011).

Comparison of myocardial remodeling between cryoinfarction and reperfused infarction in mice.

J Biomed Biotechnol. 2011:961298.

Edwards AS, Scott JD (2000).

A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond.

Curr Opin Cell Biol. 12(2):217-21.

Eltzschig HK and Eckle T (2011).

Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation

Nat Med. 17(11): 10

Enzo Life Sciences (2019).

<http://www.enzolifesciences.com/BML-EI196/h-89-.-.2hcl/> (abgerufen am 27.08.2019)

Ferrero P, Said M, Sánchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P, Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmanna C (2007).

Ca²⁺/Calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during β-adrenergic stimulation.

J Mol Cell Cardiol. 43(3): 281–291.

Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML (2000).

IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury.

J Immunol. 165(5):2798-808.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML (2002).

The inflammatory response in myocardial infarction.

Cardiovasc Res. 53(1):31-47.

Ganz T (1993).

Macrophage function.

New Horiz.1(1):23-7.

Ganote CE (1983).

Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury.

J Mol Cell Cardiol. 15(2):67-73.

García-Dorado D, Thérroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Muñoz R, Elizaga J, Botas J, Fernández-Avilés F, et al (1992).

Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion.

Circulation. 85(3):1160-74.

García-Dorado D (2004).

Myocardial reperfusion injury: a new view.

Cardiovasc Res. 15; 61(3):363-4.

Griffiths EJ, Halestrap AP (1993).

Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts.

J Mol Cell Cardiol. 25(12):1461-9.

Grimm M, Brown JH (2010).

Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII.

J Mol Cell Cardiol. 48 (2):322-30.

Gündüz D, Kasseckert SA, Härtel FV, Aslam M, Abdallah Y, Schäfer M, Piper HM, Noll T, Schäfer C (2006).

Accumulation of extracellular ATP protects against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells.

Cardiovasc Res. 71(4):764-73.

al-Haboubi HA, Tomlinson DR, Ward BJ (1995).

The influence of hypoxia on transvascular leakage in the isolated rat heart: quantitative and ultrastructural studies.

J Physiol. 482 (Pt 1):157-66.

Haigney MC, Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS (1992). Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na (+)-Ca²⁺ exchange. *Circ Res.* 71(3):547-57.

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY (1998). Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta.* 1366(1-2):79-94.

Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002). The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 84(2-3):153-66.

Halestrap AP, Brenner C (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem.* 10(16):1507-25.

Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 61(3):372-85.

Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM (2002). Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res.* 55(3):534-43.

Heinrich P C, Müller M, Graeve L (2014). Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie
Berlin: Springer

Hempel A, Friedrich M, Schlüter KD, Forssmann WG, Kuhn M, Piper HM (1997). ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 2):H244-9.

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE (2009).

Cell death.

N Engl J Med. 361(16):1570-83.

Houslay MD, Adams DR (2003).

PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization.

Biochem J. 370(Pt 1):1-18.

Huke S, Bers DM (2008).

Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes.

Biochem Biophys Res Commun. 376(1):80-5.

Hussain M, Drago GA, Bhogal M, Colyer J, Orchard CH (1999).

Effects of the protein kinase A inhibitor H-89 on Ca²⁺ regulation in isolated ferret ventricular myocytes.

Pflugers Arch. 437(4):529-37.

Inserte J, Garcia-Dorado D, Agulló L, Paniagua A, Soler-Soler J (2000).

Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart.

Cardiovasc Res. 45(2):351-9.

Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, Agulló L, Piper HM, Soler-Soler J (2002).

Effect of inhibition of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death.

Cardiovasc Res. 55(4):739-48.

James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E. (1989).

Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum.

Nature. 342(6245):90-2

Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP (2003).

Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition

pores in the reperfused rat heart.
J Physiol. 549(Pt 2):513-24.

Kakkar AK, Lefler DJ (2004).

Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice.
Curr Opin Pharmacol. 4(2):154-8.

Kasseckert SA, Schäfer C, Kluger A, Gligorievski D, Tillmann J, Schlüter KD, Noll T, Sauer H, Piper HM, Abdallah Y (2009).

Stimulation of cGMP signalling protects coronary endothelium against reperfusion-induced intercellular gap formation.
Cardiovasc Res. 83(2):381-7.

Kolodziej SJ, Hudmon A, Waxham MN, Stoops JK (2000).

Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase II α and truncated CaM kinase II α reveal a unique organization for its structural core and functional domains.
J Biol Chem. 275(19):14354-9.

Kranias EG, Garvey JL, Srivastava RD, Solaro RJ (1985).

Phosphorylation and functional modifications of sarcoplasmic reticulum and myofibrils in isolated rabbit hearts stimulated with isoprenaline.
Biochem J. 226(1):113-21.

Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (1995).

Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange.
Am J Physiol. 268(4 Pt 2):H1531-9.

Ladilov Y, Haffner S, Balsler-Schäfer C, Maxeiner H, Piper HM (1999).

Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger.
Am J Physiol. 276(6 Pt 2):H1868-76.

Lakatta EG (2004).

Beyond Bowditch: the convergence of cardiac chronotropy and inotropy.
Cell Calcium. 35(6):629-42.

Langeberg LK, Scott JD (2005).

A-kinase-anchoring proteins.

J Cell Sci. 118(Pt 15):3217-20.

Li J, Pucéat M, Perez-Terzic C, Mery A, Nakamura K, Michalak M, Krause KH, Jaconi ME (2002).

Calreticulin reveals a critical Ca (2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis.

J Cell Biol. 158(1):103-13.

Liang J, Luan Y, Lu B, Zhang H, Luo YN, Ge P (2014).

Protection of ischemic postconditioning against neuronal apoptosis induced by transient focal ischemia is associated with attenuation of NF- κ B/p65 activation.

PLoS One. 9(5):e96734. doi: 10.1371/journal.pone.0096734.

Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM (1983).

Beta-adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca²⁺-ATPase activity in guinea pig ventricles.

J Biol Chem. 258(1):464-71.

Lukyanenko V, Viatchenko-Karpinski S, Smirnov A, Wiesner TF, Györke S (2001).

Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) content and release by luminal Ca(2+)-sensitive leak in rat ventricular myocytes.

Biophys J. 81(2):785-98.

Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B (2006).

Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes.

Circ Res. 99(2):172-82.

Maier LS, Bers DM (2002).

Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond.

J Mol Cell Cardiol. 34(8):919-39.

Maier T (2009).

Einfluss prä-ischämischer β -adrenozeptor-Stimulation auf die post-ischämische Funktionserholung.

Dissertation

http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2009/7278/pdf/MaierThorsten_2009_10_26.pdf

Maier T, Schreckenber R, Schlüter KD (2009).

Effect of preischematic beta-adrenoceptor stimulation on postischemic contractile dysfunction.

Life Sci. 84(13-14):437-43.

Manni S, Mauban JH, Ward CW, Bond M (2008).

Phosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulates PKA-AKAP interaction, substrate phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells.

J Biol Chem. 283(35):24145-54.

Marks AR, Reiken S, Marx SO (2002).

Progression of heart failure: is protein kinase a hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor?

Circulation. 105(3):272-5.

Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E, Lezoualc'h F(2008).

Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy.

Circ Res. 102(8):959-65.

Métrich M, Morel E, Berthouze M, Pereira L, Charron P, Gomez AM, Lezoualc'h F (2009).

Functional characterization of the cAMP-binding proteins Epac in cardiac myocytes.

Pharmacol Rep. 61(1):146-53.

Micoogullari M (2014).

Mechanismus der Proteinkinase A-vermittelten Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden in isolierten Herzmuskelzellen.

Dissertation

[http://geb.uni-](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2014/10905/pdf/MicoogullariMustafa_2014_04_07.pdf)

[giessen.de/geb/volltexte/2014/10905/pdf/MicoogullariMustafa_2014_04_07.pdf](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2014/10905/pdf/MicoogullariMustafa_2014_04_07.pdf)

Mika D, Richter W, and Conti M (2015).

A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling.
Biochemistry 112(7): 2023–2028.

Moens A.L., Claeys M.J., Timmermans J.P., Vrints C.J. (2005).

Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process.
Int J Cardiol. 100(2):179-90.

Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F (2009).

Myocardial no-reflow in humans.
J Am Coll Cardiol. 54(4):281-92.

Nichols CG, Lederer WJ (1990).

The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes.
Can J Physiol Pharmacol. 68(2):183-94.

Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, Piper HM (1995).

Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. Am J Physiol. 268(4 Pt 2):H1462-70.

Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV (2007).

Epac-mediated activation of phospholipase C (epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes.
J Biol Chem. 282(8):5488-95.

Oestreich EA, Malik S, Goonasekera SA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV (2009).

Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II.
J Biol Chem. 284(3):1514-22.

Oka N, Wang L, Mi W, Zhu W, Honjo O, Caldarone CA (2008).

Cyclosporine A prevents apoptosis-related mitochondrial dysfunction after neonatal cardioplegic arrest.
J Thorac Cardiovasc Surg. 135(1):123-30, 130.e1-2.

Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS (1996).

Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. Experimental Working Group.

Circulation. 94(1):10-3.

Oyama J, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T (2004).

Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice.

Circulation. 109(6):784-9.

Padilla F, Garcia-Dorado D, Agulló L, Barrabés JA, Inserte J, Escalona N, Meyer M, Mirabet M, Pina P, Soler-Soler J (2000).

Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs.

Cardiovasc Res. 51(3):592-600.

Pediaditakis P, Kim JS, He L, Zhang X, Graves LM, Lemasters JJ (2010).

Inhibition of the mitochondrial permeability transition by protein kinase A in rat liver mitochondria and hepatocytes.

Biochem J. 431(3):411-21.

Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Bénitah JP, Lezoualc'h F, Gómez AM (2007).

The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes.

J Physiol. 583(Pt 2):685-94.

Pereira L, Cheng H, Lao DH, Na L, van Oort RJ, Brown JH, Wehrens XH, Chen J, Bers DM (2013).

Epac2 mediates cardiac β 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmia.

Circulation. 127(8):913-22.

Picht E, DeSantiago J, Huke S, Kaetzel MA, Dedman JR, Bers DM (2007).

CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits frequency-dependent acceleration of relaxation and Ca²⁺ current facilitation.

J Mol Cell Cardiol. 42(1):196-205.

Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, Cragoe EJ Jr, Pohost GM (1993).

NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange.

Am J Physiol. 265(6 Pt 2):H2017-26.

Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M (2008).

Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction.

N Engl J Med. 359(5):473-81.

Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spieckermann PG (1982).

Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.

J Mol Cell Cardiol. 14(7):397-412.

Piper HM, García-Dorado D, Ovize M (1998).

A fresh look at reperfusion injury.

Cardiovasc Res. 38(2):291-300.

Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C (2004).

The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection.

Cardiovasc Res. 61(3):365-71.

Piper HM, Kasseckert S, Abdallah Y (2006).

The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection.

Cardiovasc Res. 70(2):170-3.

Piper HM, Kasseckert SA, Schlüter KD, Abdallah Y (2008).

Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschadens.

Dtsch Med Wochenschr; 133(12): 586-590.

Piper HM, Abdallah Y, Kasseckert S, Schlüter KD (2008).

Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial interaction in the mechanism of acute reperfusion injury.

Cardiovasc Res. 77(2):234-6.

Ran K, Yang DL, Chang YT, Duan KM, Ou YW, Wang HP, Li ZJ (2014).

Ginkgo biloba extract postconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury. Genet Mol Res. 13(2):2703-8.

Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ, Marks AR (2003).

Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. J Biol Chem. 278(1):444-53.

Ruehr ML, Russell MA, Bond M (2004).

A-kinase anchoring protein targeting of protein kinase A in the heart. J Mol Cell Cardiol. 37(3):653-65.

Said M, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A (2002).

The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. Pflugers Arch. 444(6):801-9.

Saucerman JJ, Bers DM (2008).

Calmodulin mediates differential sensitivity of CaMKII and calcineurin to local Ca²⁺ in cardiac myocytes. Biophys J. 95(10):4597-612.

Schäfer C, Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (2000).

Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 278(5):H1457-63.

Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM (2001).

Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. Cardiovasc Res. 51(2):241-50.

Schäfer C, Walther S, Schäfer M, Dieterich L, Kasseckert S, Abdallah Y, Piper HM (2003).

Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation.

Cardiovasc Res. 58(1):149-55.

Shahzad T, Kasseckert SA, Iraqi W, Johnson V, Schulz R, Schlüter KD, Dörr O, Parahuleva M, Hamm C, Ladilov Y, Abdallah Y (2013).

Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury.

J Mol Cell Cardiol. 58:209-16.

Shannon TR, Chu G, Kranias EG, Bers DM. (2001)

Phospholamban decreases the energetic efficiency of the sarcoplasmic reticulum Ca pump.

J Biol Chem. 276(10):7195-201.

Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM (1991).

Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes.

Am J Physiol. 260(2 Pt 2):H426-35.

Siegmund B, Zude R, Piper HM (1992).

Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload.

Am J Physiol. 263(4 Pt 2):H1262-9.

Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balser C, Piper HM (1997).

Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture.

Circulation. 96(12):4372-9.

Spoladore R, Fragasso G, Montanaro C, Maranta F, Torlasco C, Gerosa S, Margonato A (2010).

[Present trends and controversies in the use of beta-blockers in cardiovascular diseases].

Recenti Prog Med. 101(11):429-41.

Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M (2005).

Postconditioning the human heart.
Circulation. 112(14):2143-8.

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden (2019).

Gesundheit - Todesursachen in Deutschland
Genesis-Online Datenbank
<https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>
(abgerufen am 20.03.2020)

Taskén K, Aandahl EM (2004).

Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A.
Physiol Rev. 84(1):137-67.

Temsah RM, Netticadan T, Kawabata K, Dhalla NSn (2002).

Lack of both oxygen and glucose contributes to I/R-induced changes in cardiac SR function.
Am J Physiol Cell Physiol. 283(4):C1306-12.

Thibault H, Piot C, Ovize M (2007).

Postconditioning in man
Heart Fail Rev. 12(3-4):245-8.

Thiene G, Basso C (2010).

Myocardial infarction: a paradigm of success in modern medicine.
Cardiovasc Pathol. 19(1):1-5.

Tobimatsu T, Fujisawa H (1989).

Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs.
J Biol Chem. 264(30):17907-12.

Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, Belardinelli L, Maier LS (2011).

Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload.
Circ Res. 108(5):555-65.

Warren M, Sciuto KJ, Taylor TG, Garg V, Torres NS, Shibayama J, Spitzer KW, Zaitsev AV (2017).

Blockade of CaMKII depresses conduction preferentially in the right ventricular outflow tract and promotes ischemic ventricular fibrillation in the rabbit heart.

J Physiol Heart Circ Physiol. 312(4):H752-H767.

Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR (1989).

Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation.

J Biol Chem. 264(19):11468-74.

Wehrens XH1, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Rosembliit N, D'Armiento JM, Napolitano C, Memmi M, Priori SG, Lederer WJ, Marks AR (2003).

FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death.

Cell. 113(7):829-40.

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004).

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor.

Circ Res. 94(6):e61-70.

Wehrens XH, Marks AR (2004).

Molecular determinants of altered contractility in heart failure.

Ann Med. 36 Suppl 1:70-80.

Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR (2005).

Intracellular calcium release and cardiac disease.

Annu Rev Physiol. 67:69-98.

Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM (2006).

Local InsP₃-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling.

J Clin Invest. 116(3):675-82.

Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H, Chen SR (2006).

Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts.

Biochem J. 396(1):7-16.

Xiao B, Tian X, Xie W, Jones PP, Cai S, Wang X, Jiang D, Kong H, Zhang L, Chen K, Walsh MP, Cheng H, Chen SR (2007).

Functional consequence of protein kinase A-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: sensitization of store overload-induced Ca²⁺ release. J Biol Chem. 282(41):30256-64.

Yue DT, Herzig S, Marban E (1990).

Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 87(2):753-7.

Zaccolo M (2006).

Phosphodiesterases and compartmentalized cAMP signalling in the heart.

Eur J Cell Biol. 85(7):693-7.

Zakhary DR, Moravec CS, Stewart RW, Bond M (1999).

Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy.

Circulation. 99(4):505-10.

Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD (1995).

Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation.

Circ Res. 76(6):1028-35.

Zhang T, Brown JH (2004).

Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure.

Cardiovasc Res. 63(3):476-86.

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2003).

Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 285(2):H579-88.

9 Publikationsverzeichnis

Appukuttan A, Kasseckert SA, Micoogullari M, Flacke JP, Kumar S, Woste A, Abdallah Y, Pott L, Reusch HP, Ladilov Y.

Type 10 adenylyl cyclase mediates mitochondrial Bax translocation and apoptosis of adult rat cardiomyocytes under simulated ischaemia/reperfusion.

Cardiovascular Research, 2012

Micoogullari M., Shahzad T., Woste A., Abdallah Y., Piper H.M., Schlüter K.-D., Kasseckert S.A.

O 94

Rac1 activation is important for cannabinoid receptor mediated protection of coronary endothelial cells against reperfusion injury

90. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Regensburg, 2011

Micoogullari M., Woste A., Shahzad T., Raffenberg S., Johnson V., Kasseckert S., Abdallah Y., Iraqi W.

P006

Protection against reperfusion injury through activation of protein kinase A in a cell model

90. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Regensburg, 2011

Raffenberg S., Woste A., Shahzad T., Johnson V., Abdallah Y., Iraqi W.

P007

The protection against reperfusion injury through uncoupling of the mitochondrial respiratory chain at the start of reperfusion

90. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Regensburg, 2011

Johnson V., Woste A., Raffenberg S., Shahzad T., Abdallah Y., Iraqi W.

P008

Inhibition of mitochondrial Benzodiazepine Receptor protects cardiomyocytes against reperfusion injury

90. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Regensburg, 2011

10 Erklärung

„Hiermit erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Herrn PD Dr. Yaser Abdallah danke ich für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung und die hilfreiche Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Recht herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Sascha A. Grothe für die engagierte Unterstützung bedanken. Ein großes Dankeschön gilt Gudrun Pfeiffer für die emotionale Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Für das nette Arbeitsklima danke ich allen anderen Mitgliedern des Institutes.