

**Modulation von Kraftentwicklung und  
Querbrückenkinetik einzelner Kardiomyozyten  
aus gesundem und insuffizientem Myokard  
des Menschen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

**Dipl.-Biol. Steffi Lesinski geb. Schmell**

geboren am 13.06.1981 in Halberstadt

**2011**

**Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Theresia Kraft**

**Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller**

**Tag der Promotion: 29.06.2011**

## **Eidstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Steffi Lesinski (geb. Schmell), geboren am 13.06.1981 in Halberstadt, an Eides statt, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Titel:

*" Modulation von Kraftentwicklung und Querbrückenkinetik einzelner Kardiomyozyten aus gesundem und insuffizientem Myokard des Menschen "*

selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Gleichzeitig versichere ich an Eides statt, dass die in der Dissertation aufgeführten Ergebnisse hiermit zum ersten Mal in einer Prüfungsarbeit erwähnt sind und nicht bereits schon zuvor für eine Diplomarbeit o.ä. verwendet wurden.

Hannover, den 29.06.2011

Steffi Lesinski



*Meinem Mann Dietrich*

*und*

*meinen Eltern Gabi und Ralf*

*Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:*

*Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit*

*und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.*

*Albert Einstein*

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei allen Spendern der Herzproben bedanken, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Theresia Kraft, meiner Doktormutter, für ihre Betreuung und Hilfe während der gesamten Zeit bedanken. Die Möglichkeit mit humanem Gewebe zu arbeiten war für mich ein großer Vertrauensbeweis. Vielen Dank für alles.

Auch geht ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Bernhard Brenner dafür, dass er mir die Möglichkeit gab diese Promotion in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und ich so ein sehr interessantes Thema bearbeiten durfte.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Walter Müller für seine unkomplizierte und herzliche Art, sowie für die Übernahme des Korreferats und Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Anaclet Ngezahayo danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat Vorsitzender und Prüfer während meiner Disputation zu sein.

Ich danke des Weiteren Alexander Lingk und Torsten Beier für ihre unkomplizierte und fröhliche Art und vor allem für die tolle Zusammenarbeit und Hilfe bei allen technischen Fragen zur Modifikation der Apparatur.

Birgit Piep danke ich sehr für ihre Hilfe im alltäglichen Laborleben, für ihre geduldige Einarbeitung und für alle sonstigen Hilfestellungen.

Ein ganz lieber Dank geht an Evelyn Harder, nicht nur für ihre organisatorische Hilfe, sondern vor allem für ihr Verständnis, Zuspruch und das Lachen während der Mittagspausen.

Ich möchte mich beim gesamten Team der Molekular- und Zellphysiologie, vor allem bei Julie Lynn Hodgkinson, Snigdha Tripathi und Ina Stehle für die netten Gespräche, Hilfen bei jeglichen Belangen und für die unvergessliche Zeit während meiner Arbeit bedanken.

Meinen lieben Eltern danke ich so sehr für ihre Liebe, Verständnis und Hilfe in all den Jahren und dafür, dass sie mir das Studium und diese Promotion ermöglichten. So danke ich auch meinen Grosseltern, die mir nicht nur eine schöne Kindheit bescherten, sondern auch sonst immer für mich da waren.

Mein allergrößter Dank gebührt meinem lieben Mann Dietrich für seine unerschöpfliche Hilfe, Verständnis und seine unendliche Liebe und Geduld. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft!

	<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
	<b>Abstract</b>	<b>III</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Der Herzmuskel – Aufbau des kontraktiven Apparates</b>	<b>1</b>
1.1.1	Das Aktinfilament	3
1.1.2	Das Myosinfilament	4
<b>1.2</b>	<b>Der Querbrückenzyklus</b>	<b>5</b>
1.2.1	Regulation des Querbrückenzyklus	6
1.2.2	Die Kinetik des Querbrückenzyklus	7
<b>1.3</b>	<b>Besonderheiten der Regulation der Kontraktion im Herzen</b>	<b>10</b>
1.3.1	Die leichten Myosinketten (MLC)	10
1.3.2	Feinregulation der Kontraktion im Herzen über $\beta$ -adrenerge Stimulation	11
<b>1.4</b>	<b>Herzinsuffizienz</b>	<b>13</b>
1.4.1	Veränderung sarkomerischer Proteine im insuffizienten Herzen	13
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>17</b>
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterial	19
2.1.3	Software	20
2.1.4	Myokardgewebe des Menschen und der Ratte	21
2.1.5	Herstellung von Lösungen	21
2.1.5.1	Lösungen und Puffer	21
2.1.5.2	Zusammensetzung der Messlösungen	24
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
2.2.1	Bestimmung der Phosphorylierung sarkomerischer Proteine durch die eindimensionale Gelelektrophorese	28
2.2.1.1	Aufbereitung von Proben für die eindimensionale Gelelektrophorese	28
2.2.1.2	ProQ-Färbung und SyproRuby-Färbung	29
2.2.1.3	Auswertung von eindimensionalen Gelen	30

2.2.2	Bestimmung der Phosphorylierung sarkomerischer Proteinisofomen durch die zweidimensionale Gelelektrophorese	30
2.2.2.1	Aufbereitung von Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese	30
2.2.2.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung	31
2.2.2.3	Auswertung von zweidimensionalen Gelen	32
2.2.3	Aufbau der Apparatur zur Messung isometrischer Kräfte an einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyten	33
2.2.4	Vorarbeiten für isometrische Kraftmessungen an einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyten	35
2.2.4.1	Präparation der Herzproben und Kryokonservierung	35
2.2.4.2	Isolation und Permeabilisierung von Kardiomyozyten	35
2.2.4.3	Befestigung der Kardiomyozyten und Bestimmung der Zellparameter	36
2.2.4.4	Etablieren von Protokollen für isometrische Kraftmessungen an einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyten	38
2.2.4.5	Bestimmung von aktiven und passiven isometrischen Kräften	42
2.2.4.6	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs	43
2.2.4.7	Isometrische Kraftmessungen bei verschiedenen Calciumkonzentrationen	44
2.2.4.8	Isometrische Kraftmessungen bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen	46
2.2.5	Kontrollexperimente	47
2.2.5.1	Kontrollexperiment mit 2,3-Butandion Monoxim zur Bestimmung der Myosinaktivität in pCa 9.0	47
2.2.5.2	Kontrollexperiment mit Sucrose Phosphorylase zur Abschätzung der Phosphat-Verunreinigung in der Aktivierungslösung ohne Phosphatzugabe (in Donor-Kardiomyozyten)	48
2.2.5.3	Isometrische Kraftmessungen vor und nach Inkubation mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase A ( $PKA_{cat}$ )	49
2.2.6	Statistische Auswertung	49
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung der notwendigen experimentellen Bedingungen</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>Wirkung von Calcium und Phosphat auf Donor-Kardiomyozyten</b>	<b>51</b>

3.2.1	In Donor-Kardiomyozyten (Kontrolle) ist die isometrische Kraft calcium- und phosphatabhängig	51
3.2.2	In Donor-Kardiomyozyten ist die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ ) phosphatabhängig	53
3.2.3	In Donor-Kardiomyozyten ist die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ) calciumabhängig	54
3.2.4	In Donor-Kardiomyozyten beschleunigt Phosphat die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ )	56
<b>3.3</b>	<b>Donor versus Herzinsuffizienz</b>	<b>58</b>
3.3.1	Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von sarkomerischen Proteinen aus Donormyokard und aus insuffizientem Myokard	58
3.3.2	Die isometrische Kraft von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard ist im Vergleich zu Donor-Kardiomyozyten herabgesetzt	62
3.3.3	Die passive Kraft von Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen ist im Vergleich zu Kardiomyozyten aus Donormyokard erhöht	63
3.3.4	Die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ ) von Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen ist im Vergleich zu Donor-Kardiomyozyten erhöht	64
<b>3.4</b>	<b>Proteinkinase A - Effekt auf Kardiomyozyten aus Herzinsuffizienzmyokard</b>	<b>65</b>
3.4.1	Die Wirkung einer Inkubation mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A ( $PKA_{cat}$ ) auf die Calciumempfindlichkeit der Kardiomyozyten	66
3.4.2	Inkubation mit $PKA_{cat}$ verändert nicht die aktive und die passive Maximalkraft in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard	67
3.4.3	Wirkung der $PKA_{cat}$ auf die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs	68
<b>3.5</b>	<b>Phosphateffekt auf Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard</b>	<b>69</b>
3.5.1	Phosphatzugabe reduziert die isometrische Kraft von Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen	69
3.5.2	Phosphat hat kaum Einfluss auf die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ ) von Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen	70
3.5.3	Phosphat beschleunigt die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ) im insuffizienten Herzen	71
<b>3.6</b>	<b>Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse</b>	<b>73</b>

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1	<b>Kritische Betrachtung der Messmethode</b>	<b>74</b>
4.2	<b>Calciumeffekt – Vergleich zwischen Myokard des Donors und des insuffizienten Herzen</b>	<b>76</b>
4.2.1	Maximale isometrische Kraftentwicklung und passive Kraft permeabilisierter Kardiomyozyten	76
4.2.2.	Die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ ) – Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen sind calciumempfindlicher als Kardiomyozyten aus Donormyokard	78
4.2.3	Die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ) ist calciumabhängig	80
4.3	<b>Phosphateffekt – Vergleich zwischen Kardiomyozyten aus Donormyokard und aus insuffizientem Myokard</b>	<b>83</b>
4.3.1	Die isometrische Kraft ist phosphatabhängig	84
4.3.2	Wirkung von Phosphat auf die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ )	85
4.3.3	Anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) beschleunigt die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ )	86
4.4	<b>Ausblick</b>	<b>87</b>
5.	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
6.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>100</b>
7.	<b>Lebenslauf</b>	<b>103</b>
8.	<b>Publikation</b>	<b>103</b>

## Zusammenfassung

Im Verlauf vieler Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie beispielsweise Bluthochdruck oder Kardiomyopathien, entwickelt sich im Spätstadium eine Herzinsuffizienz. Zelluläre und molekulare Veränderungen des Myokards, die zur Herzinsuffizienz führen, sind jedoch größtenteils ungeklärt. Daher ist es von großem Interesse, den kontraktilen Mechanismus der Kardiomyozyten als Endstrecke vieler Signalkaskaden im gesunden und kranken Myokard genau zu charakterisieren. Beispielsweise wird der modulatorische Einfluss der Calciumkonzentration auf die Kinetik der Aktomyosin-Querbrücken und der Effekt erhöhter Phosphatkonzentration im ischämischen Myokard nach wie vor kontrovers diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zuerst ein Messsystem für funktionelle Untersuchungen an einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyten zu etablieren und anschließend die Auswirkungen unterschiedlicher Calcium- und Phosphatkonzentrationen auf die Funktion und Kinetik der Querbrücken in Kardiomyozyten aus gesundem und aus insuffizientem humanen Myokard zu charakterisieren.

Für diese Untersuchungen wurden Kardiomyozyten aus Myokardgewebe mechanisch isoliert, mit Triton X-100 permeabilisiert, und an Kraftaufnehmer und Längengeber der Messapparatur befestigt. Nach Einstellen einer definierten Sarkomerlänge wurden die aktive Kraftentwicklung, die passive Kraft und die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ), nach einer kurzen Entdehnung der Zelle, gemessen. Die Isoformen sarkomerischer Proteine sowie deren Phosphorylierung wurden mittels 1D- bzw. 2D-Gelelektrophorese überprüft.

Nach der Optimierung der experimentellen Bedingungen und Etablierung spezieller Messprotokolle konnte reproduzierbar eine gute mechanische Stabilität der Zellen (Kraftverlust maximal 10–15% nach 11 Aktivierungen) erreicht werden. Sowohl Kardiomyozyten aus gesundem als auch aus insuffizientem Myokard zeigten neben der bekannten ausgeprägten Calciumkonzentrationsabhängigkeit der Kraftentwicklung ( $F_{max}$ ) auch eine Abhängigkeit der  $k_{tr}$  von der Calciumkonzentration. Der Kurvenverlauf von  $k_{tr}$  war von 100% bis 20%  $F_{max}$  ähnlich zum Kurvenverlauf der Kraft. Die Messmethode erlaubte, auch bei sehr niedrigen Calciumkonzentrationen, bei der die Kardiomyozyten nur geringe Kräfte entwickeln (5–20%  $F_{max}$ ), die Querbrückenkinetik genau zu erfassen. Daher konnten wir erstmals zeigen, dass in beiden Zelltypen  $k_{tr}$  bei diesen geringen Kräften nicht weiter abnimmt, sondern wieder deutlich schneller wird. Somit konnten zwei Komponenten von  $k_{tr}$  identifiziert werden -  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$ .  $k_{trA}$  wird mit steigender Calciumkonzentration schneller,  $k_{trB}$  jedoch langsamer. Bei Phosphaterhöhung zeigten  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  eine ähnliche Phosphatabhängigkeit, sowohl in Kardiomyozyten aus gesundem als auch aus insuffizientem Myokard. Der direkte Vergleich der Calciumempfindlichkeit ergab für Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard eine signifikant höhere Calciumempfindlichkeit, welche durch die Inkubation mit Proteinkinase A ( $PKA_{cat}$ ) kompensiert werden konnte. Die erhöhte Calciumempfindlichkeit des insuffizienten Myokards beruht höchstwahrscheinlich auf einer verminderten Phosphorylierung des kardialen Troponin I (cTnI), die neben einer reduzierten Phosphorylierung der leichten Myosinkette 2 durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise verhielten sich bei  $PKA_{cat}$ -Inkubation die beiden  $k_{tr}$ -Komponenten gegensätzlich,  $k_{trA}$  wurde kleiner und  $k_{trB}$  signifikant größer.

Mit dieser Arbeit konnten wir bestätigen, dass auch die Querbrückenkinetik der Herzmuskelzellen, wie seit langem für den Skelettmuskel bekannt, maßgeblich von der Calciumkonzentration abhängig ist. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Kraftentwicklung bei steigender Phosphatkonzentration deutlich abnimmt, was frühere Beobachtungen untermauert und durch eine Beschleunigung der Querbrückenkinetik und eine Akkumulation der Myosinköpfe in den nicht-kraftgenerierenden Zuständen des Querbrückenzyklus erklärbar ist. Nach dem Modell der Querbrückenkinetik von B. Brenner wird  $k_{tr}$  durch die Geschwindigkeitskonstanten für den Übergang der Querbrücken von den nicht-kraftgenerierenden Zuständen in die kraftgenerierenden Zustände ( $f_{app}$ ; verbunden mit Phosphatabgabe) und für den Übergang nach vollzogenem Kraftschlag wieder in den Ausgangszustand ( $g_{app}$ ; verbunden mit ADP-Abgabe und ATP-Bindung) plus die jeweiligen Rückreaktionen bestimmt. Mit steigender Calciumkonzentration nimmt  $f_{app}$  zu und bestimmt  $k_{tr}A$ . Bei hoher Phosphatkonzentration wird die Rückreaktion  $f_{app}$  signifikant größer und damit auch  $k_{tr}$ . Die bei geringer Calciumkonzentration bzw. geringer Kraft beobachtete starke Zunahme von  $k_{tr}$  ( $k_{tr}B$ ) ist vermutlich durch eine Beschleunigung von  $g_{app}$  erklärbar. *In vivo* könnte die Beschleunigung von  $g_{app}$  bei kleinen Kräften einer Beschleunigung der Relaxation des Herzmuskels dienen. Der gegensätzliche Effekt der Phosphorylierung durch  $PKA_{cat}$  auf  $k_{tr}A$  und  $k_{tr}B$  deutet auch darauf hin, dass die beiden Komponenten von unterschiedlichen Schritten im Querbrückenzyklus bestimmt werden. Phosphorylierung von cTnI beeinflusst vermutlich  $k_{tr}A$ . Eine Phosphorylierung des kardialen Myosinbindenden Protein C (cMyBP-C), die den hemmenden Effekt von cMyBP-C auf die Querbrückenkinetik aufheben soll, könnte die Beschleunigung von  $k_{tr}B$  bewirken.

Somit wurde in dieser Arbeit ein System etabliert, mit dem funktionelle Veränderungen des Myokards auf Sarkomerebene genau charakterisiert werden können. Es ist daher sehr gut dafür geeignet, den molekularen Mechanismus der Kontraktion in Herzmuskelzellen weiter aufzuklären und dessen Veränderungen beispielsweise durch Mutationen in sarkomerischen Proteinen direkt funktionell zu charakterisieren.

Schlagworte: humane permeabilisierte Kardiomyozyten, Calcium, Phosphat, Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs, Querbrückenkinetik, Herzinsuffizienz

**Abstract**

In the course of many cardiovascular diseases like high blood pressure or cardiomyopathy, very often heart failure develops in the late stage of the disease. Several cellular and molecular adaptations of the myocardium which lead to heart failure are still unclear. Hence it is important to characterize the contractile mechanism of the cardiomyocytes which is the subject of regulation by many intracellular signaling pathways in the healthy and diseased myocardium. For instance, the modulating influence of calcium concentration on acto-myosin cross-bridge kinetics and the effect of increased phosphate concentration in the ischemic myocardium are still under debate.

The aim of the present work was (i) to establish an experimental setup for functional investigations of single, permeabilized cardiomyocytes, and (ii) to characterize the effect of different calcium and phosphate concentrations on function and kinetics of the cross-bridges in cardiomyocytes from healthy and failing human myocardium.

For these investigations, cardiomyocytes from myocardium were isolated mechanically, permeabilized with Triton X-100, and glued between a force transducer and a length controller of the setup. Active force development, passive force and the rate constant of force redevelopment ( $k_{tr}$ ) after a quick release and restretch of the cell were measured at defined sarcomere lengths. The isoforms of sarcomeric proteins as well as their phosphorylation status were tested by 1D and 2D gel electrophoresis.

After optimization of the experimental conditions and establishment of special measuring protocols a very good mechanical stability of the cells (force rundown maximum 10–15% after 11 activations) and its sarcomere structure were achieved. Beside the known strong calcium dependence of force development ( $F_{max}$ ), cardiomyocytes from healthy and insufficient myocardium also clearly showed a dependence of  $k_{tr}$  on calcium concentration. From 100% to 20%  $F_{max}$  the calcium-dependence of  $k_{tr}$  was similar to that of force. Yet, the newly established experimental method also allowed to precisely detect cross-bridge cycling kinetics at very low calcium concentrations where cardiomyocytes develop only low forces (5–20%  $F_{max}$ ). Consequently we were able to demonstrate for the first time that at low forces  $k_{tr}$  shows no further decrease but instead, it significantly increases. Thus, two components of  $k_{tr}$  could be identified -  $k_{trA}$  and  $k_{trB}$ .  $k_{trA}$  became faster with increasing calcium concentration while  $k_{trB}$ , however, became slower.

At increasing phosphate concentrations,  $k_{trA}$  and  $k_{trB}$  showed similar phosphate dependence in cardiomyocytes from healthy as well as from failing myocardium. Direct comparison of calcium sensitivity showed significantly higher calcium sensitivity for cardiomyocytes from failing myocardium which could be compensated by incubation with the catalytic subunit of protein kinase A ( $PKA_{cat}$ ). The increased calcium sensitivity of failing myocardium is most likely due to decreased phosphorylation of cardiac troponin I (cTnI), which was observed together with a decreased phosphorylation of the light myosin chain 2 in gel electrophoresis. Interestingly, the two  $k_{tr}$  components behaved in opposite ways after  $PKA_{cat}$  incubation,  $k_{trA}$  became smaller and  $k_{trB}$  significantly larger.

With this work we could corroborate that cross-bridge kinetics of heart muscle cells are strongly dependent on calcium concentration, consistent with previous results for skeletal muscle. In addition, we could confirm that force development steeply decreases with rising phosphate concentration. This

can be explained by an acceleration of cross-bridge cycling kinetics and an accumulation of the myosin heads in non-force generating states of the cross-bridge cycle. In the model for cross-bridge kinetics developed by B. Brenner,  $k_{tr}$  depends on the rate constants of the transition of the cross-bridges from non-force-generating states to force-generating states ( $f_{app}$ ; associated with phosphate release) and of the transition back to the non-force generating states after the power stroke ( $g_{app}$ ; associated with ADP release and binding of ATP).  $f_{app}$  increases with rising calcium concentration and determines  $k_{tr}A$ . With high phosphate concentration, the backward reaction  $f_{app}^{-1}$  increases significantly and with it also  $k_{tr}$ . The strong increase of  $k_{tr}$ , observed at low calcium concentration or low force ( $k_{tr}B$ ), is possibly caused by acceleration of  $g_{app}$ . *In vivo*, an acceleration of  $g_{app}$  at low forces could support speeding up of relaxation of the heart muscle. The opposite effects of phosphorylation on  $k_{tr}A$  and  $k_{tr}B$  also points to the fact that the two components are determined by different transitions in the cross-bridge cycle. Phosphorylation of cTnI most likely influences  $k_{tr}A$ . Phosphorylation by  $PKA_{cat}$  of the cardiac Myosin Binding Protein C (cMyBP-C) which should lift the restraining influence of cMyBP-C on the cross-bridge kinetics could be responsible for the acceleration of  $k_{tr}B$ .

In conclusion, we established a measuring system which allows to precisely characterize functional changes of the myocardium at the sarcomere level. Therefore, this system is very well suited to further investigate the molecular mechanism of contraction in cardiomyocytes and its changes caused for example by mutations in sarcomeric proteins.

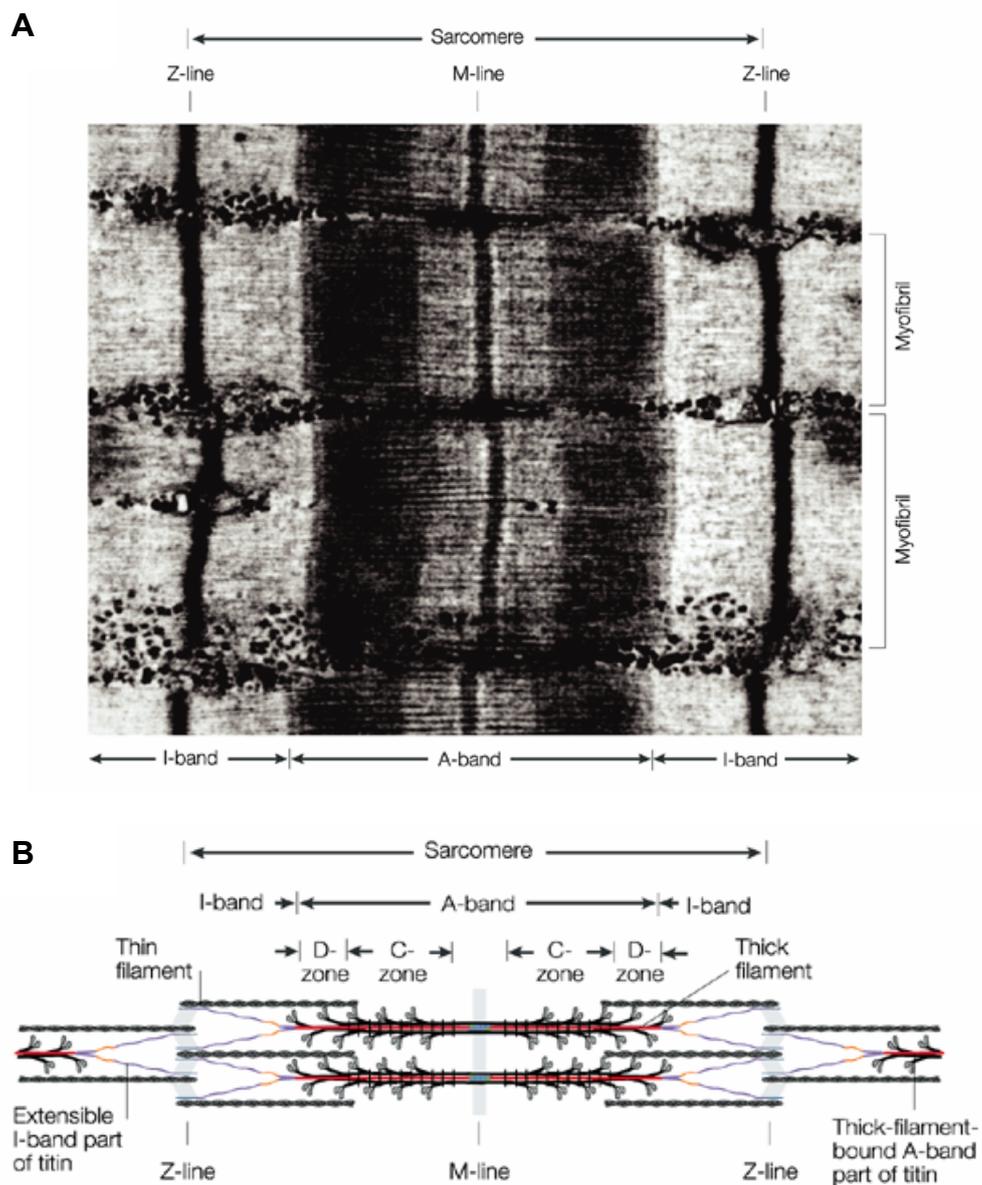
keywords: human permeabilized cardiomyocytes, calcium, phosphate, rate constant of force redevelopment, cross-bridges kinetics, heart failure

## 1. Einleitung

Während eines menschlichen Lebens bewältigt das Herz bis zur 3 Milliarden Schläge. Das zeigt die enorme Leistungsfähigkeit des Herzens. Möglich ist dies nur durch ein komplexes, fein reguliertes Zusammenspiel vieler Proteine. Um die Auswirkungen und auch die Gründe für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu verstehen, ist es nötig den grundlegenden Aufbau des kontraktiven Apparates sowie dessen Regulation im normal funktionierenden Herzen zu verstehen. Dies soll im Folgenden erläutert werden und dient zur Hinführung auf die Zielsetzung der Arbeit. Dabei ging es darum funktionelle Parameter von Kardiomyozyten aus gesundem und insuffizientem Myokard zu charakterisieren. Ein Schwerpunkt war, die Auswirkung einer erhöhten Phosphatkonzentration, wie sie bei Mangeldurchblutung des Herzens auftreten kann, auf die Kardiomyozytenfunktion zu untersuchen.

### 1.1 Der Herzmuskel – Aufbau des kontraktiven Apparates

Grundsätzlich werden zwei Arten von Muskulatur unterschieden: die glatte Muskulatur, welche die inneren Organe sowie die großen Blutgefäße umgibt und die quergestreifte Muskulatur, zu der die Skelettmuskulatur gehört. Die Herzmuskulatur ist der quergestreiften Muskulatur zuzuordnen. Der Begriff der Querstreifung begründet sich aus der Anordnung der Sarkomere, die unter dem Lichtmikroskop als regelmäßige Hell-Dunkel-Struktur beobachtet werden konnten (Abb. 1.1 A). Das Sarkomer bildet die kleinste funktionelle Einheit im Muskel und definiert sich als der Bereich zwischen zwei Z-Scheiben (Abb. 1.1 B). Hauptsächlichste Bestandteile des Sarkomers sind das dünne (Aktin) und das dicke (Myosin) Filament.



**Abb. 1.1: Aufbau des Sarkomers.** (aus Tskhovrebova und Trinick 2003)

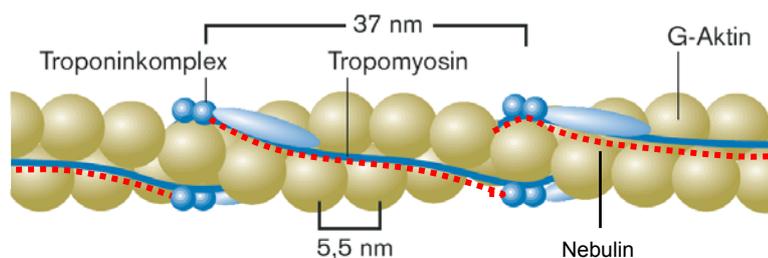
A: Mikroskopische Aufnahme einer Sarkomerstruktur

B: schematische Sarkomerdarstellung

Z: Z-Scheibe; I: I-Bande (isotrop); A: A-Bande (anisotrop); M: M-Linie

### 1.1.1 Das Aktinfilament (= dünnes Filament)

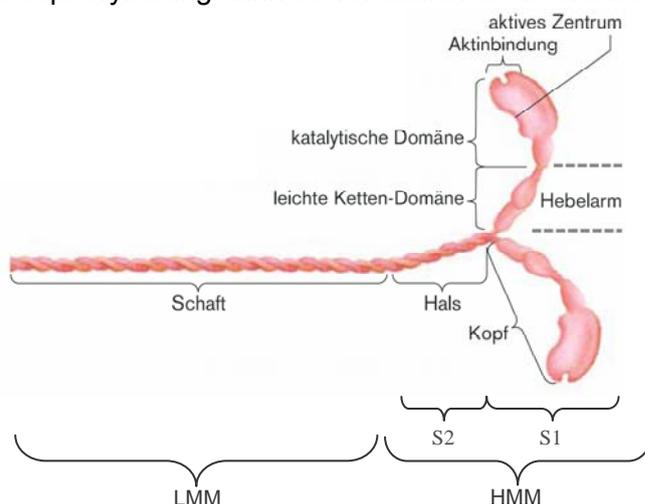
Das Aktinfilament, auch dünnes Filament genannt, besteht aus globulären Aktinmonomeren (G-Aktin; 42 kDa), welche sich in vier Domänen untergliedern lassen (Kabsch *et al.*, 1990). Diese Domänen dienen der Bindung für Nukleotide (ATP, ADP) und sowie der Bindung mit Myosin (Kabsch *et al.*, 1990; Holmes, 1996). Diese globulären Monomere polymerisieren zu einem Filament (F-Aktin). Dabei bilden zwei helikal umeinander gewundene Ketten ein Aktinfilament. Diese sind wiederum über das  $\alpha$ -Aktinin in der Z-Scheibe verankert. In den Furchen längs des Aktinfilaments liegt das Tropomyosin (Tm, 66 kDa) (Bailey, 1948), welches ebenfalls ein Dimer aus zwei  $\alpha$ -helikalen Ketten bildet (Lewis und Smillie, 1980; Tobacman, 1996). Die Bindung des Tropomyosins wird durch den Troponinkomplex (77.5 kDa) stabilisiert, welcher jeweils an der End-zu-End Zusammenlagerung der Tm-Moleküle lokalisiert ist. Dieser heterotrimere Troponinkomplex besteht aus den Untereinheiten (UE) Troponin C (Calcium-bindende UE; TnC; 18,5 kDa), Troponin I (inhibitorische UE; TnI; 24 kDa) und Troponin T (Tropomyosin-assoziierte UE; TnT; 35 kDa) (Abb. 1.2). Zusammen mit dem Tropomyosin stellt der Troponinkomplex die Regulation der Kontraktion sicher, indem Calcium an das TnC bindet und so der Tm verschoben wird, wodurch der kraftgenerierende Zyklus des Myosins möglich wird. Ein weiteres Aktin-assoziiertes Protein ist das Nebulin. Es wird angenommen, dass Nebulin die Länge des Aktinfilaments reguliert, aber auch eine Rolle in der Signaltransduktion spielen könnte (McElhinny *et al.*, 2003).



**Abb. 1.2: Teil des Aktinfilaments.** Dargestellt sind die an Aktin assoziierten Proteine, Troponinkomplex, Tropomyosin und Nebulin aus Klinke/Pape/Silbernagel, 5.Auflage (2005) und modifiziert nach Clark *et al.* (2002).

### 1.1.2 Das Myosinfilament (= dickes Filament)

Die im Herzmuskel befindlichen Myosine gehören zur Myosinunterfamilie II (Schiaffino und Reggiani, 1996). Verdaut man Myosin mittels Trypsin, resultiert ein leichter, hydrophober Anteil, das leichte Meromyosin (LMM) und ein schwer löslicher Anteil, das schwere Meromyosin (HMM). Bei einem weiteren Verdau mit Papain entsteht der katalytisch aktive globuläre Kopf, Subfragment 1 (S1) und die bewegliche Halsregion, Subfragment 2 (S2) (Margossian und Lowey, 1982) (Abb. 1.3). Das Myosinmolekül besteht aus zwei schweren Ketten (myosin heavy chain, MHC; 220 kDa), von der jede mit zwei leichten Ketten (15-22 kDa) (NH<sub>2</sub>-terminal gelegen) assoziiert ist. Hierbei handelt es sich um die regulatorische leichte Ketten (RLC oder auch MLC-2) und die essentielle leichte Kette (ELC oder auch MLC-1). Ohne die essentiellen leichten Ketten wäre das Myosin inaktiv (Dreizen und Gershman, 1970). Im Anschluss an jede dieser globulären Kopfregionen folgt jeweils der  $\alpha$ -helikale Schaft (COOH-terminal gelegen), eine coiled-coil Region, welche durch Interaktion gegensätzlich geladener Aminosäuren die Filamente (dicke Filamente) ausbildet (Rayment *et al.*, 1993; Gordon *et al.*, 2000). Die Motordomäne des Myosinkopfes (S1) besitzt Bindungsstellen für Aktin und beherbergt das katalytische Zentrum der ATPase (Lowey *et al.*, 1969; Rayment *et al.*, 1993). Das dicke Filament ist assoziiert mit dem elastischen Protein Titin (3000 kDa) und wird von diesem mit der Z-Scheibe verbunden. Titin dient damit der Stabilisierung des Myosinfilaments im Sarkomer und ist für die elastischen Rückstellkräfte (passive Kraft) zuständig (Keller, 1995). Somit spielt es wahrscheinlich auch eine entscheidende Rolle im Frank-Starling-Mechanismus des Herzens (Cazorla *et al.*, 2001). Neben weiteren mit dem Myosinfilament verbundenen Proteinen wie z.B. Myomesin und der Kreatinkinase, dem Enzym zur Energiegewinnung im Muskel, beide lokalisiert in der M-Linie, spielt auch das Myosin-bindende Protein C (MyBP-C, 140 kDa) eine große Rolle (Abb. 1.9). cMyBP-C interagiert mit der Schaftregion des Myosins (LMM), sowie möglicherweise mit Titin und auch dem Aktinfilament (Clark *et al.*, 2002). Durch Phosphorylierung kann es vermutlich die Interaktion von Myosin und Aktin modulieren.



**Abb.1.3: Schematische Darstellung eines Myosinmoleküls.** (aus Klinker/Pape/Silbernagel, 5. Auflage 2005)

S1: Myosinkopf mit leichten Ketten

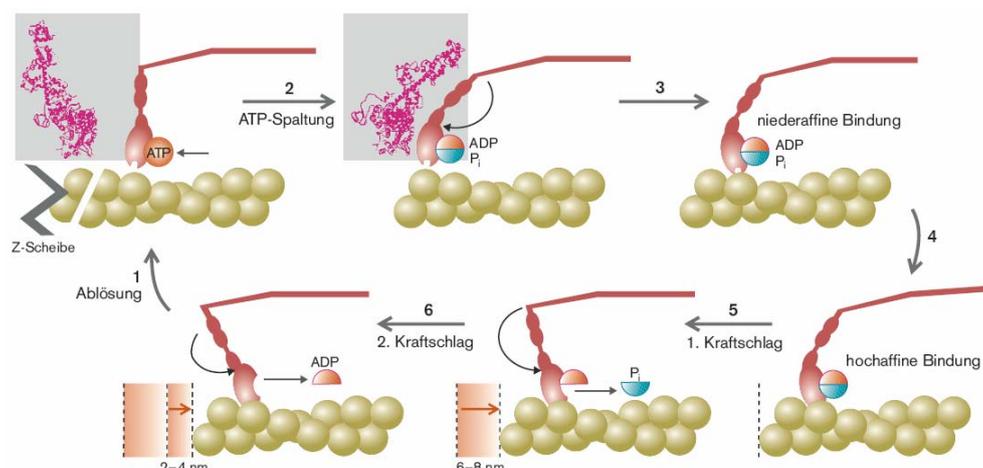
S2: Halsregion

HMM: schweres Meromyosin

LMM: leichtes Meromyosin

## 1.2 Der Querbrückenzyklus

Der Querbrückenzyklus beschreibt das zyklische Anheften und Ablösen der Myosinköpfe, wodurch unter ATP-Hydrolyse Kraft erzeugt wird, was ein Verschieben der Filamente gegeneinander zur Folge hat (Huxley und Niedergerke, 1954; Lymn und Taylor, 1971). Ohne ATP ist der Myosinkopf (S1) hochaffin am Aktinfilament gebunden (Rigor) (Abb.1.4). Erst durch die Bindung von ATP an die Nukleotid-Bindungsstelle am S1 löst sich die hochaffine Bindung zum Aktinfilament (Abb.1.4 Schritt 1). Es erfolgt nun die Hydrolyse von ATP in die Produkte ADP und  $P_i$  (Abb.1.4 Schritt 2), worauf es zu einer Konformationsänderung und einer Umlagerung des Hebelarms (= C-terminalen,  $\alpha$ -Helix am S1) kommt und somit zum „repriming“ des Myosinkopfes. Ausgehend von einer schwachen Interaktion zwischen S1 und Aktin (Abb.1.4 Schritt 3), kann der Myosinkopf nun wieder in eine hochaffine Bindung an Aktin übergehen, sofern die Bindungsstelle am Aktin nicht vom Tm-Tn-Komplex blockiert ist, also bei hoher Calciumkonzentration (Abb.1.4 Schritt 4). Die hochaffine Bindung an Aktin beschleunigt nun die Dissoziation der Hydrolyse-Produkte. Zunächst wird  $P_i$  freigesetzt (Abb.1.4 Schritt 5). Dieser Schritt geht mit einer Konformationsänderung einher und führt zum ersten Kraftschlag, bei dem das Aktinfilament ca. 6-8 nm gegen das Myosinfilament verschoben wird. Somit erfolgt der erste kraftgenerierende Schritt beim Übergang der Querbrücken aus der niederaffinen in die hochaffine Aktinbindung (Eisenberg und Hill, 1985; Brenner *et al.*, 1991; Kraft *et al.*, 1995). Im Anschluss daran wird nun auch das ADP aus dem Myosinkopf abgegeben, was einen weiteren kleineren Kraftschlag von ca. 2-4 nm zur Folge hat (Abb.1.4 Schritt 6). Jetzt ist der Myosinkopf wieder nukleotidfrei und ein neuer Zyklus kann beginnen. Kraft wird somit nur bei hochaffiner Bindung zum Aktin erzeugt, daher werden die hochaffinen Zustände auch als kraftgenerierend und die niederaffinen Zustände als nicht-kraftgenerierend bezeichnet.



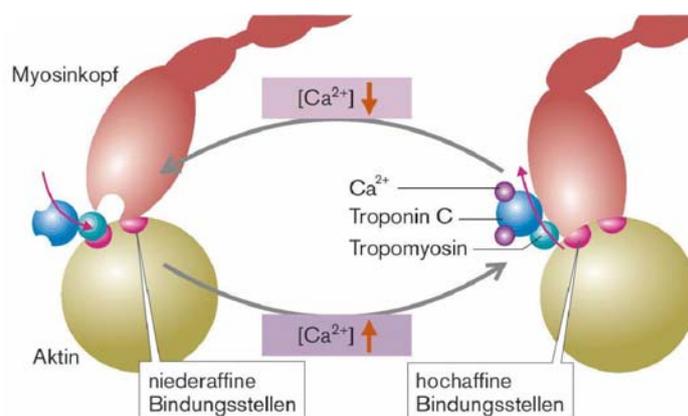
**Abb.1.4: Schematische Darstellung des Querbrückenzyklus unter Einbeziehung der Konformationsänderung des S1-Myosin-Kopfes.** (aus Klinke/Pape/Silbernagel, 5. Auflage 2005). Erklärung siehe Text.

### 1.2.1 Regulation des Querbrückenzyklus

Calcium ermöglicht durch Bindung an den Troponinkomplex, im speziellen an Troponin C, eine veränderte Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Tropomyosins auf dem Aktinfilament, wodurch hochaffine Bindungsstellen für Myosinköpfe frei werden (Ebashi und Endo, 1968). Durch dieses „Freischalten“ kann der Querbrückenzyklus im Muskel gewährleistet werden und somit auch die Verschiebung der Aktinfilamente gegeneinander (Gleitfilamenttheorie) (Huxley und Niedergerke, 1954).

Allgemein kann man zwischen einem aktivierten ( $A_{on}$ ) und einem inaktiven ( $A_{off}$ ) Aktinfilament unterscheiden (Abb. 1.5). Die Calciumabhängigkeit des Querbrückenzyklus wird durch das Gleichgewicht zwischen  $A_{on} \leftrightarrow A_{off}$ , welches durch Calcium kontrolliert wird, beeinflusst.

Mit steigender Calciumkonzentration wird die Geschwindigkeitskonstante für das Anschalten des dünnen Filaments größer und das Gleichgewicht in Richtung  $A_{on}$  verschoben. Das wiederum bedingt eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen Übergang der Querbrücken aus den nicht-kraftgenerierenden in die kraftgenerierenden Zustände (Brenner, 1988; Brenner und Chalovich, 1999). Bei höherer Calciumkonzentration nimmt schließlich die Zahl der kraftgenerierenden Querbrücken und damit die Kraftentwicklung zu, da der Übergang der Querbrücken zurück in die nicht-kraftgenerierenden Zustände zumindest bei höheren Calciumkonzentrationen nicht von Calcium beeinflusst wird (Brenner, 1988).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der beiden Querbrücken- und Aktinzustände.**

(aus Klinker/Pape/Silbernagel, 5. Auflage 2005).

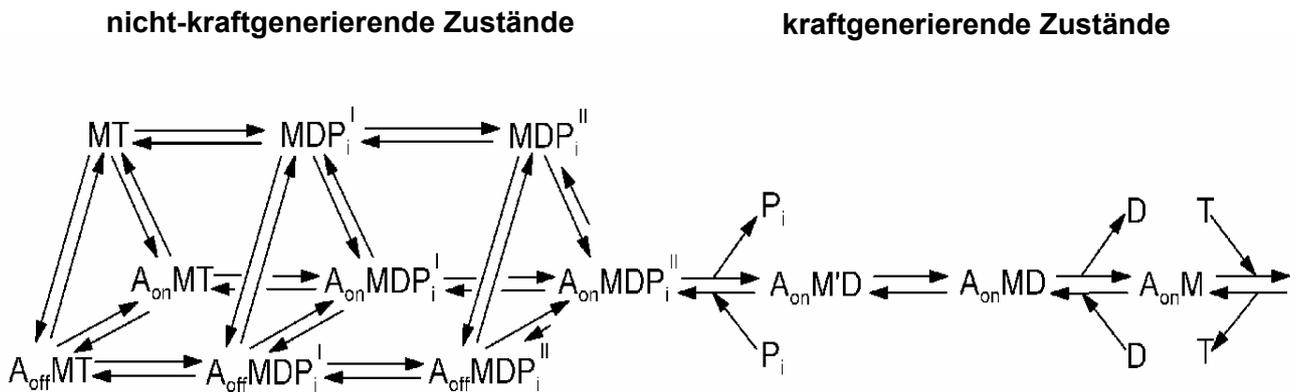
Links: Ist der nicht-kraftgenerierende Zustand ohne Calcium gezeigt, bei dem die hochaffine Myosinbindungsstelle auf dem Aktin blockiert ist ( $A_{off}$ )

Rechts: Ist Aktin aktiviert ( $A_{on}$ ) und Myosin ist hochaffin gebunden, sodass Kraft generiert werden kann

## 1.2.2 Die Kinetik des Querbrückenzyklus

A. F. Huxley postulierte erstmals, dass die Querbrücken entweder in einem angehefteten Zustand vorliegen und Kraft generieren oder abgelöst sind und somit keine Kraft generiert wird (Zwei-Zustands-Modell) (Huxley, 1957). Die Übergänge zwischen diesen Zuständen werden mit den Geschwindigkeitskonstanten  $f$  (Anheftung) und  $g$  (Ablösung) beschrieben. Dabei ist die Kraft proportional zur Anzahl der gebundenen Querbrücken ( $n$ ) (Huxley, 1957), d.h. nach diesem Modell würde Calcium die Anzahl aktiver Querbrücken (Rekrutierung) steigern (Podolsky und Teichholz, 1970). Später konnte gezeigt werden, dass Calcium die Kraftentwicklung nicht über Rekrutierung neuer Querbrücken reguliert, sondern über eine Veränderung der Kinetik (Brenner *et al.*, 1982).

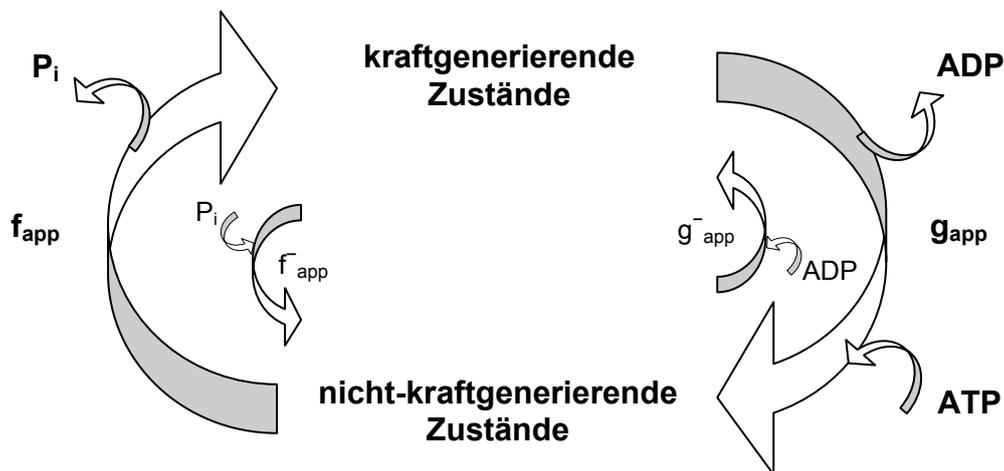
So wurde dieses Zwei-Zustands-Modell durch ein „six state model“ und andere Modelle erweitert (Eisenberg und Greene, 1980; Brenner, 1986a, 1988, 1991; Brenner und Yu, 1993; Brenner und Chalovich, 1999). Mehrere Zwischenstadien bilden im Wesentlichen zwei Gruppen von Zuständen, die entweder schwach-gebunden oder stark-gebunden vorliegen (Abb. 1.6). Die Übergänge zwischen den beiden Gruppen von Zuständen werden mit „apparenten“ Geschwindigkeitskonstanten ( $f_{app}$  und  $g_{app}$ ) beschrieben, sie stehen jeweils für mehrere Reaktionsschritte im Querbrückenzyklus (Brenner, 1988). Dabei beschreibt  $f_{app}$  den Übergang von nicht-kraftgenerierenden in kraftgenerierende Zustände unter  $P_i$ -Abgabe, wogegen  $g_{app}$  den Übergang von kraftgenerierenden in nicht-kraftgenerierende Zustände widerspiegelt, wobei ADP-Abgabe und ATP-Bindung erfolgen. Die Geschwindigkeitskonstanten für die entsprechenden Umkehrreaktionen werden als  $f_{app}^-$  und  $g_{app}^-$  bezeichnet (Abb. 1.7). Da die ADP-Wiederbindung energetisch ungünstig ist, kann  $g_{app}^-$  als sehr klein bewertet werden und wird meist vernachlässigt (Hill, 1974; Brenner, 1986b). Dagegen kann die Geschwindigkeitskonstante  $f_{app}^-$  unter bestimmten Bedingungen (hohe Phosphatkonzentration) erhöht sein und kann somit nicht vernachlässigt werden (Dantzig *et al.*, 1992). Denn bei hoher Phosphatkonzentration nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass Phosphat aus dem Medium zurück in die Nukleotidbindungstasche des Myosins bindet. Es kommt zu einer verstärkten Verschiebung in Richtung der "nicht-kraftgenerierenden Zustände".



**Abb.1.6: Biochemische Darstellung des Querbrückenzyklus.** (modifiziert nach Brenner und Chalovich, 1999). Dieses Modell beschränkt sich auf die hauptsächlich vorherrschenden Querbrücken Zustände während der ATP Hydrolyse und Kraftgenerierung (Stein *et al.*, 1979; Brenner *et al.*, 1982; Brenner und Chalovich, 1999).

M = Myosin, A = Aktin, T = MgATP, D = MgADP,  $P_i$  = anorganisches Phosphat,  $A_{on}$  = aktiviertes Aktinfilament,  $A_{off}$  = inaktives Aktinfilament

Zur Vereinfachung des Schemas wurden die selten besetzten kraftgenerierenden Zustände, die angeheftet oder abgelöst von  $A_{off}$  vorliegen können, nicht gezeigt.



**Abb.1.7: Modell des Querbrückenzyklus** (nach Brenner, 1988), Calcium beeinflusst die Geschwindigkeitskonstante  $f_{app}$  direkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden isometrische Kräfte an einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyten gemessen. Bei der isometrischen Kontraktion befinden sich die kraftgenerierenden und nicht-kraftgenerierenden Zustände im Gleichgewicht, dem so genannten „steady-state“. Abhängig ist die isometrische Kraft (F) vom Anteil an beteiligten Querbrücken, die sich in den kraftgenerierenden Zuständen aufhalten und kann wie folgt beschrieben werden:

$$[1] \quad F = n \cdot F_{\text{mean}} \cdot f_{\text{app}} / (f_{\text{app}} + g_{\text{app}})$$

Dabei gibt n die Zahl aller am Turnover beteiligten Querbrücken eines Halbsarkomers in der untersuchten Faser an und  $F_{\text{mean}}$  die mittlere Kraft, die eine einzelne Querbrücke im kraftgenerierenden Zustand entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass  $f_{\text{app}}$  von der freien Calciumkonzentration abhängig ist und  $g_{\text{app}}$  hingegen nicht (Brenner, 1988). Eine Calciumkonzentrationserhöhung beschleunigt  $f_{\text{app}}$  und erhöht die Kraft (F) insgesamt (Abb. 1.7). Neben einer möglichen Steigerung der mittleren Kraft pro Querbrücke kann die isometrische Kraft auch durch Erhöhung der am Querbrückenzyklus beteiligten Querbrücken (n) gesteigert werden, diese wäre durch eine vermehrte Überlappung der Filamente begünstigt. Es wird allerdings angenommen, dass sich weder n noch  $F_{\text{mean}}$  unter isometrischen Bedingungen ändert.

Ein weiterer zu untersuchender Parameter war die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{\text{tr}}$  oder  $k_{\text{redev}}$ ). Diese wurde nach einer kurzen lastfreien isotonischen Verkürzung (quick release) und einer Rückdehnung der Zellen auf die isometrischen Ausgangslänge gemessen. Hierbei geht man davon aus, dass sich beim „quick release“ die Querbrücken in den nicht-kraftgenerierenden Zuständen akkumulieren (= Null-Level). Daraus können sie mit calciumabhängiger Wahrscheinlichkeit wieder in die isometrische steady-state-Verteilung übergehen. Die beim Kraftwiederanstieg messbare Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{tr}}$  kann durch eine einfache Exponentialfunktion annähernd beschrieben werden. Dabei entspricht  $k_{\text{tr}}$  dem Kehrwert der Zeitkonstanten  $\tau$  der Exponentialbeziehung. Die Zeitkonstante  $\tau$  ist die Zeit, die eine Kardiomyozyte benötigt, um 63% ( $1-1/e = 0,632$ ) ihrer maximalen isometrischen Kraft zu generieren. Die Summe aller am Querbrückenzyklus beteiligten apparenten Geschwindigkeitskonstanten ergeben  $k_{\text{tr}}$  (Brenner und Eisenberg, 1986; Brenner, 1988).

Daher kann  $k_{\text{tr}}$  wie folgt beschrieben werden:

$$[2] \quad k_{\text{tr}} = f_{\text{app}} + g_{\text{app}}$$

Die unter [1] und [2] beschriebenen Formeln entsprechen einem „normal“ ablaufenden Querbrückenzyklus unter physiologischen Bedingungen.

Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Effekt einer erhöhten Phosphatkonzentration auf Kraft ( $F$ ) und Kraftwiederanstieg ( $k_{tr}$ ) untersucht, um eine Bedingung des ischämischen Zustandes im Herzen nachzustellen. Somit kann die Umkehrreaktion  $f_{app}^-$ , also jene Geschwindigkeitskonstante, welche bei Phosphaterhöhung beeinflusst wird, nicht länger vernachlässigt werden.

Daher gilt hier für die isometrische Kraft:

$$[3] \quad F = n \cdot F_{\text{mean}} \cdot f_{\text{app}} / (f_{\text{app}} + g_{\text{app}} + f_{\text{app}}^-)$$

Dies hat zur Folge, dass sich die isometrische Kraft mit Phosphaterhöhung und damit verbundener Erhöhung von  $f_{app}^-$  verringert (Pate und Cooke, 1989a; Tasche *et al.*, 1998). Durch die Phosphaterhöhung, die  $f_{app}^-$  beschleunigt, wird auch  $k_{tr}$  insgesamt beschleunigt (Abb. 1.7).

$$[4] \quad k_{tr} = f_{\text{app}} + g_{\text{app}} + f_{\text{app}}^- + g_{\text{app}}^-$$

### 1.3 Besonderheiten der Regulation der Kontraktion im Herzen

#### 1.3.1 Die leichten Myosinketten (MLC)

Neben der kardialen Isoform des TnC (cTnC) wird auch die mit dem Hebelarm des Myosins assoziierte MLC-2 durch den "second messenger" Calcium in ihrer Funktion moduliert. Die MLC-2 kann durch die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) phosphoryliert werden (Fearson und Perry, 1975). Die MLCK ist eine Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase und ist durch den Calciumspiegel reguliert. Die Phosphorylierung bewirkt eine negative Ladung an der MLC-2, wodurch eine Annäherung an das Aktinfilament und/oder die Phosphatfreisetzung während des Querbrückenzyklus beeinflusst wird (Sweeney *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung der MLC-2 zu einer erhöhten Calciumempfindlichkeit der Kraft führt (Morano *et al.*, 1985). Des Weiteren führt eine MLC-2-Phosphorylierung zu einem gesenkten Hill-Koeffizienten, der die Steigung einer pCa-Kraft-Kurve beschreibt (Sweeney und Stull, 1990), sowie zu einer Beschleunigung von  $k_{tr}$ . Dies scheint durch eine Erhöhung von  $f_{app}$  begründet zu sein (Sweeney und Stull, 1990; Morano, 1992, 1999; Davis *et al.*, 2002; van der Velden *et al.*, 2003a). Das bedeutet, dass bei MLC-2-Phosphorylierung der Querbrückenzyklus ( $k_{tr}$ ) insgesamt beschleunigt wird und

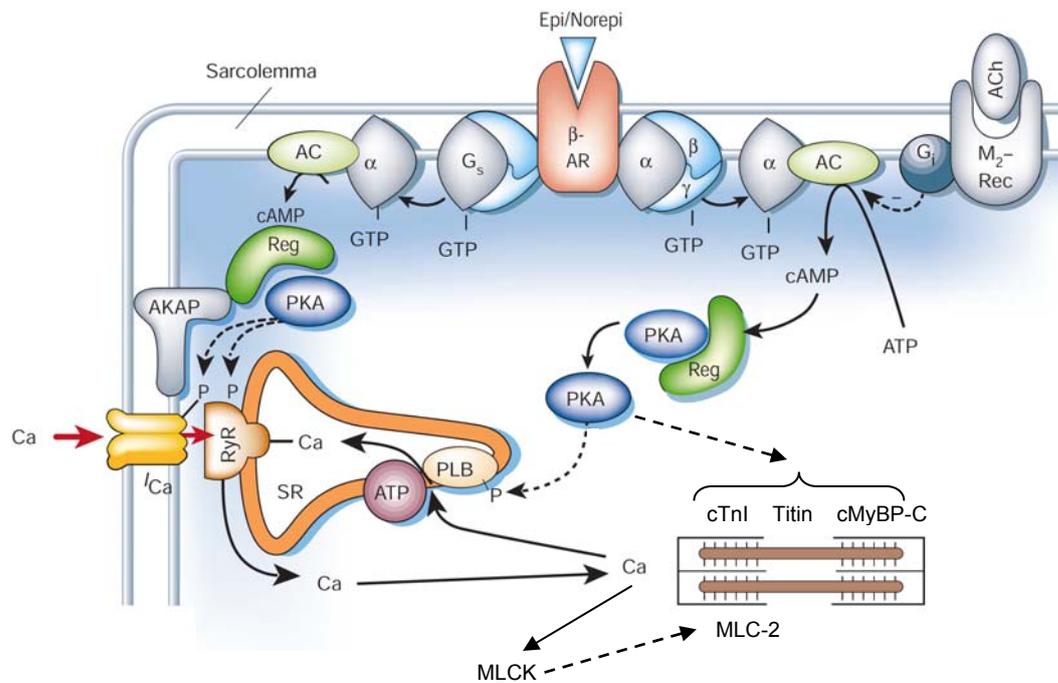
somit Calcium während der Systole nicht nur das Aktin durch Bindung an cTnC anschaltet, sondern auch die Myosinaktivität moduliert.

### 1.3.2 Feinregulation der Kontraktion im Herzen über $\beta$ -adrenerge Stimulation

Neben der Regulierung durch Calcium wird die Kraftgenerierung des Herzens außerdem über die Phosphorylierung bestimmter Proteine, ausgelöst durch die  $\beta$ -adrenerge Stimulation, moduliert und so an äußere Gegebenheiten angepasst. Diese sympathische Stimulation hat zum einen eine stärkere Kontraktion (inotroper Effekt) zur Folge und zum anderen beschleunigt sie die Relaxation (lusitroper Effekt). Ausgelöst durch das sympathische Nervensystem wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die zur Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren durch Bindung der Neurotransmitter Adrenalin bzw. Noradrenalin führt (Abb. 1.8). Diese Stimulation aktiviert ein GTP-bindendes Protein ( $G_s$ ), welches die Adenylcyclase anregt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu produzieren. Das cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits u.a. die sarkomerischen Proteine cTnI, cMyBP-C und Titin durch Phosphorylierung in ihrer Wirkung modifiziert (England, 1975; Kunst *et al.*, 2000). Die phosphorylierte Form des kardialen TnI (cTnI) zeigt eine verminderte Affinität zu den beiden anderen Tn-Untereinheiten, wodurch die Calciumaffinität von cTnC abnimmt (Reiffert *et al.*, 1998), sodass Calcium schneller vom cTnC abdissoziiert. Das heißt die Calciumempfindlichkeit wird durch Phosphorylierung von cTnI herabgesetzt (Wolff *et al.*, 1996).

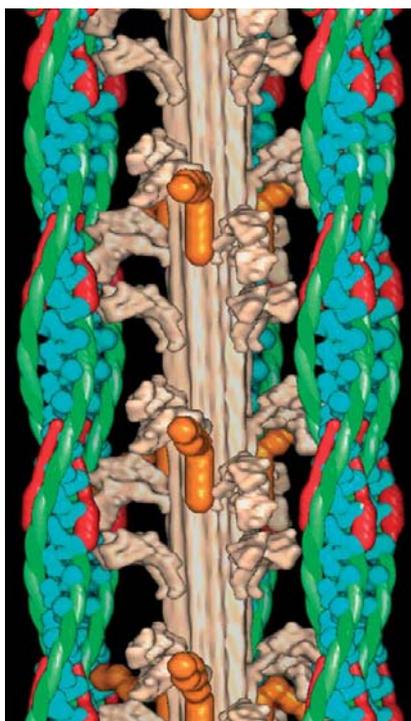
Auch Titin kann durch die PKA phosphoryliert werden. Im Herz kommen die Titin-Isoformen N2B (kurz, steif) und N2BA (lang, nachgebend) vor. Durch Phosphorylierung des N2B Elementes mittels PKA können die passiven Kräfte im Herzen moduliert werden (Kruger und Linke, 2006). Es wurde gezeigt, dass durch die Phosphorylierung des Titins die passive Kraft (Rückstellkräfte) reduziert wird (Granzier und Labeit, 2004). Hervorgerufen wird dies durch eine Verlängerung des herzspezifischen N2B Elements (steifes Element) im Titin (Yamasaki *et al.*, 2002). Somit kann Titin die Diastole modulieren, indem die Reduktion der passiven Kraft durch Phosphorylierung eine vollständigere Füllungsphase bewirkt (Granzier und Labeit, 2004).

Ein weiteres Protein, dessen PKA-vermittelte Phosphorylierung die Kontraktilität modulieren kann, ist die kardiale Isoform des MyBP-C (cMyBP-C) (McClellan *et al.*, 2001). Hier erfolgt die Modulation möglicherweise über eine strukturelle Änderung am dicken Filament (Abb. 1.9). Es wird derzeit angenommen, dass durch die Phosphorylierung von cMyBP-C die Flexibilität des Myosinkopfes erhöht wird, da die inhibierende Interaktion zwischen cMyBP-C und der S2 Region des Myosins aufgehoben wird (Kunst *et al.*, 2000).



**Abb.1.8: Schematische Darstellung der  $\beta$ -adrenergen Stimulation und die daraus resultierende Aktivierung der cAMP abhängigen PKA und der Phosphorylierung ihrer Zielproteine.** (modifiziert nach Bers, 2002).

AC: Adenylcyclase; Ach: Acetylcholin; AKAP: PKA Ankerprotein;  
 $\beta$ -AR:  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren; M<sub>2</sub>: muskarine Rezeptoren; PLB: Phospholamban;  
 Reg: regulatorischen Untereinheit der PKA; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum; MLCK: Myosin-Leichte-Ketten-Kinase; MLC-2: regulatorische Myosin leichte Kette; cTnI: kardiales Troponin I; cMyBP-C: kardiales Myosin-bindendes Protein C



**Abb. 1.9 Simulierte Darstellung interagierender Proteine einer A-Band-Region aus dem Skelettmuskel.**

aus Squire *et al.* (2004)

Basierend auf Röntgendiffraktions-Experimenten am Skelettmuskel der Scholde wurde diese Modell des Myosinfilaments umgeben von Aktinfilamenten simuliert. Entlang des Myosinfilaments befindet sich das MyBP-C, dessen N-terminale Region an das Aktinfilament bindet.

braun: Myosinfilament

blau: Aktinfilament

grün: Tropomyosin

rot: Troponinkomplex

orange: MyBP-C

Diese, durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation verursachte Phosphorylierungswelle durch PKA, bedarf einer entsprechenden Gegenregulation, um das Herz wieder in seinen „Normalzustand“ zu überführen. Dafür sorgen Phosphatasen (u.a. PP1, PP2A), die zur gezielten Dephosphorylierung, der oben beschriebenen Proteine führen.

## 1.4 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom mit unterschiedlicher Ätiologie. Allgemein definiert sich eine Herzinsuffizienz als eine eingeschränkte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer nachweisbaren kardialen Funktionsstörung (Def. nach WHO), dabei ist das Herz nicht in der Lage den Körper seinem Bedarf entsprechend mit genügend Blut zu versorgen (Hunt *et al.*, 2001). Die New York Heart Association (NYHA) schlug eine Einteilung nach Schweregrad vor, sodass man heute vier verschiedene Klassen, von beschwerdefrei bis hin zu Beschwerden im Ruhezustand (gar keine Belastung möglich), unterscheidet (NYHA I-IV). Meist ist eine Herzinsuffizienz ein Folgezustand verschiedener Grunderkrankungen. Besonders die arterielle Hypertonie und die koronaren Herzerkrankungen bilden mit 90% die häufigsten Ursachen (Parmley, 1985; Smith, 1985). Bei der Ätiologie unterscheidet man die ischämische (ICM) von der dilativen Kardiomyopathie (DCM), wobei die ICM mit ca. 70% die häufigste Kardiomyopathieform darstellt. Auch die „Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie“ (HCM) kann zur Herzinsuffizienz führen.

### 1.4.1 Veränderung sarkomerischer Proteine im insuffizienten Herzen

Die Aktivität des sympathischen Nervensystems ist bei Herzinsuffizienz gesteigert, was z.B. an einem erhöhten Noradrenalin-Spiegel erkennbar ist (Thomas und Marks, 1978). Gründe hierfür liegen zum einen in einer gesteigerten neuronalen Katecholamin-Freisetzung, sowie in einer reduzierten Wiederaufnahme von Noradrenalin in periphere Nervenendigungen (Esler *et al.*, 1997). Kompensatorisch reagiert das insuffiziente Herz mit einer Reduktion der Dichte sowie der Sensitivität von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (Bristow *et al.*, 1982; Brodde *et al.*, 1995). Die Desensibilisierung der  $\beta$ -adrenergen Stimulation und die damit einhergehende Veränderung der PKA-Aktivität resultiert auch in einer veränderten Phosphorylierung sarkomerischer Proteine. So ist z.B. die Phosphorylierung von cTnI herabgesetzt, was mit einer erhöhten Calciumempfindlichkeit einhergeht (van der Velden *et al.*, 2003b).

Auch das PKA-Zielprotein Titin weist eine reduzierte Phosphorylierung auf, was in vielen Fällen zu einer hohen diastolischen Steifheit sowie erhöhten passiven Kraft führt (Borbely *et al.*, 2009). Zusätzlich kommt es im insuffizienten Herz zu einem Isoformshift von N2BA (nachgebend) nach N2B (steif), dies hat ebenfalls eine Erhöhung der passiven Kraft zur Folge (Borbely *et al.*, 2009).

Auch die MLC-2 liegt bei Herzinsuffizienz vermindert phosphoryliert vor. Grund hierfür ist vermutlich, dass die MLC-2 mittels PP-1 dephosphoryliert wird. Die PP1-Aktivität wird durch PKA beeinflusst und ist bei Herzinsuffizienz erhöht (Neumann *et al.*, 1997; van der Velden *et al.*, 2003a; van der Velden *et al.*, 2003b). So könnte die  $\beta$ -adrenerge Desensibilisierung auch Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von MLC-2 nehmen.

Um den Querbrückenzyklus in den Kardiomyozyten und seine Veränderung bei Herzinsuffizienz bzw. bei erhöhter Phosphatkonzentration in einem möglichst genau definierten System untersuchen zu können, wurden für die vorliegende Arbeit chemisch permeabilisierte („skinned“) Kardiomyozyten verwendet. In diesem System werden die löslichen Proteine und das Zytoplasma der Kardiomyozyten entfernt, der gesamte kontraktile Apparat und seine gebunden Enzyme (CPK) bleiben erhalten. Somit kann in den permeabilisierten Zellen über das Inkubationsmedium beispielsweise ATP und Calcium kontrolliert werden. Durch Inkubation mit Kinasen oder Phosphatasen kann der Phosphorylierungsstatus der Proteine beeinflusst werden. Damit ist es möglich, mit dieser Methode gezielt Veränderungen an der Endstrecke der Signalkaskaden, dem kontraktilen Apparat z.B. bei Herzinsuffizienz zu untersuchen und ihre Folgen für den Querbrückenzyklus zu charakterisieren. Auch können Stellglieder des Querbrückenzyklus (wie Phosphat) variiert werden, um so mehr über dessen Kinetik zu erfahren, was unter anderem Ziel dieser Arbeit war.

## 1.5 Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war die vergleichende, funktionelle Charakterisierung von Kardiomyozyten aus Donormyokard (Kontrolle) sowie aus Herzinsuffizienzmyokard. Dabei waren die Auswirkungen einer Phosphatzugabe auf die isometrische Kraft und die Querbrückenkinetik im Herzmuskel von besonderem Interesse.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

### 1. Ziel (ausführliche Abhandlung siehe Methodenteil):

Etablierung eines Systems zur Messung funktioneller Parameter (isometrische Kraft, passive Kraft, Calciumempfindlichkeit, Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs) an einzelnen, permeabilisierten Kardiomyozyten aus humanem Myokard. Erreicht werden sollte:

- a) eine reproduzierbare, stabile Befestigung der Zellen an Kraftaufnehmer und Längengeber
- b) die Programmierung von Messprotokollen zur Erhaltung der Zellstruktur für die Sarkomerlängenbestimmung und zur Reduktion des Kraftverlustes bei Aktivierungen mit Calcium

### 2. Ziel:

Die Untersuchung der Calciumempfindlichkeit und Phosphatabhängigkeit funktioneller Parameter gemessen in Donor-Kardiomyozyten.

- a) Welchen Effekt haben verschiedene Calciumkonzentrationen auf die isometrische Kraft ?
- b) Welchen Effekt zeigt eine Phosphatzugabe auf isometrische Kraftmessungen bei verschiedenen Calciumkonzentrationen?
- c) Welche Auswirkungen hat eine Phosphatzugabe auf die Calciumempfindlichkeit?
- d) Ist die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs calciumabhängig?
- e) Ist die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs phosphatabhängig?

3. Ziel:

Charakterisierung von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard im Vergleich zu Donor-Kardiomyozyten.

- a) Wie unterscheidet sich der Phosphorylierungsstatus von kardialem Troponin (cTnI), kardialem Myosin-bindenden Protein C (cMyBP-C) und der leichten Myosin-Kette (MLC-2) aus den Myokardgeweben von Donor- und Herzinsuffizienzproben?
- b) Gibt es einen Unterschied in der isometrischen Kraft von Kardiomyozyten aus Donor und aus insuffizientem Herz?
- c) Besteht ein Unterschied in der Calciumempfindlichkeit zwischen Kardiomyozyten aus Donormyokard und aus insuffizientem Herz?
- d) Ist die passive Kraft in Kardiomyozyten aus Herzinsuffizienzmyokard verändert verglichen zum Donormyokard?

4. Ziel:

Die Untersuchung der Phosphatabhängigkeit funktioneller Parameter von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard.

- a) Welche Auswirkung hat eine Phosphatzugabe auf die isometrische Kraft bei verschiedenen Calciumkonzentrationen?
- b) Welche Auswirkung zeigt eine Phosphatzugabe auf die Calciumempfindlichkeit?
- c) Hat eine Phosphatzugabe einen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs?
- d) Wie unterscheidet sich die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs von Kardiomyozyten aus Donormyokard und aus insuffizientem Myokard mit und ohne Phosphatzugabe?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	J.T.Baker
Acetonitril	Baker
Acryl / Bisayl	Roth
Acryl/Bis/PDA	Roth
Adenosintriophosphat	Sigma
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)	AppliChem
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
Bench Ladder	Invitrogen
Bromphenolblau	Merck
2,3-Butandion Monoxim (BDM)	Sigma
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1- propane sulfonate (CHAPS)	Sigma
Coffein	Sigma
Color-Marker (für ProQ-Färbung)	Biorad
Coomassie	Pierce
Diammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
di-Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethanol	Büfa Chemikalien / Merck 642
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
flüssiger Stickstoff	Linde
Glycerol	Sigma
Glycin	Merck
Imidazol	Merck
Isopropanol	Baker
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Fluka
Kaliumhydroxid	Merck

Calciumchlorid	Sigma
Calciumkarbonat	Merck
katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA <sub>cat</sub> )	Sigma
Kreatinphosphat (CrP)	Sigma
Leupeptin	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma
Methanol (MeOH)	Baker
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES)	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natrium-Adenosintriphosphat (NaATP)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma I4509 oder Serva bei 2D
Natriumhydroxid/Kalilauge	Merck
NuPage Invitrogen Antioxidans	Invitrogen
Peppermint stick	Invitrogen
Pepstatin A	Sigma
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA
Phosphatase Inhibitoren Cocktail	Sigma
Propionsäure (Prop)	Sigma
ProQ destain	P33310 Invitrogen
ProQ stain	P33300, Invitrogen
Roti Load (RL1)	Roth
Salpetersäure	J.T.Baker
Salzsäure (HCl)	Merck
Sucrose Phosphorylase (SP)	Sigma
Sypro Stain	S12001, Invitrogen
ThioUrea	GE Healthcare
Titriplex EGTA	Merck
trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-guanidino) Butane (E64)	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Trizma base	Sigma T1503
Urea	Biomol
Triton X-100	Roche

IPG Buffer (pH 4.5-5.5 und 4-7)	GE Healthcare
Essigsäure Acetat-Puffer (HAc) (99%)	Baker
Criterion Gel (4-15%)	Biorad
IEF-Strip 18 cm (pH 4.5-5.5)	GE Healthcare
Norland Optical Adhesive 63 (Noa63)	APM Technica

## 2.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterial

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Biofuge Primo R	Hereaus/ Thermo
CCD Kamera	Imperx VGA-210
Criterion Cell (1D)-Gelapparatur	BioRad
Cryomörser	Eigenbau
Deckgläser	Menzel-Gläser
Digital Controller 604C A/C	Aurora Scientific Inc.
Feinwaage	Sartorius
Geldokumentation	BioStep
Geltrocknungsapparatur	BioRad
Heizblock	BioBlock Scientific
HighSpeed Length Controller	Aurora Scientific Inc.
IPGphore III	GE Healthcare
IRW16 basic Rührwerk	IKA
Kraftaufnehmer (Sensor AE 801)	HJK Sensoren + Systeme GmbH & Co.
Lad Cups	Biozym
Längengeber	Aurora Scientific Inc.
LED-Power-PEN	honle UV technology/Panacol
Lyophylle	Christ RVC2-18/CT02-50
Micro-Zentrifuge	Roth
Mikromanipulator	Sutter Instruments
Mikroskop	Zeiss, Axiovert 135 TV
Mikrowaage	Mettler M5SA
Mikrowelle	Sharp
Objektträger	Menzel-Gläser
optischer Tisch	Linos TMC
pH-Meter	Knick 763
Potter	Sartorius Potter S

Powersupply EPS 3500 XL	GE Healthcare
Protean II Apparatur (2D)	BioRad
Schüttler KS125 basic	IKA
Typhoon 9400	GE Healthcare
Ultraschallbad	Brander
Vortexer	NeoLab 7-2020
Wasserbad	Haake
Wasserstrahlpumpe / Water Jet	JP über Fisher Bioblock Scientific
Zentrifuge 5410C	Eppendorf

### 2.1.3. Software

#### Software

Argus X1  
Calcium DOS  
Control Program Version 1.54 (ASI)  
HighSpeed Video Sarcomere Length  
Program Version 1.53 (HVSL)  
Image J  
  
Labview 7.1  
Origin 7.0  
Totallab TL100

#### Hersteller

BioStep  
DOSBox Team  
Aurora Scientific Inc. (ASI Model 600A)  
Aurora Scientific Inc. (ASI Model 901A)  
  
Wayne Rasband, National Institute of  
Health, USA  
National Instruments  
OriginLab Corporation  
Nonlinear dynamics

## 2.1.4 Myokardgewebe des Menschen und der Ratte

Spezies	Eigenschaften
Mensch – biventrikuläre Herzinsuffizienz (linksventrikuläres Herzmuskelgewebe)	80 Jahre alt männlich
Mensch – Donor (linksventrikuläres Herzmuskelgewebe)	72 Jahre alt, gesund männlich Todesursache: zerebrale Blutung
Ratte – SPRD (linker Ventrikel) Anbieter Charles River	ca. 8 Monate alt weiblich

### Herkunft der Proben

Die humanen Gewebeproben stammten aus unseren Kollaborationen mit anderen Kliniken. Es handelte sich um Resektionsmaterial bzw. um nicht-transplantiertes Donormyokard. Die Verwendung des Gewebes erfolgte vollständig anonymisiert, eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) liegt vor (Nr. 507).

Das hier verwendete Rattenmyokard stammt von Ratten nach Tötung zur Organentnahme. Diese „Tötung zur Organentnahme nach §4 des Tierschutzgesetzes“ war von uns zuvor beim Tierschutzbeauftragten der MHH angezeigt worden.

## 2.1.5 Herstellung von Lösungen

### 2.1.5.1 Lösungen und Puffer

#### 1D Sample Buffer (Lagerung bei -80 °C):

- 15 % Glycerol (99%)
- 1 % SDS
- 62.5 mM Tris base (pH: 6,8; 20 °C)
- 0.001 % Bromphenolblau
- ddH<sub>2</sub>O

2D Puffer = Rehydrationspuffer (Lagerung bei -20 °C):

7 M Urea  
2 M ThioUrea  
2 % CHAPS  
10 % Glycerol  
10 % 2-Propanol  
0.001 % Bromphenolblau  
ddH<sub>2</sub>O

Trenngel für 2-D-Gele (11cm)

0.11 % SDS (10%)  
750 mM Tris base (3M; pH = 9.3)  
10 % Glycerol (99%)  
9.6 % Acryl/Bis/PDA (29.2% : 0.8%)  
0.03 % APS (10%)  
0.15 % TEMED (99%)  
ddH<sub>2</sub>O

Polymerisationszeit: 2 h

Sammelgel für 2-D-Gele

29.8 % Glycerol (99%)  
125 mM Tris (0.5 M; pH = 6.8)  
0.1 % SDS (10%)  
4 % Acryl/Bisayl (29.2% : 0.8%)  
0.04 % APS  
0.21 % TEMED (99%)  
ddH<sub>2</sub>O

Polymerisationszeit: 2 h

Equilibrierungslösung für IEF-Strips

50 mM Tris (pH: 8.8 RT)  
6 M Urea  
29.7 % Glycerol  
4 % SDS  
0.003 % Bromphenolblau

Laufpuffer (1-fach) für Criteriongel (Kathodenpuffer)

192 mM Glycin Merck  
25 mM Trizma base  
0.1 % SDS

Laufpuffer (2-fach) für 2-D-Gele (Kathodenpuffer)

380 mM Glycin  
50 mM Trizma base  
0.2 % SDS

Zusammensetzung der Permeabilisierungs-Lösung ( $\mu=198.47$  mM; pH=7.1 mit KOH):

5.95 mM Na<sub>2</sub>ATP  
6.04 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 mM EGTA  
139.6 mM KCl  
10 mM Imidazol

Inhibitoren-Stocklösung (= InhMix)

1 mg/ml Aprotinin  
10 mM Antipain  
10 mM E64  
100 mM AEBSF  
10 mM Leupeptin

### 2.1.5.2 Zusammensetzung der Messlösungen

Es wurden zunächst Relaxations- bzw. Aktivierungslösungen ohne und mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen, die jeweils eine bestimmte Ionenstärke ( $\mu$ ) aufwiesen, hergestellt. Sie setzten sich folgendermaßen zusammen:

#### Relaxationslösungen:

Relax (pCa 9.0),  $\mu=177.78$  mM; ohne Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.89	17.67
MgCl <sub>2</sub>	6.48	19.44
Kprop	40.76	40.76
BES	100	50
EGTA	6.97	20.91
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	0

Relax (pCa 9.0),  $\mu=177.78$  mM; 1mM Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.89	17.67
MgCl <sub>2</sub>	6.48	19.44
Kprop	38.76	38.76
BES	100	50
EGTA	6.97	20.91
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	2

Relax (pCa 9.0),  $\mu=177.78$  mM; 3mM Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.89	17.67
MgCl <sub>2</sub>	6.48	19.44
Kprop	34.76	34.76
BES	100	50
EGTA	6.97	20.91
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	6

Relax (pCa 9.0),  $\mu=177.78$  mM; 5mM Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.89	17.67
MgCl <sub>2</sub>	6.48	19.44
Kprop	30.76	30.76
BES	100	50
EGTA	6.97	20.91
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	10

Relax (pCa 9.0),  $\mu=177.78$  mM; 10mM Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.89	17.67
MgCl <sub>2</sub>	6.48	19.44
Kprop	20.76	20.76
BES	100	50
EGTA	6.97	20.91
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	20

Der pH wurde auf 7.1 für Lösungen zur Messung an Ratten-Kardiomyozyten bei 5 °C und für humane Kardiomyozyten bei 15 °C eingestellt. Sämtliche Zusätze wurden mit dem Programm "Calcium" (Fohr *et al.*, 1993) (in DOS) berechnet.

**Aktivierungslösungen:**Aktivierung (pCa 4.5),  $\mu=177.39$ ; ohne Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.97	17.91
MgCl <sub>2</sub>	6.28	18.84
Kprop	40.64	40.64
BES	100	50
CaEGTA	7	21
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	0

Aktivierung (pCa 4.5),  $\mu=177.39$ ; 1mM Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.97	17.91
MgCl <sub>2</sub>	6.28	18.84
Kprop	38.64	38.64
BES	100	50
CaEGTA	7	21
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	2

Aktivierung (pCa 4.5),  $\mu=177.39$ ; 3mM Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.97	17.91
MgCl <sub>2</sub>	6.28	18.84
Kprop	34.64	34.64
BES	100	50
CaEGTA	7	21
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	6

Aktivierung (pCa 4.5),  $\mu=177.39$ ; 5mM Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.97	17.91
MgCl <sub>2</sub>	6.28	18.84
Kprop	30.64	30.64
BES	100	50
CaEGTA	7	21
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	10

Aktivierung (pCa 4.5),  $\mu=177.39$ ; 10mM Phosphat

	Konzentration [mmol/L]	Ionenstärke-Beitrag [mM]
Na <sub>2</sub> ATP	5.97	17.91
MgCl <sub>2</sub>	6.28	18.84
Kprop	20.64	20.64
BES	100	50
CaEGTA	7	21
CrP	14.5	29
Coffein	10	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	20

Der pH wurde auf 7.1 für Lösungen zur Messung an Ratten-Kardiomyozyten bei 5 °C und für humane Kardiomyozyten bei 15 °C eingestellt. Sämtliche Zusätze wurden mit dem Programm "Calcium" (Fohr *et al.*, 1993) (in DOS) berechnet.

Um für alle Phosphatkonzentrationen, Lösungen mit verschiedenen pCa-Werten (= negativer dekadischer Logarithmus der Calciumkonzentration) zu generieren, wurde jeweils für jede Phosphatkonzentration die oben beschriebene Relaxationslösung und die entsprechende Aktivierungslösung in einem bestimmten Verhältnis gemischt. Die Mischungsverhältnisse wurden nach Fabiato (1988) berechnet. Hier ist am Beispiel von 15 ml Endlösung das Mischungsverhältnis pro pCa-Wert aufgelistet:

Mischungsverhältnis für jede Calciumkonzentration (pCa)

Freies $[Ca^{2+}]$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]	pCa	Relax [ml]	Aktiv [ml]
31.502	4.5	0	15
9.981	5.0	0.32	14.68
6.291	5.2	0.56	14.44
3.972	5.4	0.92	14.08
2.506	5.6	1.44	13.56
1.581	5.8	2.19	12.81
0.998	6.0	3.19	11.81
0.630	6.2	4.5	10.5
0.001	9.0	15	0

Zum Schluss wurde sämtlichen Lösungen mit pCa 4.5 noch 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  extra zugesetzt, um volle Aktivierung zu sichern. Dadurch erhöhte sich die tatsächliche Calciumkonzentration auf 46.657  $\mu\text{mol/L}$  (pCa 4.33).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bestimmung der Phosphorylierung sarkomerischer Proteine durch die eindimensionale Gelelektrophorese

#### 2.2.1.1 Aufbereitung von Proben für die eindimensionale Gelelektrophorese

Nachdem ein Teil einer Herzprobe (linker Ventrikel) in flüssigem Stickstoff mit einem Cryomörser pulverisiert wurde, erfolgte die Zugabe von 2 ml Aceton + 10% TCA. Dann folgte eine schrittweise Erwärmung (20 min bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ; 20 min bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ; 20 min bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ; 20 min bei RT). Zwischen diesen Schritten wurde die Probe gemischt, um ein gleichmäßiges Ergebnis zu gewährleisten. Nach Zentrifugation (10 min, 10000 xg,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) der Probe wurde der Überstand verworfen und 2 ml Aceton + 2% DTT zugeben. Dann wurde die Probe 5 min geschüttelt und erneut zentrifugiert (10 min, 10000 xg,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Der Schritt ab Acetonzugabe wurde insgesamt viermal wiederholt, um eine völliges Entfernen von TCA zu garantieren, da dieses störend auf die Gelelektrophorese wirkt. Zuletzt wurde die Probe in einer Lyophylle (10 min) getrocknet (= Acetonpulver) und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingelagert. Die gesamte Prozedur dient der Erhaltung von Phosphatgruppen an den Proteinen. Für den weiteren Aufschluss wurde eine Probe des Acetonpulvers (ca. 0.5-1 mg) mittels einer Mikrowaage abgewogen. Dabei ist

es von großer Bedeutung die Probe stets kalt (-80 °C) zu halten bis die Zugabe von 1D-Sample Buffer erfolgt. Die Probe wurde auf eine Konzentration von 20 µg/µl vorverdünnt indem man die entsprechende Menge an 1D-Sample Buffer mit Zusätzen (1 ml 1D-Sample Buffer + 10 µl Inh. Mix + 10 µl Phosphatase Inh. Cocktail) dazu gab. Anschließend wurde diese Probe mittels GE Grinding Kit (nur Mörser) gemörsert in 1.5 ml Lad Cups mit einem IKA Rührwerk RW16 basis für ca. 2-5 min bei ca. 1000 rpm bei Raumtemperatur (RT) zerkleinert. Danach wurde die Probe für 15 min im Ultraschallbad (RT) aufgeschlossen und zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT). Der Überstand wurde portioniert und bis zur Benutzung bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.2.1.2 ProQ-Färbung und SyproRuby-Färbung

Mit dieser Methode können Phosphatgruppen der Proteine angefärbt (ProQ-Färbung) werden und durch Vergleich der Färbeintensität mit der nachfolgenden Proteinfärbung (SyproRuby-Färbung) der Phosphorylierungsstatus der Proteine abgeschätzt werden. Es erfolgt zunächst die Entfernung des Kamms aus dem kommerziell erworbenen Criterion Precast Gel, einem Gradientengel (4-15%, Tris-HCl). Die Reproduzierbarkeit dieser Gele ist deutlich besser im Vergleich zu selbst hergestellten Gelen. Nach dem Spülen der Taschen mit Laufpuffer, konnten nun die Proben aufgetragen werden. Es wurde 25-50 µg Protein aufgetragen. Außerdem 1 µl Peppermint stick ((2 µl + 6 µl Roti Load 1), einem Standard zur Bestimmung des Molekulargewichts und der Normierung des Gels, sowie 4 µl Color-Marker (Standard für ProQ Färbung) und 4 µl Bench Ladder (für SyproRuby Färbung).

Die Laufzeit in der Criterion-Gelkammer betrug zunächst 20 min bei 100 V konst. und anschließend 60 min bei 200 V konst. , bei 4 °C, wobei die Lauffront mit Hilfe des Color-Markers kontrolliert wurde (Laufpuffer 1-fach). Die Fixierung und Färbung erfolgte in Dunkelheit in 50% MeOH + 10% HAc, über Nacht (20h) auf dem Schüttler bei RT. Nach dreimaligem Waschen (à 10 min) des Gels mit H<sub>2</sub>O, wurde für eine Stunde mit 80 ml ProQ stain gefärbt. Dieser Farbstoff färbt spezifisch phosphorylierte Proteine an. Dann wurde das Gel mit 100 ml ProQ destain (Acetonitril und Natriumacetat) in drei Schritten à 30 min wieder entfärbt. Im Typhoon 9400 (lasergestütztes Fluoreszenzdetektions-Geldokumentationssystem) wurde dann eine Aufnahme bei 532nm (560 nm LP-Filter, 500-700 PMT, Counts zw. 20000-80000) gemacht, um so die Banden mit den phosphorylierten Proteinen sichtbar zu machen. Nach 2-maligem Waschen für je 10 min erfolgte dann die SyproRuby-Färbung aller Proteine mittels 100 ml Sypro Stain (20-24 h; Endpunktfärbung) in Dunkelheit unter Schütteln bei RT. Im Anschluss daran wurde für 30 min in 10% MeOH und 7% HAc (100 ml) unter Schütteln bei RT in Dunkelheit entfärbt. Im Typhoon 9400 wurde

dann eine Aufnahme bei 457nm (560 nm LP-Filter, 500 – 700 PMT, Counts zw. 20.000 – 80.000) gemacht, um so sämtliche im Gel befindlichen Proteine sichtbar zu machen. Die Empfindlichkeit von SyproRuby liegt bei 2-2000 ng und ist somit gleichwertig mit Silberfärbung. Allerdings ist SyproRuby über drei Größenordnungen linear.

### **2.2.1.3 Auswertung von eindimensionalen Gelen**

Die Auswertung der Banden erfolgte mittels Totallab TL100 (1D-Gel Analysis). Die Basislinie wurde per Hand abgezogen (Vorlage Rollingball 103 Einstellung). Dann erfolgte die weitere Datenausgabe von OD's und Rf (Position der Probe auf dem Gel Lauffront) ohne Hintergrund. Zunächst wurde die 45 kDa Bande des Standards (Peppermintstick) bei ProQ- und SyproRuby-Färbung ausgewertet. Dies erfolgte immer als Doppelbestimmung, woraus dann der Mittelwert gebildet wurde. Der Quotient ProQ / SyproRuby des Standards ergab dann einen Faktor zur Korrektur der Gele untereinander, um eine mögliche unterschiedliche ProQ-Färbungen (die Phosphatgruppen-Färbelösung ist relativ instabil) verschiedener Gele auszugleichen. Die Protein-Banden der Proben im ProQ gefärbten Gel wurden dann je als OD-Wert ausgewertet und durch den oben ermittelten Korrekturfaktor (Peppermintstick) geteilt. Die SyproRuby-Werte blieben unverändert, da es sich hierbei um eine Endpunkt-Färbung handelte. Zuletzt wurde für jede phosphorylierte Proteinbande der Quotient aus ProQ-Intensität-korrigiert / SyproRuby-Intensität gebildet, welcher als „arbitrary units“ (a.u.) angegeben wird.

### **2.2.2 Bestimmung der Phosphorylierung sarkomerischer Proteinisoformen durch die zweidimensionale Gelelektrophorese**

Diese Methode der 2D-Gelelektrophorese dient der Charakterisierung der Phosphorylierungszustände der Myosin-Leichten Kette (MLC-2)-Isoformen.

#### **2.2.2.1 Aufbereitung von Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese**

Die Proben wurden in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Cryomörser zerkleinert, bevor die Zugabe von 2 ml Aceton + 10% TCA erfolgte. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie für die 1D-Gelelektrophorese beschrieben (Kapitel 2.2.1.1).

Nach dem Einwiegen der aufgearbeiteten Probe (ca. 1-2 mg) wurde diese mit 1D-Sample Buffer versetzt, sodass eine Konzentration von 20 µg/µl entstand. Dann folgte das Mörsern

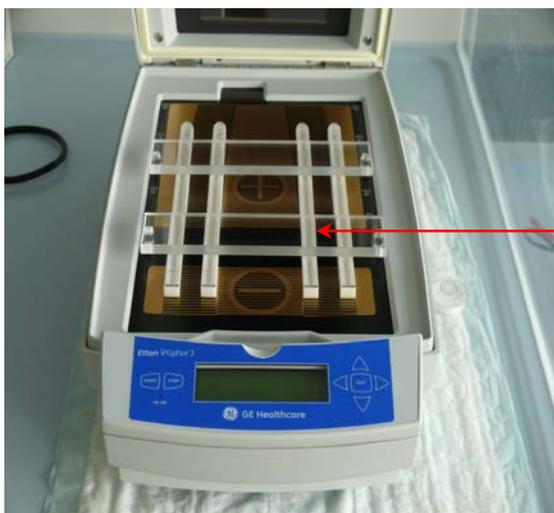
dieses Gemisches mit dem IKA Rührwerk (1000 rpm) für ca. 2-5 min in Lad Gefäßen bei RT. Nach einem 15-minutigen Ultraschallbad wurde die Probe bei 14000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde portioniert und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Im ersten Schritt werden die Proben bei dieser Methode nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt (Isoelektrische Fokussierung = IEF) (O'Farrell, 1975). Dabei werden künstliche Ampholyte verwendet, die sich mit ihrem positiven und negativen Pol in einem elektrischen Feld ausrichten, wodurch sie einen pH-Gradienten aufbauen. Das zu analysierende Protein wird sich dann entsprechend seines isoelektrischen Punkts darin bewegen.

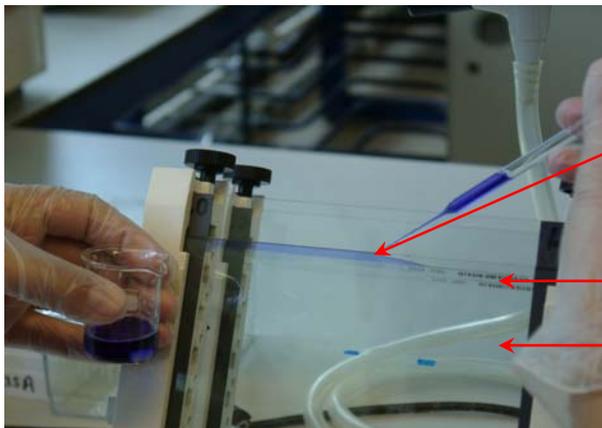
In einem zweiten Schritt erfolgte dann die Auftrennung nach Molekulargewicht.

- 1) Es wurden dafür 40-50 µl einer aufgearbeiteten Probe (= 800 – 1000 µg) mit 1D-Sample Buffer + 350 µl Rehydrationspuffer + 10 µl IPG-Puffer (pH = 4.5-5.5) + 2% DTT gemischt. Dieses Gemisch wurde in ein Porzellanschiffchen überführt in welches der IEF-Strip anschließend eingelegt wurde. Das saure Ende (pH = 4.5) des IEF-Strips wurde zur Anode ausgerichtet. Der IEF-Strip wurde dann mit einem Cover Fluid (1 ml) überschichtet, um ein Austrocknen der Probe zu vermeiden. Zum Abschluss wurde ein Deckel auf das Schiffchen gelegt und das Programm des IPGphore III GE gestartet. Es erfolgt eine 14 h Rehydration bei 20 °C zum Quellen der IEF-Strips. Dann folgte die Auftrennung. Das Programm sieht dabei vor, dass die Spannung stufenweise auf 8000V (bis 75000 Vh) erhöht wird, jeder IEF-Strip hat dann eine Stromstärke von maximal 50 µA (ca. 1.5-0.8 W). Das Trenn-Programm läuft insgesamt 9 h 22 min.



Porzellanschiffchen mit darin befindlichem IEF-Strip; überschichtet mit Cover Fluid

- 2) Nach Beendigung der Auftrennung wurde der IEF-Strip in 10 ml Equilibrierungslösung mit 4% SDS + 100 mg DTT für 30 min bei RT geschüttelt und anschließend auf das zuvor fertig gestellte 2D-Gel Sammelgel (Sammelgel und Trenngel) mittig ausgerichtet und vorsichtig aufgedrückt. Dies wurde dann mit Agarose (35 mg + 10 ml Kathodenpuffer) überschichtet und so fixiert. Dann wird das Gel in die Apparatur eingesetzt, und die Apparatur mit 2-fach Laufpuffer + 500 µl NuPage Invitrogen Antioxidans aufgefüllt. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 15 °C für 1 h bei konstant 100V (bis 30 mA, 10 W) und dann für 4 h bei konstant 70 mA (bis 500 V, 30 W). Anschließend wurde das Gel mit 40% MeOH + 10% HAc für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt, um es so zu fixieren.



Überschichten mit  
Agarose

IEF-Strip

SDS-Gel

Zuletzt wurde das Gel nach einmaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O mit 100 ml kolloidalem Coomassie (unverdünnt) für 1 h bei RT unter Schütteln gefärbt. Das Entfärben erfolgte für 24 h in Wasser bei RT. Danach wurde das Gel fotografiert (Argus X1 System) und mit Totallab TL100 (Analysis Toolbox) ausgewertet. Zum Schluss wurde das Gel zur weiteren Lagerung getrocknet. Dafür wurde es in 35% Ethanol + 10% Glycerol für 45 min bei RT geschüttelt und für 1.5 h in einer speziellen Trocknungsapparatur getrocknet.

### 2.2.2.3 Auswertung von zweidimensionalen Gelen

Die Auswertung der Protein-Dots erfolgte mittels Totallab TL100. Die Protein-Dots (MLC-2 hat im gesunden Herzen 4 dots) wurden mit Hilfe des Programms umkreist (Lasso-Funktion) und die Intensität (OD) bestimmt. Eine Kopie des Auswahlbereichs wurde in den Hintergrund gelegt und die Hintergrundintensität bestimmt. Nach Hintergrund-Subtraktion werden die Intensitäten der MLC-2-dots addiert und entsprechen 100% MLC-2. Dann wurden die Einzelanteile für jeden MLC-2 Dot berechnet. Zuletzt wurden die Prozentanteile für die unphosphorylierten Isoformen MLC-2 und MLC-2\*, sowie für die phosphorylierten MLC-2P und MLC-2\*P errechnet.

### 2.2.3 Aufbau der Apparatur zur Messung isometrischer Kräfte an einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyten

In Abbildung 2.1 ist die Messapparatur dargestellt. Sie ist auf einen schwingungsgedämpften Tisch montiert, um Störungen durch Vibrationen von Geräten und Gebäudeschwingungen zu reduzieren. Das Mikroskop, mit eingebautem Längengeber und Kraftaufnehmer, ist zusätzlich von einer Schutzhaube umgeben, um störende Luftströmungen zu inhibieren. Am Mikroskop wurde der Objektisch so modifiziert, dass einzelne Vertiefungen (Messkammern) für die Messlösungen vorhanden waren. Für jede Messung wurden definierte Lösungsvolumina verwendet. Die Messkammern wurden über angeschlossene Wasserbäder temperiert, so dass die Messungen bei konstanten Temperaturen ( $\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durchgeführt werden konnten (humane Kardiomyozyten,  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Ratten-Kardiomyozyten,  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Um zu gewährleisten, dass sich die an Kraftaufnehmer und Längengeber befestigte Kardiomyozyte beim Wechsel von einer Lösungskammer in die andere immer im Mittelpunkt der jeweiligen Messkammer befand, wurde ein „Anschlag“ entwickelt, mit dessen Hilfe der Objektisch sicher immer an der gleichen Stelle platziert werden kann. Damit konnte auch das Kraftsignal in den verschiedenen Kammern stabil auf einem Niveau gehalten werden.

Der Kraftaufnehmer besteht aus einem Sensorelement (Halbleiterdehnungsmessstreifen, Modell AE 801), an dessen Ende eine Karbonfaser mit einer feinen Nadelspitze befestigt ist. Diese Nadelspitze wurde mit Flusssäure für ca. 5 min bei RT geätzt, um eine rauere Oberfläche für die bessere Zellbefestigung zu schaffen. Daran wurden die Kardiomyozyten durch Ankleben befestigt. Erzeugt die Kardiomyozyte Kraft, wird diese über eine Verformung der Nadel und somit des Sensorelements als Änderung in der Spannung (mV) registriert. Diese Spannungsänderung wurde über einen Verstärker registriert, dabei wurde mit Hilfe eines Filters das Rauschen reduziert. Das Signal wird über den Digital Controller in das ASI-Programm eingespeist und so registriert. Der Kraftaufnehmer wurde vor dem Einbau mit verschiedenen Gewichten kalibriert und der ermittelte Kalibrierungsfaktor über das ASI-Programm automatisch bei jedem Kraftwert berücksichtigt.

Die Zelle wurde außer am Kraftaufnehmer auch an der Nadelspitze eines Längengebers, d.h. eines Motors, der kontrollierte Längenänderungen der Zelle erlaubte, befestigt. Die Längenänderungen werden über einen HighSpeed Length Controller nach einem vorprogrammierten Protokoll des ASI-Programms vorgegeben (vgl. Kapitel 2.2.4.4). Für jede Messbedingung wurde ein entsprechendes Programm geschrieben. Während der Messungen wurden die Zellen über eine Kamera aufgenommen und die Sarkomerlänge mittels Fast Fourier Transformation (FFT) ermittelt.

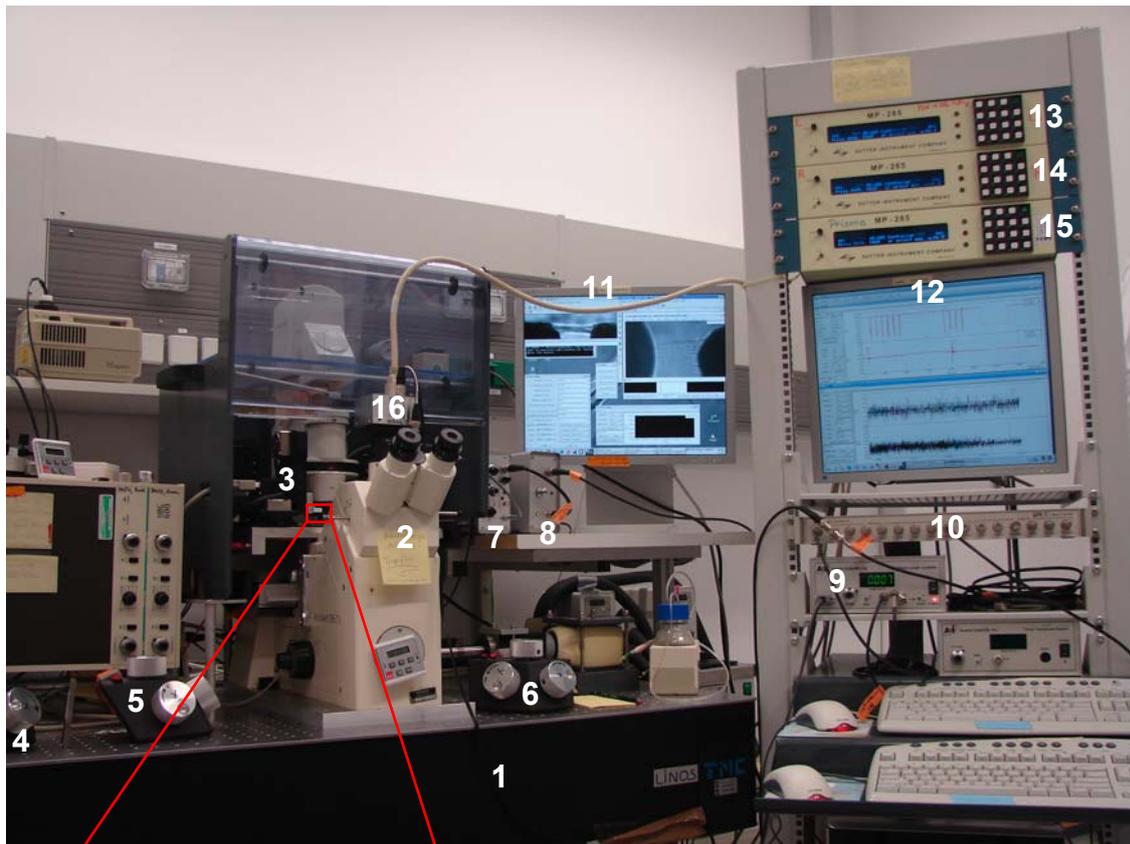
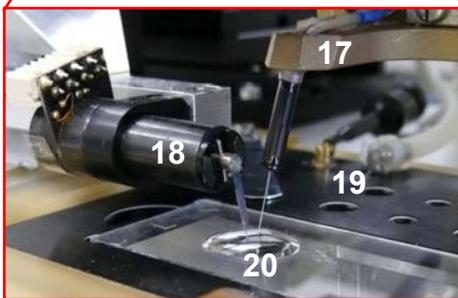


Abb. 2.1 Apparatur für isometrische Kraftmessungen



- 1 Schwingungsgedämpfter optischer Tisch
- 2 Mikroskop
- 3 Prisma zu Höhenbestimmung
- 4 Steuerung Prisma
- 5 Steuerung Längengeber
- 6 Steuerung Kraftaufnehmer
- 7 Verstärker des Kraftaufnehmers
- 8 Filter des Kraftaufnehmers
- 9 HighSpeed Length Controller
- 10 Digital Controller 604C A/C
- 11 HVLS Programm für SL Bestimmung
- 12 ASI Programm fürs Kraft-Längen Signal
- 13 Mikromanipulator-Steuerung Längengeber
- 14 Mikromanipulator-Steuerung Kraftaufnehmer
- 15 Mikromanipulator-Steuerung Prisma
- 16 Kamera
- 17 Kraftaufnehmer
- 18 Längengeber (Motor)
- 19 Messkammern (temperaturgeregelt)
- 20 Kardiomyozyten-Suspension

## **2.2.4 Vorarbeiten für isometrische Kraftmessungen an einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyten**

### **2.2.4.1 Präparation der Herzproben und Kryokonservierung**

Die Gewebstücke aus menschlichem Myokard wurden sofort nach Explantation entnommen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte ebenfalls in flüssigem Stickstoff.

Die Ratten (SPDW, 8-9 Monate alt, männliche und weibliche Tiere) wurden zunächst mittels CO<sub>2</sub>-Begasung und danach per zervikaler Dislokation getötet, der Brustkorb geöffnet und das Herz entnommen. Das in einigen Fällen noch schlagende Herz wurde in raumtemperierter PBS-Lösung ausgepumpt. Anschließend wurden die Vorhöfe entfernt und der linke Ventrikel abpräpariert. Dieser wurde dann umgehend in flüssigen Stickstoff getaucht und nach dem Gefrierprozess in ein Cryo-Gefäß zur Lagerung überführt.

### **2.2.4.2 Isolation und Permeabilisierung von Kardiomyozyten**

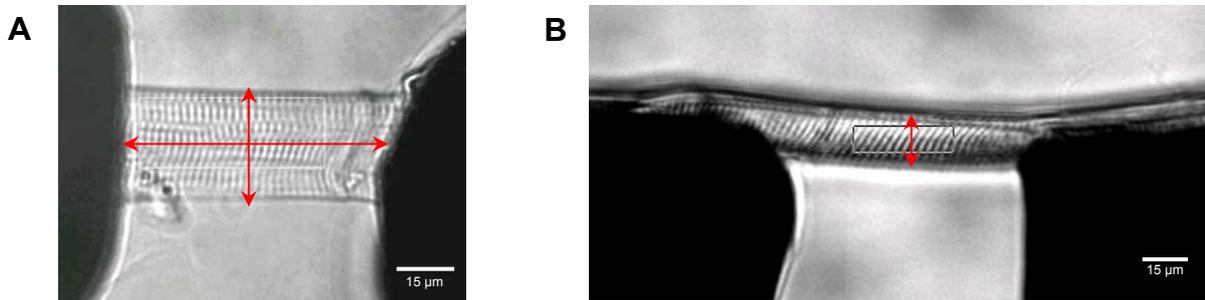
Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte modifiziert nach van der Velden *et al.* (van der Velden *et al.*, 1998). Zunächst wurde ein in flüssigem Stickstoff gelagertes Stück des linken Ventrikels (Ratte oder Mensch) in 2.5 ml Permeabilisierungs-Lösung mit 1 mM DTT und 35 µL InhMix zügig aufgetaut. Anschließend wurde das Stück grob mit einer Schere zerkleinert und in einen 5 ml Homogenisatorzylinder überführt und, je nach Spezies mehrmals homogenisiert. Hierbei war für humane Proben 5 x 1 s Homogenisation nötig und für Rattenmyokard 3 x 1 s Homogenisation. Dann wurden diese 2.5 ml Zellsuspension in ein Röhrchen mit 2.5 ml Permeabilisierungs-Lösung mit 1% Triton, 1 mM DTT und 35 µl InhMix überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde das Röhrchen mehrmals invertiert, um eine gleichmäßige Triton-Behandlung zu erzielen. Zur Entfernung des Tritons wurden die Zellen dreimal mit Permeabilisierungs-Lösung gewaschen und zwischen diesen Schritten bei 900 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Zuletzt wurden die Zellen in 1 ml Permeabilisierungs-Lösung mit 2 mM DTT und 14 µl InhMix aufgenommen. Während der gesamten Prozedur lagert die Zellsuspension stets auf Eis und wurde über Nacht weiter auf Eis im Kühlschrank gelagert.

### 2.2.4.3 Befestigung der Kardiomyozyten und Bestimmung der Zellparameter

Zunächst wurde ein Teil der Zellsuspension auf ein auf einem Objektträger befindliches Deckglas getropft. Eine geeignete permeabilisierte Zelle mit zylindrischer Form konnte durch Drehen des Deckglases so ausgerichtet werden, dass ein Anheften an die Spitzen des Kraftaufnehmers und des Längengebers möglich war. Zur Befestigung der Zellen wurden die Spitzen von Kraftaufnehmer und Längengeber zunächst mit einem kleinen Tropfen Kleber (Noa 63) versehen. Mit Hilfe der Mikromanipulatoren wurden diese Spitzen dann vorsichtig auf die Zellenden gepresst. Im Anschluss wurden die Spitzen der Nadeln mit der an ihnen befindlichen Zelle vorsichtig um 200  $\mu\text{m}$  vom Deckglas hochgefahren. Der Kleber wurde mittels UV-Licht (via LED-Power-PEN) bei 365 nm polymerisiert. Die verwendete Strahlungsdauer konnte dabei auf 30 s reduziert werden, um eine Zellschädigung zu vermeiden. Dies steht im Gegensatz zu den 2 bzw. 3 min Belichtungsdauer von Vannier *et al.* (1996) und Cazorla *et al.* (1999) (hier allerdings konnte die Lichtintensität nicht bestimmt werden). Diese Methode des Klebens wurde nach vielen Testreihen als die beste definiert, da sie einerseits schnell durchzuführen ist und die Zelle keine langen Belichtungs- bzw. Aushärtungszeiten überstehen muss. So konnten die Zellenden stabil und mit möglichst geringer „Compliance“ befestigt werden (Abb. 2.4 C).

Nach erfolgreicher Befestigung der permeabilisierten Kardiomyozyte an Kraftaufnehmer und Längengeber wurde sie in eine ca. 2.5 cm entfernte Kammer mit 70  $\mu\text{l}$  Messlösung (pCa 9.0) überführt. Bevor die Zellparameter bestimmt wurden, die für die Berechnung des Querschnitts entscheidend sind, wurde die Zelle zunächst auf eine bestimmte Sarkomerlänge (SL) je nach Spezies (Mensch: 2.2  $\mu\text{m}$ ; Ratte: 2.3  $\mu\text{m}$ ) gedehnt. Dabei wurde berücksichtigt, dass Kardiomyozyten *in vivo* im Myokard eine Sarkomerlänge zwischen 1.7 und 2.3  $\mu\text{m}$  im humanen Organismus aufweisen. Auch in der Literatur wird häufig eine SL von 2.2  $\mu\text{m}$  für solche Untersuchungen verwendet (van der Velden *et al.*, 2000). Die Sarkomerlänge dient auch als Qualitätsmerkmal für die Stabilität der Zelle, denn sie sollte während der gesamten Messprozedur nicht um mehr als 0.05  $\mu\text{m}$  absinken, ansonsten wurde die Zelle verworfen. Die zu bestimmenden Parameter für jede Zelle waren Länge, Breite und Höhe (Abb. 2.2). Die Länge und die Breite einer Zelle konnten über das Objektiv von unten (invertiertes Mikroskop) bestimmt werden. Zur Längenbestimmung wurde nur der sichtbare Bereich einer Zelle gewählt und vermessen, d.h. die Enden, die an den Nadelspitzen befestigt waren, wurden nicht mit einbezogen. Da die Zellen meist keinen runden Querschnitt aufwiesen, musste zur Abschätzung des Querschnitts auch die Höhe der Zellen bestimmt werden. Um die Höhe einer Zelle zu ermitteln wurde ein Prisma verwendet, welches ebenfalls in den Flüssigkeitstropfen getaucht wurde. Damit konnte die Zelle von der Seite betrachtet werden. Aus Breite und Höhe einer jeweiligen Zelle konnte dann der

Querschnitt errechnet werden, wobei man annimmt, dass die Zelle einen elliptischen Querschnitt hat. So gilt für die Flächenbestimmung mit  $A = r_1 \cdot r_2 \cdot \pi$ , wobei  $r_1$  der halben Breite und  $r_2$  der halben Höhe einer Kardiomyozyte entspricht.



**Abb. 2.2: Aufsicht (A) und Seitenansicht (B) einer permeabilisierten humanen Kardiomyozyte zwischen Längengeber (links) und Kraftaufnehmer (rechts).**

A: In dieser Ansicht (32-fach) wurden Breite und Länge der Kardiomyozyte bestimmt.

B: In dieser Ansicht (20-fach) mittels Prisma wurde die Höhe der Zelle ermittelt.

Das weiße Rechteck in A bezeichnet den Bereich, der für die Sarkomerlängenmessung vom Programm verwendet wird, er kann manuell ausgewählt werden und sollte möglichst einen großen Bereich der Zelle abdecken und deutliche Sarkomerstruktur beinhalten. Der weiße Balken entspricht 15 µm.

Die durchschnittlichen Werte für ermittelte Zellparameter sind in Tabelle 2.1 angegeben. Es konnte kein Unterschied zwischen den Spezies ermittelt werden. Auch optisch unterschieden sich Kardiomyozyten von Ratte und Mensch nicht.

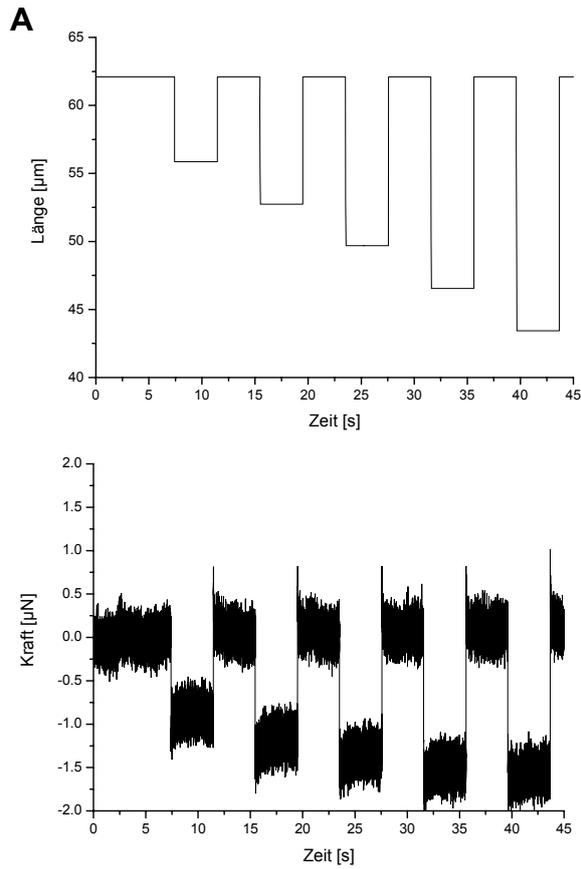
**Tab. 2.1 Zellparameter von Mensch- und Ratten-Kardiomyozyten**

	Donor-Kardiomyozyten	Herzinsuffizienz-Kardiomyozyten	Ratten-Kardiomyozyten
Länge [µm ± SEM]	70.73 ± 3.06	73.00 ± 4.36	85.30 ± 4.85
Breite [µm ± SEM]	24.01 ± 2.19	30.13 ± 2.30	33.03 ± 1.28
Höhe [µm ± SEM]	17.98 ± 3.29	20.17 ± 0.87	20.75 ± 0.66
Querschnitt [µm ± SEM]	344.46 ± 38.94	495.16 ± 50.56	540.79 ± 29.04
n	14	23	26

#### 2.2.4.4 Etablieren von Protokollen für isometrische Kraftmessungen an einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyten

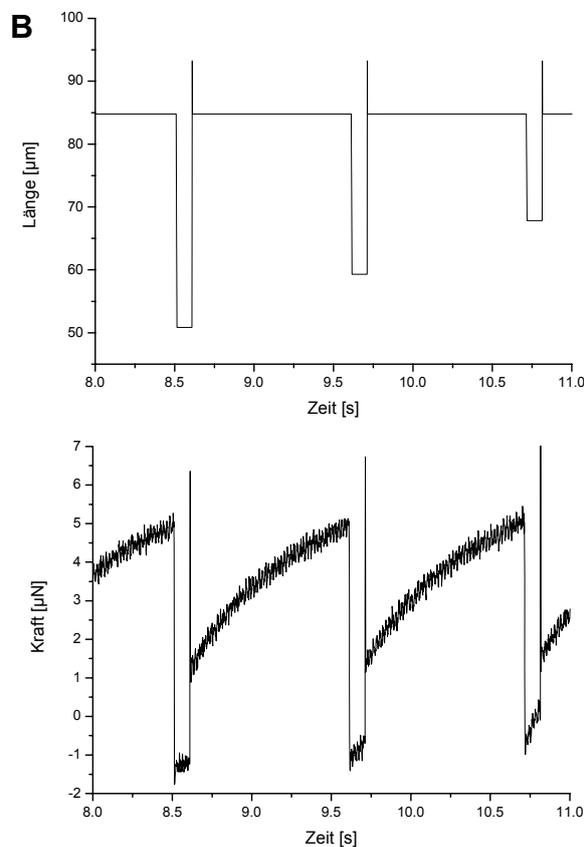
Für reproduzierbare isometrische Kraftmessungen war es von größter Bedeutung die permeabilisierten Kardiomyozyten so zu stabilisieren, dass ihre Sarkomerstruktur erhalten blieb und die isometrische Kraft auch nach mehreren Aktivierungen in calciumhaltiger Lösung möglichst wenig (nicht unter 85-90% der Ausgangskraft) absinkt. Für diese Stabilisierung der Zellen wurden ähnliche Protokolle etabliert, wie sie von Brenner an Skelettmuskelfasern des Kaninchens entwickelt worden waren (Brenner, 1983). Dabei erfolgte ein zyklischer Wechsel zwischen lastfreier isotonischer Entdehnung und Rückdehnung auf die isometrische Ausgangslänge der Kardiomyozyte. Während der Entdehnung werden vermutlich die Myosinfilamente durch die Rückstellkräfte des Titins wieder im Sarkomer zentriert, was eine Reorganisation der bei Kraftentwicklung oft etwas ungeordneten Sarkomere zur Folge hat. In das Protokoll wurde auch ein so genannter „overshoot“ integriert (Abb. 2.4 A). Das bedeutet, dass bei Rückdehnung zunächst eine leichte Überdehnung der Kardiomyozyte um 10% ihrer isometrischen Ausgangslänge erfolgte, bevor sie auf ihre Ausgangslänge gebracht wurde. Dieser „overshoot“ bewirkte offenbar eine noch bessere Reorganisation der Sarkomere und eine Koordination der Querbrücken vor dem folgenden Kraftwiederanstieg (Abb. 2.3 B; 2.4 C).

Ein weiteres Ziel bei der Entwicklung der Messprotokolle war es sicherzustellen, dass bei Entdehnung ein Level erreicht wird dem die Kraft möglichst gleich Null ist, d.h. dass sich sämtliche Myosinköpfe in den schwach-gebunden Zuständen akkumulieren. Aufgrund einer Testreihe an mehreren Zellen wurde eine Längenänderung (Entdehnung) von 40% der Ausgangslänge als am besten geeignet gewählt (Abb. 2.3 B). Ebenso musste auch unter Relaxationsbedingungen herausgefunden werden, bei welcher Entdehnung die passiven Kräfte auf Null sinken (Zelle ist vollständig entdehnt) (Abb. 2.3 A). Die passiven Kräfte werden hauptsächlich durch die Rückstellkräfte des Titins bei Dehnung der Zelle auf 2.2  $\mu\text{m}$  SL verursacht und haben nichts mit den aktiv entwickelten Kräften des Myosins zu tun. Durch eine Entdehnung der Zelle kann das Titin in seine ursprüngliche Konformation zurückwechseln. So kann die passive Rückstellkraft ermittelt werden. Es wurde eine Längenänderung von 30% ermittelt, mit der die passive Kraft bestimmt werden konnte (Abb. 2.3 A). Die gemessene passive Kraft wurde von der maximalen Kraft subtrahiert, um so die aktive von den Myosinköpfen entwickelte Kraft bestimmen zu können. (vgl. Kapitel 2.2.4.5).



**Abb.2.3: Testprotokolle zum Finden der passiven und aktiven Kraft.**

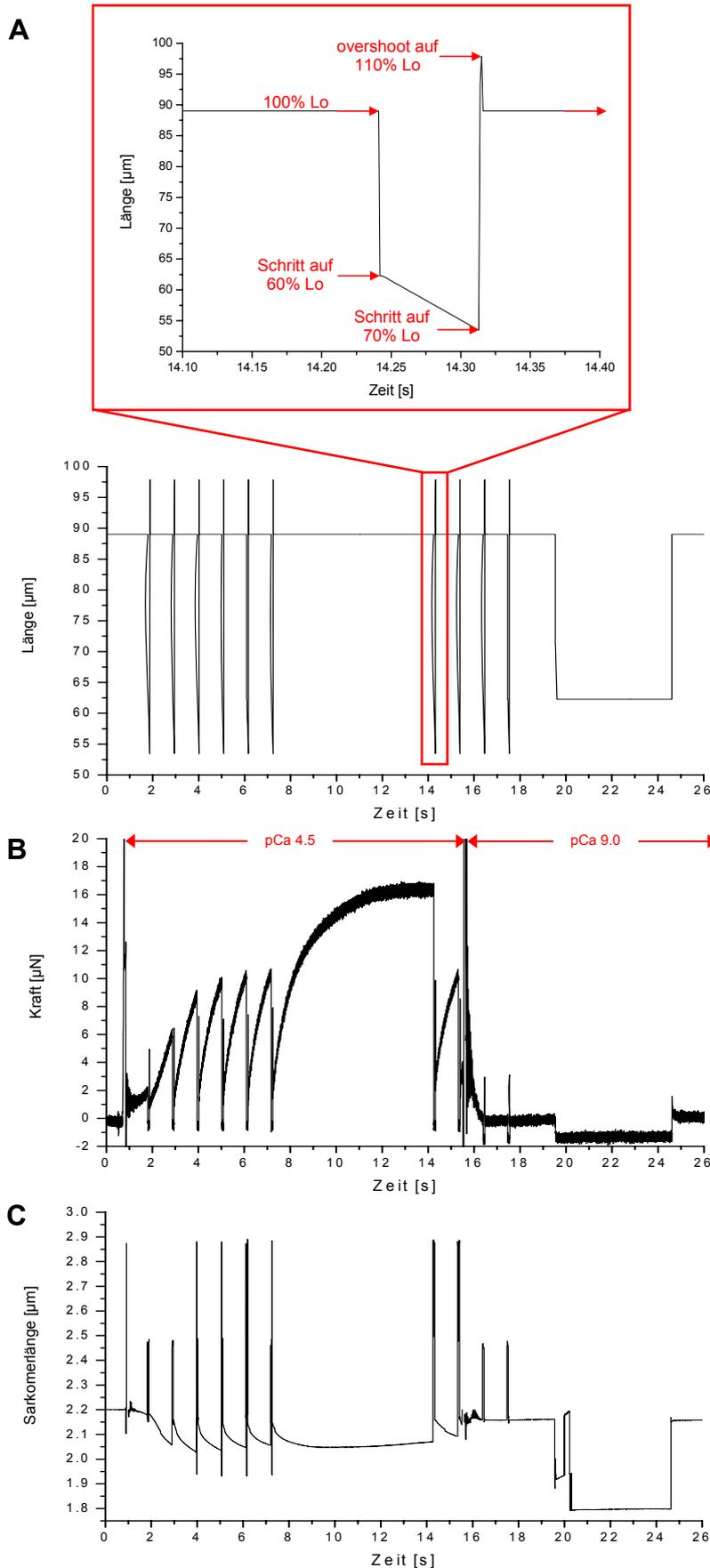
A – Nulllevel in pCa-Lösung 9.0. Hier sollte der Level gefunden werden, bei dem die passiven Kräfte nahezu Null sind. So wurden verschieden große Entdehnungen (10, 15, 20, 25, 30%) getestet. Ändert sich die Amplitude im Kraftsignal nicht mehr, so wurde der Nulllevel erreicht. Dies war bei 30% Längenänderung der Fall.



B – Nulllevel in pCa-Lösung 4.5. Hier sollte der Level gefunden werden, bei dem die aktiven Kräfte nahezu Null sind. So wurden verschieden große Entdehnungen (40, 30, 20%) getestet. Hier sollte die aktive Kraft den Nulllevel erreichen, wie bei 40% Längenänderung und nicht zu früh während der Entdehnung ansteigen, wie es bei 20% Längenänderung deutlich zu erkennen ist.

In einer weiteren Testphase wurde die Anzahl der Entdehnungen/Rückdehnungen bestimmt (Abb. 2.4 A), die notwendig waren, um die Zelle bzw. die Sarkomerstruktur zu Beginn der Aktivierung zu stabilisieren bis eine konstante Kraftentwicklung erreicht war. Die Anzahl hängt von der jeweiligen Calciumkonzentration ab. Je weniger Calcium, desto länger dauerte es, konstante Kraftentwicklung zu erreichen (Abb. 2.4 B) und desto öfter musste der zyklische Wechsel erfolgen. Somit war auch die Zeit, um konstante Kraftentwicklung zu erreichen, länger je weniger Calcium in der Lösung vorhanden war. Die Anpassungen der Messprotokolle an die verschiedenen Calciumkonzentrationen mussten auch für Messungen mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen erfolgen. Je höher die Phosphatkonzentration, desto weniger Entdehnung/Rückdehnungsphasen und desto kürzer war die Zeit um ein steady-state-Kraft-Level zu erreichen. Während des Querbrückenzyklus bzw. beim Wechsel der Querbrücken aus den nicht-kraftgenerierenden in die kraftgenerierenden Zustände wird Phosphat abgeben. Wird jedoch die Lösung mit Phosphat angereichert, bindet dieses an den Myosinkopf und zwingt so die Querbrücken zurück in die nicht-kraftgenerierenden Zustände. Der Kraftwiederanstieg und das Erreichen konstanter Kraftentwicklung wurden so bei steigender Phosphatkonzentration schneller.

Nachdem alle diese Faktoren durch vielfache Testläufe an Ratten-Kardiomyozyten ermittelt worden waren, konnte das System auf humane Kardiomyozyten umgestellt werden. Ratten-Kardiomyozyten besitzen allerdings hauptsächlich  $\alpha$ -Myosin, dessen ATPase-Rate schneller als die des  $\beta$ -Myosins der humanen Kardiomyozyten ist. Um die Turnoverkinetik zu verlangsamen erfolgten die Messungen an Ratten-Kardiomyozyten bei 5 °C. Für die Messungen an humanen Kardiomyozyten wurde die Temperatur auf 15 °C erhöht und die Messprotokolle an die veränderten Zeiten für den Kraftwiederanstieg angepasst. Eine Erhöhung auf 20 °C oder höher war dagegen nicht vorteilhaft, da dabei die Stabilität der Kardiomyozyten abnahm (van der Velden *et al.*, 2000).



**Abb.2.4: Beispiel einer Originalregistrierung einer einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyte.**

A: zeigt das Längensignal [ $\mu\text{m}$ ] mit dem Wechsel aus Entdehnen und Rückdehnen. Der obere Ausschnitt (roter Rahmen) zeigt eine Vergrößerung einer Entdehnung mit darauf folgender Rückdehnung und den entsprechenden prozentualen Längenänderungen. Lo entspricht der isometrischen Ausgangslänge einer Zelle.

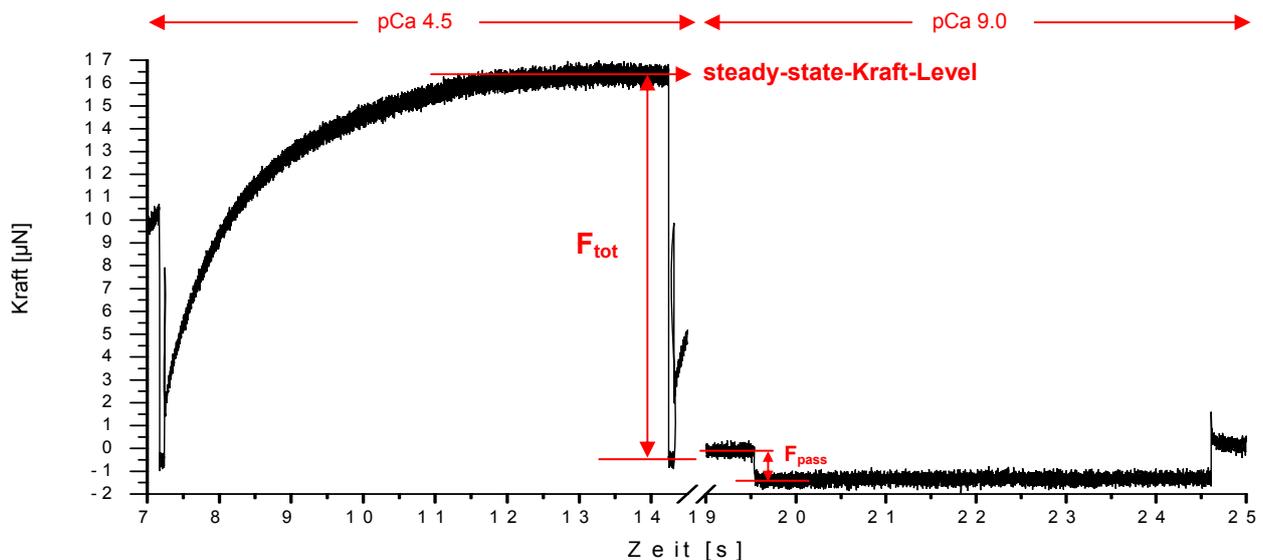
B: zeigt das Kraftsignal [ $\mu\text{N}$ ] bei maximaler Calciumkonzentration, sowie die darauf folgende Entdehnung in pCa 9.0 zu Ermittlung der passiven Kraft.

C: zeigt das Sarkomerlängensignal [ $\mu\text{m}$ ] während maximaler Kraftentwicklung. Die Sarkomerlänge sinkt nur wenig bei maximaler Aktivierung. Dies zeigt eine gute Stabilität der Zelle.

### 2.2.4.5 Bestimmung von aktiven und passiven isometrischen Kräften

Die Bestimmung der maximalen Kraft erfolgte, wie bereits in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben, nach kurzer lastfreier Entdehnung mit anschließender Rückdehnung auf die Ausgangslänge der Kardiomyozyte. Die passive Kraft wurde nach einer Entdehnung in Lösung mit pCa 9.0 ermittelt. In Abb. 2.5 ist dargestellt wie die maximale und passive Kraft ausgewertet wurde. Mit Hilfe des Programms Labview™ wurden Cursor auf den steady-state-Level und auf den Nulllevel gelegt, dabei wurde darauf geachtet, dass der Cursor mittig im Rauschen des Signals lag. Ähnlich wurde auch für den Bereich der passiven Kraft verfahren.

So konnten die Amplituden für die maximale isometrische Kraft ( $F_{\text{tot}}$ ) und die passive Kraft ( $F_{\text{pass}}$ ) ermittelt werden. Für die Berechnung der aktiven isometrischen Kraft ( $F_{\text{max}}$ ) wurde  $F_{\text{pass}}$  immer von  $F_{\text{tot}}$  subtrahiert. Zuletzt wurde die aktive Kraft noch auf den Querschnitt der Kardiomyozyte bezogen, indem der Quotient aus  $F_{\text{max}}$  und der Querschnittsfläche gebildet wurde. Diese aktive Kraft pro Querschnitt wird im Weiteren als isometrische Kraft in  $\text{kN/m}^2$  angegeben.



**Abb. 2.5: Ausschnitt einer Originalregistrierung des Kraftsignals [µN] im Zeitverlauf [s].**

Zur besseren Darstellung wurde die Zeitskala unterbrochen.

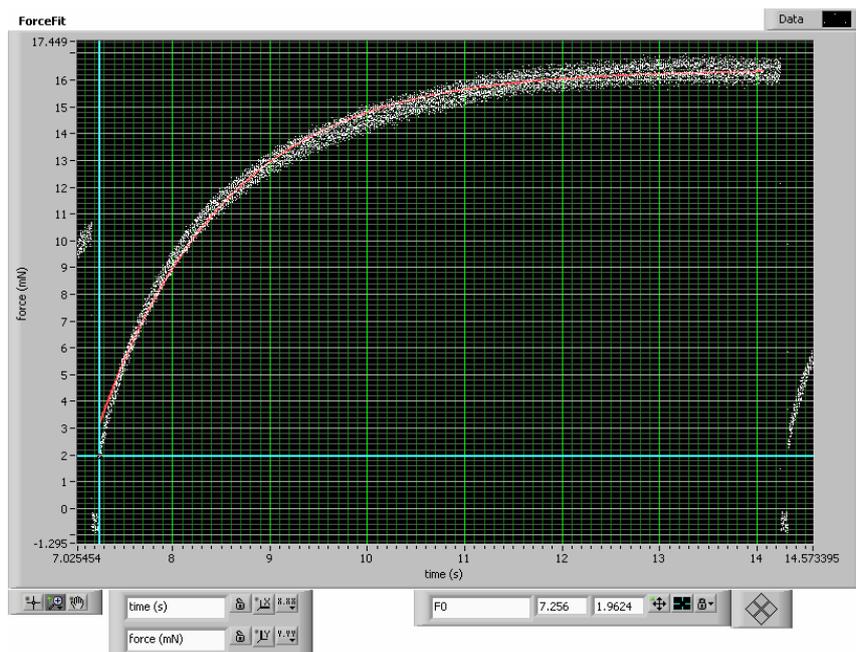
Links ist das Kraftsignal bei pCa 4.5 mit eingezeichneter Amplitude zur  $F_{\text{tot}}$ -Bestimmung.

Rechts ist das Kraftsignal bei pCa 9.0 mit eingezeichneter Amplitude zur  $F_{\text{pass}}$ -Bestimmung.

Es ist zu beachten, dass sich der Null-Level der Kraft zwischen aktiver und passiver Registrierung leicht verschoben hat, bedingt durch den Wechsel zwischen unterschiedlichen Messkammern.

### 2.2.4.6 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs

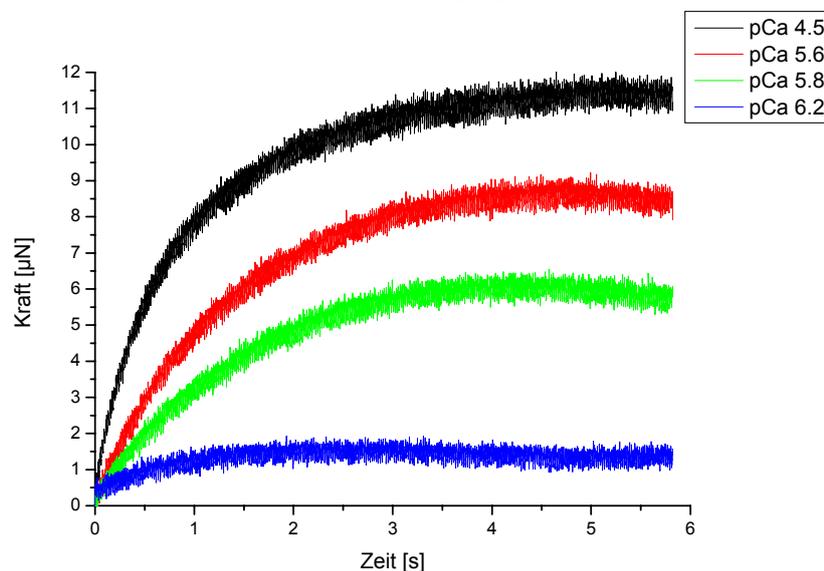
Die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ) wurde ausgehend von isometrischen Kraftmessungen, nach einer kurzen Phase der lastfreien isotonischen Verkürzung und der schnellen Rückdehnung auf die isometrische Ausgangslänge ermittelt. Dabei entspricht  $k_{tr}$  dem Kehrwert der Zeitkonstanten  $\tau$  der Exponentialbeziehung. Die Zeitkonstante  $\tau$  ist die Zeit, die eine Kardiomyozyte benötigt um 63% ( $1-1/e = 0,632$ ) ihrer maximalen isometrischen Kraft zu generieren. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Labview™. Allerdings zeigte der Fit zu Beginn des Kraftwiederanstiegs in einigen Fällen eine nicht vollständige Übereinstimmung mit den registrierten Werten (Abb. 2.6) Da jedoch unklar ist, ob der schnelle Anfangsteil der Registrierung messtechnisch bedingt ist und nicht unbedingt Querbrücken-Eigenschaften widerspiegelt, wurde hier auf die Auswertung eines zweifach exponentiellen Fits verzichtet. Der Kraftwiederanstieg entspricht näherungsweise einer einfachen Exponentialbeziehung



**Abb. 2.6:** Beispiel einer Originalregistrierung eines Kraftwiederanstiegs nach kurzer lastfreier Entdehnung und anschließender Rückdehnung. Die dargestellten Cursor (blau) geben dabei den Startpunkt für die Fitfunktion an.

### 2.2.4.7 Isometrische Kraftmessungen bei verschiedenen Calciumkonzentrationen

Am Anfang einer jeden Messreihe wurde die Kardiomyozyte zunächst einmal bei pCa 4.5 voll aktiviert. Dies geschah durch ein schnellen Wechsel aus einer Messkammer mit einer Relaxationslösung (pCa 9.0) in eine Messkammer mit einer Aktivierungslösung (pCa 4.5). Dann wurde das entsprechende Messprotokoll (vgl. Kapitel 2.2.4.4) gestartet. Bei jeder Messung wurde das Längen-, Kraft- und SL-Signal registriert (Abb. 2.4). Die erste Messung bei maximaler Calciumkonzentration wurde nicht in der Auswertung berücksichtigt, sie diente lediglich dazu die Stabilität der Zelle zu charakterisieren. In der eigentlichen Messreihe wurde als erstes in pCa 9.0 gemessen, um eine mögliche Kraftentwicklung unter Relaxationsbedingungen zu ermitteln. Dann folgte eine Messung bei pCa 4.5. Danach wurden alle anderen pCa-Lösungen (5.0 – 6.2) in randomisierter Reihenfolge gemessen (Abb. 2.7). So konnte ein systematischer Fehler durch gleiche Abfolge der Messreihe ausgeschlossen werden. Zum Schluss einer jeden Messreihe folgte eine weitere Aktivierung bei pCa 4.5, um den Kraftverlust der Zelle (Rundown) während der Messreihe zu bestimmen. Die Differenz zwischen erster und letzter Aktivierung bei pCa 4.5 entspricht dem Rundown, der bei der Messreihe 15% nicht überschreiten sollte, ansonsten wurde die Kardiomyozyte nicht für die Auswertung berücksichtigt. Zwischen den verschiedenen Messungen wurde die Messkammer mehrfach mit destilliertem Wasser gespült.



**Abb. 2.7: Verlauf des Kraftwiederanstiegs nach einer Phase der lastfreien isotonischen Verkürzung am Beispiel von vier pCa-Lösungen.**

Dargestellt am Beispiel einer Kardiomyozyte ist das Kraftsignal bei vier verschiedenen Calciumkonzentrationen, dabei sinkt die isometrische Kraft mit sinkender Calciumkonzentration.

Für die Erstellung einer Kraft-pCa-Kurve wurde jeder Kraftwert gegen den entsprechenden pCa-Wert aufgetragen. Dabei entsprachen die Werte für pCa 4.5 in den pCa-Kurven immer den Mittelwert aus Anfang und Ende einer jeden Messreihe (pCa-Reihe).

Mit Hilfe von Origin™ wurde die Kraft-pCa-Kurve mit der folgenden modifizierten Hill-Gleichung gefittet (Ruegg, 1992; van der Velden *et al.*, 2003a):

$$[5] \quad F(\text{Ca}^{2+})/F_0 = (a - k) \cdot [\text{Ca}^{2+}]^{nH} / (\text{EC}_{50}^{nH} + [\text{Ca}^{2+}]^{nH}) + k$$

$F(\text{Ca}^{2+})$  = Kraft bei der tatsächlichen Calciumkonzentration

$F_0$  = Kraft bei gesättigter Calciumkonzentration

$a$  = offset-Parameter für maximal erreichte Kräfte

$k$  = offset-Parameter für restliche aktive Kräfte bei sehr geringen Calciumkonzentrationen

$\text{EC}_{50}$  = Calciumkonzentration bei 50% der maximalen Kraft ( $\text{pCa}_{50}$ )

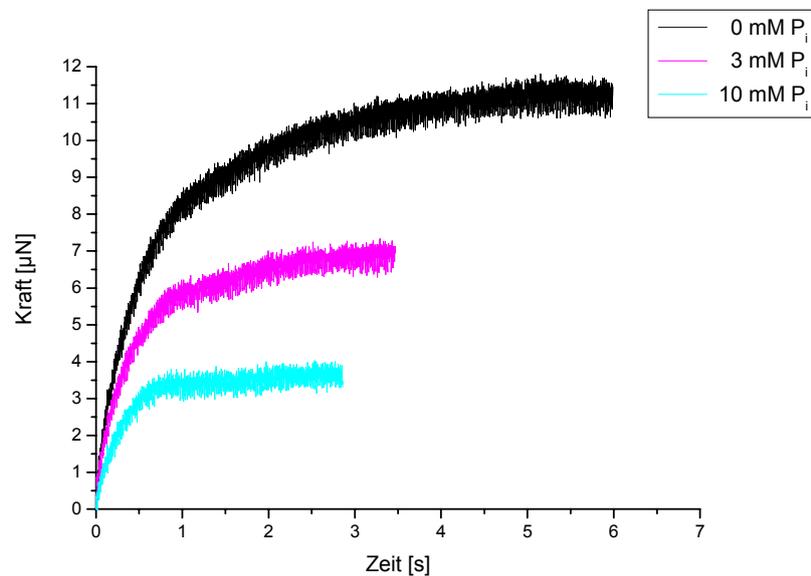
$nH$  = Hill-Koeffizient

So konnte für jede Kurve der  $\text{pCa}_{50}$ -Wert ermittelt werden. Dieser Werte gibt jene Calciumkonzentration an bei der 50% der maximalen Kraft generiert wurden. Anhand dieses Wertes lässt sich eine Aussage über die Calciumempfindlichkeit treffen. Ein weiterer Wert, der mit Hilfe der pCa-Kurven ermittelt wurde, war der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ). Dieser Wert gibt die Steilheit einer pCa-Kurve an.

Bei diesen Messungen haben bereits kleine Schwankungen in der freien Calciumkonzentration relativ große Auswirkungen auf die Kraft-pCa-Kurven und insbesondere auf die  $\text{pCa}_{50}$ -Werte. Um diese Schwankungen zu minimieren wurde für ein Set von Experimenten jeweils mit identischen Lösungen gearbeitet. Die innerhalb einer Gruppe von Experimenten gemessenen Unterschiede beruhen daher auf funktionellen Veränderungen im Sarkomer der hier untersuchten Kardiomyozyten.

### 2.2.4.8 Isometrische Kraftmessungen bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen

Der Ablauf dieser Messreihe erfolgte zunächst identisch zu dem in Kapitel 2.2.4.3 beschriebenen Ablauf, d.h. es wurde zunächst eine pCa-Reihe (ohne Phosphatzugabe) gemessen. Auf diese Reihe folgten weitere pCa-Reihen, jeweils mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen (1, 3, 5, 10 mM  $P_i$ ) (Abb. 2.8). Wieder wurden innerhalb einer pCa-Reihe z.B. mit  $P_i$  5 die pCa-Werte randomisiert gemessen und auch die Reihen mit jeweiliger Phosphatkonzentration wurden randomisiert gemessen. So können mögliche Effekte auf die isometrische Kraft und die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs eindeutig auf Phosphat bzw. Calcium zurückgeführt werden (Abb. 2.8).



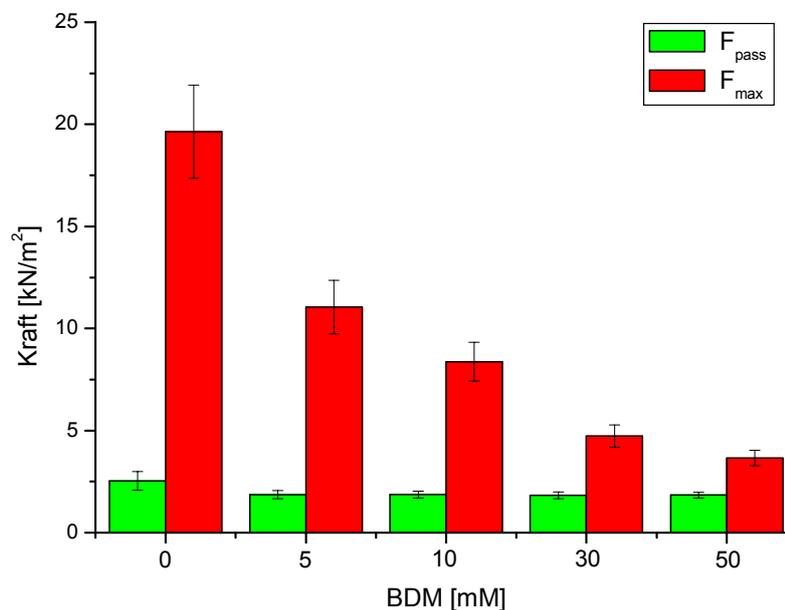
**Abb. 2.8:** Verlauf der Kraftentwicklung am Beispiel von drei Phosphatkonzentrationen bei pCa 4.5.

Am Beispiel einer Kardiomyozyte ist das Kraftsignal bei drei verschiedenen Phosphatkonzentrationen und bei pCa 4.5 dargestellt. Mit steigender Phosphatkonzentration sinkt die Kraft und  $k_{tr}$  wird schneller.

## 2.2.5 Kontrolleexperimente

### 2.2.5.1 Kontrolleexperiment mit 2,3-Butandion Monoxim zur Bestimmung der Myosinaktivität in pCa 9.0

Zur Überprüfung, ob die Querbrücken in pCa-Lösung 9.0 ( $= 10^{-9}$  mM  $[Ca^{2+}]$ ) noch aktiven Turnover zeigen, wurden Experimente mit 2,3-Butandion Monoxim (BDM) durchgeführt. BDM hemmt die ATPase des Myosinkopfes, was eine Stabilisierung des M-ADP-P<sub>i</sub> Zwischenzustandes zur Folge hat und so die Kraftgenerierung verhindert (Herrmann *et al.*, 1992; McKillop *et al.*, 1994; Ostap, 2002; Mattei, 2004). Es wurden vergleichende Experimente in pCa-Lösung 9.0 und 4.5 durchgeführt (Abb. 2.9). Isometrische Kraftmessungen in pCa 4.5 zeigten, dass mit steigender BDM-Konzentration die isometrische Kraft immer weiter abnahm, da der aktive Querbrücken-Turnover gehemmt wird. Die gemessenen „Kräfte“ in pCa 9.0 dagegen änderten sich nicht signifikant mit steigender BDM-Konzentration. Daraus könnten wir schließen, dass in Lösung mit pCa 9.0 keine Myosinköpfe aktiviert waren, da sich trotz Zugabe von BDM die Kraft ( $F_{pass}$ ) nicht reduzierte. Das bedeutet, dass die bei pCa 9.0 gemessenen Kräfte ( $F_{pass}$ ) tatsächlich vor allem auf Rückstellkräfte durch Titin zurückzuführen waren (LeWinter *et al.*, 2007).

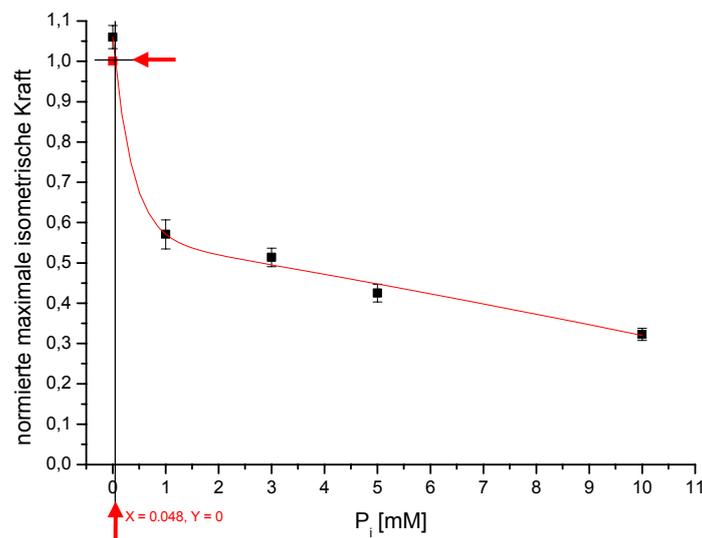


**Abb. 2.9: BDM-Effekt auf die aktive und die passive Kraft.**

Gezeigt ist der Effekt einer Zugabe von BDM in verschiedenen Konzentrationen. Der BDM-Effekt wurde bei pCa-Lösung 9.0 (grün) und bei pCa 4.5 (rot) gemessen. Die bei pCa 9.0 generierte Kraft änderte sich trotz BDM-Zugabe nicht signifikant und konnte somit vor allem auf Rückstellkräfte des Titins zurückgeführt werden ( $=F_{pass}$ ). Bei pCa 4.5 sank die maximale Kraft mit steigender BDM-Konzentration.

### 2.2.5.2 Kontrollelexperiment mit Sucrose Phosphorylase zur Abschätzung der Phosphatverunreinigung in der Aktivierungslösung ohne Phosphatzugabe (in Donor-Kardiomyozyten)

Mittels Sucrose Phosphorylase (= Disaccharid glucosyltransferase; SP) lässt sich frei in der Lösung befindliches Phosphat durch Bindung an Sucrose entfernen (Silverstein *et al.*, 1967), wodurch D-Fructose und Alpha-D-Glucose-1-Phosphat entsteht. Dadurch war es möglich die Aktivierungslösung ohne Phosphatzugabe ( $P_i0$ ) von möglichem Phosphat, hauptsächlich hervorgerufen durch ATP- oder CrP-Zerfall, zu befreien. Um die Phosphatverunreinigung in der Messlösung ohne Phosphatzugabe abschätzen zu können, wurden die normierten maximalen isometrischen Kräfte für jede Phosphatkonzentration sowie die maximale isometrische Kraft mit SP gegen die Phosphatkonzentration aufgetragen (Abb. 2.10). Anhand der gefitteten Linie (doppelten Exponentialfunktion) konnte für die Messung mit SP und damit einer Reduktion von Phosphat auf nahe 0 mM die Phosphatkonzentration (Verunreinigung) in der üblichen Messlösung ohne SP und Phosphatzugabe ermittelt werden. Die Verunreinigung betrug etwa 0.05 mM in der Aktivierungslösung ohne Phosphatzugabe ( $P_i0$ ). Da alle Messlösungen mit Phosphat basierend auf dieser Aktivierungslösung hergestellt wurden, war dieses zusätzliche Phosphat in allen Messlösungen vorhanden und wurde nicht bei in den Phosphatkonzentrationsangaben berücksichtigt. Die Reduktion der maximalen isometrischen Kraft durch das zusätzliche  $P_i$  betrug  $6 \pm 3\%$ , was im Streubereich der Messungen mit Aktivierungslösung ohne SP ( $P_i0$ ) liegt (Abb.: 3.1).



**Abb. 2.10: Phosphatabhängigkeit der maximalen isometrischen Kraft.**

Aufgetragen sind die maximalen, isometrischen Kräfte normiert auf den Mittelwert der maximalen Kraft bei  $P_i0 = 1$  (schwarz). Zusätzlich wurde die maximale isometrische Kraft mit SP eingetragen (Pfeil), sie lag bei  $1,06 \pm 0,03$ . Die Differenz zu  $P_i0$ , abgeschätzt unter Zuhilfenahme einer abfallenden zweifachen Exponentialfunktion (rot) ergab eine Verunreinigung der  $P_i0$ -Lösung von 0.05 mM (Pfeil).

### 2.2.5.3 Isometrische Kraftmessungen vor und nach Inkubation mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA<sub>cat</sub>)

Die PKA ist eine cAMP abhängige Proteinkinase, deren Ziele unter anderem sarkomerische Proteine, wie kardiales Troponin I, kardiales Myosin-bindende Protein C und Titin, sind. Das Ziel war, durch Inkubation der Zellen mit PKA, die Auswirkungen der Phosphorylierung auf die Calciumempfindlichkeit zu untersuchen. Es wurde für diese Versuche die kommerziell erhältliche, daueraktive PKA<sub>cat</sub> verwendet, bei der kein cAMP zur Aktivierung nötig ist. Die PKA<sub>cat</sub> katalysiert den Transfer von Phosphat (aus ATP) an Threonin- oder Serinreste, je nach vorhandenem Zielprotein. Um die Effekte der PKA zu ermitteln erfolgte im Anschluss an eine erste pCa-Reihe, eine Inkubation mit PKA<sub>cat</sub> in Relaxationslösung (pCa 9.0). Es wurden 100 U/ml PKA<sub>cat</sub> + 6 mM DTT (ohne InhMix) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 40 min bei 20 °C. Danach wurde die PKA<sub>cat</sub> durch mehrfaches Überführen der Kardiomyozyte in PKA<sub>cat</sub>-freie Lösung ausgespült. Im Anschluss wurde eine weitere pCa-Reihe gemessen, um so den Phosphorylierungseffekt der PKA<sub>cat</sub> auf ihre Zielproteine zu untersuchen.

### 2.2.6 Statistische Auswertung

Die im Ergebnisteil aufgeführten Daten ergeben sich als Mittelwert aus den Einzelwerten. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgten die Fehlerangaben unter Angabe der Unsicherheit des Mittelwertes, dem „standard error of the mean“ (SEM). Die Anzahl an gemessenen Zellen wurde als n angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test in Origin™. Ein signifikanter Unterschied zwischen Messwerten wurde folgendermaßen dargestellt:

\* bedeutet  $p < 0.05$

\*\* bedeutet  $p < 0.01$

\*\*\* bedeutet  $p < 0.001$

Die miteinander verglichenen Werte wurden an gegebener Stelle beschrieben.

### 3. Ergebnisse

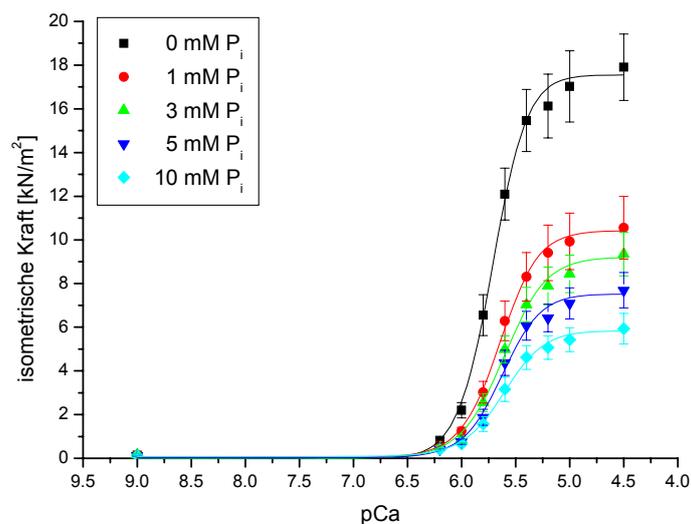
#### 3.1 Etablierung der notwendigen experimentellen Bedingungen

In einem neu aufgebauten Messsystem für einzelne, chemisch permeabilisierte Kardiomyozyten sollten zunächst geeignete Bedingungen für Messungen an kleinsten kryokonservierten Proben aus humanem Myokard etabliert werden. In einem ähnlichen System wurden bereits Kraftmessungen an permeabilisierten Kardiomyozyten der Ratte durchgeführt. Allerdings wurden frisch präparierte und enzymatisch vereinzelt Kardiomyozyten, die anschließend mit Triton permeabilisiert wurden, verwendet (Tasche *et al.*, 1998). Für humane Proben war eine Anpassung des Zellisolierungsprozesses, sowie der Befestigung der Zellen an Kraftaufnehmer und Längengeber für die stabilen Kraftmessungen, auch bei hohen Calciumkonzentrationen unumgänglich. So wurden spezielle „quick release“ Protokolle (Brenner, 1983) mit unterschiedlichen Amplituden und Geschwindigkeiten getestet, um die Sarkomerstruktur aufrecht zu erhalten und um sicherzustellen, dass bei der Entdehnung (release) ein Level erreicht wurde bei dem die Kraft gleich Null ist. Dies war nötig, um sämtliche Myosinköpfe in den schwach-gebunden Zuständen zu akkumulieren und so einen definierten Startpunkt für die Kraftgenerierung zu gewährleisten (vgl. Kapitel 2.2.4.4). Die grundlegende Etablierung erfolgte jedoch ebenfalls an Ratte, nicht zuletzt wegen der größeren Menge an verfügbarem Probenmaterial. Im Zuge dieser Messungen konnte aus vielen Klebmethoden unter Verwendung eines UV-härtenden Klebers (Noa 63), die zellschonendste und stabilste herausgefunden werden. Verschiedenste Protokollabläufe wurden getestet um schließlich ein Protokoll zu etablieren, das die Zellen über mehrere pCa-Reihen in allen Parametern stabil hielt. Der Abfall der maximalen Kraftentwicklung betrug im Mittel maximal 10–15% nach 11 Aktivierungen. Dies machte es ebenfalls möglich die Sarkomerlänge sogar bei höchster Calciumkonzentration (pCa 4.5) zu verfolgen (vgl. Abb. 2.4 C). Nachdem diese Schritte erfolgreich an der Ratte etabliert werden konnten, wurde das System endgültig auf humane Proben übertragen, sodass auch hier reproduzierbare Kraftmessungen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden konnten. Zunächst sollte das Messsystem, durch Untersuchungen an Kardiomyozyten aus Donormyokard unter Standardbedingungen, auf seine Funktionalität und seine Vergleichbarkeit der Resultate mit Literaturwerten überprüft werden.

## 3.2 Wirkung von Calcium und Phosphat auf Donor-Kardiomyozyten

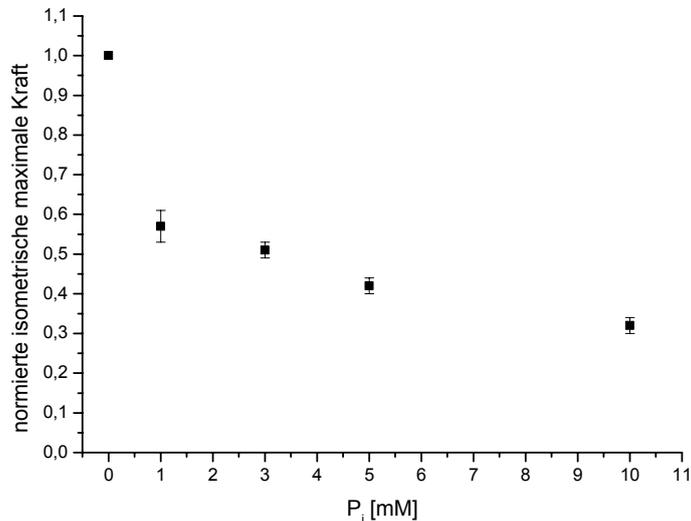
### 3.2.1 In Donor-Kardiomyozyten (Kontrolle) ist die isometrische Kraft calcium- und phosphatabhängig

Hier sollte zunächst überprüft werden welche Wirkung Calcium und Phosphat auf die maximale bzw. submaximale isometrische Krafterwicklung in permeabilisierten Kardiomyozyten hat. Im Herzmuskel ist die Wirkung von Calcium auf die Querbrückenkinetik umstritten (Hancock *et al.*, 1993; Hancock *et al.*, 1996) und der Effekt von Phosphat ist nur an Vorhofmyokard oder Kaninchenmyokard kaum untersucht worden (Schmidt-Ott *et al.*, 1990; Homsher und Millar, 1993). Besteht eine Abhängigkeit der Kraft und der Querbrückenkinetik von Calcium und Phosphat in permeabilisierten humanen Kardiomyozyten? Um diese Frage zu beantworten wurden pCa-Reihen (also Kraftmessungen bei verschiedenen freien Calciumkonzentrationen) bei 15 °C gemessen, bei denen kein Phosphat bzw. Phosphatkonzentration von 1 mM, 3 mM, 5 mM und 10 mM eingesetzt wurden ( $P_i$  0, 1, 3, 5, 10). Während dieses Experiments wurde die jeweilige Herzzelle einem Wechsel aus lastfreier isotonischer Verkürzung und Rückdehnung auf die zuvor eingestellte Länge, bei der die Zelle eine Ausgangssarkomerlänge von 2.2  $\mu\text{m}$  hat, unterzogen. Zur Bestimmung der aktiven Kraft, erzeugt von Myosinköpfen, musste noch die passive Kraft, welche in pCa-Lösung 9.0 nach lastfreier Verkürzung gemessen wurde und zum größten Teil vom Titin herrührt, subtrahiert werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1 dargestellt. Betrachtet man zunächst die Kraftmessungen ohne Phosphatzugabe, so zeigte der Kurvenverlauf die Kooperativität in der Aktivierung des dünnen Filaments bei steigender Calciumkonzentration. Mit sinkender Calciumkonzentration sank auch die isometrische Kraft von  $17.91 \pm 1.52 \text{ kN/m}^2$  bei pCa 4.5 auf  $0.14 \pm 0.03 \text{ kN/m}^2$  bei pCa 9.0 ohne Phosphatzugabe (Abb. 3.1 schwarze Kurve). Anhand dieser Kurve wurde ersichtlich, dass im Bereich submaximaler Kraft durch kleine Änderungen in der Calciumkonzentration große Kraftänderungen hervorgerufen werden können. Fast die gesamte Kraftabstufung fand im Bereich zwischen pCa 5 und pCa 6 statt. Diese Calciumabhängigkeit des Kurvenverlaufs blieb auch bei Zugabe von Phosphat weiter bestehen. Auch konnte klar nachgewiesen werden, dass die Kraft phosphatabhängig ist (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Bereits bei einer Zugabe von 1 mM Phosphat ( $P_i$ 1) sank die Kraft auf  $57 \pm 4\%$  ab, wie in der Abbildung 3.2 ersichtlich. Bei  $P_i$  3 sank die Kraft auf  $51 \pm 2\%$ , bei  $P_i$  5 auf  $42 \pm 2\%$  und bei  $P_i$  10 sogar auf  $32 \pm 2\%$ . Somit zeigte die isometrische Kraft, gemessen an permeabilisierten Kardiomyozyten, eine Abhängigkeit von Calcium und auch von Phosphat.



**Abb. 3.1: Die Kraft-Calcium-Beziehung mit und ohne Phosphatzugabe**

Beziehung zwischen der isometrischen Kraft ( $\text{kN/m}^2$ )  $\pm$  SEM und der Calciumkonzentration für jede Phosphatkonzentration.  $n=11$



**Abb. 3.2: Reduktion der maximalen isometrischen Kraft durch Phosphatzugabe.**

Auswirkungen der Phosphatkonzentration [mM] auf die normierte isometrische Kraft  $\pm$  SEM. Auf  $F_{\max}$  ohne Phosphatzugabe wurden alle anderen isometrischen Kraftwerte normiert. Die isometrische Kraft sank bei einer Phosphatkonzentration von 10 mM um ca. 68%.  $n=11$

### 3.2.2 In Donor-Kardiomyozyten ist die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ ) phosphatabhängig

Calcium kontrolliert die Kraftentwicklung, indem es durch die Bindung an Troponin C die Freigabe möglicher Querbrückenbindungsstellen für die hochaffine Bindung der Myosinköpfe am Aktin induziert. Es sollte untersucht werden, ob die Calciumempfindlichkeit der Kardiomyozyten, durch die Erhöhung der Phosphatkonzentration, verändert wird.

Die Calciumempfindlichkeit, angegeben als  $pCa_{50}$ , d.h. jene Calciumkonzentration bei der 50% der maximalen Kraft erreicht sind, zeigte hier eine gewisse Abhängigkeit von Phosphat (Abb. 3.3; Tab. 3.1). Im Vergleich der Kurve ohne Phosphatzugabe zu den Kurven mit Phosphatzugabe, konnte eine Rechtsverschiebung beobachtet werden. Diese Rechtsverschiebung zeigte sich bereits mit 1 mM Phosphat um  $\Delta pCa_{50} = 0.06$  pCa Einheiten und verstärkte sich nochmals bei 3 mM Phosphat um  $\Delta pCa_{50} = 0.09$  pCa Einheiten (Tab. 3.1). Darüber hinaus konnte keine wesentliche Rechtsverschiebung bei weiterer Phosphatgabe detektiert werden. Auch die Kooperativität, definiert als Hill-Koeffizient (nH), welcher die Steilheit der Kurven angibt, zeigte hier keine signifikante Veränderung mit Phosphaterhöhung. Lediglich bei 3 mM Phosphat im Vergleich zur Messung ohne Phosphatzugabe konnte eine signifikante Veränderung nachgewiesen werden.

**Tab. 3.1 –  $pCa_{50}$  in Abhängigkeit von der zugegebenen Phosphatkonzentration**

$P_i$ [mM]	$pCa_{50}$	nH
$P_i 0$	$5.70 \pm 0.02$	$2.68 \pm 0.09$
$P_i 1$	$5.64 \pm 0.02$ *	$2.47 \pm 0.13$
$P_i 3$	$5.61 \pm 0.02$ ***	$2.20 \pm 0.10$ **
$P_i 5$	$5.61 \pm 0.02$ ***	$2.96 \pm 0.60$
$P_i 10$	$5.61 \pm 0.02$ **	$2.74 \pm 0.34$

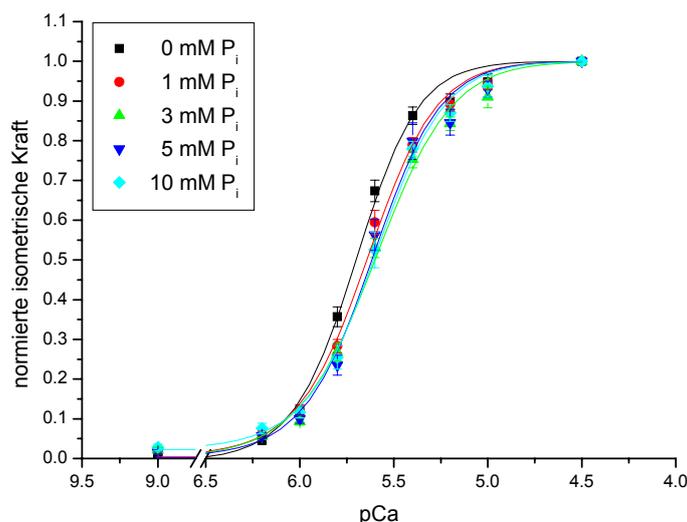
$P_i$ : anorganisches Phosphat; nH: Hill-Koeffizient (Kooperativität/Steilheit der Kurve)

Werte  $\pm$  SEM; n=11

\* bedeutet einen  $p < 0.05$  im Unterschied zum  $pCa_{50}$  Wert ohne Phosphatzugabe ( $P_i 0$ )

\*\* bedeutet einen  $p < 0.01$  im Unterschied zum  $pCa_{50}$  Wert ohne Phosphatzugabe ( $P_i 0$ )

\*\*\* bedeutet einen  $p < 0.001$  im Unterschied zum  $pCa_{50}$  Wert ohne Phosphatzugabe ( $P_i 0$ )



**Abb. 3.3: Auswirkung der Phosphatzugabe auf die Calciumempfindlichkeit der isometrischen Kraft.**

Gezeigt ist die Beziehung zwischen normierter isometrischer Kraft  $\pm$  SEM und der Calciumkonzentration (pCa) für jede Phosphatkonzentration. Die Kraft pro Phosphatkonzentration ist, relativ zu der von der Zelle erreichten maximalen Kraft (pCa 4.5), normiert angegeben. Der pCa<sub>50</sub> war ohne Phosphatzugabe  $5.70 \pm 0.02$  und bei 10 mM  $5.61 \pm 0.02$ . Somit ergab sich eine Rechtsverschiebung von  $\Delta pCa_{50} = 0.09$  pCa Einheiten.  $n = 11$

### 3.2.3 In Donor-Kardiomyozyten ist die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ) calciumabhängig

Die Geschwindigkeitskonstante für den Kraftwiederanstieg ( $k_{tr}$ ) nach einer Phase der lastfreien Verkürzung und Rückdehnung auf die Ausgangslänge ist ein wichtiger Indikator für die Turnoverkinetik des Querbrückenzyklus im Skelettmuskel (Brenner, 1988) und wurde bislang am menschlichen Myokard wenig untersucht. Nicht zuletzt deswegen, weil die Bestimmung besonders bei geringen Calciumkonzentrationen schwierig ist. In dieser Arbeit sollte  $k_{tr}$  für humane Kardiomyozyten bestimmt werden, sowie deren Abhängigkeit von Calcium, da hier widersprüchliche Aussagen vorliegen (Hancock *et al.*, 1993).

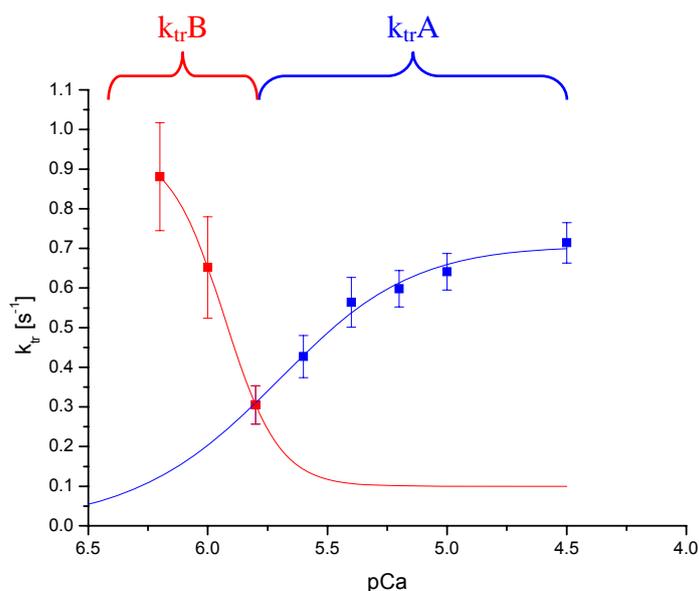
Durch das hier etablierte Messsystem und die speziellen Messprotokolle war es nun erstmals möglich auch bei sehr geringen Calciumkonzentrationen (pCa 6.2)  $k_{tr}$  zu bestimmen (Abb. 3.4). Bei Betrachtung der in Abbildung 3.4 dargestellten  $k_{tr}$ -Werte (ohne Phosphatzugabe) ist eine deutliche Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der freien Calciumkonzentration zu beobachten, anders als von Hancock *et al.* (1993) beschrieben. Zunächst verhielt sich  $k_{tr}$  wie im Kaninchenmuskel bereits gezeigt und wurde mit sinkender Calciumkonzentration kleiner (Brenner, 1988). In Abbildung 3.4 ist  $k_{tr}$  bei

pCa 4.5  $0.71 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$  und sank mit abnehmender Calciumkonzentration auf  $0.31 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$  bei pCa 5.8 (Abb. 3.4). Interessanterweise stieg  $k_{tr}$  ab einem pCa-Wert von 5.8 mit weiter abnehmender Calciumkonzentration sogar steiler an als sie zuvor gefallen war und erreichte einen Wert von  $0.88 \pm 0.14 \text{ s}^{-1}$  bei pCa 6.2. Für pCa 9.0 konnte kein  $k_{tr}$  bestimmt werden, da hier keine aktive Kraftentwicklung nachweisbar war. Messungen mit 2,3-Butandion Monoxim (BDM), einem Inhibitor für den aktiven Turnover der Querbrücken, zeigten (vgl. Kapitel 2.2.5.1; Abb. 2.9), dass die Myosinköpfe bei dieser geringen Calciumkonzentration nicht mehr aktiv waren, sodass hier die sehr geringen Kräfte auf Rückstellkräfte, also passive Komponenten wie beispielsweise Titin, zurückzuführen sind (LeWinter *et al.*, 2007).

Somit wurden hier erstmals zwei Komponenten der  $k_{tr}$ -Calcium-Beziehung gefunden, die eine unterschiedliche Abhängigkeit von Calcium aufweisen und hier fortan in  $k_{trA}$  für den pCa-Bereich 4.5 bis 5.8 und  $k_{trB}$  für den pCa-Bereich ab pCa 5.8 bis 6.2 eingeteilt werden.

$k_{trA}$ : nimmt ab mit abnehmender Calciumkonzentration

$k_{trB}$ : nimmt zu mit abnehmender Calciumkonzentration



**Abb. 3.4: Calciumeffekt auf die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ).**

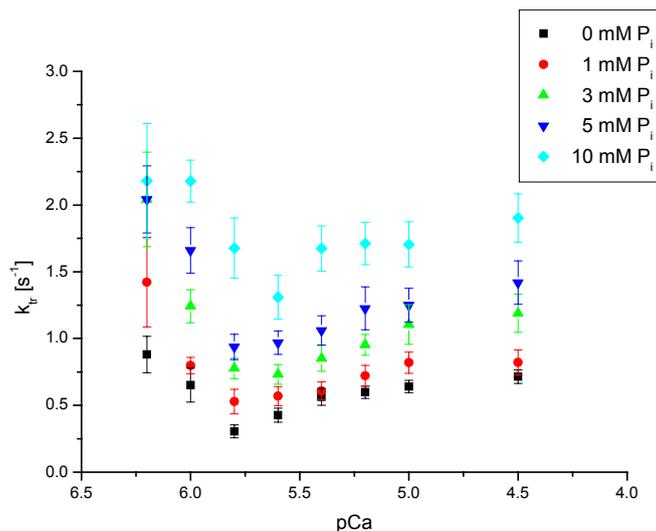
Beziehung zwischen  $k_{tr}$  [ $\text{s}^{-1}$ ]  $\pm$  SEM und Calciumkonzentration ohne Phosphatzugabe ( $P_i$ 0).

In blau ist der Bereich für die Komponente  $k_{trA}$  dargestellt, in dem die Geschwindigkeitskonstanten des Kraftwiederanstiegs bei Calciumabnahme verlangsamt werden. Der rote Bereich zeigt die Komponente  $k_{trB}$ , in dem die Geschwindigkeitskonstanten des Kraftwiederanstiegs bei weiterer Calciumabnahme erhöht werden. Unter der Annahme, dass  $k_{trA}$  bei pCa 9.0 gegen  $0 \text{ s}^{-1}$  geht und  $k_{trB}$  bei pCa 4.5 gegen  $0.1 \text{ s}^{-1}$ , wurden diese Komponenten an eine sigmoid verlaufende Kurve gefittet.

n=11

### 3.2.4 In Donor-Kardiomyozyten beschleunigt Phosphat die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ )

Die als  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  beschriebenen Komponenten der Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs wurden auf ihre Phosphatabhängigkeit untersucht. Dazu wurden die zuvor in Abbildung 3.4 durchgeführten Experimente um Messungen mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen erweitert. Wie in Abbildung 3.5 gezeigt, war die Calciumabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante über die verschiedenen Calciumkonzentrationen unter Phosphatzugabe ähnlich zum Ansatz ohne Phosphatzugabe. Die Größe der Geschwindigkeitskonstante stieg jedoch bei maximaler Calciumkonzentration (pCa 4.5) von  $P_i0$  mit  $0.71 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$  auf  $1.90 \pm 0.18 \text{ s}^{-1}$  bei  $P_i10$  signifikant an (Tab. 3.2), was einer ca. dreifachen Beschleunigung der  $k_{tr}$  entsprach. Das heißt die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs weist, neben der bereits im Kapitel 3.2.3 erläuterten Calciumabhängigkeit, auch eine Phosphatabhängigkeit auf (Abb. 3.6). Diese Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration lässt sich gut anhand des Modells von Huxley (1957) modifiziert von Brenner (1986b) erklären. Da mit steigender Phosphatkonzentration die Rückbindung von Phosphat in die nukleotidbindende Tasche des Myosins begünstigt wird, steigt die Rückreaktion von den kraftgenerierenden Zuständen in die nicht-kraftgenerierenden Zustände an. Dies hat somit eine Vergrößerung von  $f_{app}$  zur Folge, wodurch sich auch  $k_{tr}$  erhöht. Die Calciumabhängigkeit von  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  blieb mit steigender Phosphatkonzentration annähernd gleich, d. h. die Calciumabhängigkeit wird von Phosphat nicht beeinflusst. Der Übergang zwischen den Komponenten  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  scheint jedoch von der Phosphatkonzentration abhängig zu sein. Bei 1, 3 und 5 mM Phosphat war der Wendepunkt zwischen beiden Komponenten bei pCa 5.8, bei  $P_i10$  lag er jedoch schon bei pCa 5.6. Bei näherer Betrachtung war die Streuung hier recht groß, sodass der Wendepunkt zwischen  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  nicht genau bestimmt werden konnte und im Bereich zwischen pCa 5.6 und pCa 5.8 lag.



**Abb. 3.5: Phosphateffekt auf die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs.**

Beziehung zwischen  $k_{tr}$  [ $s^{-1}$ ]  $\pm$  SEM und Calciumkonzentration ohne ( $P_i 0$ ) und mit 1, 3, 5 und 10 mM Phosphat. Bei allen Phosphatkonzentrationen waren die Komponenten  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  erkennbar.  $n=11$

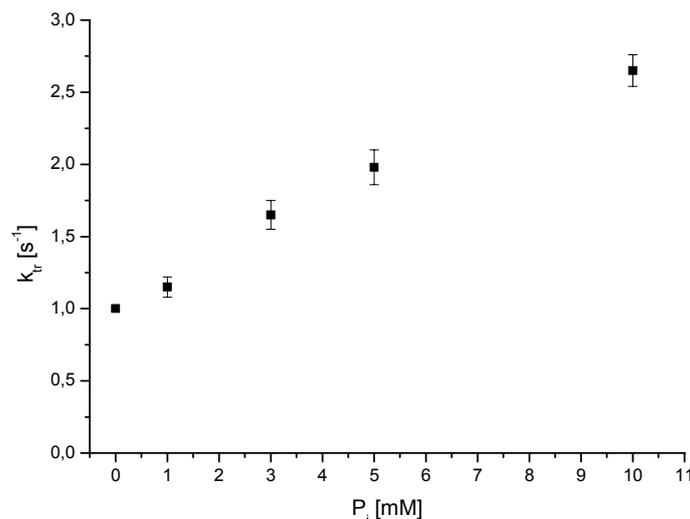
**Tab. 3.2 – Signifikante Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der zugegebenen Phosphatkonzentration**

$P_i$ [mM]	$k_{tr \max}$
$P_i 0$	$0.71 \pm 0.05$
$P_i 1$	$0.82 \pm 0.09$
$P_i 3$	$1.19 \pm 0.14^{**}$
$P_i 5$	$1.42 \pm 0.16^{***}$
$P_i 10$	$1.90 \pm 0.18^{***}$

$k_{tr \max}$  zeigt die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs bei maximaler Aktivierung (pCa 4.5). Werte  $\pm$  SEM;  $n=11$

\*\* bedeutet einen  $p < 0.01$  im Unterschied zum  $pCa_{50}$  Wert ohne Phosphatzugabe ( $P_i 0$ )

\*\*\* bedeutet einen  $p < 0.001$  im Unterschied zum  $pCa_{50}$  Wert ohne Phosphatzugabe ( $P_i 0$ )



**Abb. 3.6: Beschleunigung der Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ) mit steigender Phosphatkonzentration.**

Auswirkung einer Phosphaterhöhung auf  $k_{tr}$  [ $s^{-1}$ ]  $\pm$  SEM in pCa-Lösung 4.5. Auf den  $k_{tr}$  ohne Phosphatzugabe wurden alle anderen  $k_{tr}$  normiert.  $k_{tr}$  stieg bei einer Phosphatkonzentration von 10 mM um fast das dreifache an.  $n=11$

### 3.3 Donor versus Herzinsuffizienz

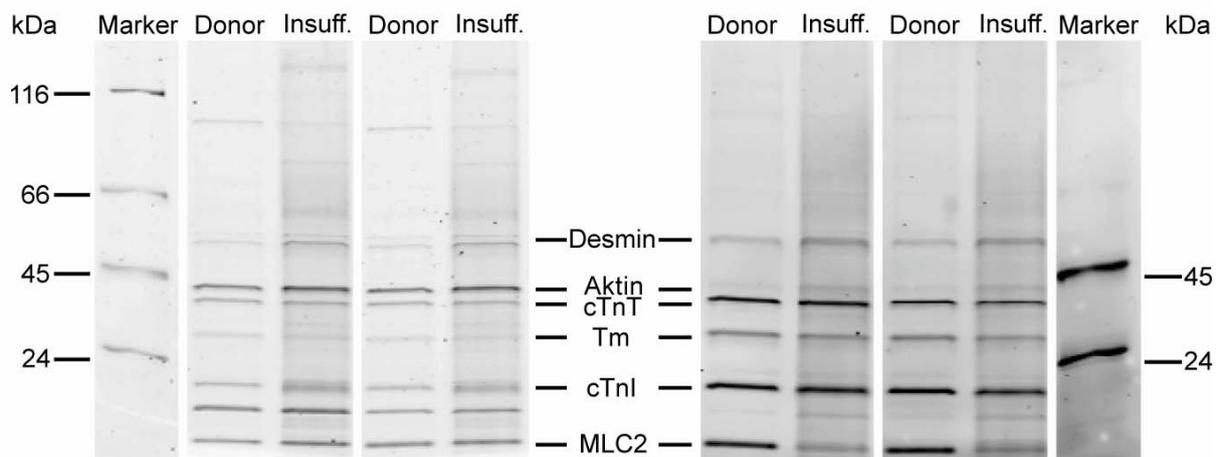
#### 3.3.1 Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von sarkomerischen Proteinen aus Donormyokard und aus insuffizientem Myokard

Für Kardiomyozyten aus Donormyokard wurde eine starke Abhängigkeit von  $F_{max}$ ,  $pCa_{50}$  und  $k_{tr}$  von Calcium und Phosphat beobachtet. Diese Erkenntnisse sollten nun in Bezug zu Messungen am insuffizienten Herzen gesetzt werden, um Aufschluss über die Auswirkungen einer Insuffizienz auf die Funktion der Kardiomyozyte zu erlangen. Um die Proben hinsichtlich veränderter Phosphorylierung sarkomerischer Proteine charakterisieren zu können, wurden eindimensionale (1D)-Gelelektrophoresen von Proben des Donormyokards und des insuffizienten Herzens durchgeführt (Abb. 3.7). Durch eine spezifische Färbung des Gels mit ProQ wurden ausschließlich phosphorylierte Proteine sichtbar gemacht. In einem weiteren Schritt via SyproRuby-Färbung erfolgte dann die Färbung sämtlicher im Gel befindlichen Proteine der mechanisch aufgeschlossenen und mit Triton X-100 behandelten Herzproben. Durch die SyproRuby-Färbung konnten in beiden Proben Desmin, Aktin, kardiales Troponin T (cTnT), Tropomyosin (Tm) und kardiales Troponin I (cTnI) und die regulatorische Myosin-Leichte-Kette 2 (MLC-2) detektiert werden (Abb. 3.7 A).

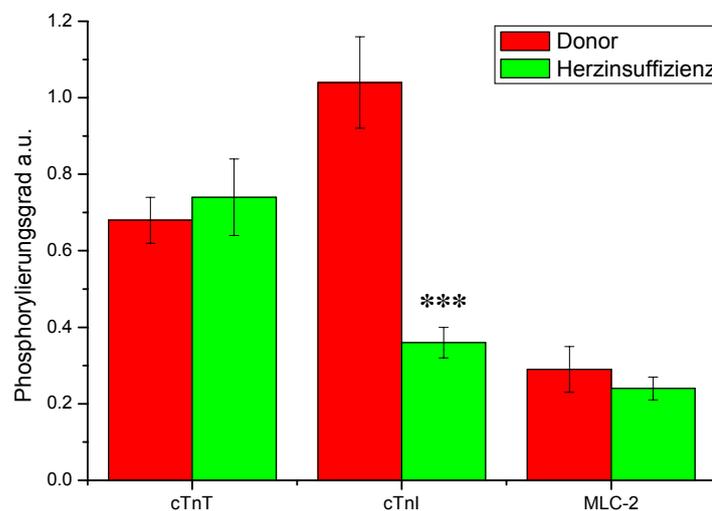
In der ProQ-Färbung zeigte sich, dass der Phosphorylierungsgrad von cTnT und Tm in beiden Proben ähnlich war. MLC-2 war im Donormyokard etwas stärker phosphoryliert, als im insuffizienten Herzen, wie die Auswertung mehrerer Gele ergab (Abb. 4.8 B). Die Phosphorylierung von cTnI hingegen war stark signifikant reduziert im insuffizienten Herzen, verglichen zum Donormyokard.

Mittels 2D-Gelelektrophorese wurde der Phosphorylierungsstatus der MLC-2-Isoformen untersucht. Im 2D-Gel werden die Proteine nicht nur nach Größe getrennt, sondern auch nach ihrem isoelektrischen Punkt, mittels pH-Gradienten (Abb. 3.8). Dies ermöglicht es, unphosphorylierte MLC-2-Isoformen von phosphorylierten MLC-2-Isoformen zu unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass beide MLC-2 Isoformen im insuffizienten Herzen signifikant geringer phosphoryliert waren als im Donormyokard und dementsprechend der Anteil unphosphoryliertes MLC-2 und MLC-2\* zunahm (Abb. 3.8 B). Die funktionellen Auswirkungen der Phosphorylierungsunterschiede, auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten, wurden durch mechanische Messungen näher untersucht und werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

## A



## B



**Abb. 3.7: 1D-Gelelektrophorese zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von Sarkomerproteinen (cTnT, cTnI, MLC-2) nach der Permeabilisierung mit Triton X-100.**

A: Beispiel für ein 1D-Gel gefärbt mit SyproRuby (links) und mit ProQ-Färbung (rechts), flankiert mit einem Größenmarker [kDa] in jeweiliger Färbung.

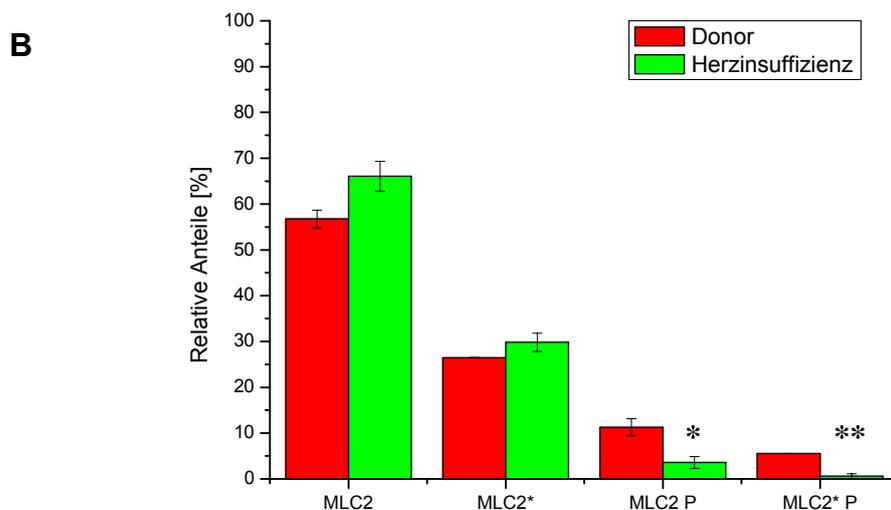
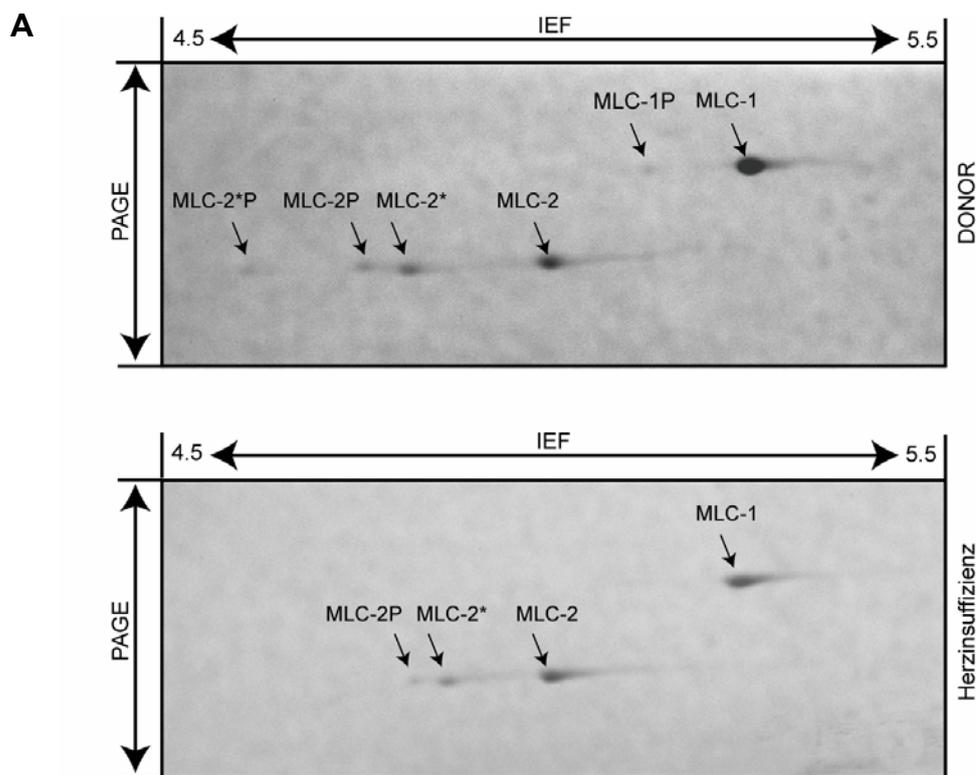
B: Auswertung von 12 Gelbahnen von 4 Gelen für Proben von Donor (rot) und Herzinsuffizienz (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Gelen [„arbitrary units“, a.u.]. In diesem Beispielgel erscheint die MLC-2 in der insuffizienten Myokardprobe stärker dephosphoryliert als cTnI. Dies war jedoch im Mittel bei allen Analysen nicht so deutlich ausgeprägt. Dennoch zeigte auch die 2D-Gelanalyse (vgl. Abb. 3.8) eine deutliche Dephosphorylierung der MLC-2.

cTnT-Banden: Donor n = 10; Herzinsuffizienz n = 11

cTnI-Banden: Donor n = 10; Herzinsuffizienz n = 10

MLC-2-Banden: Donor n = 10; Herzinsuffizienz n = 10

\*\*\* bedeutet einen  $p < 0.001$  im Unterschied zum Donormyokard



**Abb. 3.8: 2D-Gelelektrophorese zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus der MLC-2 nach der Permeabilisierung mit Triton X-100.**

A: Beispiel für ein 2D-Gel einer Myokardprobe aus Donor (oben) und aus Herzinsuffizienz (unten) gefärbt mit Coomassie. Horizontal wurden die Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes (IEF; pH 4.5-5.5) aufgetrennt. Vertikal erfolgte die Auftrennung über das Molekulargewicht der Proteine.

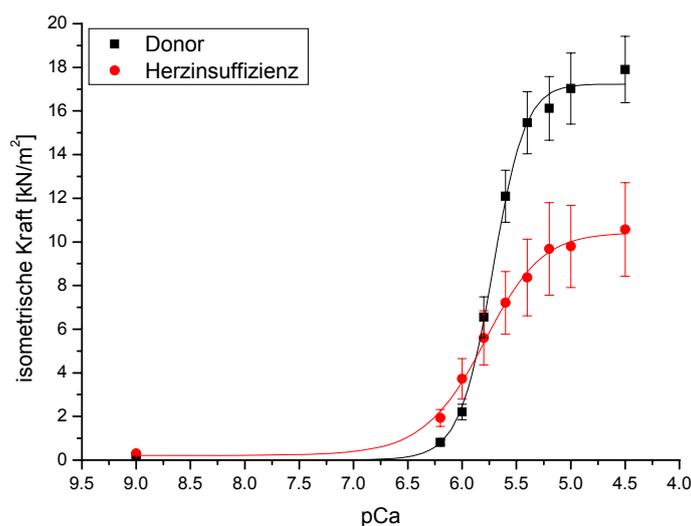
B: Auswertung der 2D-Gele von Proben aus Donormyokard (rot) und aus insuffizienten Herzen (grün). Dargestellt sind jeweils die Anteile der jeweiligen Gruppe [in %] der MLC-2 Isoformen (MLC-2 und MLC-2\*) und der phosphorylierten Form dieser Isoformen (MLC-2 P und MLC-2\* P). Die Anteile wurden auf jeweils 100% MLC-2 normiert. Donor n = 2 Gele; Herzinsuffizienz n = 3 Gele

\* bedeutet einen  $p < 0.05$  im Unterschied zum Donormyokard

\*\* bedeutet einen  $p < 0.01$  im Unterschied zum Donormyokard

### 3.3.2 Die isometrische Kraft von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard ist im Vergleich zu Donor-Kardiomyozyten herabgesetzt

Die absolute Kraftentwicklung aufgetragen gegen die Calciumkonzentration (Abb. 3.9), zeigte dass die isometrischen Kräfte in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard bei pCa 4.5 bis 5.6 signifikant niedriger als in Kardiomyozyten aus Donormyokard lagen (Tab. 3.3). Ab pCa 6.0 bis 9.0 jedoch lagen die isometrischen Kräfte in Kardiomyozyten aus Donor niedriger als aus insuffizientem Myokard. Die maximale isometrische Kraft (pCa 4.5) von Kardiomyozyten aus Donormyokard betrug  $17.9 \pm 1.5 \text{ kN/m}^2$  und  $10.6 \pm 2.2 \text{ kN/m}^2$  bei Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard. Dies entsprach einer 40%igen Reduktion der maximalen isometrischen Kraft (Tab. 3.3). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Kraftmessungen von van der Velden et. al. die keinen Unterschied in der maximalen Kraft zwischen Donor- und Herzinsuffizienz-Kardiomyozyten finden konnten (van der Velden *et al.*, 2003b).



**Abb. 3.9: Vergleich der isometrischen Kraft von Kardiomyozyten aus Donor- und Herzinsuffizienzmyokard.**

Es wurden die isometrischen Kräfte als Funktion der Calciumkonzentration (pCa) aufgetragen. Die schwarze Kurve: Kardiomyozyten aus Donor; rote Kurve: Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard. Der Mittelwert der maximalen isometrischen Kraft für Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard lag bei  $10.6 \pm 2.2 \text{ kN/m}^2$  und für Donor-Kardiomyozyten bei  $17.9 \pm 1.5 \text{ kN/m}^2$ , was einer Reduktion der isometrischen Kraft von ca. 40% bei Herzinsuffizienz-Kardiomyozyten entsprach.

Donor n = 11; Herzinsuffizienz n = 7

**Tab. 3.3 – Vergleich der isometrischen Kraft zwischen Kardiomyozyten aus Donor- und insuffizientem Myokard**

pCa	Donor F [kN/m <sup>2</sup> ]	Herzinsuffizienz F [kN/m <sup>2</sup> ]
4.5	17.9 ± 1.5	10.6 ± 2.2 *
5.0	17.0 ± 1.6	9.8 ± 1.9 *
5.2	16.1 ± 1.5	9.7 ± 2.1 *
5.4	15.5 ± 1.4	8.4 ± 1.8 **
5.6	12.1 ± 1.2	7.2 ± 1.4 *
5.8	6.6 ± 0.9	5.6 ± 1.2
6.0	2.2 ± 0.4	3.7 ± 0.9
6.2	0.8 ± 0.1	1.9 ± 0.4 **

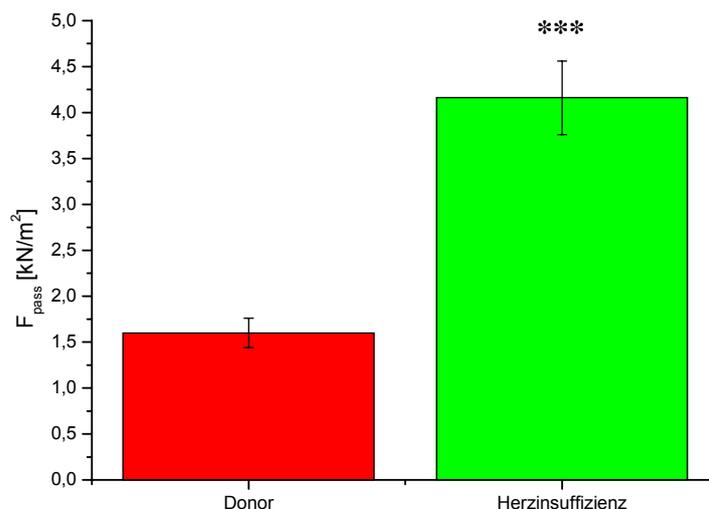
F gibt die gemittelte Kraft pro pCa-Wert an. Werte ± SEM; Donor n = 11; Herzinsuffizienz n = 7

\* bedeutet einen p<0.05 im Unterschied zum Donor

\*\* bedeutet einen p< 0.01 im Unterschied zum Donor

### **3.3.3 Die passive Kraft von Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen ist im Vergleich zu Kardiomyozyten aus Donormyokard erhöht**

Auch die passiven Kräfte der Kardiomyozyten können bei Herzinsuffizienz verändert sein. Dies kann z.B. durch veränderte Titin-Phosphorylierung verursacht sein. Um dies für die hier untersuchten Kardiomyozyten aus Donor- und insuffizientem Myokard überprüfen zu können, wurde die passive Kraft der Zellen ermittelt. Diese wird unter Relaxationsbedingungen (pCa 9.0) gemessen. Bei isometrischen Kraftmessungen wurde grundsätzlich die passive Kraft subtrahiert, um nur die aktive, durch die Querbrücken erzeugte, Kraft zu ermitteln (vgl. Kapitel 2.2.4.5, Abb. 2.5). Die Gegenüberstellung der passiven Kräfte (Abb. 3.10) ergab eine signifikante Erhöhung der passiven Kraft von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard. Dabei war diese passive Kraft bei Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen mit  $4.2 \pm 0.4 \text{ kN/m}^2$  fast dreimal so hoch wie die passive Kraft der Donor-Kardiomyozyten mit  $1.6 \pm 0.2 \text{ kN/m}^2$ .



**Abb. 3.10: Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen haben im Vergleich zu Donor-Kardiomyozyten erhöhte passive Kraft.**

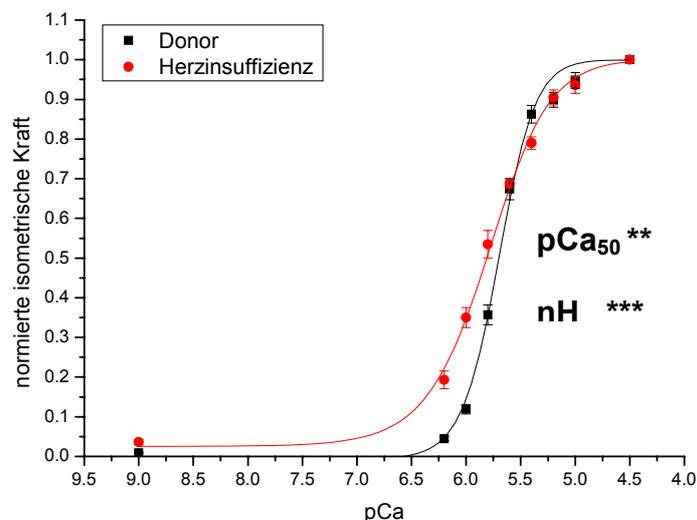
Aufgetragen ist die passive Kraft [kN/m<sup>2</sup>] von Donor- (rot) und Herzinsuffizienz-Kardiomyozyten (grün). Die passive Kraft wurde in einer Phase lastfreier Verkürzung unter Relaxationsbedingungen (pCa 9.0) bestimmt. Die passive Kraft für den Donor-Kardiomyozyten betrug  $1.6 \pm 0.2$  kN/m<sup>2</sup> und für Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard lag sie signifikant höher bei  $4.2 \pm 0.4$  kN/m<sup>2</sup> (SEM).

Donor n = 11; Herzinsuffizienz n = 7

\*\*\* bedeutet einen  $p < 0.001$  im Unterschied zum Donor

### 3.3.4 Die Calciumempfindlichkeit (pCa<sub>50</sub>) von Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen ist im Vergleich zu Donor-Kardiomyozyten erhöht

Die Auswirkungen, der in Kapitel 3.3.1 ermittelten Veränderungen in der Phosphorylierung sarkomerischer Proteine, wurden nun auch auf funktioneller Ebene in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard untersucht. Im Vergleich der Calciumempfindlichkeit (pCa<sub>50</sub>) von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard mit Donormyokard konnte eine unterschiedliche Calciumabhängigkeit beobachtet werden (Abb. 3.11). Es zeigte sich eine deutliche Linksverschiebung der Kraft-Calcium-Beziehung bei Herzinsuffizienz (Abb. 3.11, rot) im Vergleich zum Donor (Abb. 3.11, schwarz). Der Unterschied der Calciumempfindlichkeit betrug dabei  $\Delta pCa_{50} = 0.096$  pCa Einheiten. Der Hill-Koeffizient, welcher Hinweise auf die kooperative Aktivierung des Aktinfilaments gibt, war in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard, in dieser Messserie, mit  $1.58 \pm 0.05$  signifikant geringer, als im Donormyokard mit  $2.68 \pm 0.09$ .



**Abb. 3.11: Der Vergleich der Calciumempfindlichkeit zwischen Kardiomyozyten aus Donor- und aus Herzinsuffizienzmyokard.**

Aufgetragen ist die normierte isometrische Kraft von Kardiomyozyten aus Donormyokard (schwarze Kurve) und Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard (rote Kurve). Gemessen wurde eine Calciumempfindlichkeit von  $pCa_{50} = 5.70 \pm 0.02$  (SEM) für Donor-Kardiomyozyten und eine erhöhte Calciumempfindlichkeit von  $pCa_{50} = 5.80 \pm 0.02$  (SEM) bei Herzinsuffizienz. Somit ergab sich eine Linksverschiebung von  $\Delta pCa_{50} = 0.096$  pCa Einheiten. Donor  $n = 11$ ; Herzinsuffizienz  $n = 7$

\*\* bedeutet einen  $p < 0.01$  im Unterschied zum Donormyokard.

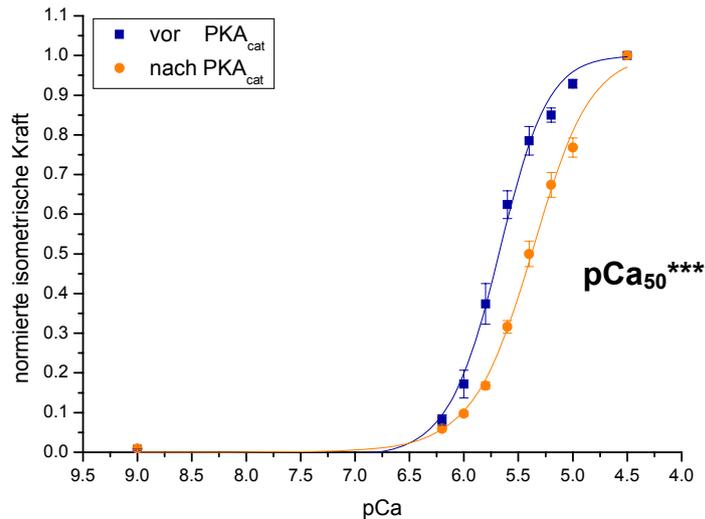
\*\*\* bedeutet einen  $p < 0.001$  im Unterschied zum Donormyokard.

### 3.4 Proteinkinase A - Effekt auf Kardiomyozyten aus Herzinsuffizienzmyokard

Sämtliche unter 3.4 beschriebenen Experimente mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A ( $PKA_{cat}$ ) wurden mit einer anderen Lösungscharge durchgeführt, sodass quantitative Vergleiche der hier gemessenen Werte ( $F$ ,  $pCa_{50}$ ,  $k_{tr}$ ) mit anderen in der Arbeit durchgeführten Messungen nicht möglich sind. Geringfügige Änderungen in der freien Calciumkonzentration führten hier schon zu deutlichen Verschiebungen der Kraft-pCa-Kurven. Das  $PKA_{cat}$ -Experiment ist somit in sich und unabhängig von den anderen Absolutwerten zu betrachten. Mit den hier beschriebenen Experimenten sollte der Effekt einer veränderten Phosphorylierung durch  $PKA_{cat}$  auf Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard gezeigt werden.

### 3.4.1 Die Wirkung einer Inkubation mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA<sub>cat</sub>) auf die Calciumempfindlichkeit der Kardiomyozyten

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der cAMP aktivierten Proteinkinase A (PKA) bei Herzinsuffizienz heruntergeregelt ist (Wolff *et al.*, 1996; LeWinter, 2005). Die PKA phosphoryliert neben kardialen Troponin I (cTnI) auch Titin und das kardiale Myosin-bindende Protein C (cMyBP-C). Von besonderem Interesse hier war der Phosphorylierungsstatus des cTnI, da dessen Veränderung großen Einfluss auf die Calciumempfindlichkeit nimmt (van der Velden *et al.*, 2003b). Daher wurden Kraftmessungen an Kardiomyozyten aus insuffizienten Herzen vor und nach Inkubation mit PKA<sub>cat</sub> durchgeführt (Abb. 3.12). Im Vergleich der gemessenen Kraft-pCa-Kurven mit und ohne PKA<sub>cat</sub>-Inkubation (Abb. 3.12, schwarz und rot) zeigte sich eine deutliche Rechtsverschiebung, also eine Verringerung der Calciumempfindlichkeit. Der pCa<sub>50</sub>-Wert verringerte sich von  $5.69 \pm 0.04$  vor der PKA<sub>cat</sub>-Inkubation auf  $5.38 \pm 0.02$  nach der Inkubation. Der Hill-Koeffizient wurde hier ebenfalls bestimmt. Er sank von  $2.10 \pm 0.15$  ohne PKA<sub>cat</sub>-Inkubation auf  $1.68 \pm 0.09$  mit PKA<sub>cat</sub>-Inkubation. Die hier, gegenüber im Kapitel 3.2 beschriebenen Messungen, veränderten Werte für pCa<sub>50</sub> (und Hill-Koeffizient) waren auf verschiedene Chargen der calciumhaltigen Aktivierungslösungen zurückzuführen. Aus der Literatur ist bekannt, dass PKA<sub>cat</sub> bei Donor-Kardiomyozyten nur eine geringe Rechtsverschiebung der pCa-Kurve verursacht, sodass nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den pCa-Kurven für Kardiomyozyten aus Donor- und Herzinsuffizienzmyokard besteht (van der Velden *et al.*, 2003b).



**Abb. 3.12: Inkubation von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard mit der katalytischen Untereinheit der PKA (PKA<sub>cat</sub>) verringert die Calciumempfindlichkeit.**

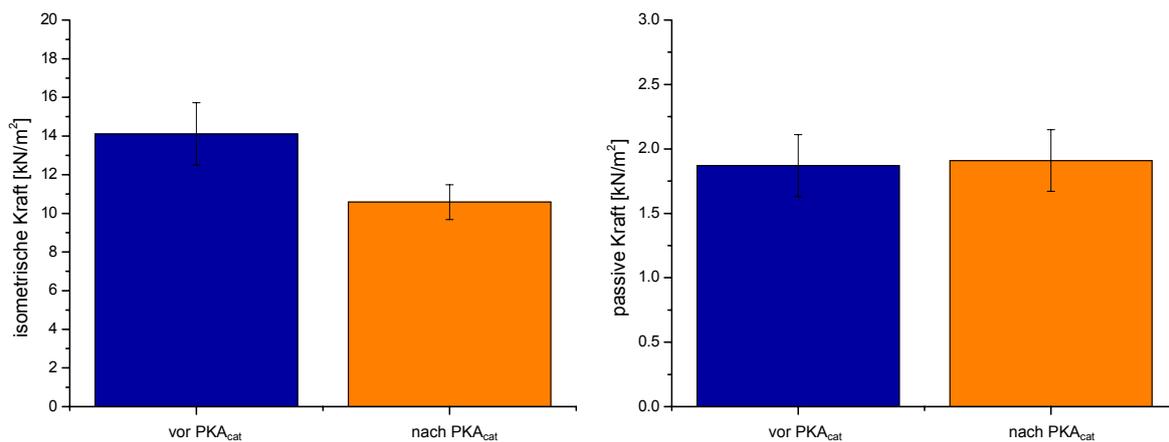
Aufgetragen ist die normierte isometrische Kraft als Funktion der Calciumkonzentration (pCa).

blaue Kraft-Kurve zeigt: vor der PKA<sub>cat</sub>-Inkubation; orangefarbene Kraft-Kurve: nach der PKA<sub>cat</sub>-Inkubation. Es ergab sich eine Änderung der Calciumempfindlichkeit von  $pCa_{50} = 5.69 \pm 0.04$  vor der PKA<sub>cat</sub>-Inkubation auf  $5.38 \pm 0.02$  und somit eine Rechtsverschiebung um  $\Delta pCa_{50} = 0.31$  pCa Einheiten.  $n = 10$

\*\*\* bedeutet einen  $p < 0.001$  im Unterschied im  $pCa_{50}$  Wert nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation.

### 3.4.2 Inkubation mit PKA<sub>cat</sub> verändert nicht die aktive und die passive Maximalkraft in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard

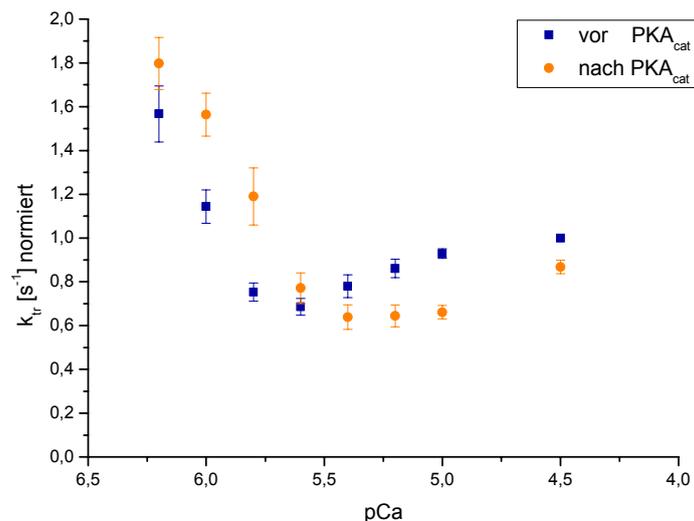
Im Zuge der unter 3.4.1 durchgeführten Inkubation mit PKA<sub>cat</sub> wurde auch deren Einfluss auf die maximale Kraftentwicklung bei pCa 4.5 sowie auf die passive Kraft bei pCa 9.0 untersucht. In Abbildung 3.13 sind die Werte für die aktiv entwickelte isometrische Kraft ( $F_{act}$ ) und die passive isometrische Kraft ( $F_{pass}$ ) der Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard vor und nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede vor und nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation in  $F_{act}$  oder  $F_{pass}$  gefunden. Somit hatte eine Inkubation mit PKA<sub>cat</sub> keinen Einfluss auf die passive bzw. maximale aktive isometrische Kraft.



**Abb. 3.13: Einfluss einer Inkubation mit der katalytischen Untereinheit der PKA (PKA<sub>cat</sub>) auf die aktiv entwickelte und die passive isometrische Kraft in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard.** Links ist die maximale aktive isometrische Kraft vor (blau) bzw. nach (orange) PKA<sub>cat</sub>-Inkubation gezeigt. Rechts ist die passive Kraft vor (blau) bzw. nach (orange) PKA<sub>cat</sub>-Inkubation dargestellt. n = 10

### 3.4.3 Wirkung der PKA<sub>cat</sub> auf die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs

Eine wichtige Frage war, inwieweit die Querbrückenkinetik in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard verändert ist und welchen Einfluss eine PKA<sub>cat</sub>-Inkubation auf  $k_{tr}$  und damit auf die Komponenten  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  hat. In Abbildung 3.14 wurden die Werte für Messungen von  $k_{tr}$  an Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard vor und nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation dargestellt. Interessanterweise änderten sich die beiden Komponenten  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  unterschiedlich mit PKA<sub>cat</sub>-Inkubation. Die  $k_{tr}$ -Werte für  $k_{trA}$  lagen vor PKA<sub>cat</sub>-Inkubation alle höher als nach der PKA<sub>cat</sub>-Inkubation. Dieses Verhalten war ab dem Wendepunkt zwischen den Komponenten  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  entgegengesetzt. Hier lagen die Werte nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation höher als vor der PKA<sub>cat</sub>-Inkubation. Die Daten deuten daraufhin, dass eine Phosphorylierung der Proteine cTnI und cMyBP-C durch PKA<sub>cat</sub> einen verlangsamen Effekt auf  $k_{trA}$  hatte. Dem gegenüber steht die Komponente  $k_{trB}$ , welche sich durch PKA<sub>cat</sub>-Inkubation erhöhte. Das könnte bedeuten, dass  $k_{trB}$  anders auf cTnI Phosphorylierung reagiert bzw. durch ein anderes PKA<sub>cat</sub>-abhängiges Protein (cMyBP-C, Titin) beeinflusst wurde.



**Abb. 3.14: Einfluss einer Inkubation mit der katalytischen Untereinheit der PKA (PKA<sub>cat</sub>) auf k<sub>tr</sub> der Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard.**

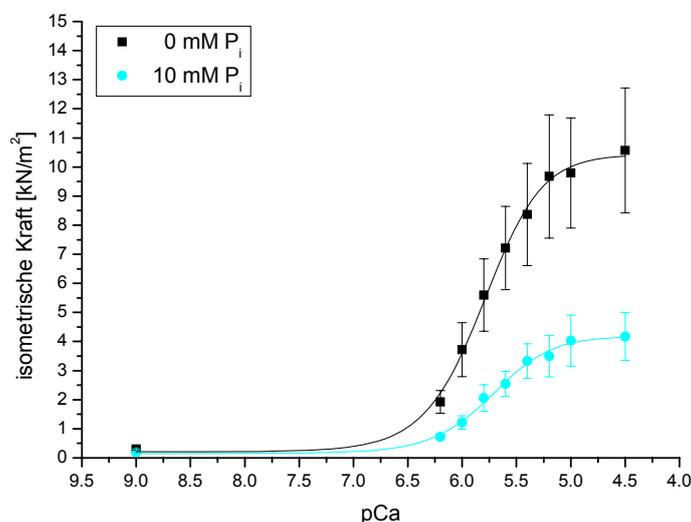
Beziehung zwischen k<sub>tr</sub> [s<sup>-1</sup>] und Calciumkonzentration vor und nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation (vor PKA<sub>cat</sub>-Inkubation = blau; nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation = orange). Es wurden sämtliche k<sub>tr</sub>-Werte nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation auf k<sub>tr</sub> vor PKA<sub>cat</sub>-Inkubation normiert. n = 10

### 3.5 Phosphateffekt auf Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard

#### 3.5.1 Phosphatzugabe reduziert die isometrische Kraft von Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen

Während einer Ischämie kommt es zu einer Unterversorgung des Herzens mit Sauerstoff, zur verminderten Produktion von ATP, via oxidativer Phosphorylierung, und zu einer Akkumulation von Phosphat (Allen und Orchard, 1987; Ebus *et al.*, 1994). Daher sollte die Auswirkung der Phosphatanreicherung bei Herzinsuffizienz auf die schon in Kardiomyozyten aus Donormyokard charakterisierten Parameter F (Abb. 3.1), pCa<sub>50</sub> (Abb. 3.3) sowie die k<sub>tr</sub> (Abb. 3.4) untersucht werden. Hierüber sollten auch etwaige Kompensationsmechanismen im insuffizienten Herzen aufgedeckt werden. Zunächst wurde die Wirkung von Phosphat auf die isometrische Kraft untersucht (Abb. 3.15). Dazu wurde an jeweils einer Zelle eine pCa-Reihe ohne Phosphatzugabe (P<sub>i</sub>0) und anschließend eine pCa-Reihe mit 10 mM Phosphat (P<sub>i</sub>10) gemessen. Es wurde hier lediglich die höchste Phosphatkonzentration gewählt, um ein unnötiges Strapazieren der Zelle, durch vermehrte Aktivierung, zu vermeiden. Es ergab sich wie auch beim Donor (Abb. 3.1) eine Kraftreduktion durch Phosphatzugabe. Bei Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard sank die maximale isometrische Kraft von 10.6 ± 2.2 kN/m<sup>2</sup> ohne Phosphatzugabe (P<sub>i</sub>0) auf 4.2 ± 0.8 kN/m<sup>2</sup> bei 10 mM Phosphat (P<sub>i</sub>10), was

einer Reduktion von ca. 60% entsprach. Diese Kraftreduktion war somit um 7% signifikant kleiner im Vergleich zum Donor ( $p < 0.01$ ; Abb. 3.1) Somit verhielt sich die isometrische Kraft der Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard nach Phosphatzugabe insgesamt ähnlich wie die von Kardiomyozyten aus Donormyokard (Abb. 3.1).



**Abb. 3.15 Die Beziehung zwischen isometrischer Kraft und Calciumkonzentration von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard.**

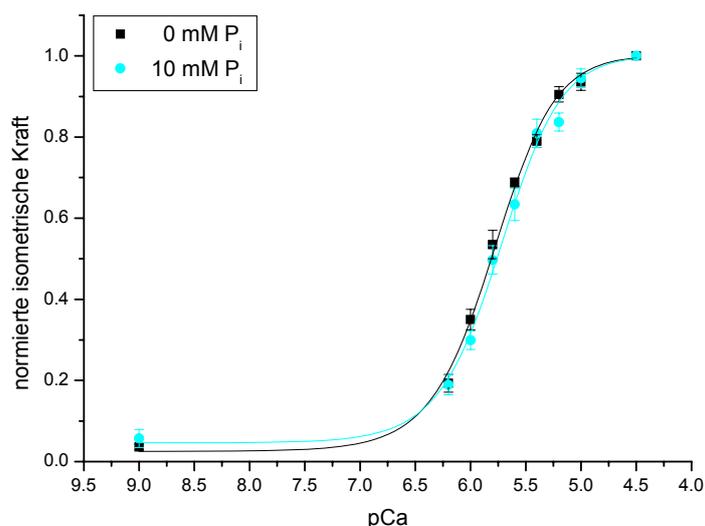
schwarze Kurve: ohne Phosphat

hellblaue Kurve: 10 mM Phosphat

Es wurde eine maximale isometrische Kraft von  $10.57 \pm 2.15 \text{ kN/m}^2$  ohne Phosphatzugabe ( $P_i0$ ) und  $4.17 \pm 0.82 \text{ kN/m}^2$  bei 10 mM Phosphat ( $P_i10$ ) gemessen.  $n = 7$

### 3.5.2 Phosphat hat kaum Einfluss auf die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ ) von Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen

In Abbildung 3.3 konnte in Donor-Kardiomyozyten eine signifikante Verschiebung der Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ ) durch Phosphatzugabe gezeigt werden. Dies war jedoch in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard nur tendenziell der Fall (Abb. 3.16). Es wurde eine Rechtsverschiebung der Kurve bei 10 mM Phosphat (Abb. 3.16, hellblau) um  $\Delta pCa_{50} = 0.06$  ermittelt, und damit eine Abnahme der Calciumempfindlichkeit. Allerdings war diese Verschiebung zwischen den beiden Kurven nicht signifikant. Auch die in Abbildung 3.3 gezeigte Veränderung der Kooperativität ( $nH$ ) konnte hier nicht beobachtet werden. Insgesamt lässt sich daher sagen, dass eine Anreicherung von Phosphat nicht den gleichen Effekt auf die Calciumempfindlichkeit bei Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard ausübte, wie er in Donor-Kardiomyozyten festgestellt werden konnte.



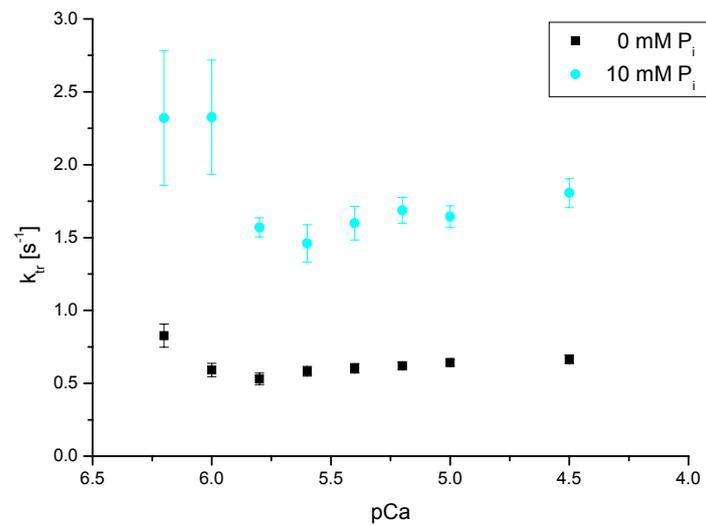
**Abb. 3.16: Die Wirkung von Phosphat auf die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ ) von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard.**

Die Beziehung zwischen normierter isometrischer Kraft und Calciumkonzentration ( $pCa$ ) ohne Phosphatzugabe ( $P_i0$ ) und bei 10 mM Phosphat ( $P_i10$ ) ist hier dargestellt.

Der  $pCa_{50}$  belief sich ohne Phosphatzugabe ( $P_i0$ ) auf  $5.79 \pm 0.06$  und bei 10 mM Phosphat ( $P_i10$ ) auf  $5.73 \pm 0.03$ . Somit ergab sich eine Rechtsverschiebung durch Phosphatzugabe von  $\Delta pCa_{50} = 0.06$   $pCa$  Einheiten, die jedoch nicht signifikant war.  $n = 7$

### 3.5.3 Phosphat beschleunigt die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ) im insuffizienten Herzen

Des Weiteren wurde die Wirkung von Phosphat auf die  $k_{tr}$  von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard untersucht. In Abbildung 3.17 ist die Beziehung zwischen Calciumkonzentration und  $k_{tr}$  ohne Phosphatzugabe ( $P_i0$ ) (schwarz) und mit 10 mM Phosphat ( $P_i10$ ) (hellblau) aufgetragen.  $k_{tr}$  war ohne Phosphatzugabe ( $P_i0$ ) in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard ähnlich wie in Donor-Kardiomyozyten. Auch hier waren die beiden Komponenten der  $k_{tr}$ -Calcium-Beziehung ( $k_{trA}$  und  $k_{trB}$ ) zu erkennen. Bei einer Erhöhung der Phosphatkonzentration auf 10 mM ( $P_i10$ ) stieg  $k_{tr}$  bei  $pCa$  4.5 von  $0.67 \pm 0.03$   $s^{-1}$  ohne Phosphatzugabe auf  $1.81 \pm 0.09$   $s^{-1}$ . Die beiden Komponenten  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  blieben erhalten. Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs für Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard ähnlich wie für Donor-Kardiomyozyten verhielt.



**Abb. 3.17: Phosphateffekt auf die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs für Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen.**

Die Beziehung zwischen  $k_{tr} [s^{-1}]$  und der Calciumkonzentration ohne Phosphatzugabe ( $P_i0$ ) und bei 10 mM Phosphat ( $P_i10$ ) ist hier dargestellt. Die Geschwindigkeitskonstante erhöht sich bei maximaler Aktivierung ( $pCa$  4.5) von  $P_i0$  zu  $P_i10$  von  $0.67 \pm 0.03 s^{-1}$  auf  $1.81 \pm 0.09 s^{-1}$ .  $n = 7$

### 3.6 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden:

- humane Kardiomyozyten aus Donormyokard (Kontrolle) zeigten eine calciumabhängige Kraftentwicklung und Querbrückenkinetik
- $k_{tr}$  zeigte unterschiedlich calciumabhängige Komponenten ( $k_{trA}$  und  $k_{trB}$ );  $k_{tr}$  erreichte ein Minimum etwa bei  $pCa$  5.8 und eine maximale Geschwindigkeit bei sehr geringer Calciumkonzentration
- in Gegenwart von erhöhter Phosphatkonzentration nahm die maximale Kraftentwicklung ab und die Querbrückenkinetik änderte sich, d.h.  $k_{tr}$  wurde abhängig von der Phosphatkonzentration schneller; die beiden Komponenten der  $k_{tr}$ -Calcium-Beziehung blieben erhalten und die Calciumempfindlichkeit wurde geringfügig kleiner
- Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard wiesen neben einer reduzierten Phosphorylierung von cTnI und MLC-2 eine erhöhte Calciumempfindlichkeit gegenüber Donor-Kardiomyozyten auf; durch Inkubation mit der katalytischen Untereinheit der PKA ( $PKA_{cat}$ ) wurde die erhöhte Calciumempfindlichkeit kompensiert
- $PKA_{cat}$ -Inkubation veränderte beide Komponenten der  $k_{tr}$ -Calcium-Beziehung unterschiedlich, d.h. die Werte für  $k_{trA}$  wurden kleiner und für  $k_{trB}$  größer
- erhöhte Phosphatkonzentration hatte insgesamt vergleichbare Effekte auf Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard, wie zuvor mit Donor-Kardiomyozyten beobachtet

## 4. Diskussion

### 4.1 Kritische Betrachtung der Messmethode

Die seit vielen Jahren etablierte Methode der permeabilisierten bzw. gehäuteten Muskelfasern erwies sich als sehr gut geeignet für muskelphysiologische Experimente (Hellam und Podolsky, 1969; Fabiato und Fabiato, 1973; Godt und Maughan, 1977, 1981). Diese Methode erlaubt die direkte Beeinflussung der kontraktilen Proteine, um mögliche funktionelle Veränderungen des Sarkomers, sei es nun durch Mutationen, Medikamente oder anderes, zu charakterisieren.

Auch für diese Arbeit wurde sich dieser Methode bedient. Allerdings war es nötig, diese Methode und im Besonderen das Messen funktioneller Parameter an einzelnen Kardiomyozyten in unserem Labor zu etablieren und weiter zu optimieren. Kardiomyozyten haben nicht die Stabilität und Größe, wie sie Skelettmuskelfasern aufweisen (Kardiomyozyten: 100-150  $\mu\text{m}$  lang,  $\varnothing$  20-50  $\mu\text{m}$ ; Skelettmuskelfaser: mehrere mm lang,  $\varnothing$  ca. 100  $\mu\text{m}$ ). Hier war es von entscheidender Bedeutung die einzelnen Kardiomyozyten stabil zu befestigen und somit Messungen bei verschiedensten Bedingungen und vor allem mehreren Aktivierungen bei hohen Calciumkonzentrationen zu ermöglichen, ohne dass ein großer Kraftverlust entstand. All diese Faktoren konnten während dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden (siehe Methodenteil).

So war es möglich durch spezielle Messprotokolle für die isometrische Kraftmessung die Struktur der Zellen auch während der Aktivierung aufrechtzuerhalten, was für die Bestimmung der Sarkomerlänge nötig war (Brenner, 1983). Mit diesen Messprotokollen konnte die gleichmäßige Struktur der Zelle auch nach mehreren pCa-Reihen erhalten werden. Eine weitere Stabilisierung der Sarkomerstruktur kann z.B. durch eine Verlangsamung des Querbrückenzyklus und damit geringere Kraftentwicklung erreicht werden. Daher wurde eine Messtemperatur von 15 °C verwendet. Dies gewährleistete zum einen die Sarkomerstabilität auch nach mehreren Aktivierungen und erlaubte zum anderen die Registrierung der Sarkomerlänge während der Aktivierung. Des Weiteren ließ die gewählte Temperatur eine bessere Vergleichbarkeit mit der bestehenden Literatur zu.

Weiterhin konnte durch die Installation eines Prismas durch seitliche Betrachtung die exakte Höhe der jeweiligen Kardiomyozyte bestimmt werden, wodurch auch eine genaue Berechnung des Zellquerschnitts und somit auch der isometrischen Kraft möglich war. Auch wurden Zellen verworfen wenn ihre vorher eingestellte Sarkomerlänge von 2.2  $\mu\text{m}$  um mehr als 0.05  $\mu\text{m}$  absank, da die Sarkomerlänge großen Einfluss auf die Kraftentwicklung sowie auf die Calciumempfindlichkeit und damit Vergleichbarkeit der Proben hat (McDonald und Moss, 1995; Fitzsimons und Moss, 1998; van der Velden *et al.*, 2002). Ein weiteres Kriterium

war der so genannte „Rundown“ einer Zelle. Er bezeichnet den Kraftabfall von der ersten vollen Aktivierung innerhalb einer pCa-Reihe bis zur letzten und sollte nicht mehr als 15% betragen. Zellen mit höherem Kraftabfall wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Grundlegende methodische Einschränkungen blieben jedoch bestehen und sollen an dieser Stelle kurz erläutert werden. Die Permeabilisierung bewirkt einen Verlust natürlicher Calciumsensitizer, wie Taurin oder Carnosin-ähnliche Stoffe aus dem Zytoplasma. Dies hat eine verminderte Calciumempfindlichkeit des kontraktiven Apparates zur Folge (Steele *et al.*, 1990; Gao *et al.*, 1994).

Des Weiteren können gehäutete Faserpräparate durch die fehlende Zellmembran in wässriger Lösung deutlich anschwellen, wobei der Myofilamentverbund auseinanderweichen kann (Godt und Maughan, 1977; Andrews *et al.*, 1991). Dies kann Einfluss auf die Kraftentwicklung nehmen (April und Brandt, 1973) und ist ein wichtiger Faktor in der Calciumempfindlichkeit (de Beer *et al.*, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass dieser negative Effekt auf die Calciumempfindlichkeit durch osmotische Kompression mit Dextran weitgehend rückgängig gemacht werden kann (Magid und Reedy, 1980; de Beer *et al.*, 1988). Allerdings wird die Vergrößerung der Filamentabstände bei der Permeabilisierung mit Triton X-100, die in dieser Arbeit verwendet wurde, von vielen Wissenschaftlern als gering eingeschätzt (April und Brandt, 1973; Godt und Maughan, 1977; de Beer *et al.*, 1988).

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Triton X-100 die maximale Kraft sowie die Querbrückenkinetik nicht verändert wird (Saeki *et al.*, 1991; McClellan *et al.*, 2001), wohl aber die Calciumempfindlichkeit. Als Gründe für eine veränderte Calciumempfindlichkeit kommt auch ein möglicher Verlust von Calmodulin und eventuell der Myosin-Leichte-Ketten Kinase (MLCK) (Gao *et al.*, 1994) oder eine Reduktion der Phosphorylierung in Frage (Gomes *et al.*, 2005; Neulen *et al.*, 2007).

Ein weiterer Punkt ist die Sarkomerlänge, die sich während der Aktivierung mit Calcium in der isometrischen Phase teilweise reversibel verkürzte. Diese innere Verkürzung („internal shortening“) konnte leider nicht ganz vermieden werden, da die Kardiomyozyten nicht nur an den befestigten Enden, sondern auch in sich, geringfügig nachgeben (Jewell, 1977; de Beer *et al.*, 1988). Dies könnte man mit einem Feedbacksystem, welches kontinuierlich die Sarkomerlänge auf einen bestimmten Wert fixiert, lösen. Allerdings ist dies aufgrund der Größe der Zellen technisch nur schwer realisierbar.

Da jedoch die hier erwähnten kritischen Punkte, die mit der Methode einhergehen, bei allen Messungen der vorliegenden Arbeit annähernd gleich waren, werden sie in der Betrachtung der Ergebnisse vernachlässigt. Die hier beobachteten Unterschiede zwischen Kardiomyozyten aus Donormyokard und aus insuffizientem Myokard können somit auf funktionelle Unterschiede sowie Phosphorylierungsunterschiede zurückgeführt werden.

Im Zuge der Phosphorylierungsunterschiede zwischen Kardiomyozyten aus Donormyokard und aus insuffizientem Myokard muss noch auf den hohen Phosphorylierungsgrad der Kardiomyozyten aus Donormyokard hingewiesen werden. Verursacht wird dies durch die hohe adrenerge Stimulation bei Eintreten des (unnatürlichen) Todes, die bei Donorproben immer vorliegt.

## **4.2 Calciumeffekt – Vergleich zwischen Myokard des Donors und des insuffizienten Herzen**

### **4.2.1 Maximale isometrische Kraftentwicklung und passive Kraft permeabilisierter Kardiomyozyten**

Um die Wirkung von Calcium auf die Kraftentwicklung von Kardiomyozyten aus Donormyokard und aus insuffizientem Myokard untersuchen zu können, wurden isometrische Kraftmessungen bei verschiedenen Calciumkonzentrationen durchgeführt (Abb. 3.9). Dabei ergab sich eine maximale isometrische Kraft von  $17.9 \pm 1.5 \text{ kN/m}^2$  in Donor-Kardiomyozyten und von  $10.6 \pm 2.2 \text{ kN/m}^2$  für Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard, und folglich eine Kraftreduktion von ca. 40%. Die hier ermittelten Werte für das Donormyokard liegen etwas niedriger als die unter ähnlichen experimentellen Bedingungen gemessenen Werte von van der Velden *et al.* (2006). Jedoch kann die maximale isometrische Kraft stark zwischen den Patientenproben variieren, wie auch bei van der Velden *et al.* (2006) ersichtlich. Hier ergaben sich je nach Gruppe von Donorproben isometrische Kraftwerte von im Mittel  $23 \pm 4 \text{ kN/m}^2$ ,  $29 \pm 3 \text{ kN/m}^2$  und  $41 \pm 8 \text{ kN/m}^2$ .

Das bedeutet, dass die mit den von uns gemessenen Kardiomyozyten ermittelte isometrische Kraft im unteren Streubereich von Werten aus der Literatur lag. Die 40%ige Kraftreduktion im humanen insuffizienten Herzen, wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist etwas größer als in der Literatur beschrieben. Van der Velden *et al.* (2006) zeigten eine im Mittel um 22% reduzierte maximale Kraft für Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard, wobei auch Werte über 50% Kraftreduktion auftraten. Andere Arbeiten beschreiben keine oder eine deutlich geringere Kraftreduktion von 15% bei Herzinsuffizienz (van der Velden *et al.*, 2000; Borbely *et al.*, 2005b).

Die Diskrepanz in der Kraftreduktion von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard ist vermutlich auf die Heterogenität dieser Proben zurückzuführen. Nicht nur die Ursachen für Herzinsuffizienz sind vielfältig, sondern auch der Schweregrad der Erkrankung und damit auch die bereits erfolgten Veränderung an den Kardiomyozyten. Dies kann, neben Veränderungen in der Proteinphosphorylierung (van Dijk *et al.*, 2009) und in der

Isoformexpression kontraktiler Proteine, auch die strukturelle Integrität der Kardiomyozyten betreffen (van Heerebeek *et al.*, 2006). Ein Hinweis darauf, dass bei den in dieser Arbeit untersuchten Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard auch strukturelle Veränderungen mit für die relativ stark verminderte Kraft gegenüber Donor-Kardiomyozyten verantwortlich sein könnte, liefert der mittlere „Rundown“ der Zellen. Die Kardiomyozyten zeigten zwar lichtmikroskopisch eine regelmäßige Sarkomerstruktur, jedoch war der „Rundown“ mit  $17.9 \pm 3.1\%$  im Vergleich zum Donor mit  $13 \pm 1.8\%$ , geringfügig erhöht, was auf eine geringere strukturelle Stabilität der Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard schließen lässt.

Passive Kräfte werden unter Relaxationsbedingungen (pCa 9.0) gemessen und sind in der Regel ohne Beteiligung aktivierter Querbrücken. Überprüft wurde dies durch Messungen der passiven Kraft mit 2,3-Butandion Monoxim (BDM). BDM blockiert die ATPase des Myosinkopfes und stabilisiert den M-ADP-P<sub>i</sub> Zwischenzustand, sodass die Kraftgenerierung verhindert wird (Herrmann *et al.*, 1992; McKillop *et al.*, 1994; Ostap, 2002; Mattei, 2004). BDM hatte in unseren Kontrolleexperimenten keinen Einfluss auf  $F_{\text{pass}}$ , was eine Beteiligung aktiver Querbrücken ausschließt. Messungen der passiven Kraft ergaben einen fast dreifach erhöhten Wert für Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard im Vergleich zu Donor-Kardiomyozyten (Abb. 3.10). Auch Borbély *et al.* beobachtete einen fast dreifachen Anstieg der passiven Kraft in Herzproben mit Herzinsuffizienz (Borbely *et al.*, 2009). Verantwortlich für die passiven Kräfte in permeabilisierten Kardiomyozyten sind hauptsächlich die Rückstellkräfte des Titins (Wang *et al.*, 1993; Helmes *et al.*, 1996), denn endomybiales Bindegewebe wurde durch die Isolierungs- und Permeabilisierungsprozedur größtenteils entfernt. Im menschlichen Herzen werden zwei Titin-Isoformen exprimiert, die längere (mehr nachgebende) N2BA Isoform und die kurze (steifere) N2B Isoform (Freiburg *et al.*, 2000; Makarenko *et al.*, 2004). Sie kommen im gesunden Herzen in einem Verhältnis von ca. 30:70 vor (Neagoe *et al.*, 2002; Makarenko *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass sich dieses Verhältnis im insuffizienten Herzen zugunsten der N2BA Isoform verschiebt, sodass dann ein Verhältnis von ca. 50:50 zwischen beiden Isoformen beobachtet werden konnte (Neagoe *et al.*, 2002). Es wurde sogar in einigen Publikationen von einer Titin-Degeneration im insuffizienten Herzen berichtet (Hein *et al.*, 1994; Morano *et al.*, 1994). Im Kontrast dazu zeigten andere Arbeitsgruppen einen Anstieg der steifen N2B-Isoform bei Herzinsuffizienz, was eine Erhöhung der passiven Kraft zur Folge hat (van Heerebeek *et al.*, 2006; Borbely *et al.*, 2009). Wir nehmen an, dass auch für die von uns gemessenen erhöhten passiven Kräfte in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard ein solcher Isoformshift hin zur steiferen N2B-Isoform ursächlich sein könnte.

Außer des Isoformshifts wäre aber auch eine veränderte Phosphorylierung des Titins eine mögliche Erklärung. So wurde in der Literatur beschrieben, dass es während  $\beta$ -adrenerger Stimulation und damit verbundene Aktivierung der PKA, zu einer Erhöhung der ventrikulären

Dehnbarkeit kommen kann und damit zu einer Reduktion der passiven Kraft (Yamasaki *et al.*, 2002; Fukuda *et al.*, 2005). Unsere registrierte erhöhte passive Kraft lässt nun darauf schließen, dass möglicherweise die Phosphorylierung des Titins im insuffizienten Herzen verringert ist. Ein Indiz dafür sind die Ergebnisse der Phospho-Gelelektrophorese (Abb. 3.7), die zeigten, dass im insuffizienten Myokard die Phosphorylierung von cTnI verringert war, was auf eine verminderte Aktivität der PKA im insuffizienten Herzen schließen lässt (Bodor *et al.*, 1997; van der Velden *et al.*, 2006; Messer *et al.*, 2007). Eine Reduktion der Phosphorylierung der Titin-Isoform N2B im insuffizienten Herzen war von Borbely *et al.* (2005b) gezeigt worden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Inkubationen mit PKA<sub>cat</sub> zeigten jedoch keine Veränderungen der passiven Kraft (Abb. 3.13). Dies zeigt, dass die hier gemessene erhöhte passive Kraft in Kardiomyozyten aus Herzinsuffizienz nicht durch eine verringerte Phosphorylierung durch PKA zustande kam, sondern höchstwahrscheinlich durch eine vermehrte Expression der steiferen N2B-Titinisoform verursacht wurde.

*In vivo* bedeutet eine höhere passive Kraft der Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz Funktionseinbußen in der diastolischen Phase des insuffizienten Herzens, d.h. eine gestörte Relaxation (diastolische Insuffizienz).

#### **4.2.2 Die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ ) – Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen sind calciumempfindlicher als Kardiomyozyten aus Donormyokard**

Die Calciumempfindlichkeit der Kardiomyozyten von Herzinsuffizienzpatienten ist verändert, jedoch in welche Richtung wird kontrovers diskutiert. Einerseits wurde von einer erhöhten Calciumempfindlichkeit bei Herzinsuffizienz berichtet (Schwinger *et al.*, 1994; Wolff *et al.*, 1996), andererseits beobachteten Hajjar *et al.* (1988) überhaupt keine Änderung in der Calciumempfindlichkeit. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Calciumempfindlichkeit als  $pCa_{50}$ -Wert für beide Proben ermittelt. Die hier gemessenen  $pCa_{50}$ -Werte für Kardiomyozyten aus Donormyokard betragen im Mittel  $5.7 \pm 0.02$  (Abb. 3.11).

Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard wiesen eine erhöhte Calciumempfindlichkeit von  $pCa_{50} = 5.8 \pm 0.02$  auf, was einen Unterschied zum Donormyokard von  $\Delta pCa_{50} = 0.096$  pCa Einheiten entspricht. Dieser Befund lässt sich gut mit Daten von van der Velden *et al.* (2006) vergleichen, die eine erhöhte Calciumempfindlichkeit mit  $\Delta pCa_{50} = 0.15$  pCa Einheiten gemessen hatten. Die Abweichung zwischen Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard und Donor-Kardiomyozyten ist vermutlich auf eine Reduktion der, durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation vermittelten, Phosphorylierung des cTnI zurückzuführen (Wolff *et al.*, 1996). Alternativ wurde auch eine erhöhte Aktivität der Typ 1 Phosphatase (Neumann *et al.*, 1997;

Braz *et al.*, 2004) oder eine verminderte Konzentrationen von cAMP (Feldman *et al.*, 1987) als Ursache für reduzierte cTnI-Phosphorylierung beschrieben. Wenn cTnI reduziert phosphoryliert vorliegt (Abb. 3.7), erhöht dies die Calciumaffinität von cTnC und damit die Calciumempfindlichkeit (Robertson *et al.*, 1982; Solaro, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Bodor *et al.*, 1997).

Experimentell wurde der Einfluss der Phosphorylierung von cTnI und von cMyBP-C durch PKA<sub>cat</sub>-Inkubation der Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen und aus Donormyokard überprüft (Abb. 3.12). Es zeigte sich nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation eine deutlich reduzierte Calciumempfindlichkeit in Form einer Rechtsverschiebung. Auch in anderen Arbeiten wurde dies beobachtet und auf eine gesteigerte cTnI-Phosphorylierung zurückgeführt (Wolff *et al.*, 1996; Borbely *et al.*, 2005b; van der Velden *et al.*, 2006). Des Weiteren konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass auch eine Phosphorylierung von cMyBP-C zu einer Calciumunempfindlichkeit führen kann (Schlossarek *et al.*, 2011). Allerdings ist der Effekt von cMyBP-C auf pCa<sub>50</sub> unklar, da in cMyBP-C-knockout-Mäusen die Calciumempfindlichkeit der Kardiomyozyten unverändert gegenüber WT-Mäusen war (Colson *et al.*, 2008). Die Reduktion der Calciumempfindlichkeit (Rechtsverschiebung der Kraft-pCa-Kurve) nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation betrug  $\Delta pCa_{50} = 0.31$  pCa Einheiten (Abb. 3.12). Die Verschiebung war damit größer als der pCa<sub>50</sub>-Unterschied zwischen Kardiomyozyten aus Donormyokard und insuffizientem Herzen (Abb. 3.11). Dies lässt den Schluss zu, dass die Donor-Kardiomyozyten zwar stärker phosphoryliert waren als die Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard, wie in der Gelelektrophorese gezeigt, jedoch wiesen wohl auch die Donor-Kardiomyozyten unvollständige Phosphorylierung auf. Bestätigt wird das durch andere Arbeiten, in denen auch Donor-Kardiomyozyten nach PKA<sub>cat</sub>-Inkubation eine kleine Rechtsverschiebung der Kraft-pCa-Kurve hin zu reduzierter Calciumempfindlichkeit zeigen (Wolff *et al.*, 1996; Borbely *et al.*, 2005b; van der Velden *et al.*, 2006).

Zur weiteren Beschreibung der Kraft-Calcium-Kurven dient neben dem pCa<sub>50</sub>-Wert der so genannte Hill-Koeffizient (nH). Er beschreibt die Steigung der Kurve am pCa<sub>50</sub>-Punkt und ist ein Maß für die Kooperativität der Aktivierung des dünnen Filamentes (Rüegg, 1986). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Hill-Koeffizienten für Donor-Kardiomyozyten ergaben im Mittel  $2.68 \pm 0.09$  (Tab. 3.1) und waren somit ähnlich wie die von van der Velden *et al.* unter vergleichbaren Bedingungen gemessenen nH-Werten, die für verschiedene Gruppen von Donormyokardproben zwischen  $2.5 \pm 0.2$  und  $3.3 \pm 0.3$  lagen (van der Velden *et al.*, 2006). Darin zeigt sich die relativ große Streubreite dieser Werte.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Hill-Koeffizient für die Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard mit  $1.58 \pm 0.05$  signifikant niedriger war als für Donor-Kardiomyozyten (Abb. 3.11). Van der Velden *et al.* hatten diese Reduktion des nH bisher nicht (van der Velden *et al.*, 2002) oder nur in geringerem Ausmaß beobachtet (van

der Velden *et al.*, 2003a; van der Velden *et al.*, 2003b; van der Velden *et al.*, 2006). Unsere nH-Werte bedeuten eine wesentlich steilere Kraft-Calcium-Kurve für Donor-Kardiomyozyten im Vergleich zu Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard und damit eine reduzierte Kooperativität bei Herzinsuffizienz.

#### 4.2.3 Die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs ( $k_{tr}$ ) ist calciumabhängig

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten des Kraftwiederanstiegs dient der Messung der Querbrückenkinetik und spiegelt die Geschwindigkeitskonstanten für den Übergang der Querbrücken von den nicht-kraftgenerierenden in die kraftgenerierenden Zustände ( $f_{app}$ ) und die Ablösung der Querbrücken beim Vervollständigen des Zyklus ( $g_{app}$ ) wider (Brenner, 1988). Die Summe aller apparenten Geschwindigkeitskonstanten des Querbrückenzyklus ergibt also  $k_{tr}$  (Brenner und Eisenberg, 1986). Bei diesem Prozess spielen die jeweiligen Rückreaktionen ( $f_{app}^-$  und  $g_{app}^-$ ) kaum eine Rolle, da in unseren Experimenten zunächst kein Phosphat zugesetzt wurde und somit  $f_{app}^-$  nicht begünstigt wurde. Auch konnte  $g_{app}^-$  hier vernachlässigt werden, da die Wahrscheinlichkeit einer Wiederbindung von ADP gering ist (Hill, 1974).

$k_{tr}$  wird ausgehend von einer Akkumulation der Querbrücken in die nicht-kraftgenerierenden (schwach-gebundenen) Zustände bestimmt. Hierzu werden die Kardiomyozyten aus den isometrischen steady-state-Bedingungen heraus kurz entdehnt und der nach Rückdehnung auf die Ausgangslänge zu beobachtende Kraftwiederanstieg analysiert (Brenner und Eisenberg, 1986).  $k_{tr}$  entspricht dabei dem Zeitverlauf der Rückverteilung in den steady-state-Zustand zwischen kraftgenerierenden und nicht-kraftgenerierenden Querbrücken (Brenner und Eisenberg, 1986). Zur Calciumabhängigkeit von  $k_{tr}$  im Herzmuskel gibt es bisher konträre Ansichten. Hancock *et al.* postulierte, dass die Querbrückenkinetik nicht von Calcium moduliert wird, da in ihren Experimenten die Auswertung der  $k_{tr}$  ein lineares, calciumunabhängiges Verhalten zeigte (Hancock *et al.*, 1996). Andererseits konnte sowohl in Arbeiten an Kardiomyozyten der Ratte (Araujo und Walker, 1994; Wolff *et al.*, 1995; Vannier *et al.*, 1996; Tasche *et al.*, 1998) als auch an humanem Proben eine Calciumabhängigkeit von  $k_{tr}$  beobachtet werden (van der Velden *et al.*, 2003a; Borbely *et al.*, 2005a; Édes *et al.*, 2007). In unseren Untersuchungen (Abb. 3.4) zeigte  $k_{tr}$  eine deutliche Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Bei hohen Calciumkonzentrationen (pCa 4.5 – etwa 5.8) verhielt sich  $k_{tr}$  ähnlich wie die isometrische Kraft, d.h.  $k_{tr}$  nahm mit abnehmender Calciumkonzentration ab. Bei weiterer Reduktion der Calciumkonzentration (pCa 6.0 und 6.2) stieg  $k_{tr}$  jedoch überraschenderweise wieder an. Somit konnten hier erstmalig zwei Komponenten für  $k_{tr}$

definiert werden,  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  (Abb. 3.4). Dies wurde bislang in der Literatur so nicht beobachtet. Grund hierfür ist möglicherweise, dass es anderen Arbeiten nicht möglich war, auch bei sehr kleinen Calciumkonzentrationen  $k_{tr}$  präzise zu bestimmen (van der Velden *et al.*, 2003a).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten  $k_{tr}$ -Werte bei maximaler Aktivierung (pCa 4.5) lagen dabei für Donor-Kardiomyozyten im Mittel bei  $0.71 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$ , was mit publizierten Werten von  $0.77 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  (van der Velden *et al.*, 2003a) bzw.  $\sim 0.9 \text{ s}^{-1}$  vergleichbar war (van der Velden *et al.*, 2006). Borbély *et al.* und Edes *et al.*, die zwar Messungen bis pCa = 6.0 und 6.5 durchführen konnten, beobachteten keinen Anstieg von  $k_{tr}$  bei geringen Calciumkonzentrationen (Borbely *et al.*, 2005a; Édes *et al.*, 2007).

$k_{tr}$  von Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard zeigte insgesamt eine ähnliche Calciumabhängigkeit (Abb. 3.17) wie Donor-Kardiomyozyten (Abb. 3.4). Allerdings lag die  $k_{tr}$  mit  $0.67 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$  bei maximaler Calciumkonzentration unter den Werten der Donor-Kardiomyozyten. Dies konnten auch van der Velden *et al.* für manche Gruppen von Donorproben beobachten (van der Velden *et al.*, 2003a). Dabei wurde vermutet, dass es im insuffizienten Ventrikel durch die Expression der atrialen leichten Kette des Myosins (ALC-1) zu einer Erhöhung von  $k_{tr}$  kommen könnte (Morano *et al.*, 1996).

Eine Erhöhung von  $k_{tr}$  könnte auch durch eine vermehrte Expression der schnellen Myosin-Isoform, das  $\alpha$ -kardiale Myosin, entstehen. Das hier untersuchte Herzinsuffizienz-Gewebe lieferte jedoch in vorläufigen gelelektrophoretischen Analysen keine Hinweise auf Expression von  $\alpha$ -MHC, sodass  $k_{tr}$  nicht von einem Myosin-Isoformshift beeinflusst sein sollte (de Tombe, 1998). Die Calciumabhängigkeit von  $k_{tr}$  war im insuffizienten Herzen weniger stark ausgeprägt als im Donormyokard, verdeutlicht durch einen geringeren Abfall von  $k_{tr}$  von pCa 4.5 auf pCa 5.8 mit  $0.14 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$  für Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard *versus*  $0.41 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$  für Kardiomyozyten aus Donormyokard (Abb. 3.4; Abb. 3.17).

Insgesamt bestätigten unsere Daten, dass  $k_{tr}$  im menschlichen Myokard klar von der Calciumkonzentration abhängig ist. Wie von Brenner (1988) an Skelettmuskelfasern des Kaninchens gezeigt wurde, beruht die Calciumabhängigkeit vor allem auf einer Erhöhung von  $f_{app}$  mit steigender Calciumkonzentration und damit einem schnelleren Übergang der Querbrücken in die kraftgenerierenden Zustände. Es kommt zu einer Zunahme von  $k_{tr}$  (vgl. Formel [2]) und auch von  $F_{max}$  (vgl. Formel [1]), da  $g_{app}$  und die jeweiligen Rückreaktionen sich calciumabhängig nicht ändern (Brenner, 1988). Dies traf für die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die Komponente  $k_{trA}$  (bei pCa 5.8-4.5) zu. Bei geringer Calciumkonzentration (pCa 5.8-6.2) wurde  $k_{tr}$  von den Geschwindigkeitskonstanten für den Übergang in die nicht-kraftgenerierenden Zustände ( $g_{app}$ ) bestimmt. In logischer Konsequenz sollte daher  $k_{tr}$  bei weiter sinkender Calciumkonzentration ebenfalls abnehmen bzw. einen für  $g_{app}$  typischen Wert annehmen (Brenner, 1988). Bei den Kardiomyozyten zeigte sich jedoch

bei weiterer Reduktion der Calciumkonzentration eine Zunahme von  $k_{tr}$  ( $k_{tr}B$ ). Es stellte sich hier die Frage, ob  $g_{app}$  bei sehr geringen Calciumkonzentrationen doch calciumabhängig zu sein scheint, was eventuell den Anstieg von  $k_{tr}$  in Komponente  $k_{tr}B$  erklären würde. Ein erhöhtes  $g_{app}$  würde nicht nur  $k_{tr}$  erhöhen, sondern auch  $F_{max}$  verringern (vgl. Formel [1]), da das Gleichgewicht vermehrt auf Seiten der nicht-kraftgenerierenden Zustände wäre. Hinweise auf eine Zunahme von  $g_{app}$  bei geringer Calciumkonzentration wurden in langsamen Skelettmuskelfasern des Kaninchens, die ebenfalls  $\beta$ -kardiales Myosin exprimieren, beobachtet (Hutzler, 1993). Der Quotient aus ATPase/Kraft (tension cost), der proportional zu  $g_{app}$  ist, stieg bei Kräften unter 20% von  $F_{max}$  um das 2-3-fache deutlich an, was der Komponente  $k_{tr}B$  der Kardiomyozyten entspricht.

Alternativ würde auch eine Zunahme von  $f_{app}$  bei niedrigen Calciumkonzentrationen zu einem schnellen  $k_{tr}$  und reduzierter Kraft führen. Dies kann auch aufgrund von Experimenten bei erhöhter Phosphatkonzentration, auf die später noch genauer eingegangen wird, nicht endgültig ausgeschlossen werden. Eine Wiederbindung von Phosphat erhöht  $f_{app}$ . Basierend auf der Annahme, dass  $f_{app}$  bei allen Calciumkonzentrationen um den gleichen Betrag ansteigt, bedeutet die Formel  $k_{tr} = f_{app} + g_{app} + f_{app}^- + g_{app}^-$ , dass sich ein konstanter Betrag zu  $k_{tr}$  addierte. Dies entspricht der gemessenen Steigerung von  $k_{tr}$  bei allen Calciumkonzentrationen. Allerdings ist ohne Phosphatzugabe, d.h. in den hier verwendeten Messlösungen eine nennenswerte Phosphat-Wiederbindung eher unwahrscheinlich, sodass wir von einer Zunahme von  $g_{app}$  bei geringer Calciumkonzentration ausgehen. Ein Anstieg von  $f_{app}$  mit hoher Phosphatkonzentration um den gleichen Faktor bei allen Calciumkonzentrationen (senkrecht affine Verschiebung), ist jedoch ausgeschlossen, da die Daten einer Zunahme um den gleichen Betrag bei allen Calciumkonzentrationen entsprechen.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass  $k_{tr}A$  von  $f_{app}$  dominiert und  $k_{tr}B$  vermutlich von  $g_{app}$  dominiert wird. Unter dieser Annahme könnte man durch Kurvenanpassung  $g_{app}$  bei verschiedenen Calciumkonzentrationen bestimmen und so  $f_{app}$  berechnen (und bei hohem  $P_i$  auch  $f_{app}^-$ ).  $f_{app}$ , was mit  $P_i$ -Abgabe einhergeht, ist langsamer als  $g_{app}$  (ADP-Abgabe bzw. ATP-Bindung) bei sehr geringem Calcium (pCa 6.2) bzw. sehr geringer Kraft (ca. 5% von  $F_{max}$ ). Daher ist  $k_{tr}$  bei pCa 4.5 etwas langsamer als  $k_{tr}$  bei pCa 6.2. Physiologisch betrachtet könnte ein sehr schnelles  $g_{app}$  die Relaxation bei sinkender Calciumkonzentration beschleunigen bzw. eine Behinderung der Relaxation durch ein zu langsames  $g_{app}$  verhindern.

Um auch den Effekt einer Phosphorylierung sarkomerischer Proteine auf  $k_{tr}$  zu untersuchen, erfolgte eine Inkubation mit  $PKA_{cat}$  (Abb. 3.14). Allerdings waren die dabei verwendeten Lösungen nicht identisch mit der, für alle anderen in der Arbeit verwendeten Lösungen. Daher ist das  $PKA_{cat}$ -Experiment in sich zu betrachten, die Absolutwerte konnten nicht mit anderen Werten verglichen werden (Abb. 3.14). Nach der Inkubation mit  $PKA_{cat}$  wurde  $k_{trA}$  langsamer, wogegen  $k_{trB}$  schneller wurde. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei  $k_{trA}$  und  $k_{trB}$  um zwei verschiedene Prozesse, die unterschiedlich reguliert werden, handelt.

$k_{trA}$  wird von  $f_{app}$  bestimmt und somit sank  $k_{trA}$  auch bei sinkender Calciumkonzentration. Durch  $PKA_{cat}$ -vermittelte cTnI-Phosphorylierung wird die Calciumempfindlichkeit herabgesetzt. Die cTnI-Phosphorylierung könnte sich verlangsamernd auf  $f_{app}$  und damit auf  $k_{trA}$  auswirken.  $k_{trB}$  entspricht jedoch vermutlich  $g_{app}$  und wurde größer nach  $PKA_{cat}$ -Inkubation (Abb. 3.14). Eine Erklärungsmöglichkeit dafür könnte eine  $PKA_{cat}$ -vermittelte Phosphorylierung von cMyBP-C sein. Wird cMyBP-C von PKA phosphoryliert, so reduziert es die Bindung zum Aktin und unterbricht seine Bindung zum S2 (Kunst *et al.*, 2000; Kulikovskaya *et al.*, 2003). Dies resultiert in flexibleren Querbrücken, die zwar schneller an Aktin binden können, aber nicht lange in den kraftgenerierenden Zuständen verbleiben. Damit könnte eine  $PKA_{cat}$ -vermittelte Phosphorylierung von cMyBP-C die Querbrückenkinetik beeinflussen und die Geschwindigkeitskonstante ( $g_{app}$ ) der Querbrücken erhöhen (Chen *et al.*, 2010; Schlossarek *et al.*, 2011). Eine Zunahme von  $g_{app}$  mit  $PKA_{cat}$ -Inkubation, die bei sinkender Calciumkonzentration stärker wurde, könnte  $k_{trB}$  erklären.

### 4.3 Phosphateffekt – Vergleich zwischen Kardiomyozyten aus Donormyokard und aus insuffizientem Myokard

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung von Phosphat auf funktionelle Parameter ( $F_{max}$ ,  $pCa_{50}$ ,  $k_{tr}$ ) in permeabilisierten Kardiomyozyten aus Donor- und insuffizientem Myokard zu untersuchen. Eine Phosphaterhöhung im menschlichen Herzen kann beispielsweise durch ischämische Zustände auftreten, wobei der Blutfluss reduziert ist und es zu einer Unterversorgung des Herzens mit Substraten und zu einer Anreicherung von Metaboliten kommt (Gibbs, 1978). Die Phosphaterhöhung kommt durch eine vermehrte ATP-Hydrolyse zustande und führt zu einem Kraftabfall des kontraktiven Apparates (Allen und Orchard, 1987). Das Auftreten von verminderter Kraft bei Phosphatakkumulation während ischämischer oder hypoxischer Zustände könnte herzschtzend wirken, da dadurch vermindert ATP verbraucht wird und eine weitere ATP-Verarmung möglicherweise verringert wird. Phosphat hat hier also eine entscheidende Rolle für die Kraftentwicklung. Beim Wechsel der Querbrücken von nicht-kraftgenerierenden in die kraftgenerierenden Zustände

wird Phosphat abgegeben (Hibberd *et al.*, 1985). Dieser Wechsel wird mit der Geschwindigkeitskonstante  $f_{app}$  beschrieben und die Rückreaktion mit  $f_{app}^{-1}$  (Brenner, 1988). Wird nun die Phosphatkonzentration in der Lösung erhöht, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass nach  $P_i$ -Abgabe wieder ein neues  $P_i$  in die Nukleotidbindungstasche des Myosins bindet (Pate und Cooke, 1989b; Dantzig *et al.*, 1992). Dieser Umstand hat eine Zunahme von  $f_{app}$  und damit eine Verschiebung des Gleichgewichtes auf die Seite der nicht-kraftgenerierenden Zustände zur Folge. Die Kraftentwicklung wird reduziert (vgl. Formel [3]) und  $k_{tr}$  wird schneller (vgl. Formel [4]).

#### 4.3.1 Die isometrische Kraft ist phosphatabhängig

Zur Bestimmung der Auswirkungen einer Phosphatanreicherung auf die isometrische Kraft permeabilisierter Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen und aus Donormyokard, wurden Kraft-pCa-Kurven in Gegenwart unterschiedlicher Phosphatkonzentrationen registriert (Abb. 3.1 und Abb. 3.15). Dabei wurde die isometrische Kraft mit steigender Phosphatkonzentration kleiner (Abb. 3.2). Die größte Kraftreduktion um ca. 40%, konnte bereits bei einer Phosphatkonzentration von 1 mM ( $P_{i1}$ ) in Donor-Kardiomyozyten beobachtet werden. Bei einer Phosphatkonzentration von 10 mM ( $P_{i10}$ ) war  $F_{max}$  auf 32% gesunken. Bei Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen hingegen (Abb. 3.15) war die Kraftabnahme etwas geringer als in Donor-Kardiomyozyten. Hier reduzierte sich die Kraft bei 10 mM Phosphat auf 39% der ursprünglichen maximalen isometrischen Kraft ohne Phosphatzugabe. Auch van der Velden *et al.* beobachteten einen ähnlichen Abfall der isometrischen Maximalkraft zwischen Donor-Kardiomyozyten und Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen, allerdings bei 30 mM  $P_i$  (van der Velden *et al.*, 2001). So auch Hajjar *et al.*, die ebenfalls einen höheren Kraftabfall im Donormyokard im Vergleich zum insuffizienten Herzen bei 15 mM  $P_i$  zeigten (Hajjar *et al.*, 2000).

Insgesamt zeigt die maximale isometrische Kraft in Donor-Kardiomyozyten und in Kardiomyozyten aus insuffizientem Herzen eine ähnliche Abhängigkeit von Phosphat. Interessanterweise war diese Abhängigkeit nicht so stark, wie beispielsweise im Rattenmyokard. Hier konnten wir in ersten Kontrollversuchen eine deutlich stärkere Kraftreduktion, auf 25% bereits bei 5 mM Phosphat, beobachten, was auch in der Literatur ähnlich beschrieben wird (Kentish, 1991; Ebus *et al.*, 1994; Tasche *et al.*, 1998). Möglicherweise ist dies durch die im Rattenventrikel hauptsächlich exprimierte  $\alpha$ -kardiale Isoform des Myosins, mit schnellerer Querbrückenkinetik, begründet.

#### 4.3.2 Wirkung von Phosphat auf die Calciumempfindlichkeit ( $pCa_{50}$ )

Der Effekt von Phosphat auf die Kraft-Calcium-Kurve wurde ebenfalls in Donor-Kardiomyozyten und in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard untersucht (Abb. 3.3 und Abb. 3.16). Wir konnten zeigen, dass der  $pCa_{50}$  mit steigender Phosphatkonzentration im Donormyokard signifikant anstieg. In Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard war dies jedoch nicht der Fall. Damit sank die Calciumempfindlichkeit bei erhöhter Phosphatkonzentration nur in Kardiomyozyten aus Donormyokard.

Die größte Reduktion der Calciumempfindlichkeit ergab sich bereits bei 1 mM Phosphat und verringerte sich von da an nur noch geringfügig bei weiter steigender Phosphatkonzentration. Auch weitere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls eine solche Phosphatabhängigkeit in der Calciumempfindlichkeit, in Form einer Rechtsverschiebung der  $pCa$ -Kurve, bei steigender Phosphatkonzentration beobachten (Kentish, 1986; Schmidt-Ott *et al.*, 1990; Hajjar *et al.*, 2000; van der Velden *et al.*, 2001).

Sie konnten zeigen, dass diese Rechtsverschiebung der Kraft- $pCa$ -Kurven mit Phosphat nur bei Donor-Kardiomyozyten, nicht aber bei Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard auftrat (Hajjar *et al.*, 2000; van der Velden *et al.*, 2001).

Es ist unwahrscheinlich, dass die Verschiebung des  $pCa_{50}$ -Wertes mit steigender Phosphatkonzentration durch eine Interaktion von  $P_i$  mit cTnC zustande kam. Stattdessen könnte der Effekt von Phosphat auf den Querbrückenzyklus eine Erklärung für die Abnahme der Calciumempfindlichkeit bieten. Eine erhöhte Phosphatkonzentration verschiebt das Gleichgewicht im Querbrückenzyklus auf die Seite der nicht-kraftgenerierenden Zustände (schwach-gebundene Zustände), wodurch der Anteil hochaffin gebundener Querbrücken abnimmt. Da aber hochaffin gebundene Querbrücken (kraftgenerierend) die Calciumempfindlichkeit von Troponin durch kooperative Interaktion erhöhen, würde eine Phosphaterhöhung auch diesen Effekt vermindern und damit die Calciumempfindlichkeit herabsetzen (Bremel und Weber, 1972; Kentish, 1986; Brozovich *et al.*, 1988).

Unklar bleibt jedoch, warum die Rechtsverschiebung mit Phosphaterhöhung bei Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard deutlich kleiner ist. Möglicherweise kompensiert die erhöhte Calciumempfindlichkeit in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard die negative Wirkung von Phosphat auf den Querbrückenzyklus, sodass hier kaum eine Rechtsverschiebung zustande kam.

### 4.3.3 Anorganisches Phosphat (P<sub>i</sub>) beschleunigt die Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs (k<sub>tr</sub>)

In humanen permeabilisierten Kardiomyozyten wurde der Effekt einer Phosphaterhöhung auf k<sub>tr</sub> bislang kaum (Édes *et al.*, 2007) bzw. auf Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard gar nicht untersucht. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, diesen Effekt genauer zu betrachten und vor allem auch für Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard zu charakterisieren. Bei hohen Phosphatkonzentrationen hat auch  $f_{app}$  einen signifikanten Einfluss auf k<sub>tr</sub> (vgl. Formel [4]) (vgl. Abb. 1.6). Es wurden isometrische Kraftmessungen bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen im maximalen und submaximalen Calciumbereich durchgeführt und so die Wirkung von Phosphat auf k<sub>tr</sub> untersucht (Abb. 3.5). Mit einer Erhöhung der Phosphatkonzentration von 0 mM auf 10 mM stieg k<sub>tr</sub> bei maximaler Calciumkonzentration fast um das dreifache an (Abb. 3.5). Auch k<sub>tr</sub> bei pCa 6.2 zeigte einen ähnlichen Anstieg. Somit war die phosphatinduzierte Beschleunigung von k<sub>tr</sub> für die Komponenten k<sub>trA</sub> und k<sub>trB</sub> der k<sub>tr</sub>-Calcium-Kurve etwa gleich. Ein Anstieg der k<sub>tr</sub> bei Phosphaterhöhung konnte in anderen Arbeiten auch nachgewiesen werden (Millar und Homsher, 1990; Walker *et al.*, 1992; Araujo und Walker, 1996; Wahr *et al.*, 1997; Tasche *et al.*, 1998; Tesi *et al.*, 2002; Hinken und McDonald, 2004; Édes *et al.*, 2007). Während Araujo und Walker (1996) ein lineares Verhältnis zwischen Phosphatkonzentration und k<sub>tr</sub> in Ratten-Kardiomyozyten-Bündeln detektierten, wurde in der vorliegenden Arbeit eher ein exponentielles Verhalten beobachtet (Abb. 3.6). Wie schon bei der isometrischen Kraft beobachtet, zeigte auch k<sub>tr</sub> von Ratten-Kardiomyozyten eine stärkere Abhängigkeit von Phosphat, als die humanen Kardiomyozyten (Daten nicht gezeigt). Gründe hierfür sind wahrscheinlich die Expression von vorwiegend  $\alpha$ -kardialem Myosin, sowie die Spezies-Unterschiede der Isoformen (Lompre *et al.*, 1984; Sweeney und Kelley, 1990).

Die Wirkung von Phosphat auf Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard war bislang nicht untersucht worden und sollte daher hier betrachtet werden (Abb. 3.17). Wir konnten zeigen, dass sich k<sub>tr</sub> in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard ähnlich wie in Kardiomyozyten aus Donormyokard verhielt und mit höherer Phosphatkonzentration anstieg. Mit einer Erhöhung der Phosphatkonzentration auf 10 mM beschleunigte sich k<sub>tr</sub> um das dreifache in pCa 4.5 und verhielt sich damit etwa genauso wie im Donormyokard. Auch konnten die beiden Komponenten k<sub>trA</sub> und k<sub>trB</sub> in Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard nachgewiesen werden. Ihr Verhalten bei erhöhter Phosphatkonzentration war ähnlich wie in Kardiomyozyten aus Donormyokard. Auch bei Kardiomyozyten aus insuffizientem Myokard erhöht sich k<sub>tr</sub> bei allen Calciumkonzentrationen um einen ähnlichen Betrag.

In Kapitel 4.2.3 wurde bereits die Herkunft und das Verhalten der beiden Komponenten k<sub>trA</sub> und k<sub>trB</sub> diskutiert.

#### 4.4 Ausblick

Im Myokard ist der Bereich der submaximalen Aktivierung der normale Arbeitsbereich im Wechsel zwischen Systole (Kontraktion) und Diastole (Relaxation). Das bedeutet, dass auch der Bereich von Calciumkonzentrationen, in dem der Kraftwiederanstieg, wie in dieser Arbeit beobachtet, sehr schnell wird, für die Herzmuskelzellen unter physiologischen Bedingungen funktionell wichtig ist. Daher ist eine weitere Aufklärung von  $k_{tr}$  und den zugrundeliegenden Mechanismen von großem Interesse. Um dies zu erreichen, müssen Messungen des ATP-Umsatzes der Kardiomyozyten etabliert werden. Durch Messungen des ATP-Umsatzes der Zellen zusammen mit der Querbrückenkinetik könnte überprüft werden, ob bei niedrigen Calciumkonzentrationen tatsächlich  $g_{app}$  deutlich schneller wird.

Es wäre auch eine Erweiterung der Messparameter wichtig, die es durch Verwendung eines Force-Feedback-Systems erlaubt, auch Messungen der Verkürzungsgeschwindigkeit durchzuführen. Dies würde ermöglichen  $g_{app}$  auch unter isotonischen Bedingungen zu untersuchen.

Die Auswirkungen einer Anreicherung von Phosphat auf  $k_{tr}$ , als eine Folge einer Ischämie, wurde in dieser Arbeit erstmals im insuffizienten Herzen, als neuer Parameter für funktionelle Charakterisierung von humanen Kardiomyozyten etabliert. Diese Messungen könnten im Weiteren durch pH-Erniedrigung, als einer weiteren Folge einer Ischämie, ergänzt werden.

Unter Verwendung der hier etablierten Methode und den zusätzlich genannten Parametern, wäre schließlich eine Untersuchung von Kardiomyozyten von Patienten mit familiärer hypertropher Kardiomyopathie (FHC), verursacht u.a. durch Mutationen sarkomerischer Proteine, und weiterer Herzmuskelerkrankungen möglich. Dies müsste neben den hier beschriebenen Proteinanalysen mit der Bestimmung des Verhältnisses von  $\alpha$ -MHC zu  $\beta$ -MHC, z.B. per HPLC-Analysen (Lemon *et al.*, 2011) ergänzt werden. Daraus könnten weitere Erkenntnisse über einen Myosin-Isoformshift während der Kardiomyopathie und dessen Folgen auf funktionelle Parameter gewonnen werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- Allen DG, Orchard CH.** 1987. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* 60:153-168.
- Andrews MA, Maughan DW, Nosek TM, Godt RE.** 1991. Ion-specific and general ionic effects on contraction of skinned fast-twitch skeletal muscle from the rabbit. *J Gen Physiol* 98:1105-1125.
- April EW, Brandt PW.** 1973. The myofilament lattice: studies on isolated fibers. 3. The effect of myofilament spacing upon tension. *J Gen Physiol* 61:490-508.
- Araujo A, Walker JW.** 1994. Kinetics of tension development in skinned cardiac myocytes measured by photorelease of Ca<sup>2+</sup>. *Am J Physiol* 267:H1643-1653.
- Araujo A, Walker JW.** 1996. Phosphate release and force generation in cardiac myocytes investigated with caged phosphate and caged calcium. *Biophys J* 70:2316-2326.
- Bailey K.** 1948. Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril. *Biochem J* 43:271-279.
- Bers DM.** 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205.
- Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA.** 1997. Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96:1495-1500.
- Borbely A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JG, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ, Paulus WJ.** 2009. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res* 104:780-786.
- Borbely A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JG, Varro A, Paulus WJ, van der Velden J, Stienen GJ, Papp Z.** 2005a. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res* 67:225-233.
- Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ.** 2005b. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111:774-781.
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkentin JD.** 2004. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10:248-254.
- Bremel RD, Weber A.** 1972. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nat New Biol* 238:97-101.

- Brenner B.** 1983. Technique for stabilizing the striation pattern in maximally calcium-activated skinned rabbit psoas fibers. *Biophys J* 41:99-102.
- Brenner B.** 1986a. The cross-bridge cycle in muscle. Mechanical, biochemical, and structural studies on single skinned rabbit psoas fibers to characterize cross-bridge kinetics in muscle for correlation with the actomyosin-ATPase in solution. *Basic Res Cardiol* 81 Suppl 1:1-15.
- Brenner B.** 1986b. Zum molekularen Mechanismus der Muskelkontraktion. Mechanische, biochemische und röntgenstrukturanalytische Untersuchungen am isolierten kontraktilem Apparat von Skelettmuskelfasern. *Habilitationsschrift an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen*.
- Brenner B.** 1988. Effect of  $Ca^{2+}$  on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3265-3269.
- Brenner B.** 1991. A new concept for the mechanism of  $Ca^{+}$ -regulation of muscle contraction. Implications for physiological and pharmacological approaches to modulate contractile function of myocardium. *Basic Res Cardiol* 86 Suppl 3:83-92.
- Brenner B, Chalovich JM.** 1999. Kinetics of thin filament activation probed by fluorescence of N-((2-(iodoacetoxy)ethyl)-N-methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-labeled troponin I incorporated into skinned fibers of rabbit psoas muscle: implications for regulation of muscle contraction. *Biophys J* 77:2692-2708.
- Brenner B, Eisenberg E.** 1986. Rate of force generation in muscle: correlation with actomyosin ATPase activity in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3542-3546.
- Brenner B, Schoenberg M, Chalovich JM, Greene LE, Eisenberg E.** 1982. Evidence for cross-bridge attachment in relaxed muscle at low ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7288-7291.
- Brenner B, Yu LC.** 1993. Structural changes in the actomyosin cross-bridges associated with force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5252-5256.
- Brenner B, Yu LC, Chalovich JM.** 1991. Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness in skeletal muscle by caldesmon: implications for the pathway to force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5739-5743.
- 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* 307:205-211.
- Brodde OE, Michel MC, Zerkowski HR.** 1995. Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 30:570-584.
- Brozovich FV, Yates LD, Gordon AM.** 1988. Muscle force and stiffness during activation and relaxation. Implications for the actomyosin ATPase. *J Gen Physiol* 91:399-420.

- Cazorla O, Vassort G, Garnier D, Le Guennec JY.** 1999. Length modulation of active force in rat cardiac myocytes: is titin the sensor? *J Mol Cell Cardiol* 31:1215-1227.
- Cazorla O, Wu Y, Irving TC, Granzier H.** 2001. Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res* 88:1028-1035.
- Chen PP, Patel JR, Rybakova IN, Walker JW, Moss RL.** 2010. Protein kinase A-induced myofilament desensitization to Ca(2+) as a result of phosphorylation of cardiac myosin-binding protein C. *J Gen Physiol* 136:615-627.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC.** 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:637-706.
- Colson BA, Bekyarova T, Locher MR, Fitzsimons DP, Irving TC, Moss RL.** 2008. Protein kinase A-mediated phosphorylation of cMyBP-C increases proximity of myosin heads to actin in resting myocardium. *Circ Res* 103:244-251.
- Dantzig JA, Goldman YE, Millar NC, Laktis J, Homsher E.** 1992. Reversal of the cross-bridge force-generating transition by photogeneration of phosphate in rabbit psoas muscle fibres. *J Physiol* 451:247-278.
- Davis JS, Satorius CL, Epstein ND.** 2002. Kinetic effects of myosin regulatory light chain phosphorylation on skeletal muscle contraction. *Biophys J* 83:359-370.
- de Beer EL, Grundeman RL, Wilhelm AJ, van den Berg C, Caljouw CJ, Klepper D, Schiereck P.** 1988. Effect of sarcomere length and filament lattice spacing on force development in skinned cardiac and skeletal muscle preparations from the rabbit. *Basic Res Cardiol* 83:410-423.
- de Tombe PP.** 1998. Altered contractile function in heart failure. *Cardiovasc Res* 37:367-380.
- Dreizen P, Gershman LC.** 1970. Relationship of structure to function in myosin. II. Salt denaturation and recombination experiments. *Biochemistry* 9:1688-1693.
- Ebashi S, Endo M.** 1968. Calcium ion and muscle contraction. *Prog Biophys Mol Biol* 18:123-183.
- Ebus JP, Stienen GJ, Elzinga G.** 1994. Influence of phosphate and pH on myofibrillar ATPase activity and force in skinned cardiac trabeculae from rat. *J Physiol* 476:501-516.
- Édes IF, Czuriga D, Csányi G, Chłopicki S, Recchia FA, Borbély A, Galajda Z, Édes I, van der Velden J, Stienen GJM, Papp Z.** 2007. Rate of tension redevelopment is not modulated by sarcomere length in permeabilized human, murine, and porcine cardiomyocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 293:R20-R29.
- Eisenberg E, Greene LE.** 1980. The relation of muscle biochemistry to muscle physiology. *Annu Rev Physiol* 42:293-309.

- Eisenberg E, Hill TL.** 1985. Muscle contraction and free energy transduction in biological systems. *Science* 227:999-1006.
- England PJ.** 1975. Correlation between contraction and phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin in perfused rat heart. *FEBS Lett* 50:57-60.
- Esler M, Kaye D, Lambert G, Esler D, Jennings G.** 1997. Adrenergic nervous system in heart failure. *Am J Cardiol* 80:7L-14L.
- Fabiato A.** 1988. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol* 157:378-417.
- Fabiato A, Fabiato F.** 1973. Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardioactive drugs. *Eur J Cardiol* 1:143-155.
- Feldman MD, Copelas L, Gwathmey JK, Phillips P, Warren SE, Schoen FJ, Grossman W, Morgan JP.** 1987. Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 75:331-339.
- Fitzsimons DP, Moss RL.** 1998. Strong binding of myosin modulates length-dependent Ca<sup>2+</sup> activation of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 83:602-607.
- Fohr KJ, Warchol W, Gratzl M.** 1993. Calculation and control of free divalent cations in solutions used for membrane fusion studies. *Methods Enzymol* 221:149-157.
- Frearson N, Perry SV.** 1975. Phosphorylation of the light-chain components of myosin from cardiac and red skeletal muscles. *Biochem J* 151:99-107.
- Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, Kolmerer B, Witt C, Beckmann JS, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S.** 2000. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res* 86:1114-1121.
- Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL.** 2005. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol* 125:257-271.
- Gao WD, Backx PH, Azan-Backx M, Marban E.** 1994. Myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in intact versus skinned rat ventricular muscle. *Circ Res* 74:408-415.
- Gibbs CL.** 1978. Cardiac energetics. *Physiol Rev* 58:174-254.
- Godt RE, Maughan DW.** 1977. Swelling of skinned muscle fibers of the frog. Experimental observations. *Biophys J* 19:103-116.
- Godt RE, Maughan DW.** 1981. Influence of osmotic compression on calcium activation and tension in skinned muscle fibers of the rabbit. *Pflugers Arch* 391:334-337.

- Gomes AV, Harada K, Potter JD.** 2005. A mutation in the N-terminus of troponin I that is associated with hypertrophic cardiomyopathy affects the Ca<sup>2+</sup>-sensitivity, phosphorylation kinetics and proteolytic susceptibility of troponin. *J Mol Cell Cardiol* 39:754-765.
- Gordon AM, Homsher E, Regnier M.** 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80:853-924.
- Granzier HL, Labeit S.** 2004. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* 94:284-295.
- Hajjar RJ, Gwathmey JK, Briggs GM, Morgan JP.** 1988. Differential effect of DPI 201-106 on the sensitivity of the myofilaments to Ca<sup>2+</sup> in intact and skinned trabeculae from control and myopathic human hearts. *J Clin Invest* 82:1578-1584.
- Hajjar RJ, Schwinger RH, Schmidt U, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK.** 2000. Myofilament calcium regulation in human myocardium. *Circulation* 101:1679-1685.
- Hancock WO, Martyn DA, Huntsman LL.** 1993. Ca<sup>2+</sup> and segment length dependence of isometric force kinetics in intact ferret cardiac muscle. *Circ Res* 73:603-611.
- Hancock WO, Martyn DA, Huntsman LL, Gordon AM.** 1996. Influence of Ca<sup>2+</sup> on force redevelopment kinetics in skinned rat myocardium. *Biophys J* 70:2819-2829.
- Hein S, Scholz D, Fujitani N, Renollet H, Brand T, Friedl A, Schaper J.** 1994. Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 26:1291-1306.
- Hellam DC, Podolsky RJ.** 1969. Force measurements in skinned muscle fibres. *J Physiol* 200:807-819.
- Helmes M, Trombitas K, Granzier H.** 1996. Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 79:619-626.
- Herrmann C, Wray J, Travers F, Barman T.** 1992. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry* 31:12227-12232.
- Hibberd MG, Dantzig JA, Trentham DR, Goldman YE.** 1985. Phosphate release and force generation in skeletal muscle fibers. *Science* 228:1317-1319.
- Hill TL.** 1974. Theoretical formalism for the sliding filament model of contraction of striated muscle. Part I. *Prog Biophys Mol Biol* 28:267-340.
- Hinken AC, McDonald KS.** 2004. Inorganic phosphate speeds loaded shortening in rat skinned cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C500-507.
- Holmes KC.** 1996. Muscle proteins--their actions and interactions. *Curr Opin Struct Biol* 6:781-789.

- Homsher E, Millar N.** 1993. Kinetics of force generation and Pi release in rabbit soleus muscle fibers. *Adv Exp Med Biol* 332:495-502; discussion 503.
- Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Jacobs AK, Hiratzka LF, Russell RO, Smith SC, Jr.** 2001. ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation* 104:2996-3007.
- Hutzler C.** 1993. Kinetische Analysen des Querbrückenzyklus im Muskel am Beispiel der Wirkung von Calcium auf enthäutete Soleus-Einzelfasern des Kaninchens. *Dissertation, Universität Ulm.*
- Huxley AF.** 1957. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem* 7:255-318.
- Huxley AF, Niedergerke R.** 1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173:971-973.
- Jewell BR.** 1977. A reexamination of the influence of muscle length on myocardial performance. *Circ Res* 40:221-230.
- Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC.** 1990. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347:37-44.
- Keller TC, 3rd.** 1995. Structure and function of titin and nebulin. *Curr Opin Cell Biol* 7:32-38.
- Kentish JC.** 1986. The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. *J Physiol* 370:585-604.
- Kentish JC.** 1991. Combined inhibitory actions of acidosis and phosphate on maximum force production in rat skinned cardiac muscle. *Pflugers Arch* 419:310-318.
- Klinke R, Pape H-C, Silbernagle S.** 2005. Physiologie. 5., komplett überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kraft T, Chalovich JM, Yu LC, Brenner B.** 1995. Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness by caldesmon fragments at physiological ionic strength and temperature conditions: additional evidence that weak cross-bridge binding to actin is an essential intermediate for force generation. *Biophys J* 68:2404-2418.
- Kruger M, Linke WA.** 2006. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil* 27:435-444.

- Kulikovskaya I, McClellan G, Flavigny J, Carrier L, Winegrad S.** 2003. Effect of MyBP-C binding to actin on contractility in heart muscle. *J Gen Physiol* 122:761-774.
- Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH.** 2000. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* 86:51-58.
- Lemon DD, Papst PJ, Joly K, Plato CF, McKinsey TA.** 2011. A high-performance liquid chromatography assay for quantification of cardiac myosin heavy chain isoform protein expression. *Anal Biochem* 408:132-135.
- LeWinter MM.** 2005. Functional consequences of sarcomeric protein abnormalities in failing myocardium. *Heart Fail Rev* 10:249-257.
- LeWinter MM, Wu Y, Labeit S, Granzier H.** 2007. Cardiac titin: structure, functions and role in disease. *Clin Chim Acta* 375:1-9.
- Lewis WG, Smillie LB.** 1980. The amino acid sequence of rabbit cardiac tropomyosin. *J Biol Chem* 255:6854-6859.
- Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V.** 1984. Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem* 259:6437-6446.
- Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H.** 1969. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol* 42:1-29.
- Lymn RW, Taylor EW.** 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* 10:4617-4624.
- Magid A, Reedy MK.** 1980. X-ray diffraction observations of chemically skinned frog skeletal muscle processed by an improved method. *Biophys J* 30:27-40.
- Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA.** 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res* 95:708-716.
- Margossian SS, Lowey S.** 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol* 85 Pt B:55-71.
- Mattei T.** 2004. Strukturelle Charakterisierung eines neuen potenziell kraftgenerierenden ADP.Pi - Zustandes des Akto-Myosin-Komplexes. *Dissertation, Universität Hannover.*
- McClellan G, Kulikovskaya I, Winegrad S.** 2001. Changes in cardiac contractility related to calcium-mediated changes in phosphorylation of myosin-binding protein C. *Biophys J* 81:1083-1092.

- McDonald KS, Moss RL.** 1995. Osmotic compression of single cardiac myocytes eliminates the reduction in Ca<sup>2+</sup> sensitivity of tension at short sarcomere length. *Circ Res* 77:199-205.
- McElhinny AS, Kazmierski ST, Labeit S, Gregorio CC.** 2003. Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle. *Trends Cardiovasc Med* 13:195-201.
- McKillop DF, Fortune NS, Ranatunga KW, Geeves MA.** 1994. The influence of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) on the interaction between actin and myosin in solution and in skinned muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 15:309-318.
- Messer AE, Jacques AM, Marston SB.** 2007. Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser<sup>23/24</sup> on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 42:247-259.
- Millar NC, Homsher E.** 1990. The effect of phosphate and calcium on force generation in glycerinated rabbit skeletal muscle fibers. A steady-state and transient kinetic study. *J Biol Chem* 265:20234-20240.
- Morano I.** 1992. Effects of different expression and posttranslational modifications of myosin light chains on contractility of skinned human cardiac fibers. *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 1:129-141.
- Morano I.** 1999. Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med* 77:544-555.
- Morano I, Hadicke K, Grom S, Koch A, Schwinger RH, Bohm M, Bartel S, Erdmann E, Krause EG.** 1994. Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 26:361-368.
- Morano I, Hofmann F, Zimmer M, Ruegg JC.** 1985. The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres. *FEBS Lett* 189:221-224.
- Morano M, Zacharzowski U, Maier M, Lange PE, Alexi-Meskishvili V, Haase H, Morano I.** 1996. Regulation of human heart contractility by essential myosin light chain isoforms. *J Clin Invest* 98:467-473.
- Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA.** 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 106:1333-1341.
- Neulen A, Blaudeck N, Zittrich S, Metzler D, Pfitzer G, Stehle R.** 2007. Mn<sup>2+</sup>-dependent protein phosphatase 1 enhances protein kinase A-induced Ca<sup>2+</sup> desensitisation in skinned murine myocardium. *Cardiovasc Res* 74:124-132.
- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N.** 1997. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29:265-272.

- O'Farrell PH.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021.
- Ostap EM.** 2002. 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *J Muscle Res Cell Motil* 23:305-308.
- Parmley WW.** 1985. Pathophysiology of congestive heart failure. *Am J Cardiol* 55:9A-14A.
- Pate E, Cooke R.** 1989a. Addition of phosphate to active muscle fibers probes actomyosin states within the powerstroke. *Pflugers Arch* 414:73-81.
- Pate E, Cooke R.** 1989b. A model of crossbridge action: the effects of ATP, ADP and Pi. *J Muscle Res Cell Motil* 10:181-196.
- Podolsky RJ, Teichholz LE.** 1970. The relation between calcium and contraction kinetics in skinned muscle fibres. *J Physiol* 211:19-35.
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM.** 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261:50-58.
- Reiffert SU, Jaquet K, Heilmeyer LM, Jr., Herberg FW.** 1998. Stepwise subunit interaction changes by mono- and bisphosphorylation of cardiac troponin I. *Biochemistry* 37:13516-13525.
- Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, Kranias EG, Potter JD, Solaro RJ.** 1982. The effect of troponin I phosphorylation on the Ca<sup>2+</sup>-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-regulatory site of bovine cardiac troponin. *J Biol Chem* 257:260-263.
- Ruegg JC.** 1992. Calcium in Muscle Contraction. A Comparative Approach. *Berlin: Springer Verlag.*
- Rüegg JC.** 1986. Calcium in Muscle Activation - A Comparative Approach. *Springer- Verlag Berlin Heidelberg.*
- Saeki Y, Kawai M, Zhao Y.** 1991. Comparison of crossbridge dynamics between intact and skinned myocardium from ferret right ventricles. *Circ Res* 68:772-781.
- Schiaffino S, Reggiani C.** 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76:371-423.
- Schlossarek S, Mearini G, Carrier L.** 2011. Cardiac myosin-binding protein C in hypertrophic cardiomyopathy: Mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol* 50:613-620.
- Schmidt-Ott SC, Bletz C, Vahl C, Saggau W, Hagl S, Ruegg JC.** 1990. Inorganic phosphate inhibits contractility and ATPase activity in skinned fibers from human myocardium. *Basic Res Cardiol* 85:358-366.

- Schwinger RH, Bohm M, Koch A, Schmidt U, Morano I, Eissner HJ, Uberfuhr P, Reichart B, Erdmann E.** 1994. The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ Res* 74:959-969.
- Silverstein R, Voet J, Reed D, Abeles RH.** 1967. Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase. *J Biol Chem* 242:1338-1346.
- Smith WM.** 1985. Epidemiology of congestive heart failure. *Am J Cardiol* 55:3A-8A.
- Solaro RJ.** 1995. Troponin C - troponin I interactions and molecular signalling in cardiac myofilaments. *Adv Exp Med Biol* 382.
- Squire JM, Roessle M, Knupp C.** 2004. New X-ray diffraction observations on vertebrate muscle: organisation of C-protein (MyBP-C) and troponin and evidence for unknown structures in the vertebrate A-band. *J Mol Biol* 343:1345-1363.
- Steele DS, Smith GL, Miller DJ.** 1990. The effects of taurine on Ca<sup>2+</sup> uptake by the sarcoplasmic reticulum and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of chemically skinned rat heart. *J Physiol* 422:499-511.
- Stein LA, Schwarz RP, Jr., Chock PB, Eisenberg E.** 1979. Mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase. Evidence that adenosine 5'-triphosphate hydrolysis can occur without dissociation of the actomyosin complex. *Biochemistry* 18:3895-3909.
- Sweeney HL, Stull JT.** 1990. Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: implications for regulation of actin-myosin interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:414-418.
- Sweeney HL, Yang Z, Zhi G, Stull JT, Trybus KM.** 1994. Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1490-1494.
- Sweeney LJ, Kelley SW.** 1990. Histochemical and biochemical analysis of myosin heavy chain expression during cardiogenesis in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 22:361-370.
- Tasche C, Meyhoefer E, Brenner B.** 1998. Force generation and phosphate release in single skinned cardiac myocytes. *unpublished*.
- Tesi C, Colomo F, Piroddi N, Poggesi C.** 2002. Characterization of the cross-bridge force-generating step using inorganic phosphate and BDM in myofibrils from rabbit skeletal muscles. *J Physiol* 541:187-199.
- Thomas JA, Marks BH.** 1978. Plasma norepinephrine in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 41:233-243.
- Tobacman LS.** 1996. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu Rev Physiol* 58:447-481.
- Tskhovrebova L, Trinick J.** 2003. Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:679-689.

- van der Velden J, Boontje NM, Papp Z, Klein LJ, Visser FC, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Stienen GJ.** 2002. Calcium sensitivity of force in human ventricular cardiomyocytes from donor and failing hearts. *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1:118-126.
- van der Velden J, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Stienen GJ.** 2000. Effect of protein kinase A on calcium sensitivity of force and its sarcomere length dependence in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 46:487-495.
- van der Velden J, Klein LJ, van der Bijl M, Huybregts MA, Stoker W, Witkop J, Eijssman L, Visser CA, Visser FC, Stienen GJ.** 1998. Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue. *Cardiovasc Res* 38:414-423.
- van der Velden J, Klein LJ, Zaremba R, Boontje NM, Huybregts MA, Stoker W, Eijssman L, de Jong JW, Visser CA, Visser FC, Stienen GJ.** 2001. Effects of calcium, inorganic phosphate, and pH on isometric force in single skinned cardiomyocytes from donor and failing human hearts. *Circulation* 104:1140-1146.
- van der Velden J, Narolska NA, Lamberts RR, Boontje NM, Borbely A, Zaremba R, Bronzwaer JG, Papp Z, Jaquet K, Paulus WJ, Stienen GJ.** 2006. Functional effects of protein kinase C-mediated myofilament phosphorylation in human myocardium. *Cardiovasc Res* 69:876-887.
- van der Velden J, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PM, Hasenfuss G, Stienen GJ.** 2003a. The effect of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 57:505-514.
- van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ.** 2003b. Increased Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 57:37-47.
- van Dijk SJ, Holewijn RA, Tebeest A, Dos Remedios C, Stienen GJ, van der Velden J.** 2009. A piece of the human heart: variance of protein phosphorylation in left ventricular samples from end-stage primary cardiomyopathy patients. *J Muscle Res Cell Motil* 30:299-302.
- van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ.** 2006. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113:1966-1973.
- Vannier C, Chevassus H, Vassort G.** 1996. Ca-dependence of isometric force kinetics in single skinned ventricular cardiomyocytes from rats. *Cardiovasc Res* 32:580-586.
- Wahr PA, Cantor HC, Metzger JM.** 1997. Nucleotide-dependent contractile properties of Ca(2+)-activated fast and slow skeletal muscle fibers. *Biophys J* 72:822-834.
- Walker JW, Lu Z, Moss RL.** 1992. Effects of Ca<sup>2+</sup> on the kinetics of phosphate release in skeletal muscle. *J Biol Chem* 267:2459-2466.

- Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchell R.** 1993. Viscoelasticity of the sarcomere matrix of skeletal muscles. The titin-myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. *Biophys J* 64:1161-1177.
- Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM.** 1996. Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J Clin Invest* 98:167-176.
- Wolff MR, McDonald KS, Moss RL.** 1995. Rate of tension development in cardiac muscle varies with level of activator calcium. *Circ Res* 76:154-160.
- Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H.** 2002. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 90:1181-1188.
- Zhang R, Zhao J, Potter JD.** 1995. Phosphorylation of Both Serine Residues in Cardiac Troponin I is required to decrease the Ca<sup>2+</sup> affinity of cardiac troponin C. *J Biol Chem* 270.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\mu$	Ionenstärke [mM]
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butandion Monoxim
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cMyBP-C	kardiales Myosin-bindendes Protein C
cTnI	kardiales Troponin I
cTnT	kardiales Troponin T
d.h.	das heißt
F	isometrische Kraft
$f_{\text{app}}$	apparente Geschwindigkeitskonstante des Übergangs der Querbrücken aus nicht-kraftgenerierende in kraftgenerierende Zustände
$\bar{f}_{\text{app}}$	apparente Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion von $f_{\text{app}}$ , d.h. Übergang der Querbrücken aus kraftgenerierende in nicht-kraftgenerierende Zustände
$F_{\text{max}}$	aktive isometrische Kraft (ohne $F_{\text{pass}}$ )
$F_{\text{pass}}$	passive Kraft
$F_{\text{tot}}$	isometrische Kraft (mit $F_{\text{pass}}$ )
g	Gramm

$g_{app}$	apparente Geschwindigkeitskonstante des Übergangs der Querbrücken aus kraftgenerierende in nicht-kraftgenerierende Zustände
$g_{app}^-$	apparente Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion von $g_{app}$ , d.h. Übergang der Querbrücken aus nicht-kraftgenerierenden in kraftgenerierende Zustände
HMM	schweres Meromyosin
IEF	isoelektrische Fokussierung
InhMix	Inhibitorenmixtur
k.o.	knock out
$k_{tr}$	Geschwindigkeitskonstante des Kraftwiederanstiegs
LMM	leichtes Meromyosin
MHC	Schwere Kette des Myosins (myosin-heavy-chain)
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minute
ml	Milliliter
MLC-2	Regulatorische leichte Kette des Myosins (myosin-light chain 2)
MLCK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
mm	Millimeter
Ø	Durchmesser
p	p-Wert ermittelt nach zweiseitigem T-Test
pCa	negativer dekadischer Logarithmus der Calciumkonzentration
pCa <sub>50</sub>	Calciumkonzentration bei der 50% der maximalen isometrischen Kraft erreicht sind = Calciumempfindlichkeit in Kardiomyozyten
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Konzentration
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
PKA	cAMP abhängige Proteinkinase A
PKA <sub>cat</sub>	katalytische Untereinheit der PKA (kommerziell erworben)
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

S1	Subfragment 1 (Myosinkopf)
S2	Subfragment 2 (Halsregion des Myosins)
SEM	Standardfehler der Mittelwerte ( <i>Standard error of the mean</i> )
SP	Sucrose Phosphorylase
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
zw.	zwischen
$\alpha$ -MHC	$\alpha$ -kardiale schwere Kette des Myosins
$\beta$ -MHC	$\beta$ -kardiale schwere Kette des Myosins

## 7. Lebenslauf

Dipl. Biol. Steffi Lesinski geb. Schmell

Geburtsdatum, -ort	13.06.1981, Halberstadt
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

### schulische Ausbildung

1988 - 1992	Gebrüder-Grimm-Grundschule, Halberstadt
1992 - 2000	Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Halberstadt; Abschluss: Abitur
2000 - 2001	Au Pair Aufenthalt in Chicago, USA

### universitäre Ausbildung

2001 - 2005	Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig Diplomstudiengang Biologie Hauptfach: Zellbiologie, Nebenfächer: Genetik und Zoologie Abschluss: Diplom-Biologin
2006	Diplomarbeit unter Leitung von PD Dr. Walter Steffen im Institut für Molekular- und Zellphysiologie, Medizinische Hochschule Hannover, zum Thema „Etablierung einer Aufreinigungsmethode eines einzelköpfigen, rekombinanten Fragments des zytoplasmatischen Dyneins aus <i>Dictyostelium discoideum</i> “.
seit Okt. 2006	Arbeit an der Promotion zum Thema „Modulation von Kraftentwicklung und Querbrückenkinetik einzelner Kardiomyozyten aus gesundem und insuffizientem Myokard des Menschen“ im Institut für Molekular- und Zellphysiologie (Medizinische Hochschule Hannover) unter Leitung von Prof. Dr. Theresia Kraft

## 8. Publikation

**Kinase enhanced Phosphatase Inhibitor (KEPI) overexpression enhances cardiac contractile function and sensitivity to  $\beta$ -adrenergic stimulation.**

Anna Panek, Bastian Spallek, Steffi Lesinski, Robert Fischer, Ingo Morano, Theresia Kraft, Peter Boknik, Michael Bader, Cemil Özcelik

*Manuskript in Vorbereitung*