Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie

(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Bedeutung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II für den gestörten Kalziumstoffwechsel der isolierten Rattenherzmuskelzelle unter Doxorubicinbehandlung

I N A U G U R A L – D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Anne Christine Köhler

aus

Homburg/Saar

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L.S. Maier
II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. D. Schild
III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. D. Katschinski

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ..... - 1 -

1.1 Das Anthrazyklin Doxorubicin ..... - 1 -

1.1.1 Doxorubicin als Chemotherapeutikum ..... - 1 -

1.1.2 Kardiale Nebenwirkungen des Doxorubicins ..... - 2 -

1.1.3 Antitumoröse Wirkung von DOX und möglicher Zusammenhang mit der Pathogenese der DOX-induzierten toxischen Kardiomyopathie ..... - 4 -

1.2 Die Elektromechanische Kopplung des Herzmuskels ..... - 4 -

1.2.1 Das Aktionspotential des Herzens ..... - 4 -

1.2.2 Die Elektromechanische Kopplung des Herzmuskels und die Rolle des Kalziums ..... - 5 -

1.3 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II ..... - 8 -

1.3.1 Struktur und Aufbau der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II .. - 8 -

1.3.2 Bedeutung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II für den Ca^{2+}-Stoffwechsel der Herzmuskelzelle ..... - 9 -

1.4 Herzinsuffizienz und dilatative Kardiomyopathie ..... - 11 -

1.4.1 Definition der Herzinsuffizienz ..... - 11 -

1.4.2 Mechanismen der Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene ..... - 12 -

1.4.3 Die Rolle der CaMKII bei Herzinsuffizienz ..... - 13 -

1.5 Reaktive Sauerstoffspezies und deren Wirkung auf das Herz ..... - 13 -

1.5.1 Reaktive Sauerstoffspezies ..... - 13 -

1.5.2 Wirkung der ROS auf die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle……. ..... - 14 -

1.5.3 DOX-vermittelter Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration ..... - 16 -

1.6 Ziele der Arbeit ..... - 17 -

2 Methoden ..... - 19 -

2.1 Herzmuskelzellisolation aus adultem Rattenmyokard ..... - 19 -

2.2 Fluoreszenzmikroskopie ..... - 22 -

2.2.1 Grundlagen der fluoreszenzmikroskopischen Messung ..... - 22 -

2.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe ..... - 22 -

2.2.3 Epifluoreszenzmikroskopie ..... - 26 -

2.2.4 Konfokalmikroskopie ..... - 31 -

2.2.5 Ansetzen von Lösungen und Farbstoffen ..... - 34 -

2.3 Western Blot ..... - 36 -

2.3.1 Inkubation mit DOX und Vorbereitung der Zellen ..... - 36 -

2.3.2 Gewinnung des Proteins und Bestimmung der Proteinkonzentration ..... - 36 -

2.3.3 SDS-Gelelektrophorese und elektrischer Proteintransfer ..... - 37 -

2.3.4 Inkubation der Antikörper ..... - 40 -

2.3.5 Entwicklung und Auswertung ..... - 41 -

2.4 Statistische Auswertung ..... - 42 -

3 Ergebnisse ..... - 43 -

3.1 Einfluss von DOX auf den Redoxstatus und die Ca^{2+}-Homöostase der Herzmuskelzelle ..... - 43 -

3.1.1 DOX-Exposition erhöht die intrazelluläre ROS-Konzentration ($[ROS]_i$) ..... - 43 -

3.1.2 Die Ca^{2+}-Transientenamplitude ist nach DOX-Exposition erniedrigt ..... - 44 -

3.1.3 Die diastolische Ca^{2+}-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ steigt unter dem Einfluss von DOX..... ..... - 46 -

3.1.4 Die NCX-Funktion ist nach DOX-Exposition gesteigert bei unveränderter Dauer des Ca^{2+}Transientenabfalls ..... - 48 -

3.1.5 Die Frequenz der Ca^{2+}-Sparks ist unter DOX erhöht ..... - 50 -

3.1.6 Der SR-Ca^{2+}-Gehalt ist unter DOX-Einfluss erniedrigt ..... - 52 -

3.2 CaMKII-Phosphorylierung ist nach DOX-Einwirkung erhöht ..... - 54 -

3.3 Wirkung der CaMKII-Inhibition auf den veränderten Ca^{2+}-Stoffwechsel unter DOX-Exposition ..... - 55 -

3.3.1 CaMKII-Inhibition reduziert die diastolische Ca^{2+}-Überladung der Herzmuskelzelle ..... - 55 -

3.3.2 Die Ca^{2+}-Transientenamplitude ist unter CaMKII-Inhibition weniger stark durch DOX-Einwirkung beeinträchtigt ..... - 57 -

3.3.3 Der SR-Ca^{2+}-Gehalt ist unter CaMKII-Inhibition bei DOX-Einwirkung höher- 58 -

3.3.4 Die Ca^{2+}-Sparkfrequenz unter DOX wird durch CaMKII-Inhibition reduziert - 60 -

4 Diskussion ..... - 61 -

4.1 Wahl der DOX-Konzentrationen ..... - 61 -

4.2 Die Erhöhung der $[ROS]_i$ nach DOX-Exposition ..... - 61 -

4.2.1 Betrachtung weiterer Nachweise vermehrten oxidativen Stresses unter DOX..... - 61 -

4.2.2 Methodische Einschränkungen des Ergebnisses ..... - 63 -

4.2.3 Zusammenhang der gesteigerten $[ROS]_i$ mit der gestörten Ca^{2+}-Homöostase..... - 64 -

4.3 Die Veränderungen der Ca^{2+}-Homöstase unter DOX ..... - 65 -

4.3.1 Die diastolische Ca^{2+}-Überladung unter DOX und konsekutive Reduktion der Ca^{2+}-Transientenamplitude ..... - 65 -

4.3.2 Mögliche Ursache der diastolischen Ca^{2+}-Überladung: Ca^{2+}-Verlust aus intrazellulären Speichern..... - 67 -

4.3.3 Klinische Korrelate der Störung der Ca^{2+}-Homöostase ..... - 70 -

4.4 Betrachtung der CaMKII unter DOX-Einwirkung..... - 71 -

4.4.1 Wahl der CaMKII als untersuchten Mediator ..... - 71 -

4.4.2 Aktivität der CaMKII unter DOX-Einwirkung ..... - 72 -

4.5 Die Effekte der CaMKII-Inhibition auf den gestörten Ca^{2+}-Haushalt nach DOX-Behandlung..... - 74 -

4.5.1 Wirkungen der CaMKII-Inhibition auf die kardiale Ca^{2+}-Homöostase und Bedeutungen des Mechanismus im Rahmen der Herzinsuffizienz..... - 74 -

4.5.2 Mögliche weitere in die gestörte Ca^{2+}-Homöostase involvierte Pathomechanismen ..... - 75 -

4.5.3 Kritische Betrachtung der verwendeten Inhibitoren ..... - 76 -

4.5.4 Zusammenhang der erhöhten CaMKII-Aktivierung mit dem veränderten Redox-Milieu und der gestörten Ca^{2+}-Homöostase ..... - 77 -

4.6 Klinische Betrachtung und Einordnung..... - 78 -

5 Zusammenfassung..... - 80 -

6 Literaturverzeichnis ..... - 81 -

Danksagung ..... - 94 -

Lebenslauf..... - 95 -

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: S. 2

Abb. 1.2: S. 8

Abb. 1.3: S. 9

Abb. 1.4: S. 10

Abb. 1.5: S. 16

Abb. 1.6: S. 17

Abb. 2.1: S. 21

Abb. 2.2: S. 24

Abb. 2.3: S. 25

Abb. 2.4: S. 26

Abb. 2.5: S. 27

Abb. 2.6: S. 28

Abb. 2.7: S. 29

Abb. 2.8: S. 29

Abb. 2.9: S. 30

Abb. 2.10: S. 33

Abb. 2.11: S. 34

Abb. 3.1: S. 43

Abb. 3.2: S. 44

Abb. 3.3: S. 46

Abb. 3.4: S. 50

Abb. 3.5: S. 52

Abb. 3.6: S. 54

Abb. 3.7: S. 55

Abb. 3.8: S. 57

Abb. 3.9: S. 58

Abb. 3.10: S. 60

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: S. 19

Tab. 2.2: S. 20

Tab. 2.3: S. 21

Tab. 2.4: S. 35

Tab. 2.5: S. 36

Tab. 2.6: S. 38

Tab. 2.7: S. 39

Tab. 2.8: S. 39

Tab. 2.9: S. 40

Tab. 2.10: S. 41

Tab. 3.1: S. 48

Tab. 3.2: S. 48

Tab. 3.3: S. 50

Formelverzeichnis

Formel 1: S. 23

Formel 2: S. 30

Formel 3: S. 30

Formel 4: S. 34

Formel 5: S. 42

Abkürzungsverzeichnis

AIP	Autocamtide-2-related inhibitory peptide
AM	Azetoxymethylester
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	arbitrary units, dimensionslose Fluoreszenzeinheit
Ca^{2+}	Kalzium, ionisiert
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre zytosolische Ca^{2+}-Konzentration
Ca^{2+}-Leck	Produkt des spontanen diastolischen Ca^{2+}-Verlustes aus dem SR
CaM	Calmodulin
Ca^{2+}/CaM-Komplex	Kalzium/Calmodulin-Komplex
CaMKII	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
Ca^{2+}-Spark	spontanes Ca^{2+}-Freisetzungsereignis aus dem SR
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Ctrl	Kontrollgruppe
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. *deoxyribonucleic acid*
DOX	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol
Em	Emission
F	Fluoreszenz
F_0	Fluoreszenz der Ruhekalziumkonzentration
F_{BG}	Hintergrundfluoreszenz
F_t	absolute Fluoreszenz des Ca^{2+}-Transienten
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GSH	Glutathion
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IC_{50}	Konzentration, bei der 50% eines Enzyms oder einer Zielstruktur inhibiert werden
I_{Ca}	Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle
LTCC	L-Typ- Ca^{2+}-Kanal

KN-92	2-[N-(4-methoxybezensulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinamyl)-N-methylbenzylaminphosphat, *inaktiver CaMKII-Inhibitor*
KN-93	2-[N-(2-hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzensulfonyl)]amino-N-(4 -chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamin, *aktiver kompetitiver CaMKII-Inhibitor*
Myr	Myristinsäure
Na^+	Natrium
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na_v	spannungsabhängige Natriumkanäle
NCX	N^+- Ca^{2+}-Austauscher
O_2^-	Superoxidanion
OH·	Hydroxylradikal
pCaMKII	phosphorylierte Form der CaMKII
pK_s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl. *phosphat buffered saline*
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, engl. *reactive oxygen species*
$[ROS]_i$	intrazelluläre Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies
RT	Relaxationszeit
r.u.	ratio unit, Fluoreszenzeinheit der ratiometrischen Farbstoffe unter Division zweier Wellenlängen
RyR	Ryanodinrezeptoren des Subtyps II (kardialer Subtyp)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, engl. *standard error of the mean*
Ser	Serin
SERCA	Sarko/Endoplasmatische Ca^{2+}-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Reticulum
TBS	Pufferlösung, engl. *tris-buffered saline*
Thr	Threonin
UV-A-Licht	kurzwelliges ultraviolettes Licht (315-380 nm)

1 Einleitung

Bekanntermaßen sind Krebserkrankungen nach den Herzkreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (STATISTISCHES BUNDESAMT DEUTSCHLAND 2010). Was seltener öffentlich diskutiert wird, ist, dass Krebserkrankungen die häufigste Todesursache im Kindesalter sind (BLEYER 1990). Die Lebenserwartung der betroffenen Kinder konnte in den letzten Jahrzehnten durch die Verbesserung moderner Therapiestrategien jedoch deutlich gesteigert werden (BLEYER 1990). Leider ist dieses Kollektiv durch die vergleichsweise lange Lebenserwartung nach kurativer Therapie wiederum beeinträchtigt durch Langzeitnebenwirkungen der antitumorösen Therapie, insbesondere durch kardiale Nebenwirkungen der Chemotherapie (MULROONEY et al. 2009). Diese Langzeitnebenwirkungen sind häufig von großer Tragweite und können lebensbedrohlich sein, was die Prognose der überlebenden Betroffenen verschlechtert. Eine große Rolle spielt dabei das Anthrazyklin Doxorubicin (DOX), das für seine kardiotoxische Wirkung bereits lange bekannt ist (PRAGA et al. 1979, YEH und BICKFORD 2009). Die durch DOX verursachte toxische Kardiomyopathie führt zu einer schwerwiegenden Herzinsuffizienz, ist aber von Seiten ihrer Pathogenese immer noch nicht gut verstanden. Reaktive Sauerstoffspezies und deren Wirkung auf die Ca^{2+}-Homöostase scheinen jedoch in den Pathomechanismus involviert zu sein (TIMOLATI et al. 2006, KIM SY et al. 2006).

1.1 Das Anthrazyklin Doxorubicin

1.1.1 Doxorubicin als Chemotherapeutikum

Das Anthrazyklin DOX ist eines der potentesten Chemotherapeutika, die in der modernen onkologischen Therapie zum Einsatz kommen. Anthrazykline, eine Substanzgruppe, die in den 1960er Jahren entdeckt wurde, stellen eine wichtige Säule der onkologisch-medikamentösen Therapie dar (WOUTERS et al. 2005, GIANTRIS et al. 1998). Nach wie vor werden sie für die Therapie von soliden Tumoren wie Mammakarzinomen, Sarkomen, Ovarial- und Bronchialkarzinomen sowie für die Behandlung von Lymphomen und Leukämien verwendet (ZUPPINGER et al. 2007). Die Substanz gehört zu den sehr häufig verwendeten Chemotherapeutika; im Jahr 2007 wurden allein im MD Anderson Cancer Center, University of Texas, über 5000 Dosen Doxorubicin angewendet (YEH und BICKFORD 2009).

Der Mechanismus der antitumorösen Wirkung der Substanz ist nicht vollständig verstanden, wird aber vor allen Dingen auf Interkalation in die DNA zurückgeführt, die die Replikation verhindert. Die ebenfalls bekannte durch DOX induzierte Generierung von reaktiven

Sauerstoffspezies (ROS) könnte ein weiterer Aspekt der zytostatischen Wirkung sein (ZUPPINGER et al. 2007, MINOTTI et al. 2004).

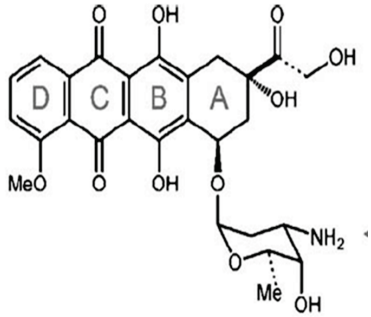


Abb. 1.1 Doxorubicin (nach TOKARSKA-SCHLATTNER et al. 2006, S.399)

1.1.2 Kardiale Nebenwirkungen des Doxorubicins

Obwohl Anthrazykline in der onkologischen Therapie für Patienten mit neoplastischen Erkrankungen wichtige und häufig eingesetzte Medikamente sind, verfügen sie über ein ungünstiges Nebenwirkungsspektrum, das den klinischen Gebrauch und die kumulative Dosis für einen Patienten limitiert (PRAGA et al. 1979, WOUTERS et al. 2005, GIANTRIS et al. 1998). Die wahrscheinlich schwerwiegendste Nebenwirkung ist die Kardiotoxizität, die sich auf unterschiedliche Art und Weise manifestieren kann (BRISTOW et al. 1978, LIPSHULTZ et al. 1991, KRISCHER et al. 1997). Die kardiotoxischen Nebenwirkungen lassen sich zunächst nach Zeitpunkt des Auftretens untergliedern; so unterscheidet man die *akute* und die *chronisch-progressive* kardiotoxische Wirkung der Anthrazykline (YEH und BICKFORD 2009, WOUTERS et al. 2005). Die akute Kardiotoxizität manifestiert sich durch einen transienten, meist reversiblen Abfall der Kontraktilität des Myokards oder auch Arrhythmien und EKG-Veränderungen unmittelbar nach der Infusion des Medikaments, während die chronisch-progressive Kardiotoxizität erst mit Verzögerung klinisch apparent wird (BRISTOW et al. 1978, WOUTERS et al. 2005, ZUPPINGER et al. 2007, YEH und BICKFORD 2009). Hier werden weitere zwei Formen unterschieden, nämlich die frühe und die späte chronisch-progressive Kardiotoxizität, die sich im Zeitpunkt des Beginns der Symptomatik unterscheiden, wobei die frühe Kardiotoxizität bis zu einem Jahr nach der Behandlung auftritt, die späte oft erst um Jahrzehnte verzögert (KRISCHER et al. 1997, LIPSHULTZ et al. 1991). Diese beiden Formen äußern sich klinisch als eine Form der toxisch- dilatativen Kardiomyopathie, die in ihrem Vollbild zur Herzinsuffizienz führt (GIANTRIS et al. 1998, YEH und BICKFORD 2009). Bei den betroffenen Patienten kommt es sowohl zu einer systolischen Dysfunktion, im Sinne einer reduzierten Ejektionsfraktion, als auch zu einer diastolischen Dysfunktion, d.h. zu einer gestörten Relaxation des Myokards (HORACEK et al. 2007). Diese restriktive Komponente ist meist schon früher detektierbar und tritt v.a. bei Patienten auf, die bereits als Kinder eine Anthrazyklintherapie erhalten haben (TOKARSKA-SCHLATTNER et al. 2006, GIANTRIS et al. 1998). Insgesamt zeigt sich bei bis zu 26% der mit DOX behandelten Patienten

eine kardiale Beeinträchtigung (YEH und BICKFORD 2009). Diese Nebenwirkung des DOX rückt zunehmend in den Fokus der modernen onkologischen Therapie, da die Überlebensraten von onkologischen Patienten ansteigen. Die Fünfjahresüberlebensrate beträgt mittlerweile bei erwachsenen onkologischen Patienten im Mittel 65%, bei pädiatrisch-onkologischen Patienten 79% (GIANNI et al. 2008). Da die kardiale Beeinträchtigung oft mit einer Latenz von mehreren Jahrzehnten auftritt, sind onkologische Patienten nun verstärkt von dieser Nebenwirkung betroffen.

Einen besonderen Risikofaktor für das Auftreten einer DOX-induzierten Kardiomyopathie stellt die kumulative Dosis dar, die ein Patient im Laufe seines Lebens erhält (PRAGA et al. 1979, KRISCHER et al. 1997). Schon bei 400 mg/m^2 liegt die Wahrscheinlichkeit einer DOX-induzierten Herzinsuffizienz bei 3-5%, bei 550 mg/m^2 kumulativer Dosis steigt sie auf 7-26% und bei 700 mg/m^2 auf 18-48% (YEH und BICKFORD 2009), d.h. das Erkrankungsrisiko nimmt exponentiell mit der kumulativen Dosis zu. Da die kumulative Dosis offensichtlich ein wichtiger Risikofaktor für die kardiologischen Komplikationen ist, ist sie in der klinischen Anwendung auf 400-550 mg/m^2 begrenzt, was allerdings u.U. die onkologische Effektivität der Therapie beeinträchtigt (GIANNI et al. 2008). Eine Dosisreduktion stellt jedoch nur eine relative Reduktion des Risikos dar; 2009 konnte in einer großen retrospektiven Studie, die die umfangreichen Daten der Childhood-Cancer-Survivor-Study verwendete, gezeigt werden, dass auch geringe Anthrazyklindosen (<250 mg/m^2) bei Überlebenden einer malignen Erkrankung im Kindesalter langfristig zu einer erhöhten Inzidenz von Herzinsuffizienz führen (MULROONEY et al. 2009).

Einen weiteren Risikofaktor neben der kumulativen Dosis stellt ein besonders fortgeschrittenes (>65 Jahre) oder ein besonders junges Alter dar sowie eine bestehende Herzkreislauferkrankung, z.B. ein arterieller Hypertonus (ZUPPINGER et al. 2007, LIPSHULTZ et al. 1991, DEARTH et al. 1984). Des Weiteren erhöhen einige Applikationsmethoden, wie die Bolusapplikation oder einzelne Applikationen hoher Dosen, das Risiko (PRAGA et al. 1979, YEH und BICKFORD 2009). Außerdem wirkt sich wahrscheinlich eine vorhergegangene oder begleitende Radiotherapie des Mediastinums negativ auf die kardiale Prognose aus (PRAGA et al. 1979, ZUPPINGER et al. 2007, MULROONEY et al. 2009), was insbesondere in der Therapie des Mammakarzinoms zu erschwerten Therapieentscheidungen führen kann. Des Weiteren scheint das weibliche Geschlecht das Auftreten kardialer Nebenwirkungen zu begünstigen (LIPSHULTZ et al. 1995, KRISCHER et al. 1997).

Ein letzter wichtiger Risikofaktor ist die Kombination von Anthrazyklinen mit anderen kardiotoxischen Medikamenten, wie zum Beispiel dem Chemotherapeutikum Cyclophosphamid (GOTTDIENER et al. 1981, YEH und BICKFORD 2009). Seit einigen Jahren ist die Diskussion um diese zusätzliche Steigerung des Risikos in den Fokus des Interesses gerückt, da viele der neuen in der onkologischen Therapie eingesetzten Biologika ebenfalls

eine Herzinsuffizienz verursachen können. Prominentester Vertreter dieser Gruppe im Zusammenhang mit kardialen Nebenwirkungen ist Trastuzumab, ein Anti-HER2/erB2-Antikörper, der in der Therapie des Mammakarzinoms zum Einsatz kommt (SEIDMAN et al. 2002, ZUPPINGER et al. 2007, YEH und BICKFORD 2009).

In Anbetracht der zunehmenden Komplexität der onkologischen Therapie und der diversen Interaktionen der Chemotherapeutika und Biologika scheint eine genauere Betrachtung der Pathomechanismen der kardialen Nebenwirkungen angemessen, da diese Nebenwirkungen oft einen großen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben (DEARTH et al. 1984, YEH und BICKFORD 2009).

1.1.3 Antitumoröse Wirkung von DOX und möglicher Zusammenhang mit der Pathogenese der DOX-induzierten toxischen Kardiomyopathie

Der Mechanismus der antitumorösen Wirkung des DOX wird auf verschiedene Phänomene zurückgeführt; an erster Stelle ist hier die Interkalation in die DNA zu nennen, die die Synthese von Makromolekülen und die Replikation verhindert (ZUPPINGER et al. 2007, MINOTTI et al. 2004). Des Weiteren spielt die Entstehung von freien Sauerstoffradikalen (ROS), die durch DOX vermittelt wird, eine Rolle (ZUPPINGER et al. 2007, MINOTTI et al. 2004). Ferner werden als Effekte von DOX die Bindung und Alkylation der DNA, das sog. DNA *cross-linking*[1] und der Eingriff in die DNA-Strangseparation unter Beeinflussung der Helicase-Aktivität sowie direkte Membraneffekte diskutiert (MINOTTI et al. 2004). In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass auch die Induktion von Apoptose einen Teil der DOX-Wirkung ausmacht, jedoch wird kontrovers diskutiert, durch welchen Mechanismus die Apoptose ausgelöst wird (TOKARSKA-SCHLATTNER et al. 2006, MINOTTI et al. 2004).

All diese Mechanismen scheinen die antitumoröse Wirkung der Substanz auszumachen. In Anbetracht ihrer Vielzahl und der sich daraus ergebenden komplexen Wirkung der Substanz ist es nicht verwunderlich, dass bislang der Pathomechanismus, der für die Entstehung der toxischen Kardiomyopathie verantwortlich ist, noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Die Generierung von freien Sauerstoffradikalen scheint hier jedoch eine wichtige Rolle zu spielen (s. Kap. 1.5.3, S. 16 f).

1.2 Die Elektromechanische Kopplung des Herzmuskels

1.2.1 Das Aktionspotential des Herzens

Ausgehend von einem Ruhemembranpotential von ca. -90 bis -80 mV kommt es an der Herzmuskelzelle zu einer Erregung, die von den sog. Schrittmacherzellen im Vorhof, physiologischerweise von Zellen im Sinusknoten ausgeht (IRISAWA et al. 1993). Die

[1] engl. *Kreuzverbindung*, Irreversible Vernetzung der DNA-Stränge

Schrittmacherzellen weisen ein instabiles Ruhemembranpotential auf, das durch *Gap Junctions*[2], unspezifische Ionenkanäle, die die Zellen miteinander verbinden und so zum funktionellen Synzytium machen, weitergeleitet wird (BERS 2001). Durch diese Depolarisation werden spannungsabhängige Na^+-Kanäle (Na_v) geöffnet, die einen Na^+-Einstrom in die Zelle ermöglichen. Durch den Na^+-Einstrom wird die Membran bis auf ca. +30 mV depolarisiert (sog. Aufstrich und Overshoot, (GELLENS et al. 1992, BROWN et al. 1981, BERS 2001)). Durch die Depolarisation werden spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle vom L-Typ (LTCC) geöffnet, die einen Ca^{2+}-Einstrom (I_{Ca}) in die Zelle verursachen (DOERR et al. 1990, BERS 2001). Die Natriumkanäle inaktivieren nach ca. 1 ms, doch die Ca^{2+}-Kanäle bleiben geöffnet und der I_{Ca} persistiert, was der Repolarisation entgegenwirkt. Es kommt zum sog. Plateau des kardialen Aktionspotentials (AP), da das Membranpotential für 200-400 ms nicht sinkt, sondern bei ca. 0 mV stabil bleibt (LIU DW und ANTZELEVITCH 1995, BERS 2001). Nach dieser Dauer inaktivieren auch die Ca^{2+}-Kanäle und damit nehmen die repolarisierenden Ströme überhand, insbesondere der K^+-Ausstrom über die sog. *delayed-rectifier-* K^+-Kanäle[3], die mit Verzögerung spannungsabhängig öffnen, sodass sich wiederum das Ruhepotential einstellt (SANGUINETTI und JURKIEWICZ 1990, BERS 2001).

1.2.2 Die Elektromechanische Kopplung des Herzmuskels und die Rolle des Kalziums

Der Herzmuskel, als hämodynamisch wirksames Pumporgan, weist in seiner Physiologie einige Besonderheiten auf; zunächst sei erwähnt, dass, wie in anderen Muskelgeweben um eine Kontraktion herbeizuführen, eine elektrische Erregung in eine mechanische Muskelaktion, die Kontraktion, umgewandelt werden muss, was im Falle des Herzens zu einem Auswurf des im Ventrikel befindlichen Blutvolumens führt. Dieser Vorgang wird als kardiale elektromechanische Kopplung bezeichnet (BERS 2001). Für diesen Prozess ist ionisiertes Kalzium (Ca^{2+}) als sog. Second Messenger, also als intrazellulärer Botenstoff, unabdingbar. Ca^{2+} spielt für die kardiale elektrische Erregung und die folgende Kontraktion eine große Rolle, zum einen, da der transsarkolemmale I_{Ca} zum großen Teil für das Plateau des kardialen Aktionspotentials verantwortlich ist, zum anderen ist Ca^{2+} durch eine Aktivierung der Myofilamente, der kleinsten kontraktilen Einheit des Herzmuskels, direkt an der Kontraktion beteiligt (RINGER 1883, BERS 2001).

Der transsarkolemmale I_{Ca} während des Aktionspotentials wirkt auf die Ryanodinrezeptoren (RyR) des sarkoplasmatischen Reticulums (SR), des Ca^{2+}-Speichers der Zelle. Die RyR fungieren als intazelluläre Ca^{2+}-Kanäle, deren Öffnungswahrscheinlichkeit durch die transiente Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration erheblich gesteigert wird (sog. Ca^{2+}-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung, FABIATO und FABIATO 1975, SMITH et al. 1985). Es kommt zur Ca^{2+}-

[2] engl. *offene Verbindung* (sinngemäß)
[3] engl. *verzögerte Gleichrichter*

Ausschüttung aus dem SR ins Zytoplasma, wobei bei diesem Prozess ca. 25 LTCC und 100 RyR eine funktionelle Einheit, sog. *Couplons*, bilden, da sie kolokalisiert vorliegen (FRANZINI-ARMSTRONG et al. 1999). Der Vorgang erhöht die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) dramatisch um das 100 bis 1000fache von ca. 100 nM bis 1 µM auf ca. 100 µM (BERS 2001). Diese Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ermöglicht eine Bindung von Ca^{2+} an Troponin C, dem Ca^{2+}-Sensor der Myofilamente, so dass sich die Konformation des Troponin-Komplexes ändert und die Myosinbindungsstelle freigegeben wird, was wiederum eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin ermöglicht (EBASHI und EBASHI 1964, POTTER und GERGELY 1974). Der Mechanismus, der diesen Vorgang des Ca^{2+}-Einstroms aus dem SR ins Zytosol terminiert, wird noch diskutiert, es wird aber angenommen, dass eine Form der Inaktivierung der RyR sowie eine lokale Reduktion des Ca^{2+}-Gehalts des SR (SR-Ca^{2+}-Gehalt) dazu beitragen (SHAM et al. 1998, LUKYANENKO et al. 1998). Eine spontane diastolische Öffnung der RyR ist beschrieben worden. Findet diese synchron bei 6-20 RyR einer Einheit statt, so lässt sich ein lokaler Ca^{2+}-Transient detektieren, man spricht auch vom Ca^{2+}-*Spark*[4] (CHENG et al. 1993). Unter physiologischen Bedingungen sind diese diastolischen Ca^{2+}-Freisetzungen aus dem SR jedoch selten (BERS 2001).

Für die diastolische Relaxation des Herzmuskels ist entscheidend, dass die $[Ca^{2+}]_i$ wieder sinkt, so dass eine Dissoziation der Ca^{2+} von Troponin C begünstigt wird (BERS 2001). Für den Rücktransport des Ca^{2+} in den Extrazellulärraum einerseits und in das SR andererseits stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung: die Sarko-Endoplasmatische Ca^{2+}-ATPase (SERCA) transportiert Ca^{2+} zurück ins SR, der Na^{+}-Ca^{2+}-Austauscher (NCX) transportiert Ca^{2+} unter physiologischen Bedingungen und bei bestehendem Ruhemembranpotential in den Extrazellulärraum (EBASHI und LIPMANN 1962, REUTER und SEITZ 1968, PHILIPSON et al. 1988). Weitere Mechanismen sind bekannt, wie die sarkolemmale Ca^{2+}-ATPase oder der mitochondriale Ca^{2+}-Uniporter. Diese Systeme haben nur einen sehr geringen Anteil am diastolischen Rücktransport des Ca^{2+} (ca. 1%, BERS 2001), so dass in dieser Arbeit nicht näher darauf eingegangen werden soll.

Was die Gewichtung der beiden Transportsysteme, die SERCA und den NCX, angeht, so besteht in unterschiedlichen Spezies ein unterschiedliches Verhältnis. Während in Myokard aus Kaninchen der Anteil der SERCA am Ca^{2+}-Rücktransport nur 70% beträgt und der NCX 28% transportiert, ist das Verhältnis in Maus- oder Rattenmyokard zugunsten der SERCA verschoben, die hier 90 % des Ca^{2+} aus dem Zytosol pumpt, während der NCX nur 7% des Ca^{2+} eliminiert. Ein Vergleich mit dem humanen Myokard ist schwierig, insbesondere da unter verschiedenen pathophysiologischen Gegebenheiten eine Verschiebung des Gleichgewichts der Transportsysteme stattfindet. Jedoch ähnelt im gesunden humanen

[4] engl. *das Leuchten, der Funke*

Myokard das Verhältnis, im Hinblick auf die Frequenz-abhängige Alteration der Kontraktion, dem des Kaninchenmyokards (MAIER et al. 2000, BERS 2001).

Zur Regulation dieser Systeme ist zu sagen, dass die SERCA einer Modulation durch ein inhibierendes Protein, Phospholamban (PLB), unterliegt. Im dephosphorylierten Zustand hemmt PLB die SERCA und damit die Wiederaufnahme von Ca^{2+} ins SR. Liegt PLB im phosphorylierten Zustand vor, ist es inaktiv und wirkt nicht mehr auf die SERCA. Damit steigt der SR-Ca^{2+}-Gehalt durch vermehrte Aktivität der SERCA (KIM HW et al. 1990, BERS 2001).

Ferner ist zu erwähnen, dass es sich beim NCX um einen potentiell umkehrbaren Ionenfluss handelt, d.h. abhängig vom elektrochemischen Gradienten kann anstelle eines Ca^{2+}-Ausstroms auch ein Ca^{2+}-Einstrom stattfinden. Der NCX ist ein elektrogenes Transportsystem, da er drei Natriumionen (Na^+) gegen ein Kalziumion über das Sarkolemm austauscht. Unter physiologischen Bedingungen, d.h. unter einer relativ hohen $[Ca^{2+}]_i$ und unter Ruhemembranpotential, findet ein Ca^{2+}-Ausstrom statt, während bei einem positiven Membranpotential und einer hohen Na^+-Konzentration ($[Na^+]_i$), wie es zu Beginn des Aktionspotentials der Fall ist, ein Ca^{2+}-Einstrom begünstigt wird (PIESKE et al. 2002, DESPA et al. 2002, BAARTSCHEER et al. 2003, BERS et al. 2006). Unter physiologischen Bedingungen kommt es aber größtenteils zu einem Ca^{2+}-Ausstrom (BERS 2002).

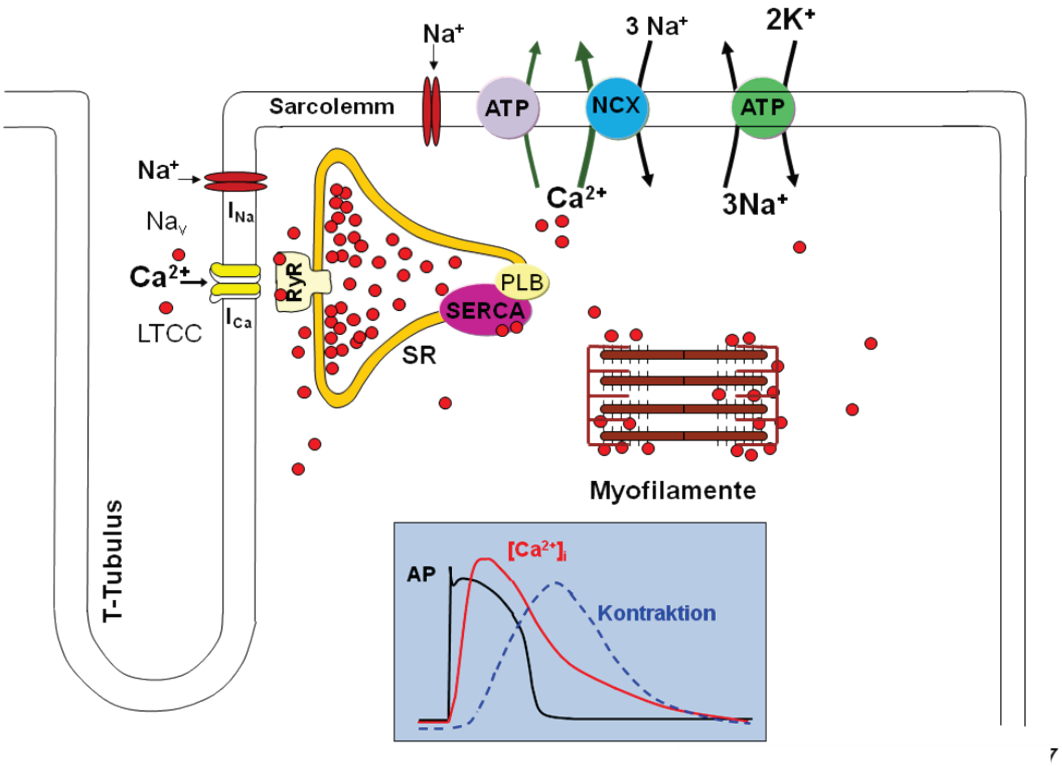


Abb. 1.2 Die Elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle

Nach initialer elektrischer Erregung strömt Na^+ durch spannungsabhängige Na^+-Kanäle (Na_v, *rot im Sarkolemm und in den T-Tubuli*) in die Zelle. Durch die fortschreitende Depolarisation der Membran öffnen spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle, insbesondere vom L-Typ (LTCC, *gelb im Sarkolemm und in den T-Tubuli*). Der Ca^{2+}-Einstrom (I_{Ca}, *Ca^{2+}-Ionen als rote Punkte dargestellt*) sorgt für eine Ca^{2+}-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR (*gelb umrandet*) über die RyR. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration (*siehe blau unterlegtes Bild*). Das Ca^{2+} bindet über Troponin C an die Myofilamente und initiiert so die Kontraktion. Zur Reduktion der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration stehen verschiedene Systeme zur Verfügung: die SERCA, der NCX und mitochondriale Systeme (*nicht eingezeichnet*). Bei Phospholamban (PLB) handelt es sich um ein Inhibitionsprotein der SERCA.
modifiziert nach MAIER und BERS 2007, S. 632

1.3 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

In den komplexen Aufbau der Ca^{2+}-Homöostase des Herzmuskels greifen verschiedene Enzyme ein, insbesondere Kinasen und Phosphatasen, die einen modulierenden Einfluss ausüben. Ein zentrales Regulationsenzym ist die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), mit deren Wirkung sich diese Arbeit befasst.

1.3.1 Struktur und Aufbau der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II

Die CaMKII wurde zuerst in Nervengewebe entdeckt; es stellte sich jedoch heraus, dass sie ubiquitär vorhanden ist, auch im Myokard. Es handelt sich bei der CaMKII um eine multifunktionelle Serin/Threonin-Kinase, die in vier verschiedenen Isoformen existiert: α, β, γ und δ. Diese Isoformen sind zu 80-90% identitisch, die α- und β-Isoformen werden ausschließlich im Nervengewebe exprimiert, während die γ- und δ-Isoform auch in anderen Geweben vor-

kommen (BRAUN und SCHULMAN 1995). Die δ-Isoform ist die vornehmlich exprimierte Form in der Herzmuskelzelle, wobei die Splicevariante δ_B im Nukleus und die Splicevariante δ_C im Zytosol vorliegt (MAIER und BERS 2007). Das Enzym besitzt eine aminoterminale katalytische Domäne und eine zentrale regulatorische Domäne mit sowohl der Calmodulin-Bindestelle als auch einer autoinhibitorischen Domäne. Der carboxyterminale Teil dient als Assoziationsdomäne für die Oligomerisierung (MAIER und BERS 2002, BRAUN und SCHULMAN 1995). Das CaMKII-Holoenzym setzt sich aus 6-12 Untereinheiten zusammen, die ringartig angeordnet sind, wobei die Assoziationsdomänen ins Zentrum gerichtet sind. Der Kalzium/Calmodulinkomplex (Ca^{2+}/CaM-Komplex), der aus einem Calmodulin-Molekül und vier Kalziumionen besteht, bindet an die regulatorische Domäne und dadurch wird das Enzym primär aktiviert (s. Abb. 1.3). Findet an den regulatorischen Domänen eine Autophosphorylierung des Threonin-286 statt, verbleibt das Enzym auch nach Dissoziation des Ca^{2+}/CaM-Komplexes im aktiven Zustand (MAIER und BERS 2002, s. Abb. 1.3). Die komplette Inaktivierung erfolgt dann durch Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen wie die Proteinphosphatase 1, 2A und 2 C (MAIER und BERS 2007).

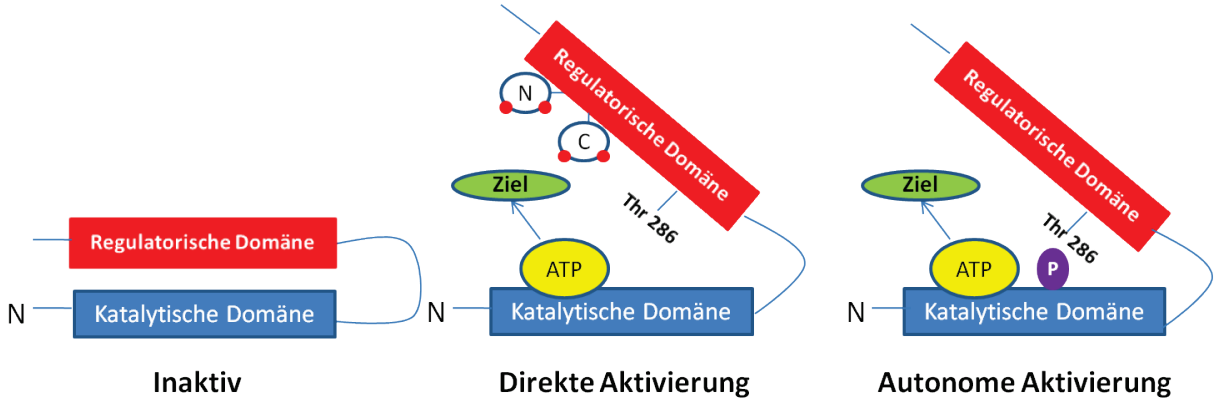


Abb. 1.3 Die Struktur und Aktivierung der CaMKII durch den Ca^{2+}/CaM-Komplex und anschließende Autophosphorylierung.

Nach Autophosphorylierung an Threonin-286 bleibt 20-80% der CaMKII-Aktivität erhalten (sog. autonomer Status). Zunächst ist der inaktive Zustand illustriert (links). Durch Ca^{2+}/CaM-Bindung an die regulatorische Domäne *(blaue Kreise mit 4 Ca^{2+}-Ionen (rot))* wird das Enzym direkt aktiviert, sobald eine Autophosphorylierung an Threonin-286 stattfindet, verbleibt das Enzym im aktiven Zustand.

modifiziert nach MAIER und BERS 2002, S. 924

1.3.2 Bedeutung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II für den Ca^{2+}-Stoffwechsel der Herzmuskelzelle

Die CaMKII phosphoryliert eine Vielfalt an Substraten, die für die Ca^{2+}-Homöostase des Herzmuskels eine entscheidende Rolle spielen (s. Abb. 1.4). Zunächst ist der LTCC zu erwähnen, dessen Aktivität durch die Phosphorylierung im Sinne einer Steigerung der Amplitude des I_{Ca} und einer Verzögerung der Inaktivierung moduliert wird (MAIER und BERS

2007). Des Weiteren phosphoryliert die CaMKII den RyR an der Stelle Ser-2809 und Ser-2815, wobei letztere eine alleinige CaMKII-Zielstruktur darstellt, während die Stelle Ser-2809 gleichzeitig eine Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase A (PKA) ist (VALDIVIA et al. 1995, MARX et al. 2000, MAIER at al. 2003, MAIER und BERS 2007).

Es wird angenommen, dass eine Phosphorylierung durch die CaMKII den Anteil des in der Systole freigesetzen Ca^{2+} erhöht und außerdem die spontane diastolische Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR und damit den spontanen Ca^{2+}-Ausstrom aus dem SR steigert (KOHLHAAS et al. 2006, AI et. al. 2005, MAIER et al. 2003). In Zusammenhang mit der Wirkung der CaMKII auf den RyR steht die Tatsache, dass die CaMKII den SR-Ca^{2+}-Gehalt zu reduzieren scheint (KOHLHAAS et al. 2006, MAIER et al. 2003). Allerdings steht dieser Abnahme des SR-Ca^{2+}-Gehalts gegenüber, dass die CaMKII als ein weiteres Substrat PLB an der Position Threonin-17 phosphoryliert und damit inaktiviert, was die Aktivität der SERCA wiederum steigert und die Ca^{2+}-Aufnahme ins SR verstärkt (KOHLHAAS et al. 2006). Weiterhin scheint die CaMKII auch Na^{+}- und K^{+}-Kanäle zu modulieren (WAGNER et al. 2006, MAIER und BERS 2007). Insbesondere die Phosphorylierung der Na^{+}-Kanäle könnte mittelbar den Ca^{2+}-Haushalt beeinflussen, da sich infolge einer Änderung der Na^{+}-Konzentration die Funktion des NCX verändert. Weiterhin wirkt sich eine Änderung des Membranpotentials auf die Funktion des NCX aus, was die Modulation der Funktion sämtlicher Ionenkanäle, die auf das Membranpotential wirken, für den Ca^{2+}-Haushalt relevant macht.

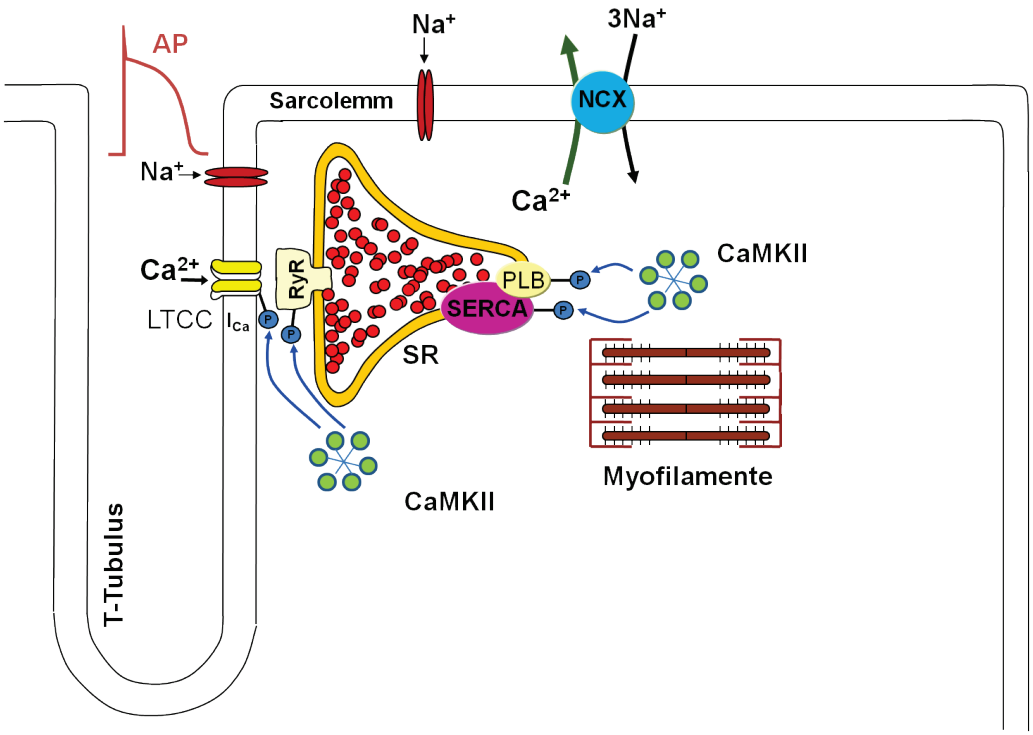


Abb. 1.4 Wirkung der CaMKII auf die Ca^{2+}-Homöostase

Die CaMKII (*als radförmiges Multimer*) phosphoryliert den RyR, den LTCC (*in Gelb*), die SERCA (*in Rosa*) und das Phospholamban (PLB, *in Gelb*)
nach MAIER und BERS 2007, S. 632

1.4 Herzinsuffizienz und dilatative Kardiomyopathie

1.4.1 Definition der Herzinsuffizienz

In Anbetracht der großen Bedeutung der CaMKII für den Ca^{2+}-Stoffwechsel der Herzmuskelzelle ist es nicht verwunderlich, dass die CaMKII auch bei pathologischen Vorgängen am Herzen eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Eine besonders wichtige und gleichzeitig basale Pathologie des Herzens ist die Herzinsuffizienz, unter der ca. 1-2% der Bevölkerung in entwickelten Ländern leiden (McMURRAY 2010).

Die einfachste Definition der Herzinsuffizienz ist die Unfähigkeit des Herzens, genug Blut auszuwerfen, um den Organismus ausreichend zu perfundieren und den Metabolismus aufrecht zu erhalten (SCHMIDT RF et al. 2005). In der Konsequenz bedeutet dies, dass die kontraktile Funktion des Herzens eingeschränkt ist. Damit einhergehend verändert sich, insbesondere bei verschiedenen Kardiomyopathien, die ursächlich für die Herzinsuffizienz sein können, die strukturell-morphologische Beschaffenheit des Herzmuskels. Bei der dilatativen Kardiomyopathie, wie sie auch als Nebenwirkung der Anthrazyklintherapie zu beobachten ist, liegt häufig eine Vergrößerung des linken Ventrikels bei meist reduzierter Wanddicke vor (LIPSHULTZ et al. 1991).

Neben diesen strukturell-funktionellen Veränderungen des Herzmuskels sind klinisch drei Kardinalsymptome der Herzinsuffizienz definiert: Luftnot bei Belastung oder in Ruhe, periphere Ödeme und Leistungsminderung im Allgemeinen. Weitere klinische Zeichen sind Müdigkeit, Nykturie, Jugularvenenstauung, Kardiomegalie, ein dritter Herzton, Tachykardie und Tachypnoe, Pleuraergüsse und Hepatomegalie (McMURRAY 2010, DICKSTEIN et al. 2008).

Ein weiterer wichtiger Punkt im Rahmen der Herzinsuffizienz ist neben der verminderten Kontraktilität, also neben der systolischen Dysfunktion, die sog. diastolische Dysfunktion. Die diastolische Dysfunktion beruht auf einer eingeschränkten Relaxation des Herzmuskels in der Diastole, bzw. einer verminderten Compliance des Herzmuskels aufgrund verschiedener Ursachen, so dass eine ausreichende Füllung des Herzens in der Diastole nicht mehr gegeben ist. Dies wirkt sich dann durch eine verminderte Vordehnung wiederum negativ auf das Schlagvolumen aus. Laut Definition ist bei der diastolischen Dysfunktion das relative Schlagvolumen jedoch zunächst erhalten; d.h. echokardiographisch zeigt sich eine Ejektionsfraktion des linken Ventrikels von über 50%, obwohl der Patient Symptome der Herzinsuffizienz verspürt. Viele Patienten leiden jedoch sowohl unter einer systolischen als auch unter einer diastolischen Dysfunktion (DICKSTEIN et al. 2008).

Die Herzinsuffizienz im Allgemeinen und die dilatative Kardiomyopathie im Besonderen sind in hohem Maße lebensbedrohlich, bedingt durch das progressive Versagen der

Pumpleistung des Herzens und aufgrund von Arrhythmien, die durch die elektrische Instabilität des geschädigten Gewebes bevorzugt entstehen und zum klinischen Bild des plötzlichen Herztods führen können (McMURRAY 2010).

1.4.2 Mechanismen der Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene

Auf zellulärer Ebene zeigt sich die Herzinsuffizienz durch eine verminderte Kontraktilität der Herzmuskelzelle, wie das klinische Bild bereits vermuten lässt. Parallel dazu nimmt die Amplitude der Ca^{2+}-Transienten ab, die Ca^{2+}-Sensitivität der Myofilamente bleibt jedoch unverändert (BERS 2001). Daher scheint es plausibel, dass die Abnahme der Kontraktilität auf die Reduktion der Ca^{2+}-Transienten zurückzuführen ist (BERS 2001). Ein weiterer Aspekt der gestörten Ca^{2+}-Homöostase, der mit der Abnahme der Ca^{2+}-Transientenamplitude in engem Zusammenhang steht, ist die Reduktion des SR-Ca^{2+}-Gehalts, der u.a. auf die verminderte Aktivität der SERCA zurückgeführt wird (BASSANI et al. 1993, BASSANI et al. 1995, HASENFUSS et al. 1999). Die Aktivität des NCX ist dagegen erhöht, so dass sich das Gleichgewicht der Ca^{2+}-eliminierenden Systeme verschiebt (HASENFUSS et al. 1994, HASENFUSS et al. 1999, BERS 2001). Diese Gleichgewichtsverschiebung würde auch die o.g. Reduktion des SR-Ca^{2+}-Gehalts weiter erklären, da der NCX das Ca^{2+} in den Extrazellularraum transportiert. Was die Zusammenhänge verkompliziert, ist die Möglichkeit der reversen Aktivität des NCX, d.h. infolge einer Na^{+}-Überladung der Zelle kann der NCX Ca^{2+} in die Zelle hinein transportieren, so dass bei einer bestehenden Herzinsuffizienz, ein Zustand, bei dem der Na^{+}-Haushalt nachhaltig gestört ist, die Funktion des NCX eventuell umgekehrt ist, d.h. dass der NCX im herzinsuffizienten Gewebe anstelle eines Ca^{2+}-Efflux einen Ca^{2+}-Influx mediieren kann (PIESKE et al. 2002, DESPA et al. 2002, BAARTSCHEER et al. 2003, BERS et al. 2006). Ein dritter Punkt, der die Reduktion des SR-Ca^{2+}-Gehalts erklärt, ist die Tatsache, dass in herzinsuffizientem Gewebe ein erhöhter diastolischer Ca^{2+}-Verlust aus dem SR nachgewiesen werden konnte (AI et al. 2005, SHANNON et al. 2003). Dieser Verlust trägt, neben der mangelhaften Auffüllung des SR in der Diastole, maßgeblich zur Depletion der intrazellulären Ca^{2+}-Speicher bei.

Für die diastolische Dysfunktion, d.h. die mangelnde Relaxation des Herzmuskels, ist auf Ebene des Ca^{2+}-Haushaltes insbesondere die diastolische Ca^{2+}-Überladung verantwortlich zu machen. Diese führt zu einer verminderten oder verlangsamten Relaxation, da durch ein dauerhaft hohes Ca^{2+}-Angebot im Zytosol die Myofilamente länger aktiviert bleiben und in der Diastole nicht in genügendem Maße relaxieren, so dass keine ausreichende Füllung ermöglicht wird (SCHMIDT U et al. 1998, MEYER et al. 1995, MERCADIER et al. 1990).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Ca^{2+}-Stoffwechsel im Rahmen der Herzinsuffizienz massiv gestört ist. Während die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in der Diastole erhöht ist, ist der SR-Ca^{2+}-Gehalt deutlich erniedrigt, was sich wiederum auf die

Amplitude der Ca^{2+}-Transienten auswirkt und dadurch eine verminderte Kontraktilität der Herzmuskelzellen bedingt.

1.4.3 Die Rolle der CaMKII bei Herzinsuffizienz

Entsprechend ihrem hohen Stellenwert in der Regulation der Ca^{2+}-Homöostase der Herzmuskelzelle spielt die CaMKII auch bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine nicht zu vernachlässigende Rolle. So wurde durch MAIER et al. 2003 gezeigt, dass die transgene Überexpression der CaMKII zu einer kardialen Hypertrophie und zur Herzinsuffizienz führen kann, die sich in murinem Gewebe durch eine Verdopplung des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses auswirkt. Des Weiteren zeigten sich infolge eines verminderten SR-Ca^{2+}-Gehalts die Ca^{2+}-Transienten der Herzmuskelzellen um die Hälfte reduziert. Die Frequenz der diastolischen Ca^{2+}-Sparks, die ein Maß für die diastolische Offenwahrscheinlichkeit der RyR darstellen, war deutlich erhöht. Die Expression der SERCA war reduziert, während der NCX stärker exprimiert wurde (MAIER et al. 2003). Diese Verschiebung der Proteinexpression begünstigt die Entleerung der Ca^{2+}-Speicher der Zelle und führt zu einer eingeschränkten Kontraktilität, was wiederum typisch für die Herzinsuffizienz ist.

Entsprechend sind im humanen herzinsuffizienten Gewebe die CaMKII-Expression und die CaMKII-Aktivität deutlich erhöht (KIRCHHEFER et al. 1999). Durch Inhibition der CaMKII in isoliertem herzinsuffizienten Gewebe konnte gezeigt werden, dass der SR-Ca^{2+}-Gehalt aufgrund eines reduzierten SR-Ca^{2+}-Verlusts, d.h. einer reduzierten SR-Ca^{2+}-Sparkfrequenz, wieder zunahm und sich die Ca^{2+}-Transientenamplitude erholte (AI et al. 2005). Außerdem konnte unter CaMKII-Inhibition in isoliertem insuffizienten menschlichen Myokard eine verbesserte Kontraktilität detektiert werden (SOSSALLA et al. 2010).

1.5 Reaktive Sauerstoffspezies und deren Wirkung auf das Herz

1.5.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Unter reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) versteht man eine sauerstoffbasierte chemische Verbindung mit hoher Reaktivität (SEDDON et al. 2007, THANNICKAL und FANBURG 2000). Es kann sich einerseits um eine Verbindung handeln, die freie Radikale aufweist, wie z.B. das Hydroxyl-Radikal (OH·) oder das Superoxidanion (O_2^-), oder um eine nicht-radikalische Verbindung, die aber durch ihre hohe Reaktivität in der Lage ist, freie Radikale zu produzieren, wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

ROS entstehen zu einem gewissen Grad in jeder Zelle als Produkt oder Nebenprodukt verschiedener Reaktionen; besonders in den Mitochondrien werden viele ROS als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung generiert (BOVERIS et al. 1972, THANNICKAL und FANBURG 2000, SEDDON et al. 2007). Aber auch in anderen Stoffwechselwegen pro-

duzieren Enzyme wie die Xanthinoxidase oder auch P-450-basierte Enzyme als Nebenprodukt ROS (CHAMBERS et al. 1985, THANNICKAL und FANBURG, 2000). Die übermäßige intrazelluläre ROS-Produktion kann jedoch für die Zelle sehr gefährlich sein; ROS sind in der Lage, sofern sie lokal in hohen Konzentrationen vorliegen, durch ihre hohe Reaktivität und die Oxidation von intrazellulären Molekülen Kettenreaktionen auszulösen, die irreversible Schäden an Proteinen, Lipiden oder der DNA verursachen können (FREEMAN und CRAPO 1982, THANNICKAL und FANBURG 2000, TAKANO et al. 2003). Hohe ROS-Produktionen können sogar Apoptose begünstigen und so zum Zelltod führen. Bei niedrigeren ROS-Konzentrationen können diese Verbindungen jedoch auch als Signalmolekül innerhalb der Zelle fungieren und biologische Informationen weitergeben bzw. mit Signalwegen innerhalb der Zelle interferieren. Dies trifft z.B. für die Signaltransduktion über Proteinkinasen zu, aber auch für die Stimulation der DNA-Synthese und die Expression von Wachstumsgenen (MARTINDALE und HOLBROOK 2002, SACHSENMAIER et al. 1994, HUANG et al. 1996, KNEBEL et al. 1996).

All diese Vorgänge können den Zellstoffwechsel aus dem Gleichgewicht bringen, so dass Systeme der Gegenregulation von Nöten sind, wie z.B. die Catalase, die Glutathionperoxidase und Gluthation (GSH) sowie die Superoxiddismutase (LEFER und GRANGER 2000, THANNICKAL und FANBURG 2000, TAKANO et al. 2003). Diese antioxidativen Systeme sind in der Lage, ROS zu reduzieren und so den Schaden, die diese innerhalb der Zelle anrichten können, abzuwenden. Die Balance zwischen ROS-Entstehung und Kapazität der antioxidativen Systeme bezeichnet man als Redox-Milieu der Zelle; ist diese Balance zugunsten der ROS verschoben und die antioxidativen Systeme sind nicht ausreichend vorhanden oder aber überlastet, spricht man von oxidativem Stress (THANNICKAL und FANBURG 2000, SEDDON et al. 2007). Bei diversen das Herz betreffenden Pathologien sind die Kardiomyozyten oxidativem Stress ausgesetzt, so z. B. bei Atherosklerose, myokardialer Ischämie und Reperfusion (ZWEIER et al. 1989, LEFER und GRANGER 2000). Auch bei der Entstehung der Herzinsuffizienz spielt eine oxidative Belastung eine große Rolle (HEYMES et al. 2003, MAACK et al. 2003, BELCH et al. 1991).

1.5.2 Wirkung der ROS auf die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle

In der Herzmuskelzelle spielen im Besonderen die Effekte der ROS auf die elektromechanische Kopplung eine große Rolle (TAKANO et al. 2003, ZIMA und BLATTER 2006). Moleküle mit vielen Cysteinresten bzw. Thiolen werden stark durch ROS beeinflusst, da Veränderungen im Redox-Milieu hier oft zur Formation bzw. zum Bruch von Disulfidbrücken führen, was die Funktion der Proteine, insbesondere auch der Ionenkanäle und -austauscher sowie der Ionenpumpen, modifizieren kann (TERENTYEV et al. 2008, GOLDHABER und LIU E, 1994, GOLDHABER et al. 1989, ZIMA und BLATTER 2006).

Eine wichtige Zielstruktur in Anbetracht der Effekte der ROS auf die elektromechanische Kopplung und den Ca^{2+}-Haushalt der Zelle ist der RyR. Der RyR weist eine enorme Menge an Cysteinresten auf, nämlich 89 pro Monomer, wobei es sich um einen Tetramerkomplex handelt (XU et al., 1998). Insbesondere hyperreaktive Thiolgruppen mit niedrigen pK_s-Werten spielen eine große Rolle (PESSAH et al. 2002, ABRAMSON und SALAMA 1989, LIU G et al. 1994). Wird bei diesen Thiolen die Formation einer Disulfidbrücke im Sinne einer Oxidation begünstigt, nimmt die Offenwahrscheinlichkeit des RyR zu (EAGER et al. 1997). Insgesamt wirken sich reduzierende Bedingungen innerhalb der Zelle, auch was die antioxidativen Systeme wie Glutathion (GSH) und Nicotinamidadenindinukleotid ($NADH/NAD^+$) angeht, entgegengesetzt, also im Sinne einer Abnahme der Aktivität aus. Diese Modulation der Aktivität wirkt sich entsprechend auf die Ca^{2+}-Sparkfrequenz aus, die bei reduzierenden Bedingungen deutlich niedriger ist (ZIMA und BLATTER 2006).

ROS können allerdings auch zu einer irreversiblen Inaktivierung des RyR führen, wahrscheinlich in Abhängigkeit von der Konzentration und der Länge der Exposition. Nach einer initialen Stimulation der Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR kann es zu einer Erschöpfung des Ca^{2+}-Gehalts des SR kommen, die sich auch in einer zytosolischen Ca^{2+}-Überladung zeigt (ZIMA und BLATTER 2006).

Zu der Erschöpfung des SR-Ca^{2+}-Gehalts trägt eine weitere funktionelle Modifikation durch oxidierende Substanzen bei; so enthält die SERCA ebenfalls 25 Cysteinreste, die die Funktion des Enzyms entscheidend beeinflussen (MURPHY 1976). Im oxidierten Zustand dieser Thiolgruppen ist die Enzymaktivität inhibiert, nach Reduktion ist die Funktion wiederhergestellt (SCHERER und DEAMER 1986, MORRIS und SULAKHE 1997). Des Weiteren wurde beschrieben, dass H_2O_2 und OH· direkt mit der ATP-Bindungstelle der SERCA interferieren und so die ATP-Hydrolyse und die davon abhängige Pumpleistung hemmen. Außerdem können ROS die Ca^{2+}-Aufnahme von der ATP-Hydrolyse entkoppeln und so ebenfalls die Pumpleistung der SERCA inhibieren (ZIMA und BLATTER 2006). Die zytosolische Ca^{2+}-Überladung infolge einer Depletion des SR kann somit grundsätzlich auf die Modifikation der SERCA-Aktivität und der Offenwahrscheinlichkeit des RyR zurückgeführt werden.

Eine weitere Zielstruktur der ROS, die den Ca^{2+}-Haushalt der Herzmuskelzelle beeinflusst, sind die LTCC, deren α_{1C}-Untereinheit 10 Cysteinreste besitzt (MIKAMI et al. 1989); eine Oxidierung der Thiolgruppen führt zu einer Reduktion des Ca^{2+}-Stroms durch den Kanal (FEARON et al. 1999, GILL et al. 1995, GOLDHABER et al. 1989).

Der NCX scheint ebenfalls für eine Redox-Modifizierung sensitiv zu sein; Sauerstoffsuperoxid scheint den NCX-vermittelten Ca^{2+}-Strom zu verstärken, und auch H_2O_2 sowie das System aus Xanthin und Xanthinoxidase scheinen die NCX-Aktivität zu erhöhen (REEVES et al. 1986, KATO und KAKO 1988, GOLDHABER 1996, WAGNER et al. 2003). Es bleibt zu bedenken, dass u.U. der Fluss durch den NCX umgekehrt sein kann. Dies ist insbesondere

bei hoher intrazellulärer Na^+-Konzentration wie etwa unter Reperfusionsbedigungen nach Ischämie oder auch bei der Herzinsuffizienz der Fall, so dass dann Ca^{2+} nach innen transportiert wird, was die Ca^{2+}-Überladung begünstigen würde. Insgesamt sind die Effekte der ROS auf den NCX nicht so eindeutig wie auf andere den Ionenhaushalt regulierende Proteine, so dass eine eindeutige Aussage schwer zu treffen ist. Allerdings scheint der NCX auf jeden Fall sensitiv auf Veränderungen des Redox-Milieus zu reagieren. Sofern man eine grundsätzliche Aussage treffen kann, scheint ein oxidierendes Milieu in der Zelle die Ca^{2+}-Überladung tendenziell zu begünstigen, während ein reduzierendes Milieu den gegenteiligen Effekt hat (ZIMA und BLATTER 2006).

Was die CaMKII betrifft, so haben ERICKSON et al. 2008 gezeigt, dass es durch die Oxidation zweier Methioninreste zur Disulfidbrücke an den Stellen 281/282 in der regulatorischen Domäne zu einer Aktivierung der CaMKII kommt. Interessanterweise ist diese Aktivierung zunächst nur möglich, wenn durch den Ca^{2+}/CaM-Komplex die Autoinhibition aufgehoben wurde und das Holoenzym bereits durch den Ca^{2+}/CaM-Komplex aktiviert ist. Nach der Oxidation der Methioninreste bleibt das Enzym jedoch aktiviert, auch wenn der Ca^{2+}/CaM-Komplex wieder dissoziiert ist (s. Abb. 1.5).

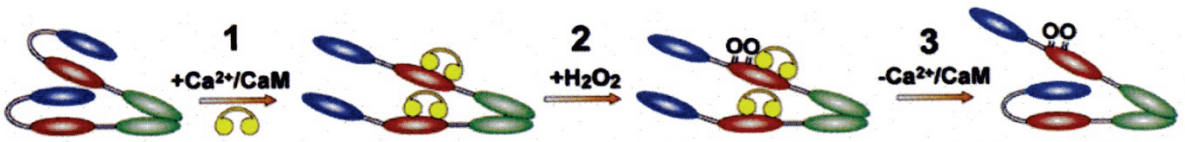


Abb. 1.5 Schema der CaMKII-Aktivierung durch ROS
Nach initialer Aktivierung durch den Ca^{2+}/CaM-Komplex (1) blockiert eine Oxidation an Methionin 281/281 (2) die Autoinhibition der katalytischen Domäne, was auch ohne Bindung des Ca^{2+}/CaM-Komplexes zu anhaltender Aktivität führt (3).
ERICKSON et al. 2008, S. 464

1.5.3 DOX-vermittelter Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration

Es gilt als erwiesen, dass DOX die Entstehung von ROS vermittelt und damit die $[ROS]_i$ erhöht. Eine Elektronaddition zu der Chinonstruktur des Rings C des DOX führt zu der Formation eines Semichinons, das sich dann durch Reduktion von Sauerstoff unter Formation eines Superoxidanions wieder in die ursprüngliche Chinonform umwandelt (VÁSQUEZ-VIVAR et al. 1997, MINOTTI et al. 2004, TOKARSKA-SCHLATTNER et al. 2006).

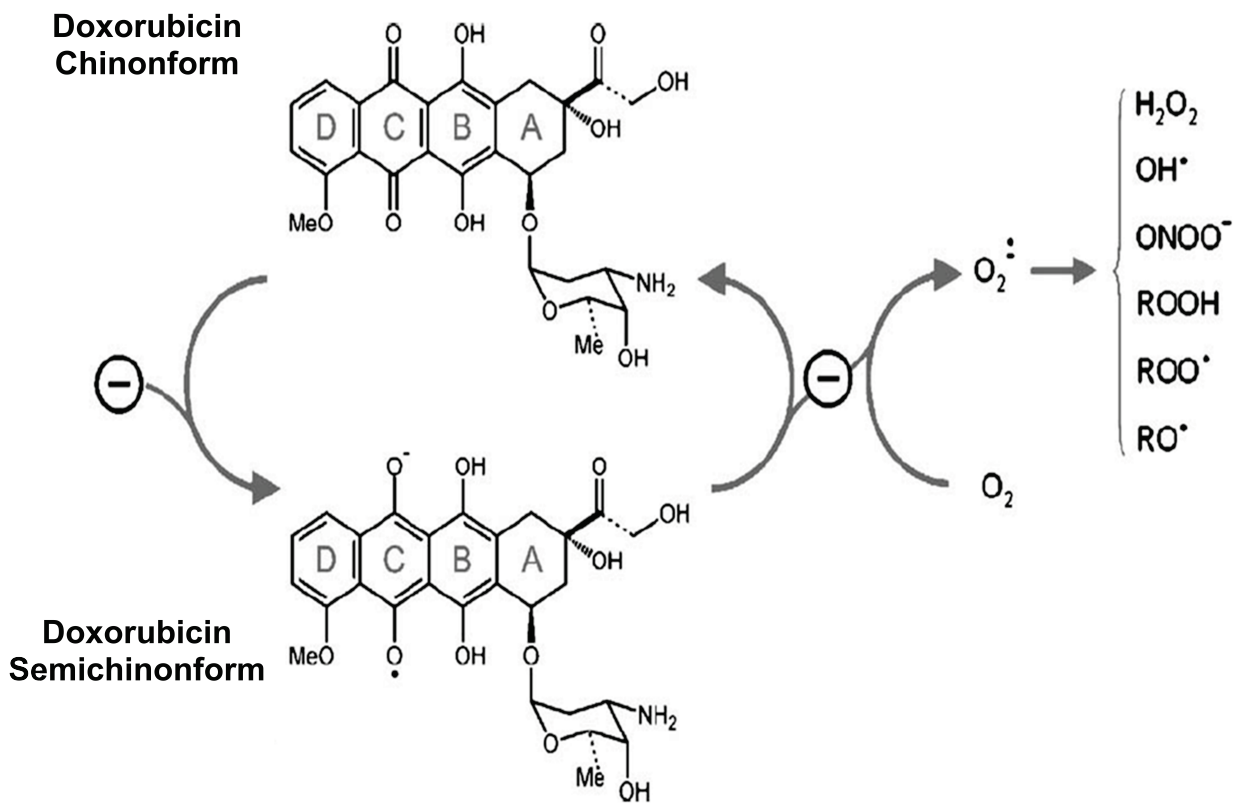


Abb. 1.6 DOX-vermittelte Entstehung von ROS
modifiziert nach TOKARSKA-SCHLATTNER et al. 2006, S. 399

Obwohl weiterhin ungeklärt ist, welche genauen Pathomechanismen zur Entstehung der DOX-induzierten toxischen Kardiomyopathie führen, so wird doch angenommen, dass der Anstieg der $[ROS]_i$ besonders zum Tragen kommt (KIM SY et al. 2006, TIMOLATI et al. 2006, OLSON et al. 1980, DAVIES und DOROSHOW 1986, MYERS et al. 1977, TOKARSKA-SCHLATTNER et al. 2006).

KIM SY et al. beschrieben 2006 an isolierten Rattenkardiomyozyten einen fluoreszenzmikroskopisch beobachteten Anstieg der $[ROS]_i$ und einen gleichzeitigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Durch eine Reduktion der $[ROS]_i$ mithilfe von Radikalfängern konnten die Veränderungen der Ca^{2+}-Homöostase im Rahmen der DOX-Behandlung verhindert werden. TIMOLATI et al. zeigten 2006, dass nach 24-stündiger DOX-Behandlung an isolierten Rattenkardiomyozyten ein gestörter Ca^{2+}-Stoffwechsel mit zytosolischer Ca^{2+}-Überladung vorliegt. Diese Experimente legen eine Verknüpfung der ROS-Entstehung mit einer Störung der Ca^{2+}-Homöostase nahe, die noch nicht näher beschrieben und erklärt ist.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung von DOX auf den Ca^{2+}-Stoffwechsel der Herzmuskelzelle darzustellen und eine mögliche Beteiligung der CaMKII, einem zentralen Mediator in der Regulation des Ca^{2+}-Stoffwechsels, zu überprüfen.

Die zu untersuchende Hypothese der vorliegenden Arbeit lautet, dass aus der DOX-Einwirkung eine Störung der Ca^{2+}-Homöostase resultiert und dass dies auf eine unter DOX gesteigerte CaMKII-Aktivität zurückzuführen ist. Ziel dieser Arbeit ist es nun, erstens zu zeigen, dass DOX die Ca^{2+}-Homöostase in Rattenkardiomyozyten tatsächlich beeinträchtigt. Zweitens soll gezeigt werden, dass dieser Effekt auf einer Steigerung der Aktivität der CaMKII beruht. Diese soll wiederum drittens durch eine Erhöhung der Radikallast, also der $[ROS]_i$, zustande kommen. Schließlich soll viertens gezeigt werden, dass eine Inhibition der CaMKII eine Rückführung der Effekte auf den Ca^{2+}-Stoffwechsel zur Folge hat.

2 Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden Kardiomyozyten aus etwa 6 Monate alten männlichen Wistar-Ratten verwendet. Alle Tierexperimente sind der örtlichen Tierschutzkommission im Rahmen des Antrags *Untersuchung von isolierten Einzelzellen, multizellulären Muskelstreifen und Herzmuskelhomogenaten von Kaninchen, Ratte und Maus (Az T14.06, Laufzeit 24.8.2006-24.8.2011)* angezeigt worden und wurden unter Berücksichtigung der GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS (1996) durchgeführt.

2.1 Herzmuskelzellisolation aus adultem Rattenmyokard

Die Isolation der Kardiomyozyten aus Rattenmyokard wurde mittels einer Langendorff-Perfusionsapparatur (LANGENDORFF 1895, SAG 2007, s. Abb. 2.1, S. 21) durchgeführt, die vor Isolationsbeginn zweifach mit Isolationstyrode gespült wurde.

Tab. 2.1 Isolationstyrode (Grundlösung)

Substanz	Konzentration	Hersteller	Bermerkung
NaCl	137 mM	Merck (Darmstadt, Deutschland)	in ddH_2O gelöst, bei 37 °C auf pH=7,4 eingestellt
KCl	5,4 mM	Merck	
$MgSO_4$ x 7 H_2O	1,2 mM	Merck	
Na_2HPO_4 x 12 H_2O	1,2 mM	Merck	
HEPES	20 mM	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	
Glucose	15 mM	Merck	
Penicillin/Streptomycin (100fach Pen/Strep)	8,3 ml/L	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)	wurde Ca-freie Tyrode verwendet, wurde Pen/Strep hinzugefügt

Danach wurde die Anlage auf 37 °C erhitzt, um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen. Die Präparier- und Isolationsschalen wurden ebenfalls mit Isolationstyrode gefüllt.

Die Ratte wurde in einer luftdichten Glaskammer mittels des Narkotikums Isofluran (Abbott) betäubt. Nach Absinken der Atemfrequenz und Zunahme der Atemtiefe als Zeichen der erfolgreichen Narkotisierung wurde das betäubte und reflexlose Tier durch einen schmerzlosen Genickbruch getötet. Mit einer Präparierschere wurde der Thorax geöffnet und die Gefäße wurden so abgesetzt, dass ein möglichst langer Aortenstumpf erhalten blieb. In das linke Herzohr wurden 0,5 ml Heparin-Natrium (2000 I.E.) injiziert, um die Koagulation des verbliebenden Blutes in den Koronararterien zu vermeiden und so sicherzustellen, dass die Enzymlösung suffizient ins Myokard gelangte. Nun konnte das Herz entnommen werden. In einer Schale mit eisgekühlter Ca^{2+}-haltiger Isolationstyrode (0,75 mM) wurde das restliche Blut sanft ausmassiert. Anschließend wurde unter einem binokularen Mikroskop mithilfe zweier Splitterpinzetten die Aorta aufgesucht und retrograd kanüliert. Über die Kanüle wurde

das Herz an die Langendorffperfusionsapparatur (s. Abb. 2.1, S. 21) angeschlossen für 5-10 min mit Ca^{2+}-haltiger Isolationstyrode (1,25 mM) retrograd perfundiert, um das Herz zum Schlagen anzuregen und so seine Vitalität zu prüfen. Daraufhin wurde zu Ca^{2+}-freier Isolationstyrode gewechselt und das Herz für ca. 20 min perfundiert (SAG 2007, NÄBAUER et al., 1996).

Danach wurde eine Perfusion mit der Kollagenase- und Protease-haltigen Enzymlösung (s. Tab. 2.2) begonnen, die bis zur Auflösung der extrazellulären Matrix fortgeführt wurde (WAGNER et al. 2003, SAG et al. 2011, SAG 2007, NÄBAUER et al. 1996). Anschließend wurde das Herz von der Apparatur abgenommen. In einem Glasbehältnis wurden die Atrien vorsichtig von den Ventrikeln getrennt und das verbleibende ventrikuläre Gewebe anschließend mit einer Präparierschere zerschnitten. Nach kurzem Schwenken im Wasserbad wurde die Zellsuspension dann durch Nylon-Gaze gefiltert und in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Nachdem das Gewebe sedimentiert war, konnte der Überstand mit enthaltenem Verdauungsenzym abgenommen werden.

Tab. 2.2: Enzymlösung

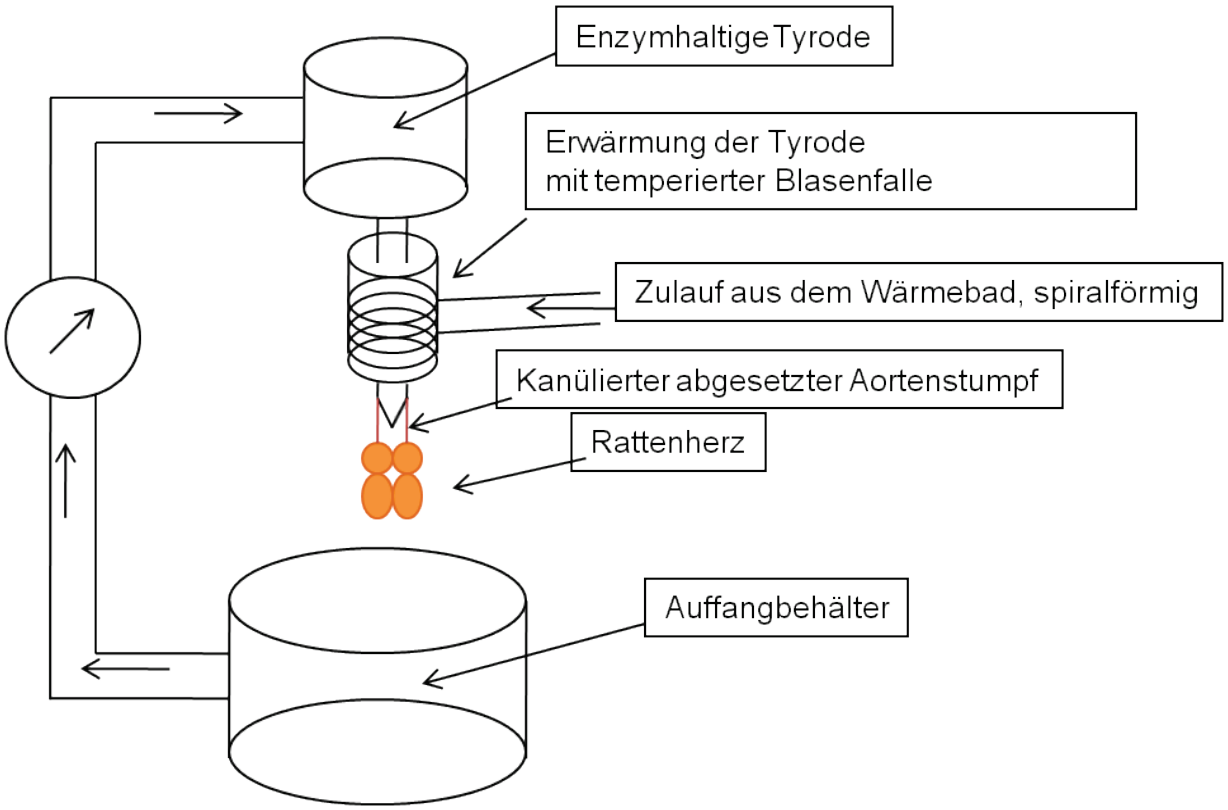
Substanz	Konzentration	Hersteller	Bermerkung
Isolationstyrode	1 x		Die Enzymlösung
Kollagenase II	230 U/ml	Biochrom AG	wurde unmittelbar
Protease XIV	0,5 U/ml	Sigma-Aldrich	vor Verwendung auf
$CaCl_2$	0,1 mM	Sigma-Aldrich	37 °C erwärmt

Als nächstes folgte eine langsame Annäherung an die gewünschte Ca^{2+}-Konzentration durch einen Wechsel der Lösungen mit jeweils aufsteigenden Ca^{2+}-Konzentrationen ($[Ca^{2+}]_i$ entsprechend 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM, appliziert für jeweils 10 min und nach Sedimentation der Zellen gewechselt, SAG 2007). Nach dem letzten Aufbauschritt wurden die Zellen nach Sedimentation in etwa 10 ml M199-Medium (s. Tab 2.3) resuspendiert und eine Probe davon in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden für weitere fluoreszenzmikroskopische oder proteinbiochemische Versuche mit M199-Medium weiter auf ca. 25 000 Zellen/ml verdünnt und konnten dann für die Versuche verwendet werden (SAG et al. 2011).

Tab. 2.3 : M199-Medium

Substanz	Masse/Volumen	Hersteller	Bermerkung
M 199 Medium	500 ml	Sigma-Aldrich, No. M7528	Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert.
Ad Taurin	312,5 mg	Sigma-Aldrich, No.T9931	
Ad D,L-Carnitin	500 mg	Sigma-Aldrich, No. C9500	
Kreatin	327,5 mg	Sigma-Aldrich, No. C0780	
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml	5,0 ml	Biochrom AG, No. A2210	
L-Glutamin 200 mM	5,0 ml	Biochrom AG, No. K0282	

Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Isolationsanlage



modifiziert nach SAG 2007, S. 26

2.2 Fluoreszenzmikroskopie

2.2.1 Grundlagen der fluoreszenzmikroskopischen Messung

Als Fluoreszenz wird das Phänomen bezeichnet, dass ein Stoff, der mit Licht einer bestimmten Wellenlänge beleuchtet wird, dadurch energetisch angeregt wird und wiederum Licht einer längeren Wellenlänge emittiert (COLEMAN et al. 2004). Dieses Prinzip macht sich die Fluoreszenzmikroskopie zunutze, indem Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht einer definierten Wellenlänge, dem sog. *Anregungslicht*, beleuchtet werden, was zur gleichzeitigen Emission eines energieärmeren Lichts, d.h. eines Lichts mit längerer Wellenlänge, führt, dem sog. *Emissionslicht*. Ermöglicht wird die Absorption und Emission des Lichts durch die Struktur der Fluoreszenzfarbstoffe, die durch mehrere aromatische Ringstrukturen geprägt ist. Die delokalisierten Elektronenpaare der aromatischen Ringstrukturen lassen verstärkt Wechselwirkungen mit der Umgebung zu und daher auch die Absorption der Photonen des Anregungslichts. Kurzzeitig werden die Ringsysteme durch die Absorption auf ein instabiles höheres Energieniveau gehoben. Dieser höherenergetische Zustand dauert einige Nanosekunden (ca. 10 ns) und der Abfall auf Ausgangsniveau geht mit der Emission von Photonen, dem Emissionslicht, einher. Da die Energie jedoch nicht ausschließlich in Form von Photonen abgegeben wird, ist das Emissionslicht energieärmer, d.h. langwelliger als das Absorptionslicht und stellt sich somit andersfarbig dar. Dieser Zusammenhang wird auch als Stokes-Regel bezeichnet und der Stokes-Shift bzw. die Stokes-Differenz entspricht der konstanten Differenz der Wellenlänge des Anregungs- und des Emissionslichts einer fluoreszierenden Substanz (LAKOWICZ 2010). Verfügt man über die genaue Kenntnis des Stokes-Shifts einer fluoreszierenden Substanz, so ist es möglich, das Emissionslicht vom Anregungslicht mittels eines Filters zu trennen und so das reine Emissionslicht zu messen. Dieses Emissionslicht wird dann durch ein lichtmikroskopisches Bildgebungsverfahren erfasst und die mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten Objekte dargestellt (SAG 2007, KOHLHAAS 2006).

2.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Bei der Gruppe der Fluoreszenzfarbstoffe handelt sich generell um Substanzen mit fluoreszierenden Eigenschaften. Diese Eigenschaften, wie Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge oder Emissionsintensität, werden durch die selektive Bindung eines Moleküls oder eines Ions verändert (LAKOWICZ 2010, GRYNKIEWICZ et al. 1985). In dieser Arbeit kommen einerseits Ca^{2+}-Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, und andererseits ein Farbstoff, der im oxidierten Zustand fluoresziert und somit Hinweise auf das oxidative Milieu gibt.

Funktionell können die hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in zwei Gruppen eingeteilt werden, die ratiometrischen und die nicht ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffe. Beide Gruppen kamen in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung. Ratiometrische Farbstoffe, wie der hier verwendete Farbstoff Fura-2AM (s. Abb. 2.2, S. 24) zeichnen sich dadurch aus, dass

sie bei zwei verschiedenen Wellenlängen Licht absorbieren oder emittieren (LAKOWICZ 2010, GRYNKIEWICZ et al. 1985). Es ist nun möglich, ein Verhältnis dieser beiden Intensitäten zueinander zu bilden, das im Verlauf der Messung konstant bleibt und nicht durch etwaige Bleichvorgänge, die Konzentration des Farbstoffs oder des Farbstoffverlusts beeinträchtigt wird, da beide Intensitäten durch diese Faktoren im gleichen Maße beeinflusst werden (BARRETO-CHANG und DOLMETSCH 2009). In diesem Sinne eigenen sich ratiometrische Farbstoffe insbesondere für die semiquantitative Messung von Ca^{2+}-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum. Der Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale und der $[Ca^{2+}]_i$ wird durch folgende Formel erstmals ausgedrückt (GRYNKIEWICZ et al. 1985):

Formel 1:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times ((R-R_{min})/(R_{max}-R)) \times (S_{f2}/S_{b2})$$

R	berechneter Ratiowert der aufgenommenen Fluoreszenzintensität (für Fura-2 bei λ_{Ex} = 340 nm/380 nm)
R_{min}	Ratiowert der Fluoreszenzintensität en (λ_{Ex}=340 nm/ 380 nm) im Ca^{2+}-freien Zustand ($[Ca^{2+}] < 10^{-9}$ M)
R_{max}	Ratiowert der Fluoreszenzintensitäten (λ_{Ex}=340 nm/ 380 nm) im Ca^{2+}-gesättigten Zustand ($[Ca^{2+}] \geq 10^{-4}$ M)
K_d	Dissoziationskonstante des Farbstoffs
S_{f2}	Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im Ca^{2+}-freien Zustand
S_{b2}	Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im Ca^{2+}-gebundenen Zustand

(KOHLHAAS 2006)

Die fluoreszenzmikroskopische Messung mit Fura-2AM beruht auf einer Chelatkomplexbildung mit Ca^{2+} und auf einer Ca^{2+}-abhängigen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 380 nm zu 340 nm, das Emissionsmaximum hingegen bleibt unabhängig von der Ca^{2+}-Konzentration bei 510 nm (GRYNKIEWICZ et al. 1985, s. auch Abb. 2.2 B). Zur Berechnung der Ca^{2+}-Konzentration wird bei ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffen ein Quotient der Fluoreszenz der beiden Wellenlängen (Fura-2: F_{340nm}/F_{380nm}) gebildet.

Fura-2 zeichnet sich durch eine relativ hohe Ca^{2+}-Selektivität im Vergleich zu anderen Kationen aus, die Dissoziationskonstante (K_d) liegt bei 224 nM (COBBOLD und RINK 1987). Der Farbstoff ist in der Lage, schon bei geringen Konzentrationen (ca. 10 nM) Fluoreszenzsignale zu emittieren, die über der Eigenfluoreszenz der Zelle liegen und ermöglicht so $[Ca^{2+}]_i$ –Messungen im nanomolaren Bereich. Die maximale zeitliche Auflösung der intrazellulären Ca^{2+}-Messung mittels Fura-2 beträgt aufgrund der Bindungs- und Dissoziationskinetik ca. 5 ms (KAO und TSIEN 1988, JACKSON et al. 1987, COBBOLD und RINK 1987). Auf die Bestimmung einer eigenen Dissoziationskonstante und Kalibrierung des Farbstoffs auf quantitative Ca^{2+}-Werte für das hier verwendetet Modell wurde verzichtet. Bei den getätigten

Messungen handelt es sich um semiquantitative Daten, die nur im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu verstehen und auszuwerten sind.

Um die Beladung der Zelle mit Fura-2 zu ermöglichen, wurde das Molekül mit einer Azetoxymetylgruppe (AM) verestert. In diesem Zustand kann es die lipophile Zellmembran permeieren (INVITROGEN: www.invitrogen.com, GRYNKIEWICZ et al. 1985). In der Zelle werden diese Esterverbindungen dann durch zytosolische Esterasen gespalten und liegen daher in Salzform vor. Dies erlaubt die Bindung von Ionen, verhindert jedoch die erneute Diffusion durch die Membran.

Die Messung mithilfe des Farbstoffs Fura-2, der wie oben beschrieben mit Licht der Wellenlängen 340-380 nm, also UV-A-Licht, angeregt wird, kann durch die Bildung von ROS durch das kurzwellige Licht zellschädigend wirken und u.U. Auswirkungen auf den Ca^{2+}-Stoffwechsel haben (IHRIG et al., 1999, GABORIAU et al. 1995). Dieser Effekt ist dann besonders kritisch zu sehen, wenn die Messgeräte, insbesondere die Lichtquellen des Mikroskops, ausgetauscht werden (IHRIG et al., 1999), da es dann u.U. zu einer unterschiedlichen Belichtungsstärke kommen könnte und somit nicht mehr zu vergleichbaren Ergebnissen. Es gilt daher zu betonen, dass während der gesamten Messreihe die Lichtquellen nicht ausgetauscht wurden.

A **B**

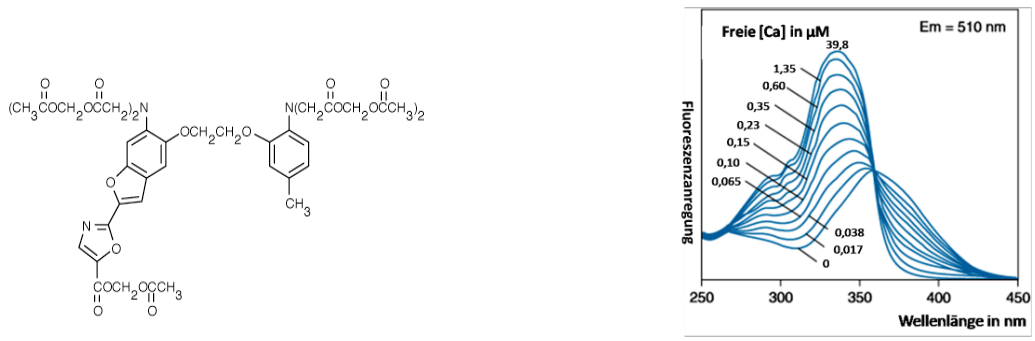


Abb. 2.2 Fura-2AM

A Strukturformel von Fura-2AM.
B Emissionsintensität von Fura-2 bei verschiedenen Ca^{2+}-Konzentrationen von 0 - 39,8 µM. Die Emission (Em) liegt bei 510 nm.

Modifiziert nach der Online Version von The Molecular Probes® Handbook 2012

Der Vorteil der nicht ratiometrischen Farbstoffe, die im Gegensatz zu den ratiometrischen Farbstoffen nur Licht einer Wellenlänge emittieren, liegt im günstigen Verhältnis von Signal zur Hintergrundfluoreszenz. In dieser Arbeit verwendete nicht ratiometrische Farbstoffe waren Fluo-4 zur Ca^{2+}-Messung und CM-H_2DCFDA zur Messung der $[ROS]_i$.

Fluo-4, ein Analogon des Farbstoffs Fluo-3, bei dem zwei Chloratome durch zwei Fluoratome ausgetauscht wurden (s. Abb. 2.3), stellt einen sehr sensitiven Ca^{2+}-Indikator dar. Das Absorptionsmaximum liegt bei ca. 488 nm und das Emissionsmaximum bei ca. 525

nm. Die K_d liegt bei ca. 350 nM. Ohne Ca^{2+}-Bindung besteht eine geringe intrinsische Fluoreszenz, jedoch zeigt sich eine starke Ca^{2+}-abhängige Fluoreszenzsteigerung, die analog zu Fluo-3 ungefähr eine 200-fache Zunahme bedeutet (HARKINS et al. 1993). Daher ist der Farbstoff besonders sensitiv und eignet sich gut zur Darstellung sehr geringer Ca^{2+}-Konzentrationen (INVITROGEN: www.invitrogen.com).

A **B**

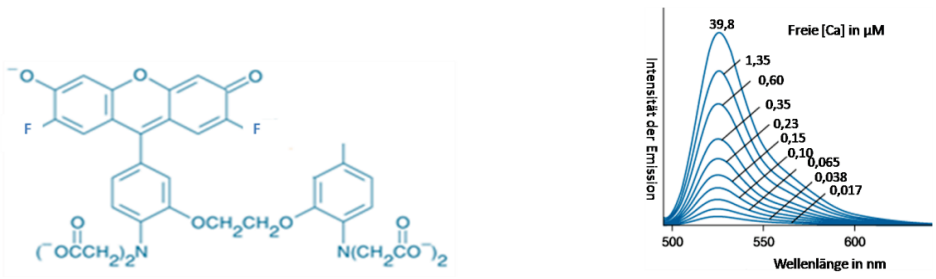


Abb. 2.3 Fluo-4

A Fluo-4-Strukturformel
B Emissionsspektrum von Fluo-4 in Abhängigkeit der freien $[Ca^{2+}]_i$
Modifiziert nach der Online Version von The Molecular Probes® Handbook 2012

Das Besondere des Farbstoffs CM-H_2DCFDA[5] ist, dass die Substanz erst im oxidierten Zustand fluoresziert, d.h. die Intensität der Fluoreszenz zeigt an, inwieweit das Redox-Milieu der Zelle in Richtung Oxidation verschoben ist. So kann die Generierung von ROS indirekt detektiert werden. Der Farbstoff emittiert nach Oxidation und Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich von 492-495 nm ein Fluoreszenzsignal einer Wellenlänge von 517-527 nm (The Molecular Probes® Handbook 2012, KOHLHAAS et al. 2010). Wichtig zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass lediglich eine Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden kann, da eine Reduktion des Farbstoffs nicht möglich ist.

[5] 5’,6’-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetatacetylester

A **B**

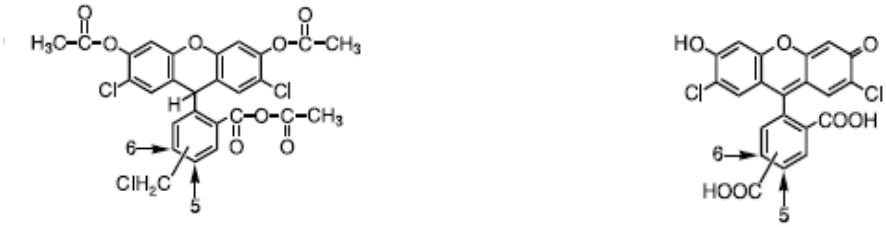


Abb. 2.4 CM-H_2DCFDA

A Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs CM-H_2DCFDA (nicht fluoreszierend).

B Deacetyliertes und oxidiertes Produkt, Dichlorodihydrofluorescein (DCF) (fluoreszierend).

Modifiziert nach der Online Version von The Molecular Probes® Handbook 2012

Als Limitation dieser Arbeit muss an dieser Stelle angeführt werden, dass DOX eine eigene Fluoreszenz hat. Die Substanz wird bei 470 nm maximal angeregt und emittiert maximal bei 585 nm. Die durch DOX emittierte Fluoreszenz wurde durch das Abziehen der am Ende des Experiments gemessenen Hintergrundfluoreszenz berücksichtigt.

2.2.3 Epifluoreszenzmikroskopie

Ziel der epifluoreszenzmikroskopischen Messung war es, die $[Ca^{2+}]_i$ mithilfe des Farbstoffes Fura-2AM zu messen. Die hier angewendete invertierte Epifluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, die fluktuierende $[Ca^{2+}]_i$ einer Herzmuskelzelle als Funktion der Zeit darzustellen, d.h. es werden sog. Ca^{2+}-Transienten abgebildet. Des Weiteren wurde die $[ROS]_i$ in Abhängigkeit der Zeit mittels des Farbstoffs CM-H_2DCFDA gemessen.

2.2.3.1 Versuchsaufbau

Für die Messungen wurde ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop mit einem 40-fach vergrößernden Ölimmersionsobjektiv der Firma ION OPTIX verwendet (Nikon Eclipse TE 200-U).

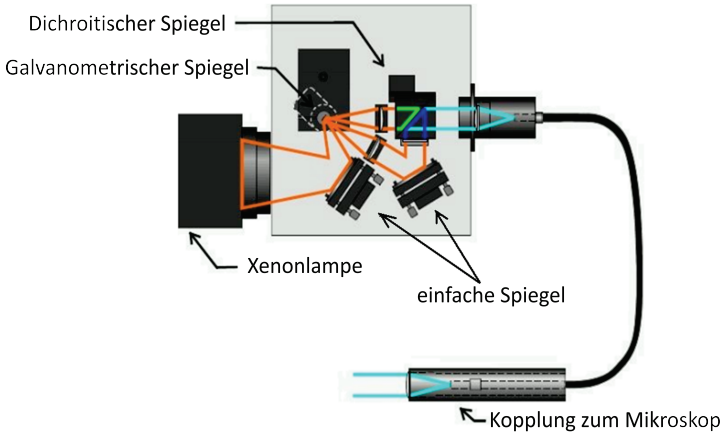


Abb. 2.5 Strahlengang der Epifluoreszenzmikroskopie modifiziert nach IONOPTIX (www.ionoptix.com) 2011

Zur Anregung diente das Licht einer 75 W Mercury Xenonlampe (Ushio, Japan). Das Licht wurde zunächst auf einen galvanometrischen Spiegel gelenkt (s. Abb. 2.5), der es erlaubte, zwischen den zwei Anregungswellenlängen hin und her zu stellen, um die Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängen für ratiometrische Farbstoffe, in dieser Arbeit Fura-2 AM, zu ermöglichen. Durch diesen Aufbau konnten bis zu 250 Ratiowerte der Wellenlängen pro Sekunde generiert werden (IONOPTIX: www.ionoptix.com). Für die Messung der nicht ratiometrischen Farbstoffe (wie z.B. CM-H_2DCFDA) konnte dieses Element aus dem Strahlengang herausgedreht werden. Das Licht wurde nun auf einen dichroitischen Spiegel gelenkt, dessen kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum des Farbstoffs liegt. Der dichroitische Spiegel zeichnet sich dadurch aus, dass er das Licht unter der kritischen Wellenlänge reflektiert und nur Licht über der kritischen Wellenlänge passieren lässt. Das kurzwellige Anregungslicht wurde daher reflektiert und so durch das Objektiv zum Präparat gelenkt, das langwelligere Emissionslicht konnte den Spiegel passieren. Ein Emissionsfilter eliminierte nun das Streulicht und die so bereinigte Fluoreszenz gelangte zum Photoelektronenvervielfacher (electron tubes limited, USA), der das einfallende Licht verstärkte und in elektrische Spannung umwandelte. Diese wurde durch den Analog-Digital-Wandler (Fluoreszenz System Interface, Ion Optix, Milton, USA) in ein digitales Signal umwandelt, das in die IonWizard Software 5.0 (IonOptix 1999) eingespeist wurde. Die verwendeten Spiegel und Filter stammen von der Firma Chroma Technology Corp, USA.

Die in das Mikroskop eingespannte Kammer wurde mithilfe eines Zulaufsystems mit Flüssigkeit superfundiert und simultan mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die Zellen wurden während der Messungen durch den Myopacer Field Stimulator (Ion Optix, USA) elektrisch stimuliert und so zur Kontraktion angeregt (SAG 2007, SOSSALLA 2006).

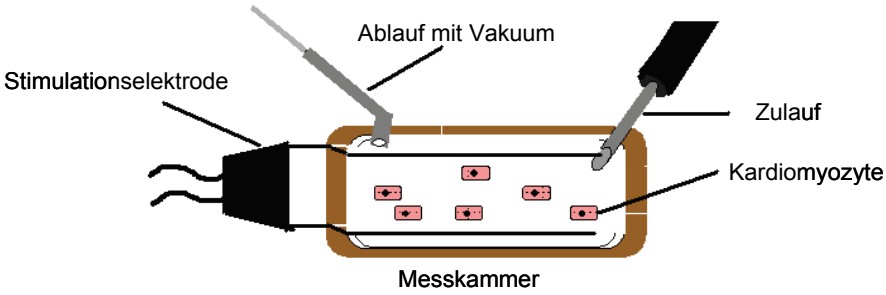


Abb. 2.6 Versuchsaufbau und Messkammer
modifiziert nach SOSSALLA 2006, S. 34

2.2.3.2 Versuchsdurchführung

Von den aus adulten Rattenherzen isolierten Kardiomyozyten wurden jeweils ca. 300 µl als Zellsuspension auf eine Messkammer (Ion Optix) ausplattiert, nachdem diese mit 2 µl Laminin (Sigma-Aldrich) bestrichen wurden, um eine Zellhaftung zu ermöglichen. Es folgte eine mindestens 15-minütige Ruheperiode im Inkubator bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO_2), in der die Zellen sedimentieren und an das Laminin binden konnten. Als nächstes wurde der Überstand mit der Pipette abgenommen und die Zellen mit 200 µl Färbelösung (Zusammensetzung s. Kap. 2.2.5, S. 35) in einer Konzentration von 10 µM bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug bei Fura-2AM 15 min, bei CM-H_2DCFDA 20 min. Die Messkammer konnte daraufhin ins Mikroskop eingespannt werden und die Farbstofflösung über fünf Minuten mit Superfusions-Tyrode (Zusammensetzung s. Kap. 2.2.5, S. 35) bei Raumtemperatur und einer Superfusionsgeschwindigkeit von 60 ml/h ausgespült werden. Während dieser Zeitspanne wurde eine elektrische Stimulation mit 2 Hz bei 20 V begonnen, an die sich die Zellen in diesen fünf Minuten adaptieren konnten (TIMOLATI et al. 2006, SAG 2007).

Für die Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ca. eine Minute nach Beginn der Messung die Superfusion von Normaltyrode auf Doxorubicinlösung (Zusammensetzung Kap. 2.2.5, S. 35) in einer Konzentration von jeweils 1 µM bzw. 10 µM mit einer Superfusionsgeschwindigkeit von 60 ml/h umgestellt. In den Kontrollgruppen wurde weiter mit Superfusions-Tyrode superfundiert. Es wurde von einer Zelle sowohl die $[Ca^{2+}]_i$ als auch die mechanische Kontraktion kontinuierlich über einen Zeitraum von einer halben Stunde gemessen. Nach diesem Zeitraum wurde eine Koffeinlösung (Zusammensetzung s. Kap. 2.2.5, S. 35) appliziert. Die Applikation des Koffeins führte dazu, dass durch eine generalisierte Öffnung der RyR der Zelle sämtliches Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt wurde (PESSAH et al. 1987, BASSANI et al. 1993, BERS 2001). So konnte der SR-Ca^{2+}-Gehalt bestimmt werden. Dazu wurde der vorhergehende Ca^{2+}-Transient in Relation gesetzt, so dass die fraktionelle Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR bezogen auf den SR-Ca^{2+}-Gehalt errechnet werden konnte.

Zur pharmakologischen Inhibition der CaMKII wurde KN-93[6] (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA, s. Abb. 2.7) in einer Konzentration von 1 µM verwendet. Bei KN-93 handelt es sich um ein Methoxybenzensulfonamid, das als selektiver kompetitiver Inhibitor der CaMKII fungiert (SUMI et al. 1991). Als inaktives Analogon wurde in den Kontrollgruppen KN-92[7] (Calbiochem, s. Abb. 2.8) in der gleichen Konzentration verwendet. Um die Zellen mit den Inhibitoren zu beladen, wurden die Messkammern vor Beginn der Stimulation 15 min mit einer KN-92- bzw. KN-93-haltigen Lösung (s. Tab. 2.2.5, S. 35) superfundiert. KN-92/KN-93 wurde ebenfalls zu der Doxorubicinlösung in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Die Inhibitionsversuche wurden nur bei einer Doxorubicinkonzentration von 10 µM durchgeführt, ansonsten analog zum vorhergegangenen Protokoll.

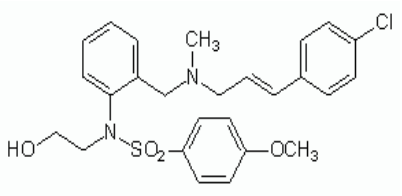


Abb. 2.7 KN-93
MERCK CHEMICALS (www.merck-chemicals.com) 2011

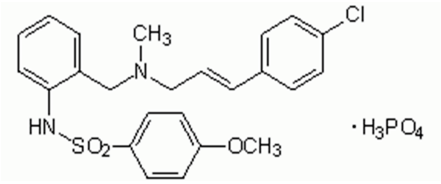


Abb. 2.8 KN-92
MERCK CHEMICALS (www.merck-chemicals.com) 2011

Für die Messungen der $[ROS]_i$ wurde nach der Einschlagzeit von 5 min direkt mit der Superfusion mit 10-µM-Doxorubicinlösung begonnen und für 30 Minuten pro Minute über 10 s die Fluoreszenz gemessen.

Die Hintergrundfluoreszenz wurde im Anschluss an jede Messung bestimmt, indem ein zellfreier Bildausschnitt in unmittelbarer Nachbarschaft der gemessenen Zelle von identischer Fläche gewählt wurde und dessen Fluoreszenzintensitäten bestimmt wurde. Damit wurde die Fluoreszenz des gesamten Messsystems einschließlich der Fluoreszenz der jeweiligen Tyrode sowie Streustrahlung benachbarter Zellen erfasst. Dann wurde die Hintergrundfluoreszenz abgezogen (s. Kap. 2.2.3.3, s.u.).

[6] 2-[N-(2-hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzensulfonyl)]amino-N-(4 -chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamin
[7] 2-[N-(4-methoxybezensulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinamyl)-N-methylbenzylaminphosphat

2.2.3.3 Auswertung

Die Auswertung des gemessenen Fluoreszenzsignals erfolgte mittels der Software *ION WIZARD ANALYZE* Version 5.0 (Ion Optix).

Die Messung der Ca^{2+}-Parameter wurde anhand des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2AM durch Berechnung der Ratio der emittierten Fluoreszenzsignale anhand folgender Formel durchgeführt:

Formel 2:

$$F_{Ratio} = \frac{F\ 340\ nm - F_{BG}\ 340\ nm}{F\ 380\ nm - F_{BG}\ 380\ nm}$$

F = Fluoreszenz
F_{BG} = Hintergrundfluoreszenz

Der Abfall der Ca^{2+}-Transienten (τ_{Ca}) wurde als monoexponentielle Funktion dargestellt, wobei A die Amplitude und t die Zeit darstellen (s. Formel 3 und Abb. 2.9). Als Parameter wurde die Dauer des Abfalls des Ca^{2+}-Transienten um 80 % der Ca^{2+}-Transientenamplitude verwendet.

Formel 3:

$$\tau_{Ca} = A \cdot e^{-\tau/t}$$

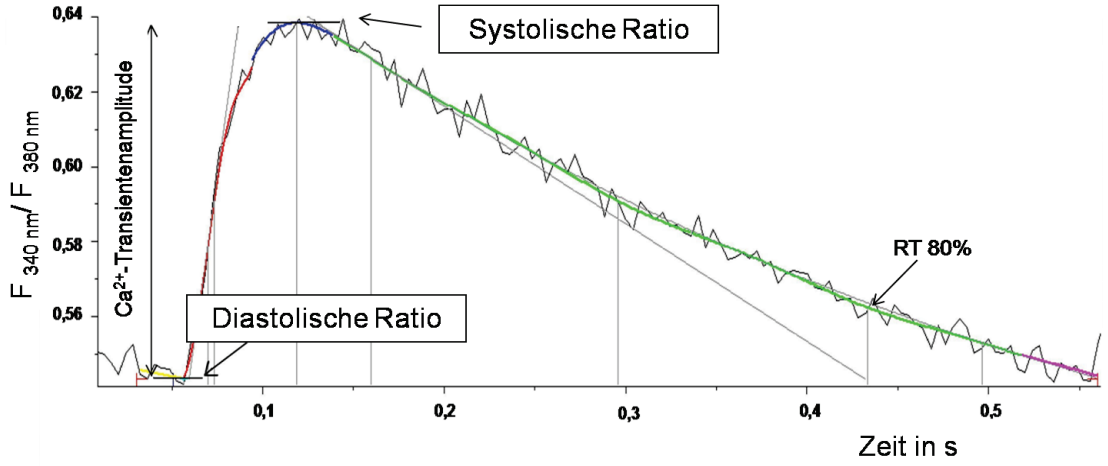


Abb. 2.9 Gemittelter Ca^{2+}-Transient mit Fura-2 – Ratio $F_{340\ nm}$/ $F_{380\ nm}$ bei 2 Hz

Bei der Messung der Radikalfluoreszenz wurde die Hintergrundfluoreszenz analog gemessen und ebenfalls eine Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz vom Messwert durchgeführt.

2.2.4 Konfokalmikroskopie

Ziel der konfokalmikroskopischen Messungen war es, den spontanen diastolischen Ca^{2+}-Verlust des SR, das sog. Ca^{2+}-Leck, darzustellen. Fluoreszenzmikroskopisch wurden diastolisch kleine lokale Spitzen in der zytosolischen $[Ca^{2+}]_i$ detektiert, die sog. Ca^{2+}-Sparks. Diese Ca^{2+}-Sparks wurden als spontane kurze Öffnungen einzelner RyR gewertet, die ohne erkennbaren Stimulus Ca^{2+} freisetzen (s. Kap. 1.2.2, S. 5 ff, CHENG et al. 1993, BERS 2001). Als quantitativ messbarer Parameter wurden die Ca^{2+}-Sparks, die innerhalb einer bestimmten Zeit auf einer definierten Fläche auftraten, verwendet.

Bei der Konfokalmikroskopie handelt es sich um ein lichtmikroskopisches Verfahren, das wie die Epifluoreszenzmikroskopie fluoreszierende Farbstoffe abbildet, aber sich zusätzlich dadurch auszeichnet, dass durch den gezielten Einsatz von Lochblenden Licht aus einer Fokusebene betrachtet werden kann, da das Licht aus den anderen Ebenen weitestgehend ausgeblendet wird.

Die hier angewandte Laserscanning-Konfokalmikroskopie (LSM 5 Pascal Laser Module, Carl Zeiss AG, Göttingen) beruht im Wesentlichen auf zwei Säulen: die punktuelle Belichtung mithilfe von Laserlicht, die das sog. Scanning[8] im Sinne einer Bildzerlegung in Pixel zur Folge hat und die punktuelle Aufzeichnung der im Fokus liegenden Schicht, die insbesondere durch den Einsatz von Lochblenden ermöglicht wird (CORLE und KINO 1996, HOUPT und DRAAIJER 1989). Die Probe wird also mithilfe von Laserlicht angeregt, d.h. der Laserstrahl wird Punkt für Punkt über das Objekt bewegt und rastert es (HOUPT und DRAAIJER 1989). Es entsteht daher kein gesamtes Bild, sondern die einzelnen Bildpunkte (Pixel) werden abgebildet. Die hier angewendete Methode des Line-Scan[9] bedeutet, dass eine Bildzeile, zusammengesetzt aus einer bestimmten Anzahl an Pixeln, immer wieder über einen bestimmten Zeitraum abgebildet wird.

Das Laserlicht fällt über ein doppeltes Linsensystem ein und gelangt dann über das Objektiv auf die Probe (s. Abb. 2.10). Durch die Anordnung der Linsen ist es möglich, dass der Strahlengang sowohl zur Belichtung der Probe als auch zur Abbildung der Probe gleich ist, d.h. das Licht wird von der Probe entsprechend des Strahlengangs reflektiert. Im Strahlengang befindet sich dann ein Strahlteiler (hierbei handelt es sich um einen dichroitischen Spiegel, s. Kap. 2.2.3.1, S. 27), der das Licht in Abhängigkeit seiner Wellenlänge zu einem

[8] engl. *die Bildzerlegung*
[9] engl. *Aufzeichnung einer Bildzeile*

Detektor leitet und so in der Lage ist, Exzitations- von Emissionslicht zu trennen (CORLE und KINO 1996).

Die Verwendung von Lochblenden im Sinne von Ortsfiltern ermöglicht die Darstellung einer Schicht, da Strahlen aus den anderen Schichten durch die Lochblende herausgefiltert werden (CORLE und KINO 1996). Das bedeutet, dass nur das Licht aus der Mitte des Strahlengangs, d.h. das Licht direkt aus der Probenebene, auf den Detektor trifft und dass das restliche Licht abgeschirmt wird (s. Abb. 2.10). Dadurch wird nur die im Fokus liegende Schicht dargestellt und das aus anderen Schichten stammende Licht wird herausgefiltert. Idealerweise ist der Lochblendendurchmesser unendlich klein, so dass ein optimaler Kontrast geschaffen wird (WILHELM 2010). Hier muss im Versuchsaufbau ein Kompromiss zwischen ausreichender Belichtungsstärke im Sinne eines ausreichend großen Durchmessers der Lochblende und der Kontrastschärfe erzielt werden.

Das von der Probe ausgehende Emissionslicht wird von einem Photoelektronenvervielfacher detektiert, in seiner Intensität verstärkt, in elektrische Spannung umgewandelt und an den Analog-Digital-Wandler weitergegeben, der die elektrische Spannung in digitale Signale umwandelt. Die Signalstärke korreliert damit mit der Fluoreszenzintensität. Dabei wird das Signal synchronisiert mit der punktuellen Laser-Anregung aufgezeichnet, so dass so die zu einem jeweiligen Bildpunkt gehörende Fluoreszenzintensität registriert werden kann.

In dem verwendeten Versuchsaufbau sind die durch die Apparatur gegebenen Dimensionen jedes Bildpunkts 0,075 x 0,075 x 0,075 μm^3. Die Registrierung erfolgte dabei unidirektional, d.h. nach Aufzeichnung einer Bildzeile erfolgte ein Rücklauf der Laser-Position an den Ausgangspunkt, so dass die darauf folgende Zeile in derselben Richtung aufgezeichnet wurde. Zur Registrierung von 5000 Bildzeilen (jeweils 512 Pixel) wurden dabei 3850 ms benötigt, dies entspricht einer Zeilenfrequenz von ca. 1,3 Bildzeilen pro ms bzw. ca. 1299 Zeilen pro s.

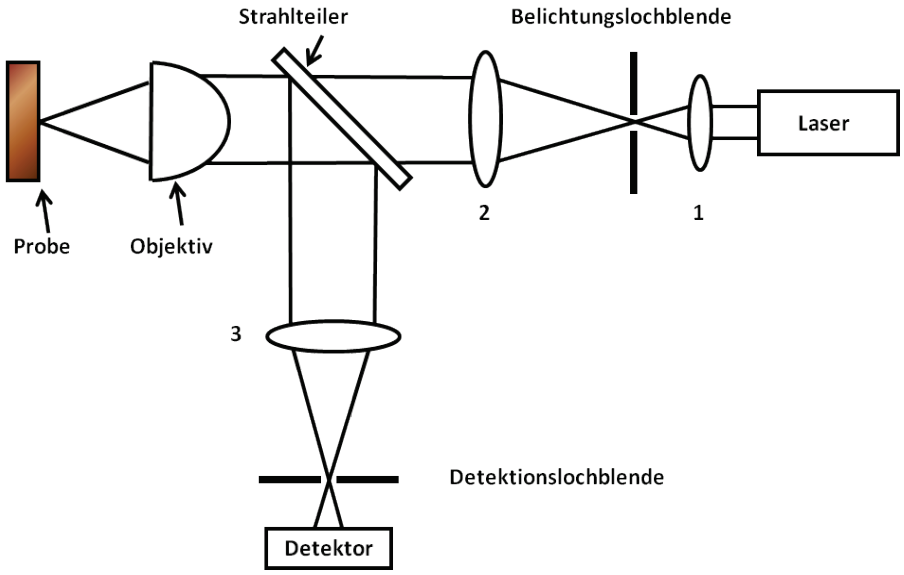


Abb. 2.10 Strahlengang der Konfokalmikroskopie

Das Laserlicht wird zunächst durch eine Linse (1) gebündelt und durch die Belichtungslochblende fokussiert. Über eine weitere konfokal dazu angeordnete Linse (2) wird das Laserlicht auf das Objektiv geleitet und darüber dann die Probe belichtet. Analog dazu wird das Licht durch die Probe reflektiert und fällt dann auf den Strahlteiler, der die kritische Wellenlänge zunächst auf eine weitere Linse (3) und darüber auf den Detektor deflektiert. Davor verhindert die Detektionslochblende den Einfall von Emissionslicht, das nicht aus der fokussierten Schicht stammt.

modifiziert nach CORLE und KINO 1996, S. 32

2.2.4.1 Versuchsdurchführung

Vor Beginn der Messung wurden die isolierten Kardiomyozyten analog zum Protokoll der epifluoreszenzmikroskopischen Versuche ausplattiert (s. Kap. 2.2.3.2, S. 28 f). Als nächstes wurden 200 µl des verwendeten Farbstoffs Fluo-4 in 10-µM-Konzentration appliziert (Lösung s. Kap. 2.2.5, S. 35) und 20 min inkubiert. Nach dieser Vorbereitung wurde die Kammer in das Konfokalmikroskop eingespannt und 5 min mit DOX-Lösung bei Raumtemperatur und einer Geschwindigkeit von 60 ml/h superfudiert (Doxorubicinlösung s. Kap. 2.2.5, S. 35). Die Kontrollzellen wurden analog mit Superfusionstyrode superfundiert (s. Kap. 2.2.5, S.35). Gleichzeitig wurde die elektrische Stimulation der Kardiomyozyten mit 0,5 Hz bei 20 V begonnen. Nach 5 min wurde begonnen, die Zellen für ca. 3,85 s zu messen, d.h. innerhalb dieser Zeit konnte eine Bildzeile von 512 Pixeln 5000-mal abgebildet werden. Eine Zellkammer wurde maximal für 15 min gemessen.

Zur pharmakologischen Inhibition wurde Autocamtide-2-related inhibitory peptide (AIP, Alexis, Farmingdale, USA) verwendet, ein spezifischer und sehr potenter CaMKII-Inhibitor (ISHIDA et al. 1995). AIP wurde in 1 µM Konzentration verwendet (s. Kap. 2.2.5, S. 35) und die Zellen wurden zunächst 15 min mit AIP-Inhibitionslösung superfundiert, dann erst wurde mit 1 µM AIP versetzter Doxorubicinlösung superfundiert.

Myr-N-Lys-Lys-Ala-Leu-Arg-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Asp-Ala-Leu-OH

Abb. 2.11 Primärstruktur von AIP (myristoyliert, *grün*).

Das N-terminale Ende ist mit N, das C-terminale Ende mit OH gekennzeichnet.

(Ala=Alanin, Arg=Arginin, Asp=Aspartat, Gln=Glutamin, Glu=Glutamat, Leu=Leucin, Lys=Lysin, Val=Valin)

Für eine bessere Zellpermeabilität wurde eine myristoylierte Version eingesetzt, d.h. das Peptid wurde an Myristinsäure (Myr), eine aliphatische, gesättigte Carbonsäure, amidisch gebunden, so dass durch elektrostatische sowie hydrophobe Effekte die Translokation über die Membran ermöglicht wurde (SEFTON und BUSS 1987, MURRAY et al. 1997, PEITZSCH und McLAUGHLIN 1993, NELSON et al. 2007, ENZO LIFE SCIENCES 2012).

modifiziert nach MERCK CHEMICALS (www.merck-chemicals.com) 2011

2.2.4.2 Auswertung

Im Anschluss an die Messung wurde die Länge des gemessenen Zellabschnitts ausgemessen und die Ca^{2+}-Sparks in diesem Abschnitt gezählt. Zur Auswertung des erstellten Falschfarbenbildes wurde die Software PASCAL LSM 5 Version 3.2 verwendet.

Zur Bewertung der Ca^{2+}-Sparks wurde die Intensität des Signals als Quotient der aktuellen Fluoreszenz während des Experiments (F_t) und der Fluoreszenz der Ruhekalziumkonzentration (F_0) dargestellt. Dieser Quotient wurde wie folgt berechnet:

Formel 4:

$$F/F_0 = \frac{F_t - F_{BG}}{F_0 - F_{BG}}$$

Als Ca^{2+}-Spark wurde ein lokaler Ca^{2+}-Transient gewertet, der ein $F/F_0 > 1{,}2$ aufwies.

Neben der Ca^{2+}-Sparkfrequenz, die in Sparks x 100 μm^{-1} x s^{-1} angegeben wird, wurde ein weiterer Parameter zur Quantifizierung des spontanen diastolischen Ca^{2+}-Austritts aus dem SR, der SR-Ca^{2+}-Verlust oder das sog. *SR-Ca^{2+}-Leak,* bestimmt. Der SR-Ca^{2+}-Verlust ist das Produkt der Mittelwerte der Ca^{2+}-Sparkfrequenz, bezogen auf eine Sekunde und 100 µm, der Amplitude, der Breite und der Dauer der einzelnen Ca^{2+}-Sparks (NEEF et al. 2010) und wird dimensionslos angegeben.

2.2.5 Ansetzen von Lösungen und Farbstoffen

In der folgenden Tab. findet sich eine Zusammenstellung der verwendeten Superfusions-, Inhibitions- und Färbelösungen. Die Färbelösungen wurden im Dunkeln angesetzt und in lichtgeschützten 0,5-ml-Reaktionsgefäßen bei -20 °C aufbewahrt.

Tab. 2.4: Superfusions- und Färbelösungen

Lösung	Substanz	Konzentration	Hersteller	Molare Masse	Bemerkungen
Superfusionstyrode (=Normaltyrode)	NaCl	140 mM	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	58,44 g/mol	in ddH_2O gelöst, mit NaOH (Roth) auf pH=7,4 eingestellt; $CaCl_2$ wurde erst unmittelbar vor der Messung dazu gegeben
	KCl	4 mM	Sigma-Aldrich	74,55 g/mol	
	$MgCl_2$	1 mM	Merck	95,21 g/mol	
	HEPES	5 mM	Roth	238,31 g/mol	
	Glucose	10 mM	Roth	180,16 g/mol	
	$CaCl_2$	1,2 mM	Fluka	110,98 g/mol	
Doxorubicinlösung	Doxorubicin hydrochloride, suitabe for fluorescence	1 µM bzw. 10 µM	Sigma-Aldrich, No. 44583	579,98 g/mol	2,9 mg in 5 ml Normaltyrode ohne Kalzium gelöst als Vorratslösung, zur Anwendung 50 µl bzw. 500 µl mit 50 ml Normaltyrode verdünnt
Koffeinlösung	Caffeine	10 mM	Sigma-Aldrich, No. C0750	194,2 g/mol	1,94 g Caffeine in 1 l Normaltyrode auflösen
KN-93	KN-93	1 µM	Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA, No. 422711	599 g/mol	1 mg in 166,95 µl H_2O (J.T.Baker) gelöst für Vorratslösung von 10 mM, für Endkonzentration wurden 5 µl der Vorratslösung auf 50 ml Normaltyrode gegeben
KN-92	KN-92	1 µM	Calbiochem, No. 422709	555 g/mol	1 mg in 180,18 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) gelöst für Vorratslösung von 10 mM, dann wurde analog zu KN-93 verfahren
AIP	Autocamtide-2-related-Inhibitory-Peptide (AIP) (Myristoylated)	1 µM	Alexis, ALX-151-030-MC05	1708,1 g/mol	0,5 mg AIP in 292,72 µl H_2O gelöst für Vorratslösung von 1 mM, dann 50 µl auf 50 ml Normaltyrode gegebn für Endkonzentration von 1µM

Lösung	Substanz	Masse/Volumen	Hersteller	Molare Masse	Bemerkungen
Fura-2AM Endkonzentration: 10 µM	Fura-2AM	50 µl	Invitrogen Carlsbad, USA, No. F1201	1001,86 g/mol	1 mg Fura-2 AM in 998,1 µl DMSO (Sigma-Aldrich) gelöst, Pluronic acid 20% in DMSO gelöst mit einer Konzentration von 200 mg/ml
	Pluronic acid 20%	5 µl	Sigma-Aldrich		
	Normaltyrode	5 ml			
CM-H_2DCFDA Endkonzentration: 10 µM	CM-H_2DCFDA	50 µg	Invitrogen, No. C6827	577,80 g/mol	CM-H_2DCFDA in 86,5 µl DMSO gelöst
	Pluronic acid 20%	8,65 µl	Sigma-Aldrich		
	Normaltyrode	8,65 ml			
Fluo-4AM Endkonzentration: 10 µM	Fluo-4AM	50 µg	Invitrogen, No. F14201	1096,95 g/mol	Fluo-4AM in 45,6 µl DMSO gelöst
	Pluronic acid 20%	4,56 µl	Sigma-Aldrich		
	Normaltyrode	4,56 ml			

2.3 Western Blot

Für die Western-Blot-Experimente wurden isolierte Myokardzellen aus adulten Rattenherzen verwendet, die, genau wie die Zellen für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche, durch Herzmuskelzellisolation gewonnen wurden (s. Kap. 2.1, S. 19 ff).

2.3.1 Inkubation mit DOX und Vorbereitung der Zellen

Nach vollendeter Isolation wurden ca. 200 000 Zellen in 5 ml M199-Medium (s. Kap. 2.1, S. 21) resuspendiert und in einem Gewebskulturflasche (5 cm^3) für 30 min bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert, wobei 50 µl der 1-mM-Doxorubicinvorratslösung (s. Kap. 2.2.5, S. 35) bzw. der Kontrollgruppe 50 µl Normaltyrode (s. Kap. 2.2.5, S. 35) zugefügt wurden. Die Endkonzentration der Doxorubicinlösung war 10 µM.

2.3.2 Gewinnung des Proteins und Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach Inkubation der Zellen mit DOX wurde die Zellsuspension in 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Dieser Vorgang wurde vier Mal wiederholt. Danach wurde das Zellpellet in 200 µl Lysepuffer (s. Tab. 2.5) resuspendiert und 30 min inkubiert, nach 15 min erneut resuspendiert und mehrfach gevortext, so dass der Proteingehalt der Zellen freigelegt wurde. Als nächstes wurde diese Lösung erneut für 10 min bei 4 °C und einer Geschwindigkeit von 3 kG zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein weiteres 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Zentrifugation wurde nach diesem Schema noch zwei Mal wiederholt.

Tab. 2.5: Lysepuffer

Substanz	Masse/Volumen	Konzentration	Hersteller	Bermerkung
Tris-HCl-Puffer	100 µl	2 M	Roth	pH=7,4
NaCl	500 µl	4 M	Roth	
NaF	1000 µl	200 mM	Roth	
Triton X-100 Puffer	100 µl	1%	Sigma-Aldrich	
DTT	100 µl	100 mM	Sigma-Aldrich	Dithiothreitol
Na_3VO_4	100 µl	100 mM	Sigma-Aldrich	
Complete-EDTA-free Proteinase Inhibitor	1 Tablette		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim No. 04693132001	Polyvinylpyrrolidon 1-5%, Polyethylenglykol 1-5%, D-Mannitol 70-80%, 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid-hydrochlorid 10-20%
PhosStop Phosphataseinhibitor	½ Tablette		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim No. 04906837001	5,6% Natriummolybdat, 3,7% Natriumorthovanadat, 0,4% Cantharidin
Die Substanzen wurden mit ddH_2O auf 10 ml aufgefüllt.				

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration kam das BCA-Protein-Assay-Kit (A Nr. 23233, B Nr. 23244) zum Einsatz. Die Proben wurden für die Proteinbestimmung zunächst mit 95 µl PBS[10] auf 5 µl Probe verdünnt. In jeweils drei Vertiefungen einer 96-Well-Platte

[10] phosphatgepufferte Salzlösung, engl. *phosphat buffered saline*

wurden 25 µl der erhaltenen Lösungen pipettiert, so dass letztendlich pro Probe drei Proteinkonzentrationen bestimmt werden konnten, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde. Als Negativprobe wurde eine Lösung aus 95 µl PBS und 5 µl Lysepuffer (s. Tab. 2.5) verwendet, deren Wert von den Proteinkonzentrationen abgezogen wurde. Nun wurden 200 µl der Farbstofflösung aus dem BCA-Protein-Assay-Kit hinzugefügt und kurz auf dem Schüttler (Thermomixer, Eppendorf) geschüttelt. Danach wurden die Proben mit der Farbstofflösung für 5 min bei 95 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Exstinktionsmessung mit dem Photometer (Wellenlänge: 562 nm) zur Feststellung der Proteinkonzentration. Bei einer Abweichung der Proben über 10% wurde das Experiment wiederholt. Mittels PBS wurden die Proben dann auf einheitliche Konzentrationen verdünnt.

Die Proben wurden zur Denaturierung und Reduktion der Proteine für 5 min bei 95 °C mit Lämmli-Puffer, der 2% ß-Mercaptoethanol (Roth) enthielt, versetzt.

2.3.3 SDS-Gelelektrophorese und elektrischer Proteintransfer

Die SDS-Gelelektrophorese diente der Auftrennung der Proteine in der Probe. Hierbei waren für die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten die verschiedenen Größen der Proteine entscheidend. Durch den anschließenden Proteintransfer konnten die Banden nach abgeschlossener Auftrennung des Proteins mittels elektrischer Spannung vom Gel auf eine Membran übertragen werden (RENART et al. 1979, SAG et al. 2007, KOHLHAAS et al. 2006, MAIER et al. 2003, FREY 1999).

Zum Gießen der Gele wurde eine Anlage von Biorad verwendet, die aus zwei verschieden dicken Glasplatten, die in einen Plexiglasständer mit zwei Schnapphalterungen auf einer Plastikbühne auf einer Schwammplatte eingespannt wurden, bestand (Biorad, München).

Tab. 2.6: Zusammensetzung der Gele

Substanz	Hersteller	Tenngel, ca. 8%	Sammelgel, ca. 5%	Bemerkung
Polyacrylamid	Rotiophorese Gel 30, Roth	2,9 ml	0,83 ml	
ddH_2O	Gibco	4,5 ml	2,86 ml	
pH-Lösung*		2,5 ml	1,25 ml	
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck	10 µl	5 µl	Diese beiden Substanzen wurden erst kurz vor dem Gießen des jeweiligen Gels hinzugefügt, da diese beiden Substanzen die Polymerisation des Gels in Gang setzen.
APS 10% (Ammoniumperoxodisulfat)		100 µl	50 µl	

* für das Trenngel wurde eine pH-Lösung mit dem pH=8,8, für das Sammelgel eine pH-Lösung mit pH=6,8 verwendet, die Zusammensetzung war wie folgt: pH= 8,8: 45,5 g TRIS-Base (Trishydroxymethylaminomethan, Roth) wurde mit 1M NaOH (Merck) auf pH=8,8 eingestellt, 1,0 g SDS (Sodium Dodecylsulfate, Roth) wurde hinzugefügt und schließlich wurde auf 250 ml mit ddH_2O aufgefüllt; pH= 6,8: 6,05 g TRIS-Base wurde mit 1M NaOH auf pH=6,8 eingestellt, 0,4 g SDS wurden hinzugefügt und schließlich wurde auf auf 100 ml mit ddH_2O aufgefüllt

Nachdem die Substanzen für das Trenngel in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen pipettiert und gut durchmischt wurden, wurde das Gel vorsichtig zwischen die Glasplatten pipettiert, bis der Spiegel ca. 1 cm unter dem oberen Rand stand. Die Oberfläche des Gels wurde mit ca. 200 µl Propanol (Roth) beschichtet, um Luftblasen zu eliminieren. Nach 15 min bei Raumtemperatur war die Polymerisation abgeschlossen, das Propanol wurde vorsichtig abgenommen. Das Sammelgel konnte nun über das Trenngel aufgetragen werden. Bevor das Sammelgel begann sich zu verfestigen, wurde ein Plastikkamm (Biorad) zur Formung der Geltaschen, in denen die Proteine aufgetragen wurden, vorsichtig in das Gel hinein gedrückt. Nach weiteren 15 min bei Raumtemperatur war das Sammelgel polymerisiert (RENART et al. 1979, SAG et al. 2007, KOHLHAAS et al. 2006, MAIER et al. 2003, FREY 1999).

Nun wurden die Glasplatten aus der Halterung genommen und in die Elektrophorese-Kammer (Biorad) eingespannt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer (s. Tab. 2.7) aufgefüllt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Gel mit Proben beladen, wobei als erstes in der äußersten Geltasche 3 µl Marker aufgetragen wurde (PEQGOLD Protein-Marker V ‚Prestained', PEQLAB Biotechnologie GmbH, Bestell.Nr. 27-2210). Für die Messung der Expression der CaMKII wurden 7,5 µl Probenvolumen verwendet, für die Messung des Phosphorylierungsstatus, d.h. die Detektion der phosphorylierten CaMKII (pCaMKII), wurden 20 µl Probenvolumen aufgetragen.

Kontrollproben wurden abwechselnd mit DOX-exponierten Proben aufgetragen. Nach der Beladung der Taschen wurde die Gelelektrophorese bei 60 mA[11] und 200 V begonnen. Bei den angegebenen Gelkonzentrationen betrug die Laufzeit ca. 2 Stunden.

[11] *Amperzahl für das Einspannen von zwei Gelen in der Vorrichtung*

Tab. 2.7: Laufpuffer, 5 fach-Vorratslösung

Substanz	Masse	Hersteller
TRIS Base (Trishydroxyaminomethan)	30,2 g	Roth
Glycin	144 g	Roth
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	10 g	Roth

10 g wurden in 100 ml ddH_2O aufgelöst, der pH-Wert wurde mit Na OH und HCl auf pH=8,3 eingestellt, 400 ml der Vorratslösung wurden mit ddH_2O auf 2 l aufgefüllt

Für den elektrischen Transfer wurde zunächst ein flaches Plastikgefäß mit Transferpuffer gefüllt. In den Transferpuffer wurden zwei Schwämme (Biorad) und vier Nitrocellulosepapierstücke in der Größe des Gels sowie eine Nitrozellulose-Transfer-Membran (Whatman Protran, Dassel) eingetaucht und vollständig befeuchtet. Das Gel wurde von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel stumpf entfernt. Das Gel wurde nun vorsichtig auf die Membran gelegt, die wiederum auf zwei Stückchen Nitrocellulosepapier und einem darunter befindlichen Schwamm lag. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden, die den Transfer hätten behindern können; diese wurden ansonsten vorsichtig ausgestrichen. Das Gel wurde mit zwei Nitrozellulosepapierstücken und einem Schwamm bedeckt. Dieses Prozedere entspricht dem Prinzip nach Towbin (TOWBIN et al. 1979, FREY 1999). Die gesamte Schichtung wurde in die Transferkartusche (Biorad) eingespannt. Die Transferkammer, in welche die Transferkartusche geschoben wurde, wurde mit Transferpuffer (s. Tab. 2.8) aufgefüllt. Der zweistündige Transfer wurde bei 400 mA und 200 V unter ständiger Kühlung durchgeführt (RENART et al. 1979, SAG et al. 2007, KOHL-HAAS et al. 2006, MAIER et al. 2003).

Tab. 2.8: Transferpuffer

5fach konzentrierte Vorrtatslösung			
Substanz	**Masse**	**Hersteller**	**Bemerkung**
TRIS Base	39,4 g	Roth	in 2 l ddH_2O gelöst
Glycin	144 g	Roth	
Einfach konzentrierter Transferpuffer zur Anwendung			
Substanz	**Volumen**	**Hersteller**	**Bemerkung**
5fach-Vorratslösung	400 ml		in 2 l ddH_2O gelöst
Methanol	400 ml	Roth	
SDS 10% *(10 g auf 100 ml ddH_2O)*	2 ml	Roth	

Nach dem vollendeten Transfer wurde die Membran, auf die die Proteinbanden übertragen worden waren, in ein kleines Plastikgefäß überführt und in dem Farbstoff Ponceau S (Sigma) geschwenkt. Dadurch wurden die Banden reversibel rot angefärbt, um die Membran zerschneiden zu können, so dass eine Inkubation mit verschiedenen Antikörperinkubationen

möglich war. Danach wurde die Membran dreifach mit TBS/Tween-Mix[12] (s. Tab. 2.9) gespült, um den Farbstoff wieder zu entfernen.

Anschließend wurde die Membran mit 5 % Blockierpuffer (s. Tab. 2.9) behandelt, der in einem flachen Plastikgefäß bei Raumtemperatur für 60 min unter ständigem Schwenken inkubierte, um die Membran mit Protein aufzusättigen und so unspezifische Bindungen des Antikörpers zu minimieren.

Tab. 2.9: Blockierpuffer

Substanz	Masse/ Voulmen	Hersteller	Bemerkung
Vorratslösung			
TRIS Base	48,4 g	Roth	auf 2 l mit ddH_2O aufgefüllt, mit NaOH und HCl auf pH=7,5 eingestellt
NaCl	58,48 g	Roth	
Einfache TBS/Tween-Lösung			
Vorratslösung	200 ml		auf 2 l mit ddH_2O aufgefüllt
Tween 20	2 ml	Merck	
Einfacher Blockierpuffer			
TBS/Tween-Lösung	50 ml		angesetzt im 50-ml-Falconröhrchen, unter ständigem Rühren aufgelöst
Milchpulver	2,5 g	Roth	

2.3.4 Inkubation der Antikörper

Nach dieser Behandlung wurden die Membranen entlang der markierten Schnittlinien zerschnitten und mit dem Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper richtete sich gegen das gesuchte Protein. Die Werte wurden auf Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Konzentrationen normalisiert, um Unterschiede in der Proteinkonzentration bzw. -expression der Proben auszugleichen. Die verdünnten Antikörper (s. Tab. 2.10) wurden über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schwenken inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen dreifach mit TBS gewaschen (SAG et al. 2007, KOHLHAAS et al. 2006, MAIER et al. 2003, FREY 1999).

Die Sekundärantikörper dienen der Detektion der gebundenen Primärantikörper und wurden daher entsprechend der antikörperproduzierenden Spezies der Primärantikörper gewählt. Die verdünnten Antikörper (s. Tab. 2.10) wurden für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation der Sekundärantikörper wurde die Membran erneut dreifach mit TBS gewaschen (FREY 1999).

[12] engl. *tris-buffered saline*

Tab. 2.10: Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Volumen Primärantikörper	Blockierpuffer, (5% Trockenmilch, s. Tab. 2.9)	PBS
CaMKII (Rabbit), Geschenk von D. Bers	1 : 15 000	0,3 µl	1 ml	4 ml
Phospho-CaMKII (Thr286) (Mouse), LBA Affinity BioReagents, Golden, USA, #MA1-047	1 : 1000	5 µl	1 ml	4 ml
GAPDH (Mouse), BioTrend BT, Köln 46-9995-55	1 : 100 000	0,1 µl	2 ml	8 ml
Sekundärantikörper	**Verdünnung**	**Volumen Primärantikörper**	**Blockierpuffer, (5% Trockenmilch, s. Tab. 2.9)**	**PBS**
CaMKII (Anti-Rabbit), GE Healthcare, München #NA 934	1 : 15 000	0,3 µl	1 ml	4 ml
Phospho-CaMKII (Anti-Mouse), GE Healthcare #NA 931	1 : 5 000	1 µl	1 ml	4 ml
GAPDH (Anti-Mouse), GE Healthcare #NA 931	1 : 30 000	0,3 µl	2 ml	8 ml

2.3.5 Entwicklung und Auswertung

Um die Banden nun auf Fotofolie festhalten zu können, wurde die Membran nun in 4 ml luminol- und peroxidhaltiger Chemolumineszenz-Lösung (Immobilon Western, Millipore, Schwalbach), die kurz vorher gemischt wurde, für 5 min inkubiert. Die Wirkung der Chemolumineszenzlösung basiert auf der Oxidation von Luminol durch Peroxid. Aufgrund der Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers werden die durch ihn markierten Banden sichtbar gemacht (MILLIPORE: www.millipore.com). Anschließend wurde die Membran in eine Fotokassette (Siemens) eingespannt, in die in der Dunkelkammer auf die Membran eine Fotofolie (Fuji medical X-ray film, Fujifilm) eingelegt wurde. Die Fotokassette wurde in die Entwicklungsmaschine geschoben, wo die Folie belichtet wurde. Es war allerdings nötig, die Belichtung entsprechend der Bandenstärke in mehreren Belichtungsdurchgängen anzupassen. Schließlich wurde die Bandenintensität mit dem *Imaging-Densitometer* (MultiImage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation) ausgewertet (FREY 1999).

2.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwerte dargestellt, unter Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts, der sich aus dem Quotient der Standardabweichung σ und der Wurzel der Anzahl n der Versuche ergibt. Diese Variante wurde gewählt, da es sich bei isolierten ventrikulären Rattenkardiomyozyten um eine homogene Gruppe von Versuchsobjekten handelte.

Formel 5:

$$\text{Standardfehler des Mittelwerts: } \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Für die Analyse wiederholter Messungen, d.h. für die longitudinale Erfassung von Daten, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse ANOVA für wiederholte Messungen mit dem Student-Newman-Keuls-Posthoc-Test verwendet. Bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse werden zwei unabhängige Faktoren berücksichtigt, die die Zielvariable möglicherweise beeinflussen. In dieser Arbeit ist einer der Faktoren die Zeit, über die die Myozyten der Stimulation ausgesetzt sind, und der andere die Behandlung mit DOX. Die Zielvariable wird abhängig vom Ziel des jeweiligen Experiments gemessen.

Für die punktuelle Gegenüberstellung von Daten aus zwei Gruppen wurde der *student's t-test* (t-Test) verwendet.

Die Berechnungen wurden mittels des Statistikprogramms GRAPH PAD PRISM 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) erstellt. Für die Berechnung des ANOVA wurde das Statistikprogramm SigmaStat 3.0 (Systat Software, Chicago, USA) verwendet. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P<0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von DOX auf den Redoxstatus und die Ca^{2+}-Homöostase der Herzmuskelzelle

3.1.1 DOX-Exposition erhöht die intrazelluläre ROS-Konzentration ($[ROS]_i$)

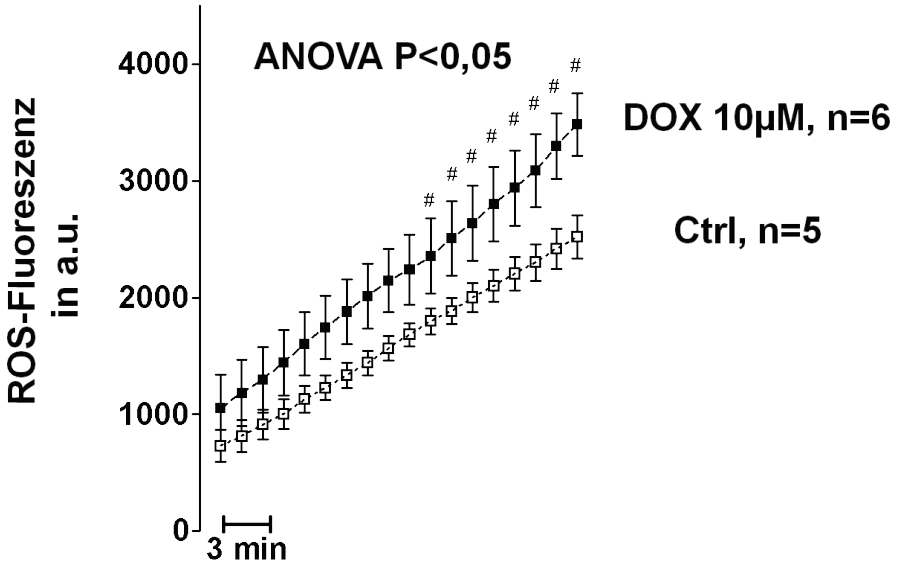


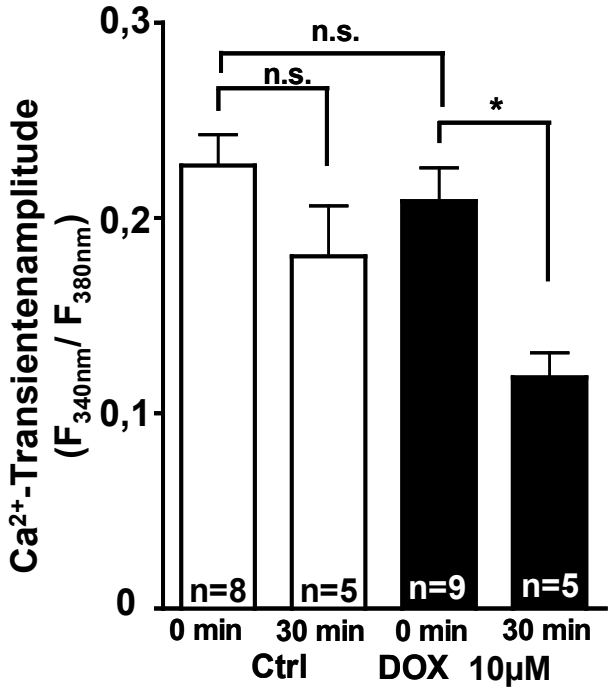
Abb. 3.1 Verlauf der Oxidations-vermittelten Fluoreszenz
als Funktion der Zeit unter Einfluss von 10 µM DOX (schwarze Quadrate) und in der Kontrollgruppe (weiße Quadrate).
 # kennzeichnet Signifikanz nach dem Student-Newman-Keuls-Posthoc-Test.

Wie die Abb. 3.1 illustriert, zeigte sich epifluoreszenzmikroskopisch in isolierten Kardiomyozyten, die ca. 25 min lang einer 10-µM-DOX-Konzentration ausgesetzt waren, ein Anstieg der an das oxidative Redox-Milieu gekoppelten Fluoreszenz (CM-H_2DCFDA, 10 µM, s. Kap. 2.2.5, S. 35) von 1218±296 a.u. ([arbitrary units], *willkürlich festgelegte Fluoreszenzeinheit*) auf 3643±256 a.u. (n=6). In der Kontrollgruppe stieg die Fluoreszenz von 827±121 a.u. auf 2490±223 a.u. (n=5). Nach Einwirkung von 10 µM DOX lag eine Erhöhung der ROS-Fluoreszenz auf 146% im Vergleich zur Kontrollgruppe vor (s. Abb. 3.1). Die Zellen stammen aus vier Versuchstieren und die Anfangsfluoreszenzwerte der Kardiomyozyten waren nicht verschieden (P=0,26). Die Fluoreszenzmessungen wurden in Abständen von 60-80 s vorgenommen. Nach Beendigung der 25-minütigen DOX-Exposition zeigte sich im zweifaktoriellen ANOVA für wiederholte Messungen eine signifikante Differenz (P<0,05). Der Student-Newman-Keuls-Posthoc-Test zeigte einen signifikanten Unterschied nach 20 min.

Dieses Ergebnis legt den Rückschluss auf eine erhöhte $[ROS]_i$ nach DOX-Exposition nahe.

3.1.2 Die Ca^{2+}-Transientenamplitude ist nach DOX-Exposition erniedrigt

A



B

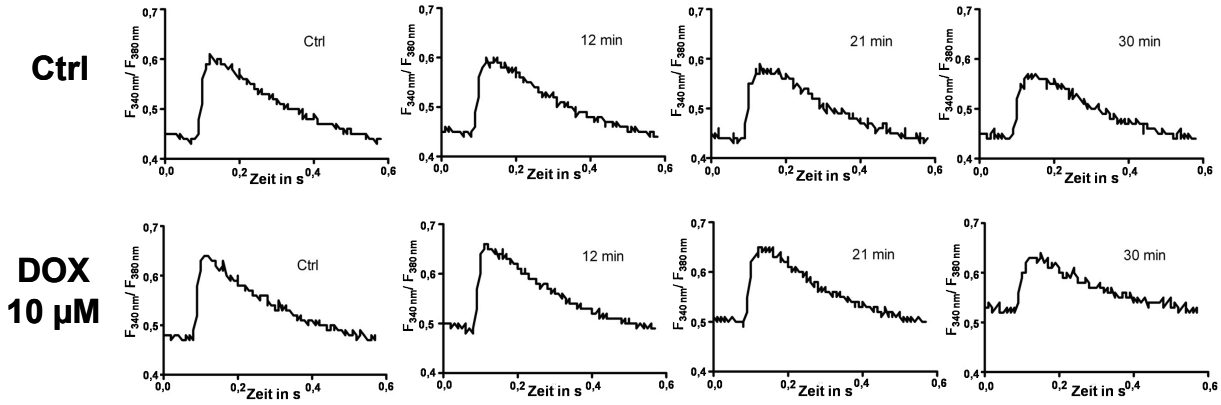


Abb. 3.2 Ca^{2+}-Transienten
A Über 30 min nimmt die Ca^{2+}-Transientenamplitude unter Einwirkung von DOX in 10-µM-Konzentration (schwarze Säulen) stärker ab als in der Kontrolle (weiße Säulen).
B Original-Ca^{2+}-Transienten (gemessen mit dem Farbstoff Fura-2AM) im Vergleich
** kennzeichnet Signifikanz im gepaarten t-Test.*

Die Ca^{2+}-Transientenamplitude, gemessen mit Fura-2AM (10 µM), betrug nach 30 min DOX-Exposition bei einer 10-µM-Konzentration 0,12±0,01 r.u. (ratio units, $F_{340\ nm}/F_{380\ nm}$), während sie nach 30 min Stimulation in der Kontrollgruppe 0,18±0,03 r.u. betrug (s. Abb. 3.2). Die Ca^{2+}-Transientenamplitude ist in beiden Gruppen über 30 min gesunken, jedoch in der Gruppe, die mit einer 10-µM-DOX-Konzentration behandelt wurde, auf 61% des Ausgangswerts, in der Kontrollgruppe hingegen nur auf 80 %. Im gepaarten t-Test zeigte sich

eine signifikante Differenz nach 30 min innerhalb der DOX-exponierten Gruppe (P=0,02), während der Abfall der Ca^{2+}-Transienten in der Kontrollgruppe kein signifikantes Niveau erreichte (P=0,15). Zu Beginn der Messung war in den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied der Ca^{2+}-Transientenamplitude zu detektieren (P=0,45). Die Zellen stammen aus sieben Versuchstieren.

Dieses Ergebnis zeigt also eine reduzierte Ca^{2+}-Transientenamplitude unter dem Einfluss von DOX. Für dieses Phänomen kommen verschiedene Erklärungsansätze infrage, unter anderem muss die toxische Wirkung der Substanz, u.a. durch eine erhöhte Radikallast, sowie die diastolische Ca^{2+}-Überladung durch eine Depletion des SR in Erwägung gezogen werden (s. Kap. 4.3.1, S. 65 ff).

3.1.3 Die diastolische Ca^{2+}-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ steigt unter dem Einfluss von DOX

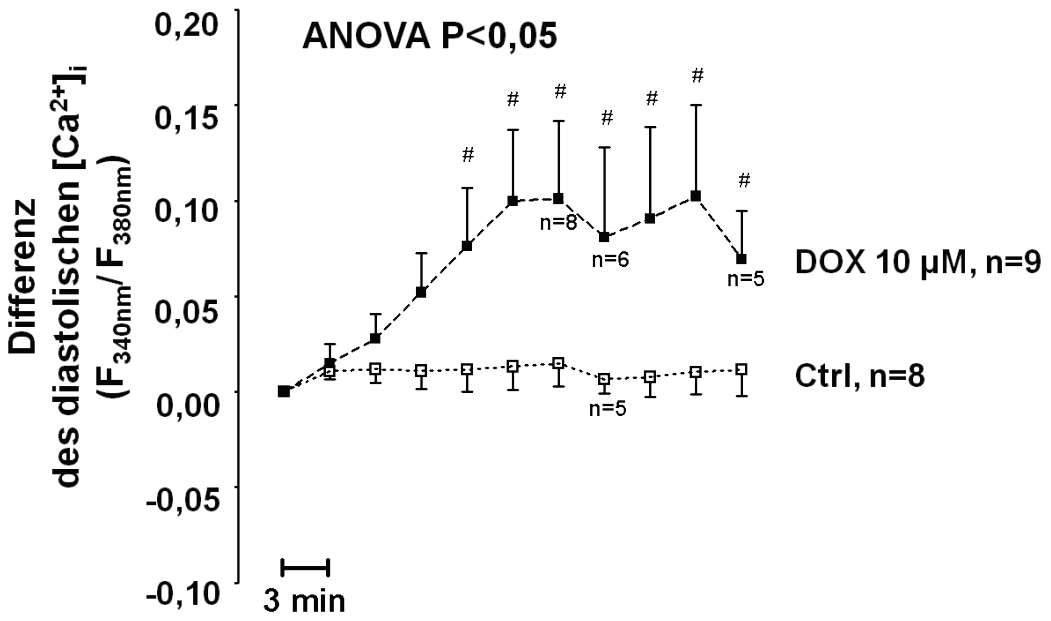


Abb. 3.3 Differenz des diastolischen $[Ca^{2+}]_i$
unter 10 µM DOX (schwarze Quadrate) und Kontrolle (weiße Quadrate) über 30 min. Die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ ist nach DOX-Exposition signifikant erhöht.
 # kennzeichnet Signifikanz nach dem Student-Newman-Keuls-Posthoc-Test.

Bereits nach 15 minütiger DOX-Exposition war in der mit 10 µM DOX behandelten Gruppe die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ auf 119% im Vergleich zum Kontrollniveau zu Beginn des Experiments gestiegen. Die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ betrug 0,62±0,04 r.u. im Vergleich zu 0,56±0,04 r.u. in der Kontrollgruppe bei 15 min. Nach 30-minütiger DOX-Exposition lag die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ in der mit 10 µM DOX exponierten Gruppe bei 0,58±0,04 r.u., während das Niveau der Kontrollgruppe nach 30 min bei 0,52±0,04 r.u. lag (s. Abb.3.3). Das bedeutet, dass die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ in der DOX-exponierten Gruppe nach 30 min um 0,07±0,03 r.u. gestiegen war, während es in der Kontrollgruppe nur zu einem Anstieg um 0,01±0,01 r.u. kam. Zu Beginn der Messung lagen die n-Zahlen bei n=8 respektive n=9. Die Anfangswerte waren nicht statistisch verschieden (P=0,49). Die Zellen stammen aus sieben Versuchstieren. Im zweifaktoriellen ANOVA für wiederholte Messungen zeigte sich eine signifikante Differenz (P<0,05). Der Student-Newman-Keuls-Posthoc-Test zeigte eine signifikante Differenz zwischen den beiden Gruppen ab 15 min.

In einer weiteren Gruppe, die mit einer nur 1-µM-Konzentration DOX behandelt wurde, zeigte sich eine Tendenz zu einer diastolischen Ca^{2+}-Überladung; die Fluoreszenzwerte stiegen hier auf 105% nach 30 min im Vergleich zu 113% nach Applikation der 10-fachen Konzentration über den gleichen Zeitraum. Dieser Trend war jedoch statistisch nicht signifikant (P=0,09).

Diese Ergebnisse zeigen also eine signifikant erhöhte diastolische $[Ca^{2+}]_i$ unter dem Einfluss von 10 µM DOX sowie eine tendenzielle Erhöhung des diastolischen Ca^{2+} unter der 1-µM-Konzentration.

3.1.4 Die NCX-Funktion ist nach DOX-Exposition gesteigert bei unveränderter Dauer des Ca^{2+}Transientenabfalls

Tab. 3.1 Ca^{2+}-Transientenabfall

Abfall der Ca^{2+}-Transienten um 80% in s		
	Ctrl	**10 µM DOX**
	0,278	0,272
	0,283	0,207
	0,290	0,254
	0,241	0,360
	0,292	0,335
Mittelwert	**0,277**	**0,286**
SEM	**0,009**	**0,028**
t-Test		**0,77**

Abfall der Ca^{2+}-Transienten um 80% in s
nach 30 min Stimulation mit 2 Hz in der Kontrollgruppe und in der DOX-exponierten Gruppe

Tab. 3.2 NCX-Funktion

τ_{Ca} der Koffeintransienten (NCX-Funktion)		
	Ctrl	**10 µM DOX**
	2,674	0,594
	2,689	0,469
	2,625	2,272
	2,828	0,781
	3,735	2,303
Mittelwert	**2,671**	**1,214**
SEM	**0,294**	**0,344**
t-Test		**0,009**

τ_{Ca} der Koffeintransienten in s
(Ca^{2+}-Transienten ausgelöst durch Superfusion mit einer 10-mM-Koffeinlösung) nach 30 min Stimulation bzw. 30 min Stimulation und Superfusion mit 10 µM DOX als Parameter für die Funktion des NCX

Die Dauer des Abfalls des Ca^{2+}-Transienten um 80% ist in der Kontrollgruppe und in der mit DOX behandelten Gruppe nicht signifikant verschieden (s. Tab. 3.1). Es ist daher wahrscheinlich, dass das Relaxationsverhalten nicht unterschiedlich ist. Die Zellen stammen aus drei Versuchstieren.

In den Koffeintransienten, die nach 30 min DOX-Behandlung induziert wurden, zeigte sich jedoch eine deutlich verkürzte Dauer des Abfalls der Koffeintransienten. Für die Messung wurde der Parameter τ_{aC}, eine monoexponentielle Funktion der Zeit, verwendet (s. Kap. 2.2.3.3, S. 30 f). Die Dauer dieses Abfalls in den Koffeintransienten verhält sich invers zu der NCX-Funktion und kann als indirekter Funktionsparameter des NCX gelten. τ_{aC} betrug nach 30 min DOX-Exposition 1,21±0,34 s, während die Dauer in der Kontrollgruppe 2,67±0,29 s betrug (s. Tab.3.2). Im t-Test zeigte sich eine signifikante Differenz (P=0,009). In der mit 1 µM DOX exponierten Gruppe war der Parameter tendenziell erniedrigt (τ_{aC} =2,22±0,52 s), jedoch erreichte dieser Wert keine Signifikanz. Die Zellen stammen aus drei Tieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz einer gesteigerten NCX-Funktion der Abfall der Ca^{2+}-Transienten unverändert ist.

3.1.5 Die Frequenz der Ca^{2+}-Sparks ist unter DOX erhöht

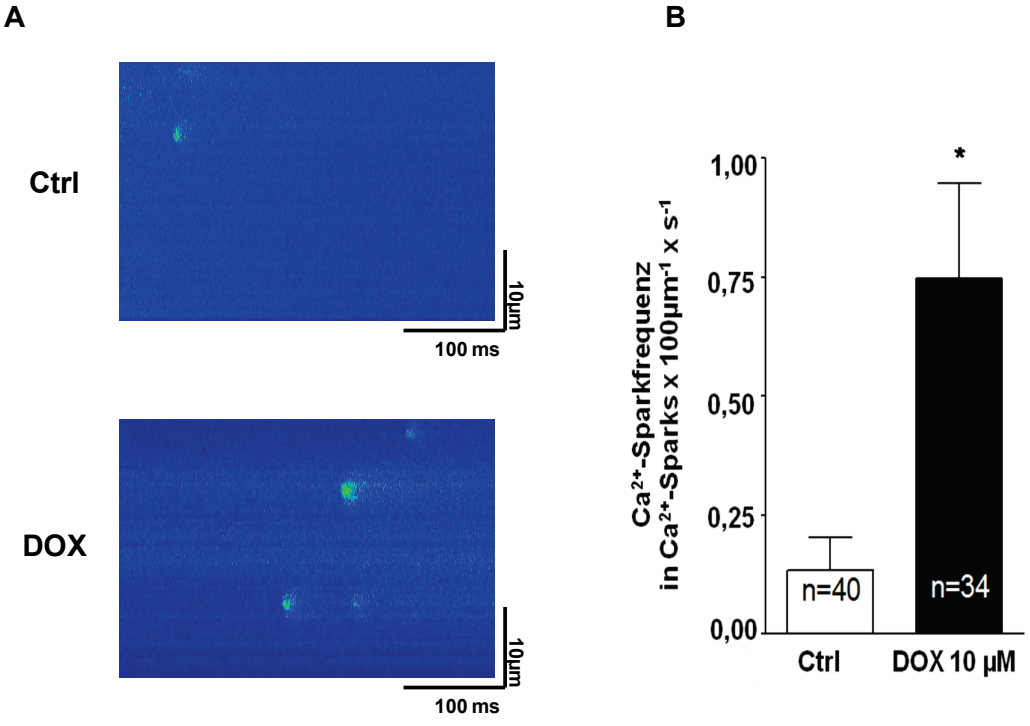


Abb. 3.4 Ca^{2+}-Sparkfrequenz ist unter Einwirkung von DOX dramatisch erhöht.
A konfokalmikroskopisches Originalbild mit 10 µM DOX (unten) und Kontrolle (oben)
B Ca^{2+}-Sparkfrequenz ist nach Einwirkung von 10 µM DOX (schwarz) über max. 15 min deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle (weiß)

Tab. 3.3 Eigenschaften der Ca^{2+}-Sparks unter DOX und Kontrollbedingungen

	Ca^{2+}-Sparkdauer (ms)		Ca^{2+}-Sparkamplitude (F/F_0)		Ca^{2+}-Sparkbreite (µm)	
	Ctrl	**10 µM DOX**	**Ctrl**	**10 µM DOX**	**Ctrl**	**10µM DOX**
	86,8	56,22	1,2	1,33	2,55	2,4
	52,01	111,63	1,38	1,27	2,92	2,77
	72,5	45,23	1,3	1,2	1,87	1,65
	65,54	127,31	1,3	1,24	2,02	1,94
	80,65	122,38	1,3	1,49	2,92	2,17
		99,33		2,12		2,1
		124,94		1,31		2,17
		42,61		1,25		1,27
		109		1,3		2,1
		100,9		1,28		1,66
		57,16		1,34		1,87
		94,44		1,25		3,07
		60,17		1,6		1,8
		24,38		1,36		1,8
		86,86		1,25		1,65
		100,83		1,36		2,77
		120,22		1,34		2,55
		43,37		1,42		1,27
Mittelwert	**71,5**	**84,8**	**1,3**	**1,37**	**2,46**	**2,06**
SEM	**6,06**	**7,9**	**0,03**	**0,05**	**0,22**	**0,12**
P-Wert		**0,4**		**0,43**		**0,13**

Die Ca^{2+}-Sparkfrequenz war, konfokalmikroskopisch gemessen, unter 10-µM-DOX-Exposition von 0,13 Sparks x 100 μm^{-1} x s^{-1} in der Kontrollgruppe auf 0,75 Sparks x 100 μm^{-1}

x s^{-1} erhöht, das heißt um das ca. 5,8-fache gesteigert (n=41 vs. n=34, t-Test P<0,05). In beiden Gruppen wurden Zellen, die keine Ca^{2+}-Sparks zeigten, eingeschlossen. Die Ca^{2+}-Sparkamplitude unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die Ca^{2+}-Sparkdauer war ebenfalls nicht signifikant verschieden (84,8±7,9 ms im Vergleich zu 71,5±6,1 ms in der Kontrollgruppe, P=0,4). Die Ca^{2+}-Sparkbreite war in der 10-µM-DOX-exponierten Gruppe tendenziell erniedrigt, und zwar auf 2,1±0,1 µm, im Vergleich zu 2,5±0,2 µm in der Kontrollgruppe. Diese Tendenz war allerdings nicht signifikant (P=0,13, vlg. Tab. 3.3). Der SR-Ca^{2+}-Verlust war trotzdem aufgrund der hohen Differenz der Ca^{2+}-Sparkfrequenz deutlich erhöht, und zwar von 28±14 auf 151±46 (t-Test P<0,05). Die Zellen stammen aus vier Tieren.

Diese Ergebnisse zeigen einen deutlich erhöhten Ca^{2+}-Verlust aus dem SR nach DOX-Einwirkung.

3.1.6 Der SR-Ca^{2+}-Gehalt ist unter DOX-Einfluss erniedrigt

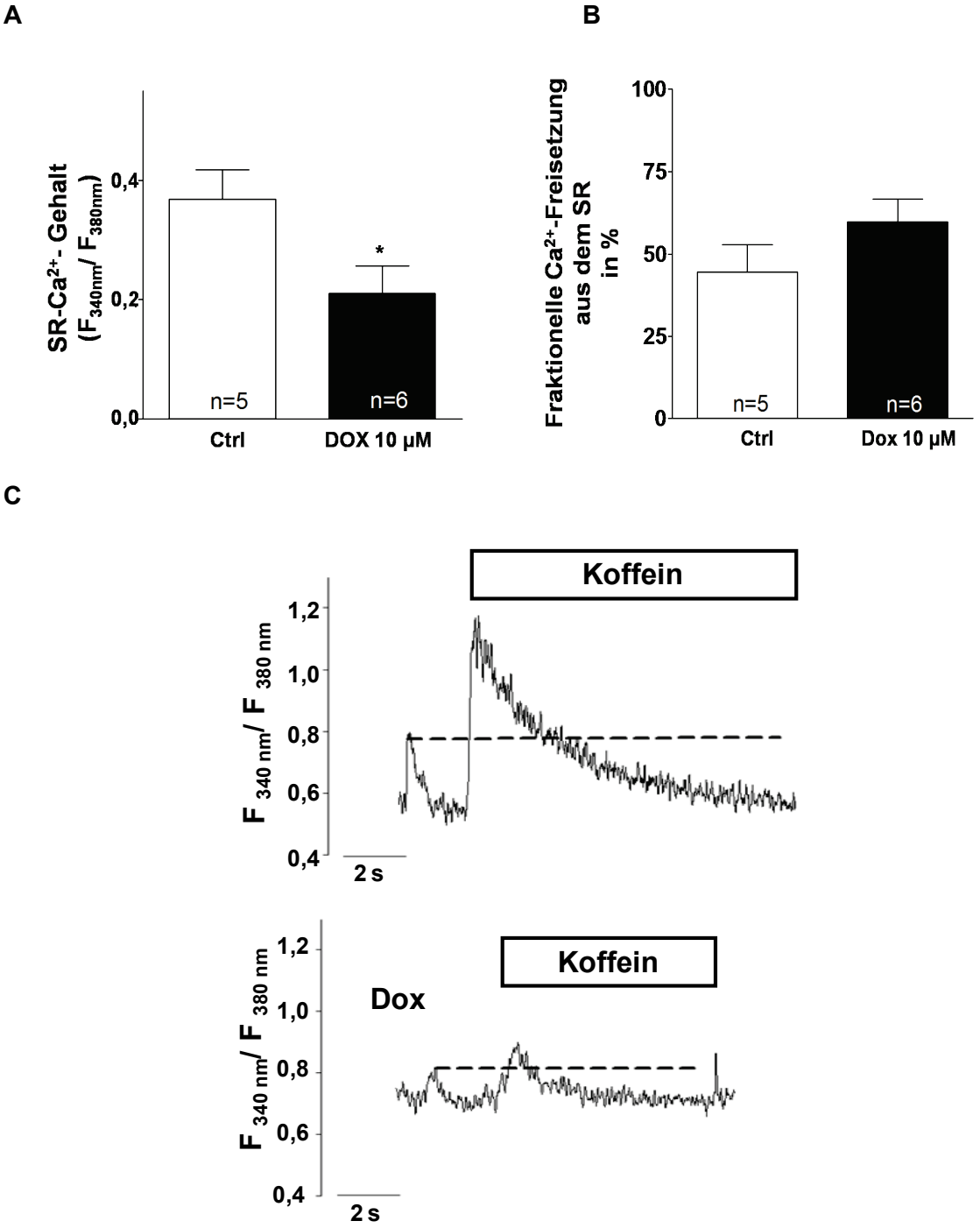


Abb. 3.5 Ca^{2+}-Gehalt des SR und fraktionelle Ca^{2+}-Freisetzung
A SR-Ca^{2+}-Gehalt nach 30 min Stimulation in der Kontrolle (weiß) und 10-µM-DOX-Exposition (schwarz) in $F_{340\ nm}$/ $F_{380\ nm}$
B Ca^{2+}-Ausschüttung aus dem SR bei einem einzelnen Ca^{2+}-Transienten in Relation zum Ca^{2+}-Gehalt des SR in Prozent, analog zum SR-Ca^{2+}-Gehalt
C Koffein-induzierte Originaltransienten zur Darstellung des SR-Ca^{2+}-Gehalts unter 10-µM-DOX-Exposition (unten) und in der Kontrolle (oben) nach 30 min Stimulation bzw. Stimulation und DOX-Exposition

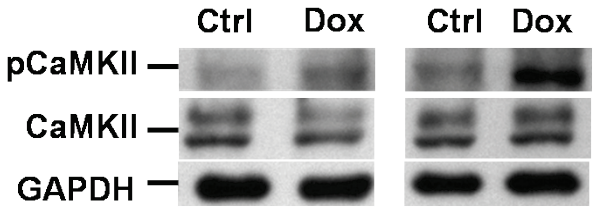
Entsprechend des hohen SR-Ca^{2+}-Verlusts konnte ein verminderter SR-Ca^{2+}-Gehalt anhand von Koffeintransienten festgestellt werden. Es zeigte sich epifluoreszenzmikroskopisch

ein signifikanter Abfall des SR-Ca^{2+}-Gehalts von 0,37±0,05 r.u. (n=5) auf 0,21±0,05 r.u. (n=6) nach 30-minütiger DOX-Exposition einer Konzentration von 10 µM (s. Abb. 3.6 A und C, t-Test P=0,044). Die relative Ca^{2+}-Ausschüttung während der Systole im Verhältnis zum SR-Ca^{2+}-Gehalt stieg tendenziell, und zwar von ca. 45% in der Kontrollgruppe auf ca. 64% bei der 10-µM-DOX-exponierten Gruppe (s. Abb. 3.5 B, t-Test P>0,05, nicht signifikant). In der 1-µM-DOX-exponierten Gruppe zeigte sich der gleiche Trend, der jedoch kein statistisch signifikantes Niveau erreichte. Die Zellen stammen aus vier Versuchstieren.

Diese Ergebnisse zeigen einen deutlich reduzierten SR-Ca^{2+}-Gehalt nach DOX-Exposition.

3.2 CaMKII-Phosphorylierung ist nach DOX-Einwirkung erhöht

A



B

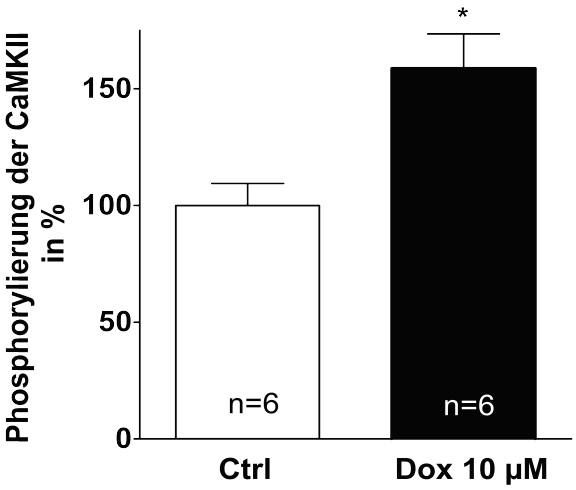


Abb. 3.6 CaMKII-Aktivität ist nach 30-minütiger DOX-Exposition erhöht.
A Originalbanden der Western Blots für phosphorylierte CaMKII, Gesamt-CaMKII und GAPDH
B Phosphorylierungsstatus der CaMKII nach 30 min DOX-Exposition bei 10 µM (schwarz) im Vergleich zur Kontrolle (weiß) in Prozent. Die Daten wurden normiert auf die CaMKII-Expression.
** kennzeichnet Signifikanz nach Student's t-Test.*

In der Western-Blot-Analyse zeigte sich der CaMKII-Phosphorylierungsgrad nach 30 min DOX-Einwirkung auf 159±12% der Kontrolle erhöht (t-Test P<0,05). Der Antikörper richtete sich gegen die Phosphorylierungsstelle Threonin 286 (Thr-286) der CaMKII. Die Expression war im Vergleich zur Kontrolle auf 88±4% erniedrigt, diese Tendenz ist jedoch nicht signifikant. Auch für diese Experimente wurden isolierte Rattenkardiomyozyten verwendet, die 30 min lang mit DOX inkubiert wurden. GAPDH wurde als nicht reguliertes *housekeeping proteine*[13] eingesetzt. Alle Werte wurden auf GAPDH normalisiert. Der Phosphorylierungsgrad wurde wiederum auf die Expression normalisiert. Pro Gruppe wurden sechs Proben bestimmt (n=6). Die Daten stammen aus vier Versuchstieren.

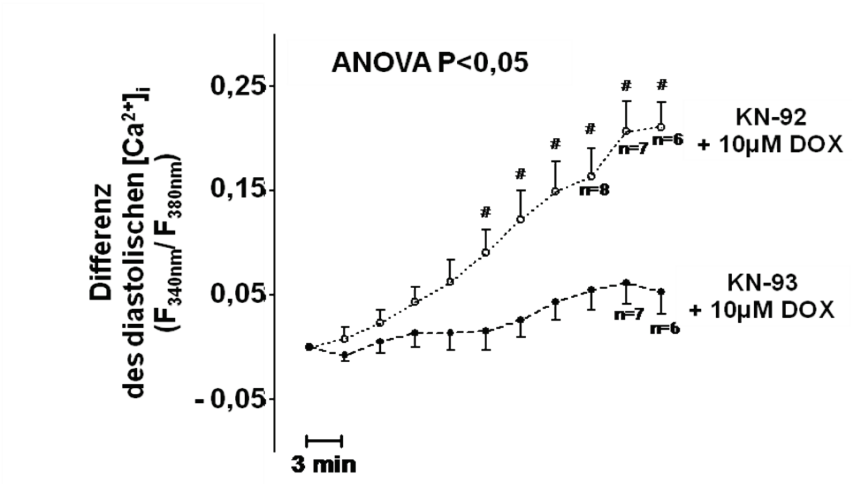
Diesem Ergebnis zufolge ist eine verstärkte Aktivierung der CaMKII nach DOX-Exposition wahrscheinlich.

[13] engl. *housekeeping proteine = Haushaltsprotein, Bezeichnung für ein in der Expression konstantes Protein*

3.3 Wirkung der CaMKII-Inhibition auf den veränderten Ca^{2+}-Stoffwechsel unter DOX-Exposition

3.3.1 CaMKII-Inhibition reduziert die diastolische Ca^{2+}-Überladung der Herzmuskelzelle

A



B

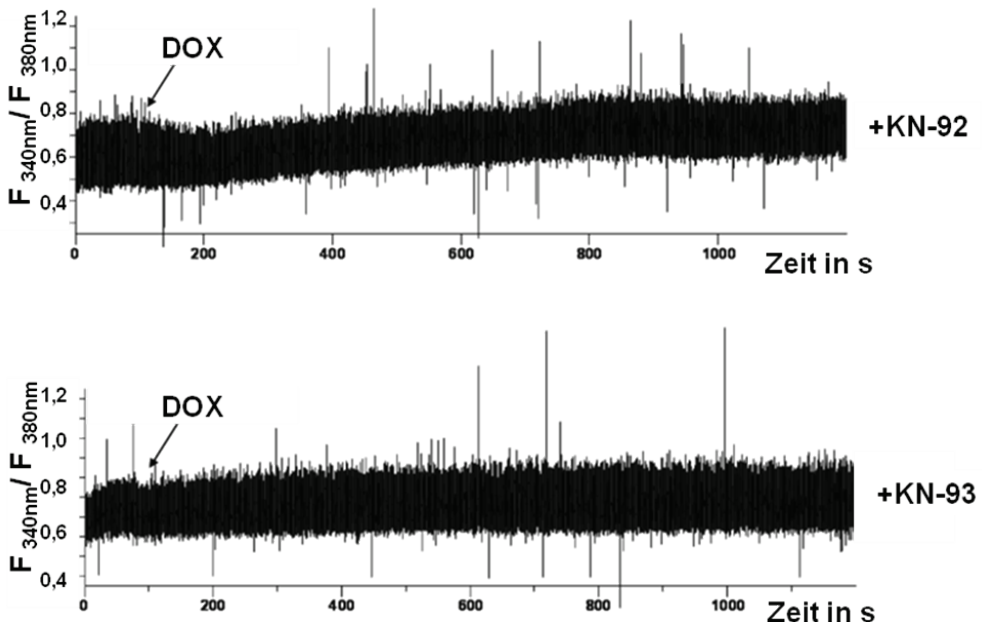


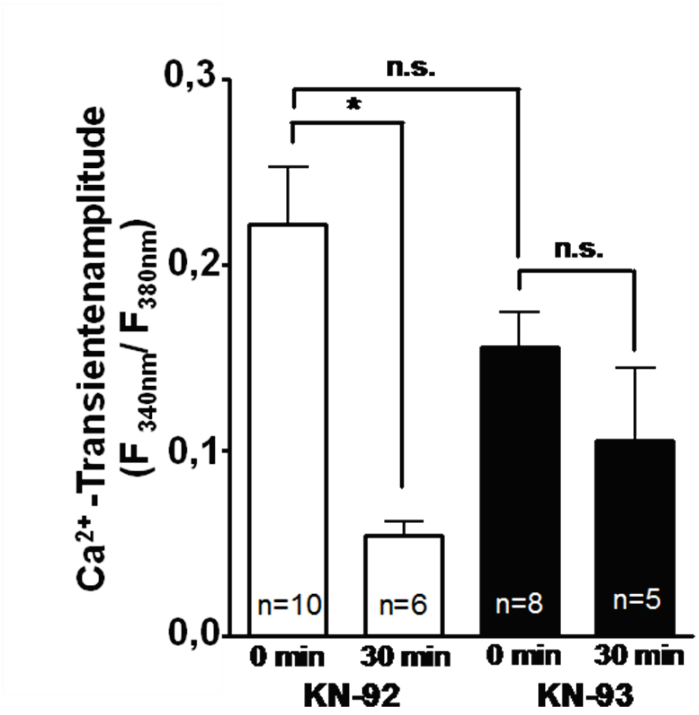
Abb. 3.7 Diastolische Ca^{2+}-Überladung ist nach CaMKII-Inhibition verringert
A Differenz des diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ nach CaMKII-Inhibition mit KN-93 unter 10-µM-DOX-Exposition (schwarze Kreise) im Vegleich zu KN-92 und 10-µM-DOX-Exposition (weiße Kreise) in $F_{340\ nm}$/ $F_{380\ nm}$
B Epifluoreszenzmikroskopische Originalmessung des Verlaufs der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ über 30 min unter KN-93 (unten) bzw. KN-92 (oben) und 10 µM DOX
 # kennzeichnet Signifikanz nach dem Student-Newman-Keuls-Posthoc-Test.

Mittels CaMKII-Inhibition mit KN-93 (1 µM) konnte die diastolische Ca^{2+}-Überladung nach 30-minütiger DOX-Exposition bei 10-µM-Konzentration von 0,76 ±0,03 r.u. unter Kontrollbedingungen mit KN-92, einem inaktiven Analogon, auf 0,64 ±0,02 r.u. mit KN-93 gesenkt werden (n=10 respektive n=8). Das heißt die Differenz der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ betrug in der Gruppe mit Inhibitor KN-93 0,05 r.u. im Vergleich zum Kontrollniveau, während bei Anwendung des inaktiven Analogons KN-92 die Differenz der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ auf 0,21 r.u. anstieg (ANOVA P=0,003, s. Abb. 3.8). Dies entspricht einer Reduktion einer Ca^{2+}-Überladung von 139% auf 109% im Vergleich zu Kontrollbedingungen zu Beginn der Messung. Die Zellen stammen aus fünf Versuchstieren.

Die Ca^{2+}-Überladung ist also unter CaMKII-Inhibition reduziert.

3.3.2 Die Ca^{2+}-Transientenamplitude ist unter CaMKII-Inhibition weniger stark durch DOX-Einwirkung beeinträchtigt

A



B

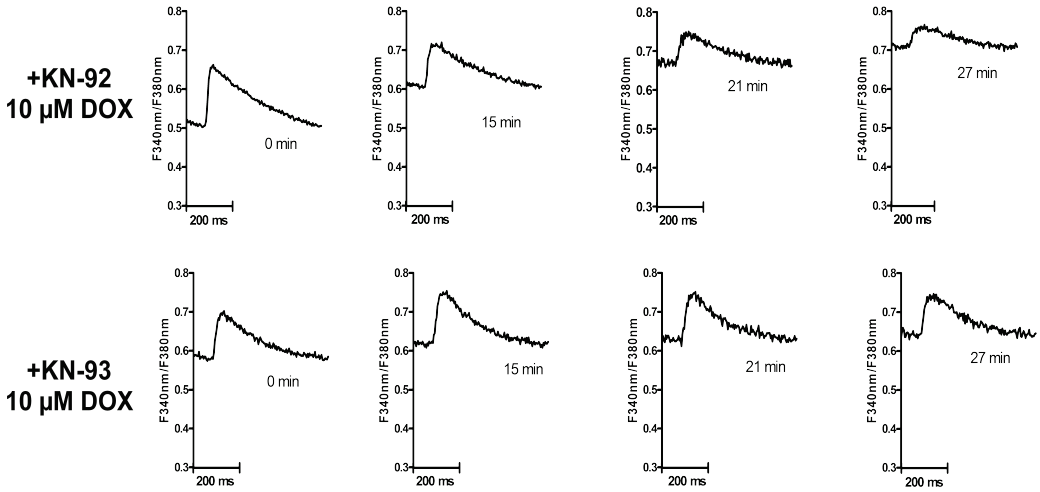


Abb. 3.8 Die Ca^{2+}-Transientenamplitude ist unter CaMKII-Inhibition teilweise erhalten.
A Ca^{2+}-Transienten unter CaMKII-Inhibition mit KN-93 (1 µM, schwarze Säulen) im Vergleich zu KN-92 (1 µM, weiße Säulen) unter jeweils 10 µm DOX in $F_{340\ nm}$/ $F_{380\ nm}$
B Originaltransienten (Fura-2AM) unter DOX 10 µM mit KN-92 (oben) bzw. KN-93 (unten) über den Verlauf von 27 min in $F_{340\ nm}$/ $F_{380\ nm}$

Die Ca^{2+}-Transientenamplitude war unter KN-93, also unter CaMKII-Inhibition bei einer DOX-Konzentration von 10 µM, im Vergleich zu Kontrollbedingungen mit DOX und KN-92, deutlich gesteigert; sie lag bei 0,11±0,04 r.u. nach 30-minütiger Stimulation, während sie unter Einfluss von KN-92 nach gleicher Expositionsdauer bei 0,05±0,01 r.u. lag (n=8 respek-

tive n=10). Das bedeutet, die Ca^{2+}-Transientenamplitude war unter KN-92 auf 30% des Kontrollniveaus zu Beginn der Messung reduziert, während sie unter KN-93 nur auf 70% reduziert war. Es war also eine geringere Abnahme der Ca^{2+}-Transienten unter KN-93 zu verzeichnen. Die Reduktion der Ca^{2+}-Transientenamplitude unter KN-92 war im gepaarten t-Test signifikant (P<0,05), während die Reduktion der Amplitude unter KN-93 nicht signifikant war (P=0,22). Zu Beginn war die Differenz in der Amplitude zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden. Die Zellen stammen aus fünf Versuchstieren.

Die Ca^{2+}-Transienten sind also unter CaMKII-Inhibition weniger stark durch DOX beeinträchtigt.

3.3.3 Der SR-Ca^{2+}-Gehalt ist unter CaMKII-Inhibition bei DOX-Einwirkung höher

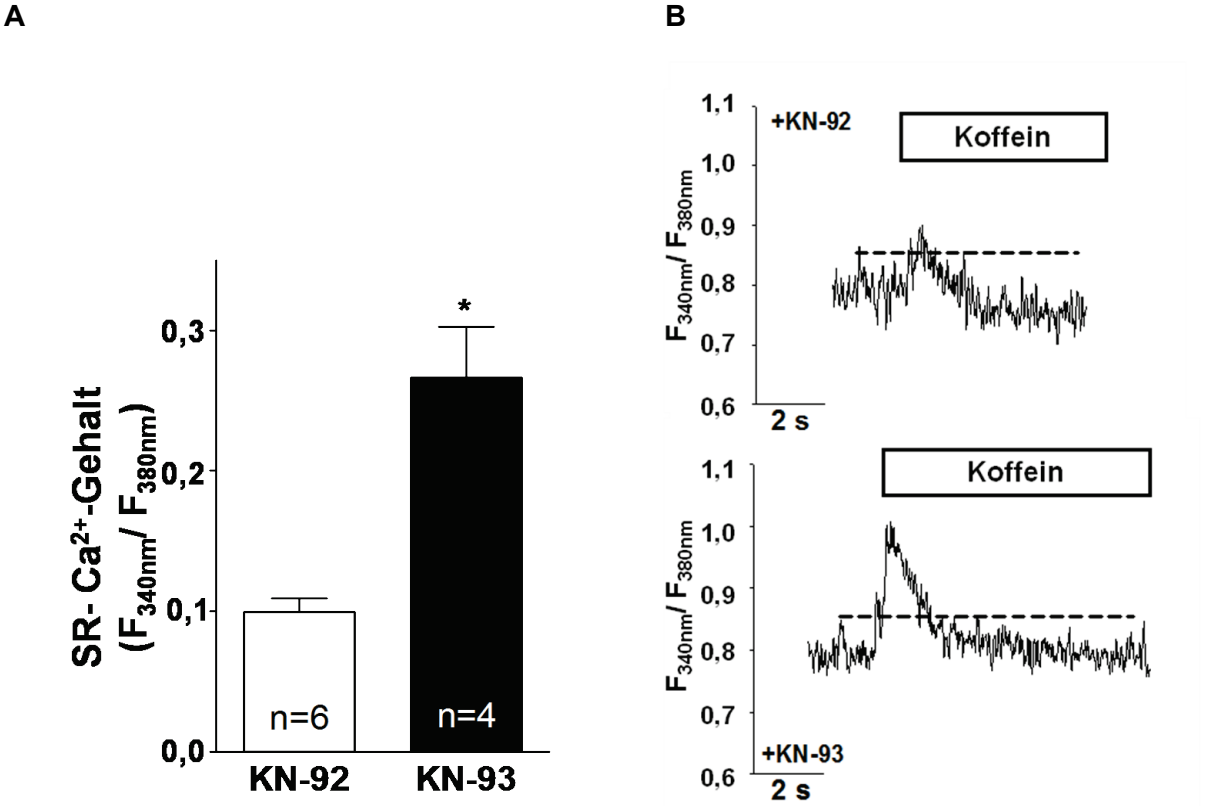


Abb. 3.9 Der SR-Ca^{2+}-Gehalt ist nach 30 min Stimulation und unter Einwirkung von 10 µM DOX bei gleichzeitiger CaMKII-Inhibition erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.
A SR-Ca^{2+}-Gehalt in $F_{340\,nm}$/ $F_{380\,nm}$ nach 30 min unter KN-93 (1 µM, schwarz) und KN-92 (1 µM, weiß) unter Einwirkung von 10 µM DOX
B Koffein-induzierte Originaltransienten zur Darstellung des SR-Ca^{2+}-Gehalts in $F_{340\,nm}$/ $F_{380\,nm}$ unter KN-93 (unten) und KN-92 (oben) und jeweils 10 µM DOX nach 30 min

Unter Einwirkung von KN-93 und nach 30-minütiger DOX-Exposition (10 µM) zeigte sich ein deutlich erhöhter SR- Ca^{2+}-Gehalt von 0,27±0,04 r.u. im Vergleich zu einem Wert von 0,1±0,01 r.u. unter Kontrollbedingungen mit KN-92 (n=4 respektive n=6, T-Test P<0,05). Dies bedeutet eine Zunahme um 168%. Die Zellen stammen aus drei Versuchstieren.

Unter CaMKII-Inhibition ist also der SR-Ca^{2+}-Gehalt, der sich unter DOX-Einwirkung vermindert zeigte, wieder hergestellt.

3.3.4 Die Ca^{2+}-Sparkfrequenz unter DOX wird durch CaMKII-Inhibition reduziert

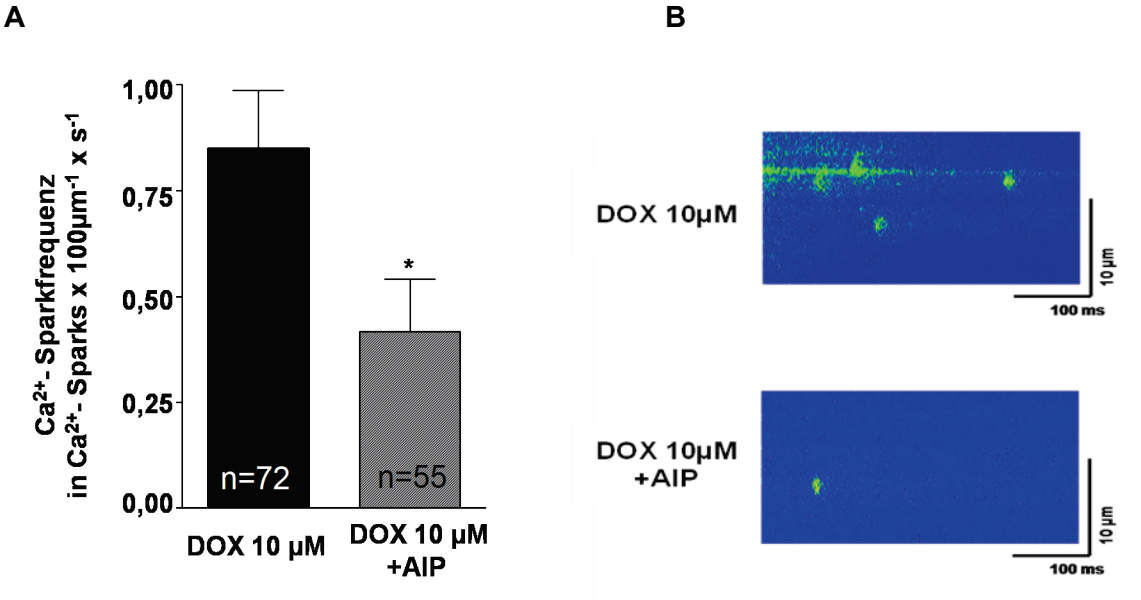


Abb. 3.10 Die Ca^{2+}-Sparkfrequenz unter DOX ist bei gleichzeitiger CaMKII-Inhibition deutlich erniedrigt
A Ca^{2+}-Sparkfrequenz unter 10-µM-DOX-Einwirkung (schwarz) und 10-µM-DOX-Einwirkung mit AIP (1 µM)
B Konfokalmikroskopisches Originalbild unter 10-µM-DOX-Einwirkung (oben) und unter 10-µM-DOX-Einwirkung mit AIP (1µM) (unten)

Unter CaMKII-Inhibition mittels AIP (1 µM) konnte bei einer DOX-Exposition der Konzentration 10 µM die Ca^{2+}-Sparkfrequenz von 0,85±0,14 Sparks pro 100µm pro s auf 0,42±0,12 Sparks pro 100 µm pro s reduziert werden (n=72 respektive n=55, t-Test P<0,05). Dies entspricht einer Reduktion der Ca^{2+}-Sparkfrequenz auf 49%. Dies bedeutet für den SR-Ca^{2+}-Verlust, der unter DOX gesteigert war (s. Kap. 3.1.5, S. 50), eine Abnahme von 139±23 unter DOX auf 60±17 unter DOX bei CaMKII-Inhibition (t-Test P<0,05). Die Zellen stammen aus sechs Versuchstieren.

Der SR-Ca^{2+}-Verlust, der sich unter DOX-Exposition zunächst erhöht darstellte, ist also stark reduziert unter CaMKII-Inhibition.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen eine Beteiligung der CaMKII an der Ca^{2+}-Stoffwechselbeeinträchtigung der Herzmuskelzelle während einer DOX-Behandlung nahe, die wahrscheinlich auf eine verstärkte Aktivierung der CaMKII durch ROS zurückzuführen ist. Die $[ROS]_i$ steigt während einer 25 min DOX-Behandlung, woraufhin ein vermehrter diastolischer $[Ca^{2+}]_i$ und eine Verminderung der Ca^{2+}-Transientenamplitude festzustellen ist. Auch der SR-Ca^{2+}-Gehalt ist nach 30 min DOX-Exposition stark vermindert, was durch eine um das ~5,8 fach erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz erklärt werden kann. Durch eine Inhibition der CaMKII konnten diese Effekte rückgängig gemacht werden, was die Hypothese stärkt, dass die CaMKII für die gestörte Ca^{2+}-Homöostase mitverantwortlich ist.

4.1 Wahl der DOX-Konzentrationen

Die hier angewendeten Konzentrationen 1 µM und 10 µM sind häufig *in vitro* verwendete Konzentrationen (TIMOLATI et al. 2006, GÜNTHERT et al. 2004, SARDAO et al. 2009). *In vivo* sind ähnliche Konzentrationen nach DOX-Gabe zu detektieren. Nach Bolusgabe liegt die maximale Konzentration bei 5 µM, die *Steady-State*-Konzentration allerdings nur bei 25-250 nM. Es wird angenommen, dass *in-vitro*-Konzentrationen von 1-2 µM für *in vivo* ablaufende Vorgänge repräsentativ sind (MINOTTI et al. 2004). Da bei 1 µM und 10 µM dosisabhängige Effekte auf den Ca^{2+}-Stoffwechsel gesehen wurden, wurde nun hier angenommen, dass es sich um den gleichen Pathomechanismus bzw. den gleichen Effekt handele. Daher wurde entschieden, für die Darstellung des Effekts im Hinblick auf die CaMKII-Phosphorylierung, für die Fluoreszenzexperimente mit der Fragestellung der Wirkung auf die $[ROS]_i$ sowie für die konfokalmikroskopischen Experimente die Konzentration von 10 µM zu verwenden.

4.2 Die Erhöhung der $[ROS]_i$ nach DOX-Exposition

Die epifluoreszenzmikroskopisch detektierte Erhöhung des oxidationssensitiven Fluoreszenzsignals des Farbstoffs CM-H_2DCFDA unter DOX-Einwirkung über ca. 25 min im Vergleich zur Kontrolle stützt die Annahme, DOX erhöhe die $[ROS]_i$.

4.2.1 Betrachtung weiterer Nachweise vermehrten oxidativen Stresses unter DOX

Wie bereits beschrieben, ist die Annahme, dass die Chinonstruktur des DOX durch NAD(P)H zum Semichinon reduziert und anschließend unter Abgabe eines Elektrons an ein Sauerstoffmolekül wieder zu Chinon oxidiert wird, die Grundlage der Spekulation über eine DOX-induzierte ROS-Generierung. Die Reduktion eines Sauerstoffmoleküls bedeutet die Entstehung einer reaktiven Sauerstoffspezies, genauer gesagt die des Superoxidanions (MINOTTI et al. 2004, VÁSQUEZ-VIVAR et al. 1997).

Das hier gezeigte Ergebnis unterstützt die Arbeit von KIM SYet al., die 2006 ebenfalls unter Verwendung von CM-H_2DCFDA mittels Fluoreszenzmessungen zeigten, dass bei einer Applikation von 3 µM DOX über 60 min eine Zunahme der $[ROS]_i$ zu beobachten ist. Ferner zeigte die Gruppe in der gleichen Arbeit, dass die Veränderungen des Ca^{2+}-Stoffwechsels an isolierten Rattenkardiomyozyten unter DOX nach Applikation von Antioxidantien wie α-Tocopherol oder α-Liponsäure ausblieben. Diese Arbeit zeigt ebenfalls indirekt, dass die Pathogenese der kardialen Veränderungen durch DOX wahrscheinlich zumindest anteilig über ROS vermittelt wird. TIMOLATI et al. konnten 2006 *in vitro* an Rattenkardiomyozyten zeigen, dass der Radikalfänger N-Acetylcystein die DOX-vermittelten Effekte auf die Ca^{2+}-Homöostase inhibiert.

In begleitend zu dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass in isolierten Rattenkardiomyozyten, die mit dem Radikalfänger Melatonin behandelt wurden, die DOX-Effekte auf die Ca^{2+}-Homöostase, insbesondere auf den diastolischen $[Ca^{2+}]_i$, den SR-Ca^{2+}-Gehalt und die Ca^{2+}-Sparkfrequenz, deutlich reduziert sind (SAG et al. 2011). Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine Abhängigkeit der DOX-vermittelten Kardiotoxizität von einer gesteigerten Radikallast hin.

Dies sind jedoch bei weitem nicht die ersten Arbeiten, die die Hypothese bestätigen, DOX schädige Gewebe durch eine Erhöhung des oxidativen Stresses. Schon 1977 konnten MYERS et al. zeigen, dass die Gabe von Tocopherol vor der Gabe von Anthrazyklinen in Mäusen eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit erbrachte, obwohl diese Mäuse an einem Anthrazyklin-sensitiven Tumor litten. Dieses *in vivo*-Modell zeigte, dass die Kardiotoxizität durchaus mit einer erhöhten Radikallast zusammenhängt, die antitumoröse Wirkung jedoch nicht ausschließlich auf die Entstehung von freien Radikalen zurückzuführen ist. 1980 konnten OLSON et al. zeigen, dass 12 Stunden nach DOX-Gabe der GSH-Spiegel in murinem Gewebe deutlich erniedrigt war und damit dieses antioxidative System durch DOX-Gabe beansprucht ist. Weiterhin konnte die Gruppe zeigen, dass die Überlebenszeit der Mäuse durch die Radikalfänger N-Acetylcystein und Cysteamin deutlich verlängert und die Kardiotoxizität herabgesetzt werden konnte, während die Letalität unter DOX bei einer weiteren Depletion des GSH durch Diethylmaleat deutlich anstieg. DAVIES und DOROSHOW konnten 1986 elektronenspinresonanzspektroskopisch zeigen, dass die Radikallast unter DOX im bovinen Herzen, insbesondere in den Mitochondrien, anstieg. Dies führte zu einer geringeren Reduktion von NAD^+ zu NADH und damit zu einem geringeren Sauerstoffverbrauch.

Das vorliegende Erklärungsmodell, die Kardiotoxizität des Chemotherapeutikums sei insbesondere durch die Generierung von ROS bedingt, passt zu den Erkenntnissen der modernen Herzinsuffizienzforschung, da diese Pathologie im Allgemeinen mit einem erhöhten oxidativen Stress assoziiert ist. Bereits 1991 konnten BELCH et al. zeigen, dass bei Patien-

ten mit Herzinsuffizienz eine deutlich erhöhte Malondialdehydkonzentration im Blut vorlag, die als Biomarker für oxidativen Stress gilt. Gleichzeitig zeigte sich die Plasmathiolkonzentration reduziert, was ebenfalls für das Vorliegen von oxidativem Stress spricht. 1998 konnten dann MALLAT et al. durch Gewinnung von seröser Flüssigkeit aus humanem Perikard und dem Messen des enthaltenen 8-iso-Prostaglandin-$F_{2\alpha}$, das ebenfalls einen Marker für oxidativen Stress darstellt, zeigen, dass das Maß an oxidativem Stress mit der Schwere der Symptome der Patienten und mit dem Durchmesser des linken Ventrikels, also mit dem Ausmaß der Dilatation, korreliert. MAACK et al. konnten schließlich 2003 zeigen, dass in humanem Myokard die Aktivität der NADPH-Oxidase bei herzinsuffizienten Patienten deutlich erhöht war. HEYMES et al. untersuchten 2003 ebenfalls humanes Myokard auf die NAPDH-Oxidase-Aktivität hin und kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein erhöhtes Niveau an oxidativem Stress eine große Rolle in der Herzinsuffizienz spielt, insbesondere, da eine höhere Konzentration mit einer erschwerten Symptomatik vergesellschaftet ist.

Was gegen die Hypothese spricht, die Kardiotoxizität des Anthrazyklins sei alleinig auf die Erhöhung der Radikallast zurückzuführen, ist die Tatsache, dass LADAS et al. 2004 unter Zusammenfassung der Ergebnisse der letzten Jahre gezeigt haben, dass weder α-Tocopherol noch N-Acetylcystein als Radikalfänger bei Patienten, die mit Anthrazyklinen behandelt wurden, die Entwicklung einer Kardiomyopathie verlangsamen oder verhindern konnten. Interessanterweise wirkt der Eisenchelator Dexrazoxane im Gegensatz zu herkömmlichen Antioxidatien im Bezug auf die DOX-induzierte toxische Kardiomyopathie offenbar präventiv, was ebenfalls der Reduktion von freien Sauerstoffradikalen zugeschrieben wird, allerdings in diesem Falle der Eisen-katalysierten Formation von ROS (GIANNI et al. 2008).

4.2.2 Methodische Einschränkungen des Ergebnisses

Bei dem hier vorliegenden Experiment darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich um einen indirekten Nachweis des Anstiegs der $[ROS]_i$ handelt, da CM-H_2DCFDA auf jegliche Oxidation reagiert, die auch anderen Ursprungs sein könnte, wie z.B. durch eine verstärkte Produktion von ROS im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien oder aber durch eine Änderung der Aktivität der NAD(P)H-Oxidoreduktasen sowie veränderte Cytochrom-P450-abhängige Enzymaktivitäten (BOVERIS et al. 1972). In isolierten Kardiomyozyten ergibt sich zusätzlich das Problem, dass nicht alle Schutzmechanismen gegenüber der ROS-Generierung wie bei einem *in vivo*-Modell funktionieren können. Eine Cysteinmangel könnte z.B. dazu führen, dass die Glutathion-vermittelte ROS-Reduktion nicht mehr effektiv vor ROS schützt, wie KING et al. 2010 zeigten. Durch die Stimulation wurde der ATP-Verbrauch der Zellen gesteigert, was zu einer Stimulation der oxidativen Phosphorylierung führt, die ROS als Nebenprodukt generiert (BOVERIS et al. 1972). Das heißt, innerhalb der Zelle gibt es durchaus andere Quellen für ROS in diesem Modell und die

Schutzmechanismen der Zelle sind u.U. beeinträchtigt. Dies führt möglicherweise zu dem Anstieg der $[ROS]_i$ über die Zeit, der auch in der Kontrollgruppe zu detektieren war. Ferner muss, was die Methode betrifft, eingeräumt werden, dass der Farbstoff unter Belichtung photooxidiert wird, so dass eine zu lange Belichtung zu einem inadäquat hohen Anstieg der Fluoreszenz führen könnte (INVITROGEN: www.invitrogen.com). Um diesen Effekt zu minimieren, wurde nur punktuell 10 s pro Minute belichtet. Jedoch kann auch diese methodische Einschränkung in beiden Gruppen zu einem zu starken Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit beigetragen haben.

Die Methode bietet jedoch einen sicheren Vergleich zwischen Kontrolle und DOX, da es sich nicht um eine punktuelle, sondern um eine kontinuierliche Messung jeweils einer Zelle handelt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wäre als wichtiger limitierender Faktor vor allem die Fluoreszenz der Substanz DOX selbst zu nennen, die bei 470 nm ihr Anregungsmaximum und bei 585 nm ihr Emissionsmaximum hat. Dadurch kommt es in der DOX-exponierten Gruppe zu einem Fluoreszenzanstieg durch die Substanz selbst. Da aber die Hintergrundfluoreszenz am Ende des Experiments inklusive der Hintergrundfluoreszenz der jeweiligen Lösung abgezogen wurde, konnte der daraus resultierende Effekt berücksichtigt und ausgeglichen werden.

Die Zunahme der Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 25 min pro Minute dokumentiert. Dass die Kurve der DOX-exponierten Gruppe eine deutlich höhere Steigung aufweist als die Kontrollgruppe, bestätigt die übermäßigen oxidativen Vorgänge. Wenn man nun davon ausgeht, ROS sollten weitere ROS generieren, könnte man erwarten, dass sich eine exponentiell verlaufende Kurve ergibt. Dass dies nicht der Fall war, könnte man durch eine nicht erreichte Schwellenkonzentration der ROS erklären (ZOROV et al. 2006). In solchen Zellen mit sozusagen „explodierenden“ ROS-Konzentrationen wäre wahrscheinlich ein apoptotischer Signalweg angestoßen worden (MARTINDALE und HOLBROOK 2002), so dass diese Zellen nicht mehr den Messkriterien der Arbeit, die vitale Zellen gefordert haben, entsprochen hätten und somit aus der Wertung gefallen wären. Hierbei handelt es sich allerdings um Spekulationen.

Nichtsdestotrotz zeigte sich durch das höhere Fluoreszenzsignal unter DOX im Vergleich zur Kontrolle eine Verschiebung des Redox-Milieus in Richtung Oxidation, was sich plausibel durch DOX-induzierte ROS-Entstehung erklären lässt.

4.2.3 Zusammenhang der gesteigerten $[ROS]_i$ mit der gestörten Ca^{2+}-Homöostase

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das Ergebnis eines erhöhten Fluoreszenzsignals nach DOX-Exposition im Vergleich zur Kontrolle einen weiteren Beleg für eine erhöhte $[ROS]_i$ nach DOX-Einwirkung darstellt. Es wird angenommen, dass die DOX-induzierte Entstehung von ROS einen Großteil zur Pathogenese der DOX-induzierten toxischen dilatativen

Kardiomyopathie beiträgt, da ein Anstieg der $[ROS]_i$ konsekutiv zu einer diastolischen Ca^{2+}-Überladung und zu einer gestörten Ca^{2+}-Homöostase führt (TIMOLATI et al. 2006, KIM SY et al. 2006, SAG et al. 2011). Dieser Zusammenhang wird auch durch die im Folgenden besprochenen Experimente gestützt.

4.3 Die Veränderungen der Ca^{2+}-Homöstase unter DOX

Nach DOX-Exposition zeigte sich in den epifluoreszenzmikroskopischen Experimenten eine diastolische Ca^{2+}-Überladung sowie eine Reduktion der Ca^{2+}-Transientenamplitude. Außerdem war der SR-Ca^{2+}-Gehalt erniedrigt. Obwohl die Geschwindigkeit des Ca^{2+}-Transientenabfalls unverändert war, zeigte sich eine deutlich gesteigerte NCX-Funktion. Konfokalmikroskopisch war eine deutlich erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz zu detektieren, die den Abfall des SR-Ca^{2+}-Gehalts erklären könnte.

4.3.1 Die diastolische Ca^{2+}-Überladung unter DOX und konsekutive Reduktion der Ca^{2+}-Transientenamplitude

Das Phänomen der Ca^{2+}-Überladung der Herzmuskelzelle nach DOX-Exposition ist epifluoreszenzmikroskopisch bereits mehrfach beschrieben worden; unter anderem durch KIM SY et al., die 2006 zeigten, dass nach einer 60-minütigen DOX-Exposition von isolierten Rattenkardiomyozyten bei einer 3-µM-Konzentration die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration auf 300% stieg, ein deutlich stärkerer Effekt als in der vorliegenden Arbeit, der sich durch die verlängerte Expositionsdauer erklären lassen könnte. TIMOLATI et al. konnten 2006 zeigen, dass bei Konzentrationen von 1 µM und 10 µM DOX, den Konzentrationen, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, ebenfalls eine deutliche Ca^{2+}-Überladung zu erwarten ist, allerdings nach einer 18-stündigen Inkubation. Der Effekt der Ca^{2+}-Überladung war ebenfalls stärker als in den Experimenten dieser Arbeit und lag bei über 150% im Vergleich zur Kontrolle, während die hier gezeigte diastolische $[Ca^{2+}]_i$ unter DOX auf maximal 121% anstieg. Dieser geringere Effekt könnte durch die akute Einwirkung des DOX und die geringe Zeitspanne, die abgebildet wurde, erklärt werden. An dieser Stelle muss als Limitation angeführt werden, dass nur die Differenzen in der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$, nicht aber die Absolutwerte der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ in der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) signifikant verschieden waren.

Interessanterweise zeigte sich nach 18-stündiger Inkubation in der o.g. Arbeit (TIMOLATI et al. 2006), was die Ca^{2+}-Transientenamplitude und die Kontraktion der Kardiomyozyten betrifft, bei einer Konzentration von 1 µM DOX ein positiv inotroper Effekt, während bei 10

µM ein negativ inotroper Effekt zu sehen war. TIMOLATI et al. sahen bei einer Konzentration von 1 µM DOX eine Zunahme der Ca^{2+}-Transienten, die auf eine gesteigerte Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR zurückzuführen ist, möglicherweise durch einen erhöhten I_{Ca} und damit einen gesteigerten Ca^{2+}-induzierten Ca^{2+}-Ausstrom aus dem SR (KEUNG et al. 1991, FABIATO und FABIATO 1975) oder aber durch eine anderweitig gesteigerte Offenwahrscheinlichkeit der RyR. Letzteres könnte sowohl durch chemisch-toxische oder oxidative Effekte (ABRAMSON et al. 1988, TERENTYEV et al. 2008) oder aber auf eine CaMKII-Aktivierung zurückzuführen sein (MAIER et al. 2003, KOHLHAAS et al. 2006). Was die Wende des positiv inotropen Effekts zur negativen Inotropie erklärt, ist die Tatsache, dass nicht nur die Höhe des I_{Ca} einen Einfluss auf die Höhe der Ca^{2+}-Transientenamplitude hat, sondern auch die Füllung des SR und damit der SR-Ca^{2+}-Gehalt, wie BASSANI et al. 1995 zeigen konnten. Dadurch erklärt sich, dass sich die Ca^{2+}-Transientenamplitude bei einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der RyR und konsekutiver Depletion des SR erschöpft (BASSANI et al. 1993, BASSANI et al. 1995). Mit anderen Worten bedeutet das, dass sich eine deutlich gesteigerte Entleerung des SR negativ inotrop auswirkt, was den konzentrationsabhängigen Effekt, den TIMOLATI et al. beschreiben, erklären könnte. In Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit erscheint dieses Erklärungsmodell plausibel, da die Ergebnisse dieser Arbeit einen gesteigerten Ca^{2+}-Verlust aus dem SR unter 10-µM-DOX-Einwirkung im Sinne einer gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit der RyR nahelegen, der zu einer Depletion des SR und einem Abfall der Ca^{2+}-Transienten führt. Es gilt jedoch zu bedenken, dass bei einer erhöhten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ die Ca^{2+}-Transientenamplitude reduziert ist, was möglicherweise zu einer Überschätzung dieses Effekts führen könnte (BERS 2001).

Eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die verringerte Ca^{2+}-Transientenamplitude, die sich in der vorliegenden Arbeit unter 10 µM DOX zeigt, ist eine verringerte Vitalität der Zellen im Rahmen der Belichtungs- und Stimulationsdauer sowie der diastolischen Ca^{2+}-Überladung. Die verringerte Vitalität aufgrund der genannten experimentellen Bedingungen kann jedoch nicht die alleinige Ursache für die Reduktion der Ca^{2+}-Transientenamplitude sein, da die Amplitude der Kontrollzellen zwar ebenfalls sinkt, jedoch die der DOX-exponierten Zellen in einem signifikant stärkeren Maße abnimmt. Wichtig ist in diesem Zusammenhang aber vor allem das erhöhte diastolische $[Ca^{2+}]_i$, das wahrscheinlich durch den reduzierten SR-Ca^{2+}-Gehalt durch eine erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz zu erklären ist. Bei einem erhöhten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ ist ein negativ inotroper Effekt zu erwarten, da sich durch eine gesteigerte NCX-Funktion das SR weiter entleert bzw. nicht mehr suffizient füllen kann (BERS 2001, s. auch Kap. 3.1.4, S. 48 f). Diese erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz und die daraus resultierende Verminderung des SR-Ca^{2+}-Gehalts lässt sich durch die detektierte CaMKII-Aktivierung unter DOX-Exposition plausibel erklären (s. Kap. 4.4.2, S. 72 f, MAIER et al. 2003, AI et al. 2005, BERS 2001).

Dass zusätzlich durch DOX vermittelte toxische Effekte eine Rolle spielen, kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Es ist sehr gut möglich, dass die unter DOX detektierte verminderte Ca^{2+}-Transientenamplitude als ein multifaktoriell bedingtes Geschehen zu verstehen ist, das sowohl auf die CaMKII-Aktivierung als auch auf eine durch eine erhöhte Radikallast bedingte Toxizität der Substanz zurückzuführen ist wie beispielsweise oxidative Schäden an Proteinen, Lipidperoxidation oder auch eine verminderte Bereitstellung von ATP (TOKARSKA-SCHLATTNER et al. 2006).

4.3.2 Mögliche Ursache der diastolischen Ca^{2+}-Überladung: Ca^{2+}-Verlust aus intrazellulären Speichern

Um die Störung der Ca^{2+}-Homöostase durch DOX umfassend zu beschreiben, muss nun als weiterer wichtiger Parameter diskutiert werden, worauf die diastolische Ca^{2+}-Überladung zurückgeführt werden kann; TIMOLATI et al. schrieben sie 2006 der Verlängerung des Aktionspotentials unter DOX und damit dem vermehrten I_{Ca} zu, der wiederum zu einer gesteigerten Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR führen würde. Tatsächlich beschrieben KEUNG et al. bereits 1991 einen erhöhten I_{Ca} über den LTCC an isolierten Rattenmyokardzellen von Tieren, die *in vivo* an einer DOX-induzierten Kardiomyopathie litten. KIM SY et al. attribuierten die Ca^{2+}-Überladung ebenfalls einer Depletion der intrazellulären Ca^{2+}-Speicher, also des SR. In Anbetracht der Reduktion des SR-Ca^{2+}-Gehalts, die sich sowohl 2006 in der Arbeit von TIMOLATI et al. als auch in der vorliegenden Arbeit darstellte, scheint es plausibel, die Ca^{2+}-Überladung einer Verminderung des SR-Ca^{2+}-Gehalts zuzuschreiben. Geht man davon aus, dass der SR-Ca^{2+}-Gehalt abnimmt, so könnte dies den Abfall der Ca^{2+}-Transientenamplitude erklären, da die Höhe der Ca^{2+}-Transienten in hohem Maße vom SR-Ca^{2+}-Gehalt abhängig ist (BASSANI et al. 1993, BASSANI et al. 1995). Passend zu dieser Hypothese zeigte sich der SR-Ca^{2+}-Gehalt in den hier gezeigten Ergebnissen bei der Applikation von 10 µM DOX über 30 min vermindert. TIMOLATI et al. zeigten in ihrer Arbeit 2006 in der Tat ebenfalls eine Reduktion des SR-Ca^{2+}-Gehaltes nach einer 18-stündigen Inkubation, führten dies allerdings auf eine verminderte Expression der SERCA zurück und sahen den Ca^{2+}-Verlust des SR nicht als ursächlich für den verminderten SR-Ca^{2+}-Gehalt an, sondern stellten eine verminderte Wiederaufnahme des Ca^{2+} in das SR in den Vordergrund.

An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass TIMOLATI et al. 2006 eine verlangsamte Relaxation beschrieben. Die Expression der SERCA zeigte sich ebenfalls vermindert, sodass eine verminderte Ca^{2+}-Aufnahme in das SR als pathogenetische Erklärung für den reduzierten SR-Ca^{2+}-Gehalt beschrieben wurde. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Dauer des Ca^{2+}-Transientenabfalls unter 10 µM DOX jedoch nicht verändert.

Dass der Abfall der Ca^{2+}-Transienten nicht verlangsamt war, könnte verschiedene Ursachen haben: man könnte z.B. annehmen, es ändere sich gar nichts an der Ca^{2+}-Wiederaufnahme ins SR. Dies ist jedoch aufgrund der massiven Beeinträchtigung des Ca^{2+}-Haushalts und der involvierten Transportsysteme unwahrscheinlich. Auch die bestehende Literatur suggeriert eine Beeinträchtigung des zytosolischen Ca^{2+}-Abfalls in der Diastole im Sinne einer Verlangsamung der Relaxation: Die Aktivität der SERCA wird durch die oxidative Wirkung der ROS reduziert (SCHERER und DEAMER 1986, MORRIS und SULAKHE 1997), was die Relaxation verlangsamen würde; so beschrieben es auch TIMOLATI et al. 2006. Auf dieses Phänomen gab es in der vorliegenden Arbeit jedoch keinen eindeutigen Hinweis. Das Fehlen der Beeinträchtigung des Ca^{2+}-Transientenabfalls könnte nun durch die akute Exposition und die kurze Dauer der Messung erklärt werden, da es unter diesen experimentellen Bedingungen u. U. nicht zu einer Änderung der SERCA-Expression kommt; in den anderen beschriebenen *in vitro*-Experimente betrug die Expositionsdauer mindestens eine Stunde.

Eine weitere und wahrscheinlichere Erklärungsmöglichkeit ist jedoch die Kompensation durch andere Ca^{2+}-exportierende Systeme. Insbesondere eine verstärkte Aktivierung des NCX könnte zu einem aufrecht erhaltenen Ca^{2+}-Abfall in der Diastole beitragen. Diese Hypothese wird durch die deutlich schnellere Relaxationszeit der Koffeintransienten nach DOX-Exposition gestärkt. Da unter Koffeinapplikation sämtliche RyR geöffnet sind, kann keine effektive Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ durch Füllung des SR stattfinden; die SERCA ist als Ca^{2+}-Rücktransporter außer Gefecht gesetzt (PESSAH et al. 1987, BERS 2001). In der Konsequenz ist die Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ unter Einwirkung des Koffeins fast ausschließlich auf die NCX-Leistung zurückzuführen. Dass diese Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ unter DOX nun deutlich beschleunigt ist, weist auf eine verstärkte NCX-Leistung hin, die sich plausibel durch die Radikalexposition erklären lässt. Denn dass der NCX unter dem Einfluss einer erhöhten $[ROS]_i$ verstärkt aktiviert ist, zeigte GOLDHABER bereits 1996 an isolierten Kardiomyozyten aus Meerschweinchen; unter H_2O_2 und Xanthin mit Xanthin-Oxidase, zwei ROS-induzierenden Systemen, war ein verstärkter transienten Einwärtsstrom (I_{TI}) messbar, der unter Inhibition des NCX durch ionisiertes Nickel sistierte. Andere Gruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen (REEVES et al. 1986, KATO und KAKO 1988). In humanem herzinsuffizientem Gewebe, in dem ebenfalls von einer erhöhten Radikallast auszugehen ist (s. Kap. 4.2.1, S. 61 ff), zeigte sich die NCX-Expression ebenfalls deutlich erhöht (HASENFUSS et al. 1999).

Dieser Mechanismus steht im scheinbaren Widerspruch zur diastolischen Ca^{2+}-Überladung, da ja mehr Ca^{2+} aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum transportiert würde. Die Aktivität der SERCA wurde nicht untersucht; im Hinblick auf die Wirkung einer erhöhten $[ROS]_i$ und deren oxidativen Effekt ist es jedoch wahrscheinlich, dass die Aktivität der SERCA tendenziell erniedrigt ist (SCHERER und DEAMER 1986, MORRIS und SULAKHE 1988), was ebenfalls zu einer diastolischen Ca^{2+}-Überladung führen könnte. Auch in huma-

nem herzinsuffizientem Gewebe zeigte sich die SERCA-Expression erniedrigt (HASENFUSS et al. 1994). Über einen möglichen ähnlichen Mechanismus in dem vorliegenden Modell kann aber an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden. Es bleibt also festzuhalten, dass die Ca^{2+}-Elimination aus dem Zytosol zumindest *akut* in dem hier untersuchten Modell nicht beeinträchtigt zu sein und als Ursache für die diastolische Ca^{2+}-Überladung eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Es stellt sich also nun die Frage, ob das Phänomen der diastolischen Ca^{2+}-Überladung auf eine *reduzierte Wiederaufnahme in* oder auf einen *vermehrten Verlust aus* intrazellulären Speichern zurückgeführt werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass Letzteres anzunehmen ist.

In der Tat fand sich nämlich in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Erhöhung des diastolischen Ca^{2+}-Verlusts aus dem SR, gemessen mittels der Ca^{2+}-Sparkfrequenz. Dieser Umstand könnte nicht nur eine Erklärung für die diastolische Ca^{2+}-Überladung, sondern auch für den verminderten SR-Ca^{2+}-Gehalt bedeuten. Ein erhöhter Ca^{2+}-Verlust aus dem SR, genauer gesagt aus den Cisternae terminales von Skelettmuskeln aus einem Kaninchenmodell, ist durch ZORZATO et al. 1985 beschrieben worden. Obwohl es sich hierbei nicht um die gleiche Isoform des Ryanodinrezeptors handelt und die elektromechanische Kopplung im Skelettmuskel und Herzmuskel wichtige Unterschiede aufweist (BERS 2001), so handelt es sich doch um das gleiche Phänomen, nämlich einen Ca^{2+}-Verlust aus den intrazellulären Speichern. Die erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz zeigte sich in den konfokalmikroskopischen Experimenten dieser Arbeit innerhalb eines zeitlichen Rahmens von ca. 15 min DOX-Exposition, was zu einer Depletion des SR geführt haben könnte, die dann epifluoreszenzmikroskopisch nach 30 min detektiert werden konnte. Der gewählte Zeitraum bildet eine frühe Beeinträchtigung ab; es ist durchaus möglich, dass sich nach längerer Exposition ein noch deutlicherer Effekt zeigt. Die Methode ist jedoch bei längerer Dauer der Experimente störanfällig, da viele Faktoren, wie die Beeinträchtigung der Zellen durch den enzymatischen Verdau während der Isolation oder eine verlängerte Dauer der Stimulation, die Ca^{2+}-Sparkfrequenz deutlich erhöhen können, da sie die Integrität des SR schädigen. Es ist für das Gelingen des Experiments essentiell, diese Faktoren zu minimieren und eine möglichst geringe Schädigung der Zellen durch die experimentellen Bedingungen zu gewährleisten. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine Ca^{2+}-Sparkfrequenz von 0,13 Sparks pro 100 µm pro s, die durch die oben genannten Beeinträchtigungen der Zellen im Rahmen des Experiments zu erklären ist. Unter physiologischen Bedingungen sollte der spontane diastolische Ca^{2+}-Verlust des SR ein vereinzelt auftretendes Ereignis sein (CHENG et al. 1993, BERS 2001). Der gewählte Zeitraum stellt die geringstmögliche Beeinträchtigung und weitgehend unverfälschte Darstellung der Zellen dar, die unter den gegebenen Bedingungen möglich waren.

An dieser Stelle muss noch angemerkt werden, dass ein erhöhter diastolischer $[Ca^{2+}]_i$ ebenfalls zu einer Zunahme der Ca^{2+}-Sparkfrequenz führen kann (SATOH et al. 1997). Dies wirft die Frage auf, ob es sich bei der erhöhten Ca^{2+}-Sparkfrequenz um die Ursache oder die Wirkung des gemessenen erhöhten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ handelt. Für die Tatsache, dass es sich wie hier angenommen um die Ursache der Ca^{2+}-Überladung handelt, sprechen die folgenden vier Punkte: erstens wurde die Ca^{2+}-Sparkfrequenz in einem Zeitraum von maximal 15 min nach Beginn der DOX-Applikation gemessen; die Anstieg des diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ zeigte ab einem Zeitpunkt von 12 min, so dass der Großteil der Messzeit in der Zeitspanne lag, in der noch kein signifikant erhöhtes diastolisches $[Ca^{2+}]_i$ zu erwarten war. Zweitens zeigte sich nach 30 min DOX-Exposition epifluoreszenzmikroskopisch nach 30 min ein deutlich erniedrigter SR-Ca^{2+}-Gehalt, was wiederum grundsätzlich zu einer verringerten Ca^{2+}-Sparkfrequenz führen sollte (SATOH et al. 1997). Dies ist aber nicht der Fall, sondern das Gegenteil, eine Erhöhung der Ca^{2+}-Sparkfrequenz, tritt ein. Drittens ist es jedoch so, dass eine gesteigerte CaMKII-Aktivität eine erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz durch eine vermehrte Phosphorylierung der RyR wahrscheinlich macht (MAIER et al. 2003, AI et al. 2005). Da eine erhöhte CaMKII-Aktivität vorliegt, ist es naheliegend, dass die erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz darauf zurückzuführen ist. Die diastolische Ca^{2+}-Überladung wird im Rahmen der CaMKII-Aktivierung dem Ca^{2+}-Verlust aus intrazellulären Speichern attribuiert, und da beide Effekte unter CaMKII-Inhibition rückläufig sind, ist es wahrscheinlich, dass beide auch auf einen ähnlichen Mechanismus zurückzuführen sind (s. Kap. 4.5.1, S. 74 f). Den Zusammenhang der CaMKII-Aktivierung mit der erhöhten Ca^{2+}-Sparkfrequenz und mit dem erhöhten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ bestätigen auch begleitend zu dieser Arbeit durchgeführte Experimente mit einem transgenen Mausmodell, in dem die CaMKIIδ nicht exprimiert wird (CaMKIIδ -/-). Hier zeigte sich sowohl eine reduzierte Ca^{2+}-Sparkfrequenz als auch ein reduziertes diastolisches $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zum Wildtyp (SAG et al. 2011). Die hier gezeigte Ca^{2+}-Überladung durch eine Aktivierung der CaMKII konnte auch in anderen pathophysiologischen Belastungssituationen gezeigt werden, wie beispielsweise oxidativem Stress oder β-adrenerger Stimulation (WAGNER et al. 2011, SAG et al. 2007). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch z.B. direkte Effekte des DOX oder oxidative Effekte am RyR zu der diastolischen Ca^{2+}-Überladung beitragen und damit zusätzlich die Ca^{2+}-Sparkfrequenz erhöhen (TERENTYEV et al. 2008, XU et al. 1988, ABRAMSON et al. 1988, vgl. Kap. 4.5.2 S. 75 f).

4.3.3 Klinische Korrelate der Störung der Ca^{2+}-Homöostase

Die klinischen Korrelate der Störung des Ca^{2+}-Haushalts sind gravierend und betreffen eine doppelte Störung der Herzfunktion; durch die gegebenen Parameter ergibt sich theoretisch sowohl eine systolische als auch eine diastolische Dysfunktion, was im Folgenden erklärt werden soll.

Zunächst ergibt sich durch eine Verminderung der Ca^{2+}-Transientenamplitude eine verminderte Kontraktilität, da weniger Ca^{2+}-Ionen für die Aktivierung der Myofilamente in der Systole zur Verfügung steht. Diese Tatsache führt zu einer systolischen Dysfunktion, das heißt zu einer Minderung der Auswurfleistung des Herzens (BERS 2001). Die Verminderung der Ca^{2+}-Transientenamplitude ist auf die Depletion der intrazellulären Ca^{2+}-Speicher zurückzuführen (BASSANI et al. 1993, BASSANI et al. 1995).

Weiterhin stellt die diastolische Ca^{2+}-Überladung ein großes Problem da. Die diastolische Ca^{2+}-Überladung führt zu einer ungenügenden Relaxation und damit zu einer diastolischen Dysfunktion (SCHMIDT U et al. 1998, MEYER et al. 1995, SCHMIDT U et al. 2000, MERCADIER et al. 1990). Das bedeutet, dass während der Diastole durch die beeinträchtigte Relaxation insbesondere bei hohen Herzfrequenzen eine ausreichende Füllung des Herzens ausbleibt (SCHMIDT U et al. 1998). Es kommt zu einer zunehmenden Versteifung des Herzmuskels, was sich langfristig wiederum negativ auf die systolische Funktion, also klinisch auf die Ejektionsfraktion, auswirkt (DICKSTEIN et al. 2008).

Diese beiden Phänomene, die klinisch zu einer Herzinsuffizienz führen können, treten in dem hier gezeigten Modell nach DOX-Exposition auf und können die Genese der Herz-insuffizienz nach DOX-Exposition auf dem Niveau der Ca^{2+}-Homöostase erklären.

4.4 Betrachtung der CaMKII unter DOX-Einwirkung

4.4.1 Wahl der CaMKII als untersuchten Mediator

Als Ursache für den Ca^{2+}-Verlust durch eine erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz kann eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der RyR angenommen werden (BERS 2002, CHENG et al. 1993). Diese ist besonders dann erhöht, wenn die RyR im phosphorylierten Status, und zwar an der Position Ser-2809 oder Ser-2815, vorliegen (VALDIVIA et al. 1995, BERS 2001). Für diese Phosphorylierung kommen in der Herzmuskelzelle im Besonderen zwei Kinasen in Frage: die Proteinkinase A (PKA) und die CaMKII. Beide Kinasen phosphorylieren den RyR und können damit die Offenwahrscheinlichkeit erhöhen (MARX et al. 2000, MAIER et al. 2003, BERS 2001). In dieser Arbeit soll ein besonderes Augenmerk auf die Frage gelegt werden, inwiefern die CaMKII die Ca^{2+}-Homöostase nach DOX-Einwirkung beeinflusst. Auf die Wirkung der PKA soll hier nicht näher eingegangen werden, jedoch kommt auch sie als potentieller Mediator in Betracht. Allerdings bietet die Tatsache, dass ERICKSON et al. 2008 beschrieben haben, dass die CaMKII in einem pro-oxidativen Milieu länger aktiviert bleibt, eine Grundlage für die Annahme einer verstärkten Beteiligung der CaMKII unter Einfluss einer erhöhten $[ROS]_i$ (s. Kap. 4.4.2, s.u.). Eine ähnliche Aktivierung durch ein oxidatives Milieu ist für die PKA bislang nicht beschrieben worden. Ferner fand die Gruppe KIRCHHEFER et al. 1999 die PKA in herzinsuffizientem Gewebe nicht verstärkt aktiviert, während die Aktivität der CaMKII fast dreifach erhöht war. SOSSALLA et al. konnten 2010 zeigen, dass

die CaMKII-Expression in humanem Gewebe bei dilatativer Kardiomyopathie deutlich erhöht ist. Diese genannten Daten begründen die Wahl der CaMKII für die durchgeführten Untersuchungen.

4.4.2 Aktivität der CaMKII unter DOX-Einwirkung

Tatsächlich zeigte sich der Phosphorylierungsgrad der CaMKII nach 30 min DOX-Einwirkung in der Western-Blot-Analyse erhöht. Die CaMKII-Expression war jedoch nicht verändert.

Interessant ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass in begleitend zu der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten zwar eine erhöhte Phosphorylierung der CaMKII nach DOX-Exposition, jedoch keine signifikant erhöhte Oxidierung der CaMKII vorlag, was die Hypothese einer Aktivitätssteigerung der CaMKII alleinig durch Oxidation unwahrscheinlich macht (SAG et al. 2011).

Grundlage zur Annahme einer erhöhten oxidativen Aktivierung der CaMKII in der vorliegenden Arbeit war eine 2008 veröffentlichte Untersuchung der Gruppe von ERICKSON. Hier zeigte sich eine Stabilisierung der phosphorylierten Konformation im Rahmen eines oxidativen Redox-Milieus. Die biochemische Erklärung für diese Stabilisierung ist die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Thiolgruppen zweier Methioninreste an den Stellen 281 und 282 in der regulatorischen Domäne. Diese stabilisiert die Konformation im phosphorylierten Zustand dahingehend, dass nach Dissoziation des Ca^{2+}/CaM-Komplexes eine Phosphorylierung und Aktivierung deutlich länger erhalten bleibt (ERICKSON et al. 2008). Da jedoch in dem hier gezeigten Modell nach 30 min die oxidierte Form der CaMKII nicht signifikant erhöht vorliegt, muss ein anderer Mechanismus der vermehrten Phosphorylierung und damit vermehrten Aktivierung unter DOX zugrunde liegen. Möglicherweise erfolgt die erhöhte CaMKII-Aktivierung durch direkte oxidative Effekte auf den RyR (TERENTYEV et al. 2008) oder aber direkte Effekte der Substanz selbst auf den RyR (ABRAMSON et al. 1988) und die jeweils damit verbundene Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration. Hier bietet die Arbeit der Gruppe WAGNER et al. einen ergänzenden Beleg, da sie 2011 zeigen konnte, dass eine initiale Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR über eine oxidative CaMKII-Aktivierung unter Applikation von Wasserstoffperoxid zu einer weiteren CaMKII-Aktivierung durch Autophosphorylierung beiträgt. Die weitere Aktivierung der CaMKII könnte durch Autophosphorylierung auf dem bereits bekannten Weg stattfinden (MAIER und BERS 2007).

Weitere Mechanismen für die erhöhte Phosphorylierung der CaMKII kommen theoretisch zusätzlich in Frage; so könnte eine herabgesetzte Aktivität der zytosolischen Phosphatasen dazu führen, dass die Phosphorylierung länger bestehen bleibt. Allerdings konnten NEUMANN et al. 1997 zeigen, dass die Expression der Phosphatasen 1 und 2A in humanem Gewebe im Rahmen der Herzinsuffizienz sogar erhöht ist. Obwohl diese Untersuchungen

sich nicht auf das hier verwendete Modell übertragen lassen, machen sie eine erniedrigte Phosphataseaktivität als Ursache für die verstärkte Phosphorylierung der CaMKII unwahrscheinlich.

Da entsprechend der vorliegenden Ergebnisse davon auszugehen ist, dass die CaMKII in dem hier gezeigten Modell verstärkt aktiviert ist, muss nun die Frage gestellt werden, welche Konsequenzen eine CaMKII-Aktivierung im Hinblick auf die Ca^{2+}-Homöostase mit sich bringt. Es ist in der Vergangenheit darüber diskutiert worden, ob die CaMKII durch Phosphorylierung die Offenwahrscheinlichkeit des RyR erhöht oder erniedrigt. Beide Möglichkeiten werden in der Literatur vertreten; WITCHER et al. konnten 1991 zeigen, dass die Offenwahrscheinlichkeit erhöht ist, ebenso HAIN et al. 1995. LOKUTA et al. erbrachten jedoch 1995 Nachweis, sie sei erniedrigt infolge einer Phosphorylierung durch die CaMKII. Im Gegensatz dazu zeigten LI et al. 1997 an isolierten Frettchenkardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen eine Reduktion der Ca^{2+}-Sparkfrequenz durch CaMKII-Inhibition. 2003 konnten MAIER et al. zeigen, dass in einer die CaMKII-überexprimierenden transgenen Mausspezies die Ca^{2+}-Sparkfrequenz deutlich erhöht war, was durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der RyR erklärt wurde. Der SR-Ca^{2+}-Gehalt zeigte sich erniedrigt, passend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Al et al. konnten dann 2005 zeigen, dass in herzinsuffizientem Kaninchenmyokard eine deutlich höhere Phosphorylierung des RyR an der Stelle Ser-2815, der alleinigen CaMKII-Phosphorylierungsstelle, zu verzeichnen war, was zu einem deutlich erhöhten diastolischen SR-Ca^{2+}-Verlust führte. Dieser zeigte sich wiederum nach Inhibition der CaMKII reduziert. In diesem Sinne konnten NEEF et al. 2010 an humanem Vorhofmyokard zeigen, dass bei erhöhter CaMKII-Phosphorylierung ein höherer Phosphorylierungsstatus des RyR vorliegt sowie eine stark erhöhte diastolische Ca^{2+}-Sparkfrequenz. Insgesamt wird heute davon ausgegangen, dass die Offenwahrscheinlichkeit des RyR nach Phosphorylierung erhöht ist.

Die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR durch die erhöhte CaMKII-Aktivität wird durch die konfokalmikroskopisch detektierte erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz, die als Ausdruck einer verstärkten spontanen Öffnung der RyR gilt (CHENG et al. 1993, BERS 2001), bestätigt. Die erhöhte Ca^{2+}-Sparkfrequenz erklärt sowohl eine diastolische Ca^{2+}-Überladung als auch einen reduzierten SR-Ca^{2+}-Gehalt. Letzterer könnte der Grund für die reduzierte Amplitude der Ca^{2+}-Transienten sein; es ist erwiesen, dass nicht nur die Amplitude des I_{Ca} maßgablich für die Höhe der Ca^{2+}-Transienten ist, sondern ebenso die Höhe des SR-Ca^{2+}-Gehalt eine Rolle spielt. Ein reduzierter SR-Ca^{2+}-Gehalt führt konsekutiv zu einer erniedrigten Ca^{2+}-Transientenamplitude (BASSANI et al. 1993, BASSANI et al. 1995, BERS 2001). Eine Depletion des SR würde daher in der Folge eine Erniedrigung der Ca^{2+}-Transientenamplitude und damit der Kontraktilität bedeuten. Über diesen Mechanismus kann also die CaMKII-

Überaktivierung zu einer Verringerung der Kontraktilität der Kardiomyozyten führen. Diese Effekte sollten durch eine Inhibition verhindert werden.

4.5 Die Effekte der CaMKII-Inhibition auf den gestörten Ca^{2+}-Haushalt nach DOX-Behandlung

Durch die Inhibition der CaMKII mittels KN-93 bzw. AIP konnten die Effekte des DOX auf die Ca^{2+}-Homöostase reduziert werden: Die diastolische Ca^{2+}-Überladung konnte vermindert werden, die Ca^{2+}-Transientenamplitude konnte in hohem Maße aufrecht erhalten werden, die Ca^{2+}-Sparkfrequenz konnte durch CaMKII-Inhibition reduziert werden und der SR-Ca^{2+}-Gehalt zeigte sich im Vergleich zu einer reinen DOX-Exposition ohne CaMKII-Inhibition normalisiert.

4.5.1 Wirkungen der CaMKII-Inhibition auf die kardiale Ca^{2+}-Homöostase und Bedeutungen des Mechanismus im Rahmen der Herzinsuffizienz

Die Effekte der CaMKII auf die Ca^{2+}-Homöostase sind über die letzten Jahre sehr gut in verschiedenen Arbeiten untersucht worden; so konnte in einer Arbeit von MAIER et al. 2003 gezeigt werden, dass in einem transgenen Mausmodell mit einer Überexpression der CaMKIIδ_C-Isoform die Tiere an einer kardialen Hypertrophie mit Dilatation und Herzinsuffizienz litten. Die Ca^{2+}-Transientenamplitude sowie der SR-Ca^{2+}-Gehalt waren deutlich reduziert, der diastolische Ca^{2+}-Verlust aus dem SR war deutlich gesteigert, was wiederum als Ursache für die Depletion des SR angesehen wurde. Diese Ergebnisse passen zu der Beeinträchtigung der Rattenkardiomyozyten unter DOX und der Tatsache, dass diese Wirkung unter CaMKII-Inhibition teilweise reversibel war. KOHLHAAS et al. konnten in einer Arbeit von 2006 ebenfalls zeigen, dass in Kaninchenkardiomyozyten bei einer adenoviral vermittelten, akuten Überexpression der CaMKIIδ_C der diastolische Ca^{2+}-Verlust aus dem SR deutlich gesteigert war und durch Inhibition der CaMKII mittels KN-93 und AIP reduziert werden konnte. Auch AI et al. konnten 2005 zeigen, dass der RyR in herzinsuffizienten Kaninchenkardiomyozyten im hyperphosphorylierten Zustand vorlag, was mit einer erhöhten diastolischen Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR assoziiert war. CaMKII-Inhibition mittels KN-93 konnte den SR- Ca^{2+}-Verlust in Relation zum SR-Ca^{2+}-Gehalt deutlich reduzieren, während eine PKA-Inhibition mittels H-89 dazu nicht in der Lage war (AI et al. 2005). Gleichermaßen zeigte sich der SR-Ca^{2+}-Gehalt unter CaMKII-Inhibition erhöht. Ein ähnlicher Effekt der CaMKII-Inhibition konnte auch in dieser Arbeit festgestellt werden.

Interessanterweise konnten SOSSALLA et al. 2010 zeigen, dass eine Inhibition der CaMKII an isolierten humanen kardialen Trabekeln mittels AIP und KN-93 eine positiv inotrope Wirkung hatte. Diese Beobachtung passt zu der erhöhten Ca^{2+}-Transientenamplitude unter CaMKII-Inhibition in der vorliegenden Arbeit. SOSSALLA et al. beobachteten ebenfalls

einen erhöhten SR-Ca^{2+}-Gehalt unter KN-93 sowie einen verminderten diastolischen SR-Ca^{2+}-Verlust.

Diese Arbeiten deuten auf die wichtige Rolle der CaMKII im Rahmen der Herzinsuffizienz hin. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine mögliche ähnliche Rolle im Rahmen die DOX-vermittelten Kardiotoxizität auf, da in Bezug auf die Störungen der Ca^{2+}-Homöostase große Ähnlichkeiten mit Veränderungen nach akuter CaMKII-Überexpression vorliegen, insbesondere eine diastolische Ca^{2+}-Überladung und ein gesteigerter Ca^{2+}-Verlust aus dem SR (KOHLHAAS et al. 2006, AI et al. 2005).

4.5.2 Mögliche weitere in die gestörte Ca^{2+}-Homöostase involvierte Pathomechanismen

Auffällig bei der Bewertung der Ergebnisse nach Inhibition der CaMKII ist, dass durch die pharmakologische Inhibition nur eine partielle Reduktion der DOX-Effekte auf den Ca^{2+}-Stoffwechsel gelingen konnte. Diese Beobachtung kann auf verschiedene Ursachen zurück geführt werden: Zunächst kann man festhalten, dass die pharmakologische Inhibition als Methode für den Nachweis einer CaMKII-Beteiligung an der DOX-vermittelten Störung der Ca^{2+}-Homöostase ihre Schwächen aufweist; eine pharmakologische Inhibition garantiert nicht, dass keine Restaktivität des Enzyms mehr vorhanden ist. Bei den gewählten Konzentrationen der Inhibitoren ist insbesondere bei KN-93 eine Restaktivität zu erwarten, da KN-93 aufgrund seiner zelltoxischen Wirkung (MERCK CHEMICALS: www.merck-chemicals.com) in 1-µM-Konzentration, d.h. in der Konzentration, die 50 % der CaMKII-Aktivität hemmt (IC_{50}), zum Einsatz kommt (ROKOLYA und SINGER 2000). AIP hingegen sollte in der angewandten Konzentration von 1 µM nahezu 100% der CaMKII-Aktivität hemmen (ISHIDA et al. 1995). Doch der Inhibitor AIP konnte die Ca^{2+}-Sparkfrequenz nur auf 0,42±0,12 Ca^{2+}-Sparks pro 100 µm pro s, d.h. auf ca. 49%, reduzieren, nicht jedoch auf Kontrollniveau. Dies könnte natürlich durch eine Restaktivität der CaMKII erklärt werden, wahrscheinlicher ist jedoch, dass andere Mediatoren in diesem Modell ebenfalls eine Rolle spielen.

Dies wird durch Untersuchungen bestätigt, die begleitend zu der vorliegenden Arbeit mithilfe eines transgenen Mausmodells, das die CaMKIIδ, die im Herzen vorherrschende Isoform des Enzyms, nicht exprimiert, durchführen konnten. Es konnte gezeigt werden, dass der Ca^{2+}-Verlust aus dem SR und die diastolische Ca^{2+}-Überladung unter DOX in den die CaMKII nicht exprimierenden Tieren deutlich reduziert (SAG et al., 2011), was die Hypothese stützt, die CaMKII sei wesentlich an der Pathogenese der gestörten Ca^{2+}-Homöostase beteiligt, wie auch die Ergebnisse der pharmakologischen Inhibition der CaMKII in dieser Arbeit zeigen. Die DOX-Effekte auf die Ca^{2+}-Homöostase sind jedoch auch hier nicht völlig verschwunden, sondern nur deutlich abgeschwächt.

Als wichtiger Mediator für dieses Phänomen sind die reaktiven Sauerstoffradikalverbindungen zu nennen. Schon 1994 konnten GOLDHABER und LIU E zeigen, dass H_2O_2 in isolierten Meerschweinchenkardiomyozyten den SR-Ca^{2+}-Gehalt und gleichzeitig die Ca^{2+}-Transientenamplitude reduziert. Eine Erklärung für die Depletion des SR konnten möglicherweise TERENTYEV et al. 2008 aufzeigen, indem sie demonstrierten, dass der RyR in isolierten Kaninchenkardiomyozyten unter oxidativem Stress einen verstärkten Ca^{2+}-Verlust aus dem SR mediiert. Der Effekt konnte wiederum unter Einsatz reduzierender Substanzen wie DTT rückgängig gemacht werden. Diese oxidativen Effekte sind höchstwahrscheinlich auch in dem in dieser Arbeit eingesetzten Modell vorhanden, wie die epifluoreszenzmikroskopischen Experimente mit dem Farbstoff CM-H_2DCFDA suggerieren. Obwohl es sich hier um eine durch gesteigerte $[ROS]_i$ ausgelöste CaMKII-Aktivierung handeln könnte, ist trotzdem wahrscheinlich, dass auch direkte Effekte der ROS am RyR eine Rolle spielen. Wie eingangs beschrieben, weist der RyR 89 Cysteinreste pro Untereinheit bei vier Untereinheiten auf (XU et al. 1998). Eine Oxidation der Thiolgruppen kann durch Ausbildung von Disulfidbrücken und der damit einhergehenden Konformationsänderung des Proteins eine Funktionsänderung herbeiführen. So konnten XU et al. 1998 weiterhin zeigen, dass eine Oxidation singulärer, aus Kaninchenmyokard isolierter, in Lipiddoppelschichten inkorporierter RyR durch S-Nitrosoglutathione oder S-Nitrosocystein zu einer irreversiblen Aktivierung der RyR führt, die durch den reduzierenden Einfluss von DTT wieder rückgängig gemacht werden kann. Dieser Ansatz unterstützt die These, dass eine direkte Redoxmodifikation des Kanals unabhängig von der Aktivierung der CaMKII auch eine wichtige Rolle spielt; in der Tat stellte die Gruppe die Hypothese auf, dass einige der vielen Thiolgruppen der RyR nur als „Redox-Puffer“ zum Schutz vor exzessiver Redoxmodifikation fungieren könnten (XU et al. 1998). Sollte dieser oxidative Effekt unter DOX eine Rolle spielen, so könnte durch die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der RyR und den die damit verbundene Ca^{2+}-Freisetzung ebenfalls eine erhöhte Aktivierung der CaMKII begründet werden, und zwar auf dem Weg der Aktivierung über den Ca^{2+}/CaM-Komplex und eine nachfolgende Autophosphorylierung, die zu einer Amplifizierung des Effekts führen könnte.

Weiterhin könnten auch direkte Effekte der Substanz DOX am RyR relevant sein; ABRAMSON et al. konnten schon 1988 an radioaktiv markierten RyR aus Kaninchenmyokard zeigen, dass DOX, ähnlich der Substanz Koffein, direkt an den RyR bindet und so die Sensitivität für Ca^{2+} herabsetzt, was zu einer erhöhten Aktivierungsrate führt.

4.5.3 Kritische Betrachtung der verwendeten Inhibitoren

Die verwendeten CaMKII-Inhibitoren KN-93 und AIP sind seit 1991 bzw. 1995 etabliert und in zahlreichen Publikationen zum Einsatz gekommen (SUMI et al. 1991, SAG et al. 2007, AI et al. 2005, ISHIDA et al. 1995, SOSSALLA et al. 2010).

KN-93 ist ein mit dem Ca^{2+}/CaM-Komplex konkurrierender kompetitiver CaMKII-Inhibitor, der andere in den Ca^{2+}-Stoffwechsel eingebundene Kinasen, wie die PKA und die Proteinkinase C (PKC) nur zu einem sehr kleinen Prozentsatz hemmt und damit als selektiv gelten kann (SUMI et al. 1991). KN-93 hemmt allerdings gleichsam alle Isoformen der CaMKII. Um strukturelle, nicht funktionelle Effekte der Methoxybezensulfonamidstruktur des Inhibitors zu relativieren, wurde für alle Kontrollwerte, die im Vergleich zur Wirkung von KN-93 generiert wurden, ein inaktives Analogon, KN-92, in der gleichen Konzentration verwendet. GAO et al. konnten allerdings 2006 zeigen, dass sowohl KN-93 als auch KN-92 eine reversible Reduktion des I_{Ca} herbeiführen. Diese Wirkung muss bei der Evaluation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Dies gilt insbesondere in Bezug auf die deutlich verkleinerte Ca^{2+}-Transientenamlitude unter KN-92 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Gleichzeitig muss man sagen, dass unter der Substanz KN-93 der I_{Ca} gleichermaßen reduziert sein müsste, jedoch eine signifikant höhere Amplitude besteht, was wiederum dem Effekt der CaMKII-Inhibition zugeschrieben werden kann.

Der zweite in dieser Arbeit eingesetzte Inhibitor AIP hemmt die CaMKII ebenfalls spezifisch, d.h. er lässt die Wirkung anderer Kinasen wie der PKA, PKC oder auch der Calmodulin-abhängigen Kinase IV, die durch KN-93 teilweise mit inhibiert wird, unberührt und wirkt unabhängig von der Konzentration des Ca^{2+}/CaM-Komplexes (ISHIDA et al. 1995). AIP ist jedoch, wie auch KN-93, nicht Isoform-spezifisch. Da es sich bei AIP um ein Peptid handelt (s. Kap. 2.2.4.1, S. 33 f), wurde auf die Verwendung eines Analogons in der Kontrolle verzichtet.

4.5.4 Zusammenhang der erhöhten CaMKII-Aktivierung mit dem veränderten Redox-Milieu und der gestörten Ca^{2+}-Homöostase

Eine signifikante Reduktion der Effekte des DOX auf die Ca^{2+}-Homöostase ist nicht von der Hand zu weisen, so dass davon auszugehen ist, dass die CaMKII an der Pathogenese der DOX-induzierten kardialen Schäden zu einem gewissen Maße beteiligt ist. Zum ersten belegt dies das Ergebnis der erhöhten CaMKII-Phosphorylierung im Sinne einer gesteigerten Aktivierung der CaMKII an sich. Es bleibt ungeklärt, ob dieser Aktivierung über eine direkte Oxidation des Enzyms oder indirekt über eine oxidative Aktivierung der RyR zustande kommt und damit durch den gesteigerten Ca^{2+}-Ausstrom aus dem SR begründet ist. Zum zweiten wird der Zusammenhang mit den Veränderungen der Ca^{2+}-Homöostase durch die Inhibitionsexperimente hergestellt, insbesondere durch die partielle Rückführung der diastolischen Ca^{2+}-Überladung, die partielle Aufrechterhaltung der Ca^{2+}-Transientenamplitude, die Reduktion der Ca^{2+}-Sparkfrequenz und schließlich durch die Aufrechterhaltung des SR-Ca^{2+}-Gehalts. Wie groß die Rolle der CaMKII in diesem Zusammenhang tatsächlich ist und welche Konsequenzen sich daraus ergeben, müssen weitere Studien zeigen.

4.6 Klinische Betrachtung und Einordnung

Die klinische Bedeutung der kardiotoxischen Wirkung von DOX wird durch eine Vielzahl an Studien illustriert. Schon in den 1970er Jahren wurden kardiotoxische Effekte von Anthrazyklinen, wie die Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion und das Auftreten von Arrhythmien, beschrieben (BRISTOW et al. 1978). Besonderes klinisches Interesse besteht natürlich an der Fragestellung der tatsächlichen Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie, die oft erst nach Jahren oder Jahrzehnten auftritt. Insbesondere die 2009 im British Medical Journal veröffentlichte Studie von MULROONEY et al. legt nahe, dass die Inzidenz der Herzinsuffizienz nach Anthrazyklintherapie nicht nur je nach Dosis um das 2,4 - 5,2-fache erhöht ist, sondern auch mit zunehmendem Alter immer häufiger wird. Die Arbeit nutzt die Kohorte der Childhood-Cancer-Survivor-Study, ein großes Kollektiv an erwachsenen Überlebenden mit malignen Erkrankungen im Kindesalter und deren Geschwister als Referenzgruppe und betrachtet retrospektiv die Inzidenzen der kardialen Erkrankungen in Abhängigkeit der verschiedenen onkologischen Therapiekonzepte, darunter auch die Anthrazyklintherapie. Das deutlich erhöhte Auftreten einer dilatativen Kardiomyopathie erreicht selbst innerhalb eines Zeitraums von 30 Jahren kein Plateau, sondern steigt im Gegenteil in Abhängigkeit von der vergangenen Zeit seit der Diagnose immer stärker an.

Die um Jahrzehnte verzögerte Form der kardialen Beeinträchtigung ist jedoch nicht die einzige; so beschrieben LIPSHULTZ et al. 1991 auch eine Form der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie, die innerhalb eines Jahres nach der ersten Dosis auftritt. Akuteffekte unmittelbar nach Anthrazyklingabe werden zwar klinisch selten beobachtet (YEH und BICKFORD 2009, WOUTERS et al. 2005), dürfen aber in ihrer Bedeutung nicht unterschätzt werden. 1984 konnten DITCHEY et al. an einem *in vivo*-Hundemodell zeigen, dass eine Behandlung mit DOX akut die myokardiale Kontraktilität einschränkt und den systolischen linksventrikulären Druck erheblich verringert. Eine Studie von GANAME et al. konnte mittels Echokardiografie 2007 an 13 Kindern, die eine Anthrazyklintherapie erhielten, die Akuteffekte der Anthrazykline auf das Herz dokumentieren; es zeigte sich eine eingeschränkte linksventrikuläre Pumpleistung bei einer verlangsamten Relaxation innerhalb von zwei Stunden nach den ersten drei Dosen der Anthrazyklintherapie. Diese Ergebnisse zeigen eindrücklich, dass Akuteffekte in der Anthrazyklintherapie eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielen und möglicherweise schon auf die spätere Entwicklung einer tatsächlichen Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie hindeuten können.

In einem Positionspapier für die European Society of Cardiology wiesen ESCHENHAGEN et al. 2011 explizit auf die Gefahren einer Anthrazyklintherapie hin, insbesondere für alte Menschen und Kinder, und lenkten so erneut die Aufmerksamkeit der Fachgesellschaft auf dieses immer noch hochaktuelle Thema. Sie betonten, wie wichtig es sei, in der Kardiologie eine Anthrazyklintherapie als Risikofaktor im Sinne einer Vorschädigung des Myokards

zu werten, um spätere Stressoren, wie z.B. eine kardiale Belastung durch einen Hypertonus, richtig einschätzen zu können. Auch in diesem Artikel wurde betont, dass zu wenig prophylaktische Maßnahmen, wie z.B. die Gabe von Dexrazoxane, ergriffen werden (ESCHENHAGEN et al. 2011).

Was die Bedeutung der Rolle der CaMKII in einem klinischen Kontext angeht, so muss festgehalten werden, dass aktuell zwar noch keine Option zur therapeutischen Inhibition besteht, es jedoch von großem Vorteil für die betroffenen Patienten sein könnte, eine solche in Studien zu erproben. Eine spezifische, lokale Inhibition der CaMKII *in vivo* könnte möglicherweise einen protektiven Effekt auf den kardialen Stoffwechsel haben und somit die Pumpleistung länger aufrechterhalten. Es wäre hochinteressant, eine Substanz zu entwickeln, die sich *in vivo* unbedenklich einsetzen ließe und ihre Effekte auf den kardialen Stoffwechsel unter DOX oder anderen Stressoren in Studien zu erproben. Dies scheint besonders klinisch relevant, da die Versuche, betroffene Patienten mit Antioxidantien zu therapieren, bislang gescheitert sind (LADAS et al. 2004). Nach wie vor besteht für die Patienten neben Therapieversuchen mit einer Antizytokintherapie oder Wachstumshormonen sowie der Herztransplantation als *ultima ratio* nur die sehr unbefriedigende und mäßig wirksame Option der symptomatischen Therapie (GIANTRIS et al. 1998, WOUTERS et al. 2005). Unter dieser Therapie beläuft sich die Ein-Jahres-Mortalität der symptomatischen Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz[14] auf 40%, die Zwei-Jahres-Mortalität auf 60% (HAQ et al., 1985). Diese Zahlen verdeutlichen, wie dringend eine neue molekulare Zielstruktur für die Therapie dieser Patienten benötigt wird. Langfristig wäre es wünschenswert, die möglichen therapeutischen Konsequenzen, die sich möglicherweise aus der vorliegenden Arbeit ergeben, weiter zu ergründen. Hierfür sind jedoch viele weitere Untersuchungen, sowohl mittels *in vivo*-Modellen als auch später in der Klinik, notwendig.

[14] Als symptomatisch werden hier Patienten mit Luftnot bei leichten Aktivitäten oder in Ruhe eingestuft (=entspricht Grad III-IV nach der New York Heart Association).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der CaMKII im Rahmen der gestörten Ca^{2+}-Homöostase unter DOX-Behandlung in isolierten adulten Rattenkardiomyozyten untersucht. Nach Einwirkung des DOX konnte nicht nur ein massiv beeinträchtigter Ca^{2+}-Stoffwechsel, sondern auch eine verstärkte Aktivierung der CaMKII, die wahrscheinlich auf eine erhöhte $[ROS]_i$ zurückzuführen ist, festgestellt werden. Nach Inhibition der CaMKII zeigten sich die zuvor beobachteten Effekte des DOX auf den Ca^{2+}-Stoffwechsel, nämlich die diastolische Ca^{2+}-Überladung, die verminderte Ca^{2+}-Transientenamplitude, der erhöhte Ca^{2+}-Verlust aus dem SR und der damit einhergehende reduzierte SR-Ca^{2+}-Gehalt, vermindert. Die Beteiligung der CaMKII ist von hoher pathophysiologischer und klinischer Relevanz, da die CaMKII eine mögliche Zielstruktur zur pharmakologischen Intervention darstellt. Die kardialen Nebenwirkungen des DOX, insbesondere die dilatative Kardiomyopathie, verschlechtern die Prognose der Überlebenden nach Krebserkrankungen deutlich und können bislang nicht suffizient therapiert werden. Unter diesem Aspekt scheint eine weitere Untersuchung des Stellenwerts der CaMKII, *in vitro* und *in vivo*, geboten, um langfristig die Therapie dieses schwerwiegenden Krankheitsbildes zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

Abramson JJ, Salama G (1989): Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. J Bioenerg Biomembr 21, 283-294

Abramson JJ, Buck E, Salama G, Casida JE, Pessah IN (1988): Mechanism of Anthraquinon induced Calcium Relase from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. J Biol Chem 263, 18750-18758

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Modulates Cardiac Ryanodine Receptor Phosphorylation and Sarcoplasmic Reticulume Ca2+ Leak in Heart Failure. Circ Res 97, 1314-1322

Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MM, Belterman CN, Coronel R, Fiolet JW (2003): Increased Na+/H+-exchange activity is the cause of increased [Na]i and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. Cardiovasc Res 57, 1015-1024

Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE (2009): Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. JoVE. 23. http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1067, doi: 10.3791/1067

Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM (1993): Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. Am J Physiol 265, 533-40

Bassani JWM, Yuan W, Bers DM (1995): Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. Am J Physiol 268, 1313-1319

Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M (1991): Oxygen free radicals and congestive heart failure. Br Heart J 65, 245-248

Bers DM: Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2. Auflage; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001

Bers DM (2002): Cardiac Excitation-Contraction-Coupling, Nature 415, 198-205

Bers DM, Despa S, Bossuyt J (2006): Regulation of Ca^{2+} and Na^{+} in Normal and Failing Cardiac Myocytes. Ann NY Acad Sci 1080, 165-177

Bleyer WA (1990): The impact of childhood cancer on the United States and the world. CA Cancer J Clin 40, 355-367

Boveris A, Oshino N, Chance B (1972): The Cellular Production of Hyrdogen Peroxide. Biochem J 128, 617-630

Braun AP, Schulman H (1995): The Multifunctional Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase: From Form to Function. Ann Rev Physiol 57, 417-445

Bristow MR, Billingham ME, Mason JW, Daniels JR (1978): Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. Cancer Treat Rep 62, 873-879.

Brown AM, Lee KS, Powell T (1981): Sodium Current in Single Rat Heart Muscle Cells. J Physiol 318, 479-500

Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM (1985): Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. J Mol Cell Cardiol 17, 145-152

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB (1993): Calcium Sparks: Elementary Events Underlying Excitation-Contraction Coupling in Heart Muscle. Science 262, 740-744

Cobbold PH, Rink TJ (1987): Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. Biochem J 248, 313-328

Coleman L, Cummins H, Lynker M, McClintock P, Payne M, Shore S, Tipler P, Wiescher M: Dictionary of Physics. Macmillan, London 2004, 898

Corle TR, Kino GS: Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems. Academic Press, San Diega, CA, USA, 1996

Davies KJA, Doroshow JH (1986): Redox Cycling of Anthracyclines by Cardiac Mitochondria I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. J Biol Chem 261, 3060-3067

Dearth J, Osborn R, Wilson E, Kelly D, Mantle J, Rogers E, Malluh A, Crist W (1984): Anthracycline-induced cardiomyopathy in children: a report of six cases. Med Pediatr Oncol 12, 54-58

Despa S, Islam MA, Weber CR, Pogwizd SM, Bers DM (2002): Intracellular Na^+ concentration is elevated in heart failure, but Na^+/K-pump function is unchanged. Circulation 105, 2543-2548

Dickstein K, Cohen-Solal A. Filippatos G, McMurray JJV, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, Van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K (2008): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). Eur J Heart Fail 10, 933-989

Ditchey RV, LeWinter MM, Higgins CB (1984): Acute effects of doxorubicin (adriamycin) on left ventricular function in dogs. Int J Cardiol 6, 341-353

Doerr T, Denger R, Doerr A, Trautwein W (1990): Ionic currents contributing to the action potential in single ventricular myocytes of the guinea pig studied with action potential clamp. Pflugers Arch 416, 230-237

Eager KR, Roden LD, Dulhunty AF (1997): Actions of sulfhydryl reagents on single ryanodine receptor Ca2+-release channels from sheep myocardium. Am J Physiol 272, 1908-1918

Ebashi S, Ebashi F (1964): A new protein factor promoting contraction of actomyosin. Nature 203, 645-646

Ebashi S, Lipmann F (1962): Adenosine Triphosphate-Linked Concentration of Calcium Ions in a Particulate Fraction of Rabbit Muscle. J Cell Biol 14, 389-400

Enzo Life Sciences: http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els_a0e1042a5c.pdf, 12.07.2012, 10:31 Uhr

Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJL, Weiss RM, Spitz

DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME (2008): A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. Cell 133, 462-474

Eschenhagen T, Force T, Ewer MS, de Keulenaer GW, Suter TM, Anker SD, Avkiran M, de Azambuja E, Balligand JL, Brutsaert DL, Condorelli G, Hansen A, Heymans S, Hill JA, Hirsch E, Hilfiker-Kleiner D, Janssens S, de Jong S, Neubauer G, Pieske B, Ponikowski P, Pirmohamed M, Rauchhaus M, Sawyer D, Sugden PH, Wojta J, Zannad F, Shah AM (2011): Cardiovascular side effects of cancer therapies: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. Eur J Heart Fail 13, 1-10

Fabiato A, Fabiato F (1975): Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. J Physiol 249, 469-495

Fearon IM, Palmer AC, Balmforth AJ, Ball SG, Varadi G, Peers C (1999): Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca^{2+} channel α_{1C} subunits by redox agents and hypoxia. J Physiol 514, 629-637

Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V (1999): Shape, Size, and Distribution of Ca2+ Release Units and Couplons in Skeletal and Cardiac Muscles. Biophys J 77, 1528-1539

Freeman BA, Crapo JD (1982): Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest 47, 412-426

Frey A: Protein-Blotting: Western- Blot und andere Overlay-Techniken. In: Gentechnische Methoden hrsg. durch Gassen, HG und Schrimpf G, 2 Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1999, 199-224

Gaboriau F, Demoulins-Giacco N, Tirache I, Molière P (1995): Involvement of singlet oxygen in ultraviolet A-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. Arch Dermatol Res 287, 338-340

Ganame J, Claus P, Eyskens B, Uyttebroeck A, Renard M, D'hooge J, Gewillig M, Bijnens B, Sutherland GR, Mertens L (2007): Acute cardiac functional and morphological changes after Anthracycline infusions in children. Am J Cardiol 99, 974-977

Gao L, Blair LA, Marshall J (2006): CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels. Biochem Biophys Res Commun 345, 1606-1610

Gellens ME, George AL Jr, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, Kallen RG (1992): Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. Proc Natl Acad Sci USA 89, 554-558

Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB (2008): Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside. J Clin Oncol 26, 3777-3784

Giantris A, Abdurrahman L, Hinkle A, Asselin B, Lipshultz SE (1998): Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. Crit Rev Oncol Hematol 27, 53-68

Gill JS, McKenna WJ, Camm A (1995): Free radicals irreversibly decrease Ca^{2+} currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. Eur J Pharmacol 292, 337-340

Goldhaber JI (1996): Free radicals enhance Na+/Ca^{2+} exchange in ventricular myocytes. Am J Physiol 271, 823-833

Goldhaber JI, Liu E (1994): Excitation-contraction coupling in single guinea-pig ventricular myocytes exposed to hydrogen peroxide. J Physiol 477, 135-147

Goldhaber JI, Ji S, Lamp ST, Weiss JN (1989): Effects of exogenous free radicals on electromechanical function and metabolism in isolated rabbit and guinea pig ventricle. Implications for ischemia and reperusion injury. J Clin Invest 83, 1800-1809

Gottdiener JS, Appelbaum FR, Ferrans VJ, Deisseroth A, Ziegler J (1981): Cardiotoxicity associated with high-dose cyclophosphamide therapy. Arch Intern Med 141, 758-763

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260, 3440-3450

Guide for the care and use of Laboratory Animals, NIH Publikationsnummer 85-23, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1996

Günthert AR, Gründker C, Bongertz T, Nagy A, Schally AV, Emons G (2004): Induction of apoptosis by AN-152, a cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), in LHRH-R positive human breast cancer cells is independent of multidrug resistence 1 (MDR-1) system. Breast Cancer Res Treat 87, 255-264

Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995): Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. J Biol Chem 270, 2074-2081

Haq MM, Legha SS, Choksi J, Hortobagyi GN, Benjamin RS, Ewer M, Ali M (1985): Doxorubicin-induced congestive heart failure in adults. Cancer 56, 1361-1365

Harkins AB, Kurebayashi N, Baylor SM (1993): Resting Myoplasmic Free Calcium in Frog Skeletal Muscle Fibers Estimated with Fluo-3. Biophys J 65, 865-881

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994): Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. Circ Res 75, 434-442

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999): Relationship Between Na+-Ca2+-Exchanger Protein Levels and Diastolic Function of Failing Human Myocardium. Circulation 99, 641-648

Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM (2003): Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. J Am Coll Cardiol 41, 2164-2171

Horacek JM, Pudil R, Jebavy L, Tichy M, Zak P, Maly J (2007): Assessment of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity with Biochemical Markers. Exp Oncol 29, 309-313

Houpt PM, Draaijer A (1989): Confocal laser scanning microscope. United States Patant, No. 4863226

Huang RP, Wu JX, Fan Y, Adamson ED (1996): UV Activates Growth Factor Receptors via Reactive Oxygen Intermediates. J Cell Biol 133, 211-220

Ihrig I, Schubert F, Habel B, Haberland L, Glaser R (1999): The UVA Light Used during the Fluorescence Microscopy Assay Affects the Level of Intracellular Calcium Being Measured in Experiments with Electric-Field Exposure. Radiat Res 152, 303-311

Invitrogen: http://products.invitrogen.com/ivgn/product/F1201?ICID=search-product 22.08.2011, 20:00 Uhr

IonOptix: http://www.ionoptix.com/userfiles/File/Database/HMSYS.pdf, 22.08.2011, 20:30 Uhr

Irisawa H, Brown HF, Giles W (1993): Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. Physiol Rev 73, 197-227

Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H (1995): A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. Biochem Biophys Res Commun 212, 806-812

Jackson AP, Timmerman MP, Bagshaw CR, Ashley CC (1987): The kinetics of calcium binding to fura-2 and indo-1. FEBS Lett 216, 35-39

Kao JP, Tsien RY (1988): Ca2+ binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements. Biophys J 53, 635-639

Kato M, Kako KJ (1988): Na+/Ca2+ exchange of isolated sarcolemmal membrane: effects of insulin, oxidants and insulin deficiency. Mol Cell Biochem 83, 15-25

Keung EC, Toll L, Ellis M, Jensen RA (1991): L-Type Cardiac Calcium Channels in Doxorubicin Cardiomyopathy in Rats Morphological, Biochemical, and Functional Correlations. J Clin Invest 87, 2108-2113

Kim HW, Steenaart NAE, Ferguson DG, Kranias EG (1990): Functional Reconstitution of the Cardiac Sarcoplamic Reticulum Ca^{2+}-ATPase with Phospholamban in Phospholipid Vesicles. J Biol Chem 265, 1702-1709

Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, Chung SM, Im MJ, Kim UH (2006): Doxorubicin- induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca2+ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. Exp Mol Med 38, 535-545

King N, Lin H, Suleiman MS (2010): Cysteine protects freshly isolated cardiomyocytes against oxidative stress by stimulating glutathione peroxidase. Mol Cell Biochem 343, 125-132

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. Cardiovasc Res 42, 254-261

Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A, Herrlich P (1996): Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. EMBO J 15, 5314-5325

Kohlhaas M: Die Bedeutung der subzellulären CaMKIIδ-Überexpression auf den intrazellulären Ca^{2+}-Stoffwechsel der in Herzmuskelzellen. Rer. Nat. Diss. Göttingen 2006

Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM, Maier LS (2006): Increased Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak but Unal-

tered Contractility by Acute CaMKII Overexpression in Isolated Rat Cardiac Myocytes. Circ Res 98, 235-244

Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller A, Ong MF, Böhm M, O'Rourke B, Maack C (2010): Elevated Cytosolic Na^+ Increases Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species in Failing Cardiac Myocytes. Circulation 121, 1606–1613

Krischer JP, Epstein S, Cuthbertson DD, Goorin AM, Epstein ML, Lipshultz SE (1997): Clinical Cardiotoxicity Following Anthracycline Treatment for Childhood Cancer: The Pediatric Oncology Group Experience. J Clin Oncol 15, 1544-1552

Ladas EJ, Jacobson JS, Kennedy DD, Teel K, Fleischauer A, Kelly KM (2004): Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. J Clin Oncol 22, 517-28

Lakowicz JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3. Auflage; Springer, New York 2010

Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. Pflügers Arch 61, 291-332

Lefer DJ, Granger N (2000): Oxidative Stress and Cardiac Disease. Am J Med 109, 315-323

Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM (1997): The effect of Ca^{2+}-calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. J Physiol 501, 17-32

Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP (1991): Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. N Engl J Med 324, 808-815

Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE, Sanders SP, Orav EJ, Gelber RD, Colan SD (1995): Female sex and higher drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. N Engl J Med 332, 1738-1743

Liu DW, Antzelevitch C (1995): Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. Circ Res 76, 351-365

Liu G, Abramson JJ, Zable AC, Pessah IN (1994): Direct evidence for the existence and functional role of hyperreactive sulfhydryls on the ryanodine receptor-triadin complex selectively labeled by the cumarin maleimide 7-dietylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin. Mol Pharmacol 45, 189-200

Lokuta AJ, Rogers TB, Lederer WJ, Valdivia HH (1995): Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. J Physiol 487, 609-622

Lukyanenko V, Wiesner TF, Gyorke S (1998): Termination of Ca2+ release during Ca2+ sparks in rat ventricular myocytes. J Physiol 507, 667-677

Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U (2003): Oxgen Free Radical Release in Human Failing Myocardium Is Associated With Increased Activity of Rac1-GTPase and Represents a Target for Statin Treatment. Circulation 108, 1567-1574

Maier LS, Bers DM (2002): Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond J Mol Cell Cardiol 34, 919-39

Maier LS, Bers DM (2007): Role of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart, Cardiovasc Res 73, 631-640

Maier LS, Bers DM, Pieske B (2000): Differences in Ca^{2+}-Handling and Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+}-Content in Isolated Rat and Rabbit Myocardium. J Mol Cell Cardiol 32, 2249-2258

Maier LS, Zhang T, Chen Z, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKIIδ_C Overexpression Uniquely Alters Cardiac Myocyte Ca^{2+} Handling, Circ Res 92, 904-911

Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A (1998): Elevated Levels of 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in Pericardial Fluid of Patients With Heart Failure: A Potential Role por In Vivo Oxidant Stressin Ventricular Dilatation and Progression to Heart Failure. Circulation 97, 1536-1539

Martindale JL, Holbrook NJ (2002): Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. J Cell Physiol 192, 1-15

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit N, Marks AR (2000): PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts. Cell 101, 365-376

McMurray JJV (2010): Systolic Heart Failure. N Engl J Med 362, 228-238

Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KJ, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990): Altered Sarcoplasmic Reticulum Ca2+ ATPase Gene Expression in the Human Ventricle during End-Stage Heart Failure. J Clin Invest 85, 305-309

Merck Chemicals: http://www.merck-chemicals.com, 3.04.11 22:50 Uhr

Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. Circulation 92, 778-784

Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S (1989): Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. Nature 240, 230-233

Millipore: http://www.millipore.com/userguides/tech1/p36599. 17.09.2011, 14:54 Uhr

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004): Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. Pharmacol Rev 56, 185-229

Morris TE, Sulakhe PV (1997): Sarcopasmic reticulum Ca2+-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. Free Radic Biol Med 22, 37-47

Mulrooney DA, Yeazel MW, Kawashima T, Mertens AC, Mitby P, Stovall M, Donaldson SS, Green DM, Sklar CA, Robison LL, Leisenring WM (2009): Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. BMJ 339, b4606

Murphy AJ (1976): Sulhydryl group modification of sarcoplasmic reticulum membranes. Biochemistry 15, 4492-4496

Murray D, Ben-Tal N, Honig B, McLaughlin S (1997): Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. Structure 5, 985-989

Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC (1977): Adriamycin: The Role of Lipid Peroxidation in Cardiac Toxicity and Tumor Response. Science 197, 165-167

Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G (1996): Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. Circulation 93, 168–177

Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010): CaMKII-dependent diastolic SR Ca2+ leak and elevated diastolic Ca2+ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. Circ Res 106, 1134-1144

Nelson AR, Borland L, Allbritton NL, Sims CE (2007): Myristoyl-Based Transport of Peptides into Living Cells. Biochemistry 46, 14771-14781

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

Olson RD, MacDonald JS, vanBoxtel CJ, Boerth RC, Harbison RD, Slonim AE, Freeman RW, Oates JA (1980): Regulatory Role of Glutathione and Soluble Sulfhydryl Groups in the Toxicity of Adriamycin. J Pharmacol Exp Ther 215, 450-454

Peitzsch RM, McLaughlin S (1993): Binding of Acylated Peptides and Fatty Acids to Phospholipid Vesicles: Pertinence to Myristoylated Proteins. Biochemistry 32, 10436-10443

Pessah IN, Stambuk RA, Casida JE (1987): Ca^{2+}-Activated Ryanodine Binding: Mechanisms of Sensitivity and Intensity Modulation by Mg^{2+}, Caffeine, and Adenine Nucleotides. Mol Pharmacol 31, 232-238

Pessah IN, Kim KH, Feng W (2002): Redox sensing properties of the ryanodine receptor complex. Front Biosci 7, 72-79

Philipson KD, Longoni S, Ward R (1988): Purification of the cardiac Na+-Ca2+ exchange protein. Biochim Biophys Acta 945, 298-306

Pieske B, Maier LS, Piacentino V 3rd, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S (2002): Rate dependence of $[Na]_i$ and contractility in nonfailing and failing myocardium. Circulation 106, 447-453

Potter JD, Gergely J (1974): Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca2+ regulation of muscle contraction. Biochemistry 13, 2697-2703

Praga C, Beretta G, Vigo PL. Lenaz GR, Pollini C, Bonadonna G, Canetta R, Castellani R, Villa E, Gallagher CG, von Melchner H, Hayat M, Ribaud P, De Wasch G, Mattsson W, Heinz R, Waldner R, Kolaric K, Buehner R, Ten Bokkel-Huyninck W, Perevodchikova NI, Manziuk LA, Senn HJ, Mayr AC (1979): Adriamycin cardiotoxicity: a survey of 1273 patients. Cancer Treat Rep 63, 827-834

Reeves JP, Bailey CA, Hale CC (1986): Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. J Biol Chem 261, 4948-4955

Renart J, Reiser J, Stark GR (1979): Transfer of proteins from gels diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci USA 76, 3116-3120

Reuter H, Seitz N (1968): The Dependence of Calcium Efflux from Cardiac Muscle on Temperature and External Ion Composition. J Physiol 195, 451-470

Ringer S (1883): A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. J Physiol 4, 29-43

Rokolya A, Singer HA (2000): Inhibition of CaM kinase II activation and force maintenance by KN-93 in arterial smooth muscle. Am J Physiol Cell Phsyciol 278, 537-545

Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Zinck R, Nordheim A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ (1994): Involvement of Growth Factor Receptors in the Mammalian UVC Response. Cell 78, 963-972

Sag CM: Die Bedeutung der Ca^{2+}-Calmodulin abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) für die Erholung von Kontraktionskraft und Ca^{2+} -Transienten während der Azidose am Herzen. Med. Diss. Göttingen 2007

Sag CM, Dybkova N, Neef S, Maier LS (2007): Effects on recovery during acidosis in cardiac myocytes overexpressing CaMKII. J Mol Cell Cardiol 43, 696-709

Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, Neef S, Maier SKG, Maier LS (2009): Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Contributes to Cardiac Arrhythmogenesis in Heart Failure. Circ Heart Fail 2, 664-675

Sag CM, Köhler AC, Anderson ME, Backs J, Maier LS (2011): CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol 51, 749-759

Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK (1990): Two components of cardiac delayed rectifier K+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. J Gen Physiol 96, 195-215

Sardao VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB (2009): Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. Call Biol Toxicol 25, 227-243

Scherer NM, Deamer DW (1986): Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca^{2+}-ATPase. Arch Biochem Biophys 246, 589-601

Schmidt RF, Lang F, Thews G: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie; 29. Auflage; Springer-Verlag, Heidelberg 2005, 591-593

Schmidt U, Hajjar RJ, Helm PA, Kim CS, Doye AA, Gwathmey JK (1998): Contribution of Abnormal Sarcoplasmic Reticulum ATPase Activity to Systolic and Diastolic Dysfunction in Human Heart Failure. J Mol Cell Cardiol 30, 1929-1937

Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ (2000): Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. Circulation 101, 790-796

Seddon M, Looi YH, Shah AM (2007): Oxidative Stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure Heart 93, 903-907

Sefton BM, Buss JE (1987): The Covalent Modification of Eukaryotic Proteins with Lipid. J Cell Biol 104, 1449-1453

Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, Murphy M, Stewart SJ, Keefe D (2002): Cardiac Dysfunction in the Trastuzumab Clinical Trials Experience. J Clin Oncol 20, 1215-1221

Sham JS, Song LS, Chen Y, Deng LH, Stern MD, Lakatta EG, Cheng H (1998): Termination of Ca2+ release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci USA 95, 15096-15101

Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM (2003): Elevated sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. Circ Res 93, 592-594

Sigma-Aldrich:

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/44583?lang=de&region=DE,

02.08.2012, 14:51 Uhr.

Smith JS, Coronado R, Meissner G (1985): Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels. Nature 36, 446-449.

Sossalla ST: Der Einfluss von Protoneninhibitoren auf die Kontraktilität des Myokards. Med. Diss. Göttingen 2006

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, El-Armouche A , Hasenfuss G, Maier LS (2010): Inhibition of Elevated Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Improves Contractility in Human Failing Myocardium. Circ Res 107, 1150-1161

Statistisches Bundesamt Deutschland: Todesursachen:
http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.psml, 27.11.10 21:00 Uhr

Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, Hidaka H (1991): The newly synthesized selective Ca2+/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. Biochem Biophys Res Commun 181, 968-975

Takano H, Zou Y, Hasegawa H, Akazawa H, Nagai T, Komuro, I (2003): Oxidative Stress-Induced Signal Transduction Pathways in Cardiac Myocytes: Involvement of ROS in Heart Diseases, Antioxidant Redox Signal 5, 789-794

Terentyev D, Györke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, Carcache de Blanco, E, Khanna S, Sen CK, Cardounel AJ, Carnes CA, Györke S (2008): Redox Modification of Ryanodine Receptors Contributes to Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Leak in Chronic Heart Failure. Circ Res 103, 1466-1472

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000): Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279, 1005-1028

The Molecular Probes® Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies- 11th Edition ©2012

http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html, 27.01.2012, 17:10 Uhr

Timolati F, Ott D, Pentassuglia L, Giraud MN, Perriard JC, Suter TM, Zuppinger C (2006): Neuregulin-1 beta attenuates doxorubicin-induced alterations of excitation-contraction coupling and reduces oxidative stress in adult rat cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 41, 845-854

Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U (2006): New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. J Mol Cell Cardiol 41, 389-405

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76, 4350-4354

Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ (1995): Rapid adaption of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg^{2+} and phosphorylation. Science 267, 1997-2000

Vásquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BSS, Pritchard Jr KA, Kalyanaraman B (1997): Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Superoxide Generation from Adriamycin. Biochemistry 36, 11293-11297

Wagner S, Seidler T, Picht E, Maier LS, Kazanski V, Teucher N, Schillinger W, Pieske B, Isenberg G, Hasenfuss G, Kögler H (2003): Na+-Ca2+ exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury. Cardiovasc Res 60, 404-412

Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SKG, Zhang T, Hasenfuss G, Heller Brown J, Bers DM, Maier LS (2006): Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na^{+} channels. J Clin Invest 116, 3127-3138

Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, Belardinelli L, Maier LS (2011): Reactive species-activated Ca/calmodulin kinase IIδ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. Circ Res 108, 555-565

Wilhelm S: Confocal Laser Scanning Microscopy. Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena 2010

Witcher DR, Kovascs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR (1991): Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. J Biol Chem 266, 11144-11152

Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE (2005): Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. Br J Haematol 131, 561-578

Xu L, Eu JP, Meisser G, Stamler JS (1998): Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. Science 279, 234-237

Yeh ETH, Bickford CL (2009): Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. J Am Coll Cardiol 53, 2231-47

Zima AV, Blatter LA (2006): Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. Cardiovasc Res 71, 310-321

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2006): Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. Biochim Biophys Acta 1757, 509-517

Zorzato F, Salviati G, Facchinetti T, Volpe P (1985): Doxorubicin induces Calcium Relaease from Terminal Cisternae of Skeletal Muscle. J Biol Chem 260, S. 7349-7355

Zuppinger C, Timolati F, Suter T (2007): Pathophysiology and Diagnosis of Cancer Drug Induced Cardiomyopathy. Cardiovasc Toxicol 7, 61-66

Zweier JL, Kuppusamy P, Williams R, Rayburn BK, Smith D, Weisfeldt ML, Flaherty JT (1989): Measurement and Characterization of Postischemic Free Radical Generation in the Isolated Perfused Heart. J Biol Chem 264, 18890-18895

Verzeichnis von Publikationen, die sich auf die vorliegende Arbeit beziehen

Orginalarbeiten

Sag CM, Köhler AC, Anderson ME, Backs J, Maier LS (2011): CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol 51, 749-759

Abstracts

Koehler AC, Sag CM, Maier LS (2010): Ca/calmodulin dependent kinase II (CaMKII) contributes to disordered Ca homeostasis during doxorubicin treatment. Eur Heart J 31 (Suppl) 698

Sag CM, Koehler AC, Maier LS (2010): Redox and nitrosative regulation of cardiac remodeling: novel therapeutic approaches for heart failure. Meeting of the Fondation Leducq on in Baltimore, USA

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lars S. Maier und dem wissenschaftlichen Betreuer dieser Arbeit, Dr. Can M. Sag. Nur durch ihre große und unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, beim Verfassen der Publikationsschriften und letztendlich beim Anfertigen dieses Manuskripts konnte diese Arbeit zustande kommen; bei Problemen jeglicher Art standen sie mir stets mit ihrer außerordentlichen Erfahrung und tatkräftigen Hilfe zur Seite. Das große Vertrauen, das mir entgegengebracht wurde, indem ich mit vielen anspruchsvollen Aufgaben betraut wurde, hat mir Chancen eingeräumt, die von unschätzbarem Wert sind. Ihre Begeisterung für die Kardiologie und die Pathophysiologie und ihr erstaunliches Wissen auf diesem Gebiet haben mich tief beeindruckt und ihre ansteckende Begeisterung und herzliches Wesen haben mich immer wieder von Neuem motiviert. Wissenschaftlich und menschlich werden sie mir große Vorbilder bleiben.

Weiterhin möchte ich Frau Gudrun Müller für ihre Hilfe bei der Isolation der Kardiomyozyten danken, die ohne sie nicht möglich gewesen wäre. Sie war immer zur Stelle und hat durch ihre Zuverlässigkeit ermöglicht, dass die Experimente reibungslos ablaufen konnten. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuss und Herrn PD Dr. med. Tim Seidler für die Bereitstellung der Versuchstiere und der Räumlichkeiten danken.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Maier; hier sind einige besonders hervorzuheben: Herrn Kay Neumann möchte ich herzlich für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie und die moralische Unterstützung im Labor als Doktorand und Mitstreiter danken. Herrn Thomas Sowa möchte ich für die Hilfe bei den Western-Blot-Versuchen danken, die durch seine große Erfahrung auf diesem Gebiet an Qualität deutlich gewonnen haben. Herrn Timo Schulte und Frau Felicia Steuer möchte ich für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit danken. Herrn Dr. med. Samuel T. Sossalla, Herrn Dr. med. Stefan Neef, Herrn Dr. med. Stefan Wagner, Frau Dipl. Biochem. Natalyia Dybkova und Herrn Dr. med. Adam Rokita möchte ich dafür danken, dass sie mir bei fachlichen Fragen als auch bei kleineren oder größeren Problemen im Laboralltag immer und sofort zu Seite standen. Herrn Tim Peters, Frau Nora Drick und Herrn Nils Wilke möchte ich ausdrücklich für die Hilfe bei der Erstellung und Korrektur dieses Manuskripts danken. Herrn Prof. Dr. Donald Bers und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Bereitstellung der Antikörper danken. Bei Herrn Dr. phil. Karl-Heinz Stubenrauch möchte ich mich für die sorgfältige Durchsicht und Korrektur der Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Am 22. Juli 1986 wurde ich, Anne Christine Köhler, als Tochter von Dr. med. Claudia Köhler und Prof. Dr. med. Michael Köhler, in Homburg/Saar geboren.

Die Grundschule besuchte ich in Eddigehausen von 1992 bis 1996, danach schlossen sich zwei Jahre auf der Orientierungsstufe Bovenden (1996-1998) an. Die Gymnasialzeit absolvierte ich ab 1998 auf dem Theodor-Heuss-Gymnasium, wo ich 2005 mein Abitur mit den Leistungsfächern Englisch und Französisch machte. Von 2002 bis 2003 besuchte ich ferner das Internat Phillips Academy in Andover, MA (USA), wo ich mein High School Diploma erwarb.

Im Wintersemester 2005/2006 begann ich mein Medizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg. Nach erfolgreichem Bestehen des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung im Sommersemester 2007 wechselte ich zum Wintersemester 2007/2008 an die Georg-August-Universität zu Göttingen. Im Sommersemester 2008 und im Wintersemester 2008/2009 arbeitete ich als studentische Hilfskraft in der Abteilung für Physiologie und gab studentische Tutorien.

Im Januar 2009 begann ich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lars S. Maier innerhalb der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen die Arbeit an meiner Dissertation. Von Februar bis August 2010 arbeitete ich weiterhin in Prof. Maiers Labor als studentische Hilfskraft. Die vorliegenden Daten stellte ich auf dem Kongress der europäischen Gesellschaft für Kardiologie 2010 in Stockholm vor.

Die Ergebnisse der Arbeit wurden im Juli 2011 unter der geteilten Erstautorenschaft von Dr. med. Can Martin Sag und mir im *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* unter dem Titel *CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes* veröffentlicht.