Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie (Prof. Dr. med. G. Hasenfuß) im Zentrum Innere Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Die Rolle der Kalzium-Calmodulin-abhängigen-Proteinkinase II δc (CaMKIIδc) bei der Radikal-vermittelten Zytotoxizität in isolierten ventrikulären Kaninchenmyozyten

INAUGURAL - DISSERTATION

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

> vorgelegt von Hanna Maria Ruff aus Reutlingen

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L. S. Maier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Hülsmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2010

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Einle	eitung	1
1.1.	Herzinsuffizienz	1
	1.1.1. Veränderungen am Myokard	2
1.2.	Radikale Sauerstoffspezies (ROS)	2
	1.2.1. Radikalwirkung in der Herzmuskelzelle	3
1.3.	Elektromechanische Kopplung	4
1.4.	$Ca^{2+}$ - Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK)	7
	1.4.1. Funktionelle Aspekte der CaMKII	8
	1.4.2. CaMKII - Aktivierung nach ROS - Exposition	8
1.5.	$Na^+$ - Ströme am Herzen	9
	1.5.1. Der Na <sup>+</sup> - Kanal $\ldots$	9
	1.5.2. Modulation kardialer Na <sup>+</sup> - Ströme über die CaMKII $\ldots$	9
	1.5.3. Der späte Na <sup>+</sup> - Einstrom ("Late $I_{Na}$ ")	11
	1.5.4. Late $I_{Na}$ und radikale Sauerstoffspezies	11
	1.5.5. Late $I_{Na}$ und Herzinsuffizienz	12
1.6.	Ranolazin	13
	1.6.1. Ranolazin als Antiarrhythmikum	13
1.7.	Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit	14
Mat	erial und Methoden	16
2.1.	Generierung von Reaktiven Sauerstoffspezies	16
	2.1.1. Praktische Durchführung	17
2.2.	Adenoviral - vermittelter Gentransfer	17
	2.2.1. Isolation ventrikulärer Kaninchenmyozyten	19
2.3.	Transfektionsprotokoll	21
2.4.	Epifluoreszenzmessung	23
	<ul> <li>Einle 1.1.</li> <li>1.2.</li> <li>1.3.</li> <li>1.4.</li> <li>1.5.</li> <li>1.6.</li> <li>1.7.</li> <li>Mat 2.1.</li> <li>2.2.</li> <li>2.3.</li> <li>2.4.</li> </ul>	<b>Einleitung</b> 1.1. Herzinsuffizienz         1.1.1. Veränderungen am Myokard         1.2. Radikale Sauerstoffspezies (ROS)         1.2.1. Radikalwirkung in der Herzmuskelzelle         1.3. Elektromechanische Kopplung         1.4. $Ca^{2+}$ - Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK)         1.4.1. Funktionelle Aspekte der CaMKII         1.4.2. CaMKII - Aktivierung nach ROS - Exposition         1.5. Na <sup>+</sup> - Ströme am Herzen         1.5.1. Der Na <sup>+</sup> - Kanal         1.5.2. Modulation kardialer Na <sup>+</sup> - Ströme über die CaMKII         1.5.3. Der späte Na <sup>+</sup> - Einstrom ("Late I <sub>Na</sub> ")         1.5.4. Late I <sub>Na</sub> und radikale Sauerstoffspezies         1.5.5. Late I <sub>Na</sub> und Herzinsuffizienz         1.6.1. Ranolazin         1.6.1. Ranolazin als Antiarrhythmikum         1.7. Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit <b>Material und Methoden</b> 2.1. Generierung von Reaktiven Sauerstoffspezies         2.1.1. Praktische Durchführung         2.2.1. Isolation ventrikulärer Kaninchenmyozyten         2.3. Transfektionsprotokoll

		2.4.1. Beladung mit AM - Ester (Acetoxymethylester) - Farbstoffen	23
		2.4.2. Messung der Natriumkonzentration mit SBFI	24
		2.4.3. Kalibrierung	27
		2.4.4. Messung der Kalziumkonzentration mit Indo - 1	29
		2.4.5. Versuchsprotokoll $\ldots$	31
		2.4.6. Längenmessung	31
	2.5.	Die Patch - Clamp - Technik	33
		2.5.1. Patch - Clamp - Setup	35
		2.5.2. Versuchsdurchführung	35
	2.6.	Pharmakologische Interventionen	38
		2.6.1. KN-93	38
		2.6.2. AIP	39
		2.6.3. Ranolazin $\ldots$	39
		2.6.4. Thapsigargin	39
	2.7.	Datenerfassung und Auswertung	39
3.	ebnisse	41	
	3.1.	Wirkung von Sauerstoffradikalen auf den späten Na <sup>+</sup> - Einstrom ("late	
		$\mathbf{I}_{Na}$	41
	3.2.	Einfluss der Sauerstoffradikalwirkung auf die intrazelluläre Na <sup>+</sup> - Konzen-	
		tration $[Na^+]_i$	43
		3.2.1. In - situ - Kalibrierung von SBFI	43
		3.2.2. Änderung der $[Na^+]_i$ nach Zugabe von $H_2O_2$	45
		3.2.3. Zeit bis zum Eintreten der Hyperkontraktur	48
	3.3.	Messung der intrazellulären $Ca^{2+}$ - Konzentration mit Indo - 1	49
		3.3.1. Einfluss der Sauerstoffradikalwirkung auf die intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -	
		Konzentration $[Ca^{2+}]_i$	50
		3.3.2. Verkürzungsfraktion	52
		3.3.3. Thapsigargin	54
Л	Diel	zussion	56
ч.	4 1	Sauerstoffradikalwirkung und antioxidative Therapiemöglichkeiten	56 56
	4.2	Sauerstoffradikal-bedingte Effekte auf den zellulären Natriumhausbalt und	50
	1.4.	den Einfluss der CaMKIIdc	58

		4.2.1.	Der späte Na <sup>+</sup> - Strom	58
		4.2.2.	Die intrazelluläre Na <sup>+</sup> - Konzentration	59
		4.2.3.	Einfluss von Sauerstoffradikalen und CaMKII $\delta$ c auf die intrazellu-	
			läre $Ca^{2+}$ - Konzentration	60
		4.2.4.	Einfluss von Sauerstoffradikalen und CaMKII $\delta c$ auf die Kontraktilität	61
		4.2.5.	Die Bedeutung des Sarkoplasmatischen Retikulums für die Radikal-	
			vermittelte Zytotoxizität	61
		4.2.6.	Direkte CaMKII - Aktivierung nach Radikalexposition?	62
	4.3.	Ranola	zin	63
	4.4.	Herzin	suffizienz	64
5.	Zusa	amment	fassung	66
6.	Lite	raturvei	rzeichnis	67
Α.	Dan	ksagun	g	77
в.	Lebe	enslauf		78

# Abbildungsverzeichnis

1.1.	Orte der Radikalentstehung	4
1.2.	Aktionspotential am Myokard	5
1.3.	Elektromechanische Kopplung	6
1.4.	Struktureller Aufbau der CaMKII	7
1.5.	$Na^+$ - Kanal $Na_v$ 1.5	10
1.6.	Der späte Na <sup>+</sup> - Strom	12
2.1.	Schematische Darstellung eines Adenovirus	18
2.2.	Langendorffanlage	20
2.3.	CaMKII $\delta$ c Über expression in ventrikulären Kaninchenmyozyten	22
2.4.	Zellbeladung mit AM-Ester	24
2.5.	Fluoreszenzspektren von SBFI	25
2.6.	An passung der SBFI Fluoreszenz an unterschiedliche $\rm Na^+$ - Konzent ration	
	in vitro	26
2.7.	Strahlengang am Mikroskop bei der Messung mit SBFI	27
2.8.	Fluoreszenzspektren von Indo - 1	29
2.9.	Strahlengang am Mikroskop bei der Messung mit Indo-1	30
2.10.	Messprotokoll	31
2.11.	Technischer Aufbau zur Messung der Zelllänge als Funktion der Zeit	32
2.12.	Schematische Darstellung des Epifluoreszenzsetups	33
2.13.	Schematische Darstellung des Patch - clamp - setups	36
2.14.	Mess protokoll zur Erfassung des späten $\mathrm{Na^+}$ - Stroms nach Radikal einwir-	
	kung	38
3.1.	Originalerfassung von Na $^+$ - Strömen mittels Patch - clamp - Technik $\ldots$	42
3.2.	Mittelwertdarstellung der Integrale über den späten Na $^+$ - Einstrom $~$	43
3.3.	Repräsentatives SBFI - Kalibrierungsexperiment	44

3.4.	Eichkurve	45
3.5.	Originalregistrierung einer Epifluoreszenzmessung mit SBFI	46
3.6.	Mittelwertdarstellung der Messung mit SBFI (kalibriert)	47
3.7.	Das prozentuale Überleben der Zellen nach Radikalexposition	49
3.8.	Originalregistrierung einer Epifluoreszenzmessung mit Indo - 1	50
3.9.	Einfluss von ROS auf die diastolische Ca $^{2+}$ - Konzentration	51
3.10	Prozentuale Zellverkürzung	53
3.11	. Mittelwertdarstellung der prozentualen Zellverkürzung	54
3.12	. Diastolische $\operatorname{Ca}^{2+}$ - Konzentration nach Zugabe des SERCA - Inhibitors	
	Thapsigargin	55

# Tabellenverzeichnis

2.1.	Lösungen zur Isolation der ventrikulären Kaninchenmyozyten	19
2.2.	M199: Medium zur Kultivierung der Kaninchenmyozyten	22
2.3.	Kalibrierung	28
2.4.	Messtyrode für Epifluoreszenzmessungen	32
2.5.	Bad- und Pipettenlösung ohne Ca <sup>2+</sup> - Puffer	37
3.1.	Mittelwerte SBFI	48
3.2.	Hyperkontraktur	49
3.3.	Mittelwerte Indo-1	52

# Abkürzungsverzeichnis

ACE	engl.: Angiotensin converting enzyme
AIP	engl.: Autocamtide 2-related inhibitory peptide
AM	Acetoxymethylester
AP	Aktionspotential
ATX II	Anemonia sulcata toxin II
BAPTA	$`1,2-bis (o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic\ acid';$
	$(Ca^{2+} - Chelator)$
CaM	$\mathrm{Ca}^{2+}/\mathrm{Calmodulin}$
$CaMKII\delta c$	zytosolische Isoform der $\mathrm{Ca}^{2+}/\mathrm{Calmodulin}$ - abhängigen
	Proteinkinase II
$dd H_2O \dots$	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EADs	engl.: Early after depolarisations (frühe Nachdepolarisationen)
EGTA	engl.: Ethylene glycol tetraacetic acid
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxyd
HDAC4	Histon - Deactetylase 4
HEK 293 Zellen	engl.: Human embryonic kidney 293 Zellen
$I_{Ca}$	einwärts gerichteter $Ca^{2+}$ - Strom
$I_{Na}$	einwärts gerichteter Na <sup>+</sup> - Strom
ICD - 10	engl.: International Classification of Diseases
KN-62	CaMKII $\delta c$ - Inhibitor
KN-92	KN-93 - Analogon ohne Ca MKII $\delta c$ - inhibitorische Wirkung
KN-93	CaMKII $\delta c$ - Inhibitor
Late $I_{Na}$	später Na <sup>+</sup> - Einstrom
LQT3 Syndrom .	long QT Syndrom Nr. 3
MEF2	engl.: Myocyte Enhancer Factor-2

MOI	engl.: Multiplicity of Infection
Na <sub>e</sub>	extrazelluläre Na <sup>+</sup> - Konzentration
Na <sub>i</sub>	intrazelluläre Na $^+$ - Konzentration
NCX	$Na^+/Ca^{2+}$ - Austauscher
pfu	engl.: Plaque forming Unit
РКА	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinase
РКС	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
ROS	engl.: Reactive oxygen species, radikale Sauerstoffspezies
ROS RyR2	engl.: Reactive oxygen species, radikale Sauerstoffspezies Ryanodin Rezeptor 2
ROS RyR2 SBFI	engl.: Reactive oxygen species, radikale Sauerstoffspezies Ryanodin Rezeptor 2 engl.: Sodium-binding Benzofuran Isophthalate
ROS          RyR2          SBFI          SCN5A	engl.: Reactive oxygen species, radikale Sauerstoffspezies Ryanodin Rezeptor 2 engl.: Sodium-binding Benzofuran Isophthalate Gen des spannungsabhängigen Na <sup>+</sup> - Kanals
ROS          RyR2          SBFI          SCN5A          SEM	engl.: Reactive oxygen species, radikale Sauerstoffspezies Ryanodin Rezeptor 2 engl.: Sodium-binding Benzofuran Isophthalate Gen des spannungsabhängigen Na <sup>+</sup> - Kanals Standardfehler, engl.: 'standard error of the mean'
ROS          RyR2          SBFI          SCN5A          SEM          SERCA	engl.: Reactive oxygen species, radikale Sauerstoffspezies Ryanodin Rezeptor 2 engl.: Sodium-binding Benzofuran Isophthalate Gen des spannungsabhängigen Na <sup>+</sup> - Kanals Standardfehler, engl.: 'standard error of the mean' SR - Ca <sup>2+</sup> - ATPase
ROS         RyR2         SBFI         SCN5A         SEM         SERCA         SR	engl.: Reactive oxygen species, radikale Sauerstoffspezies Ryanodin Rezeptor 2 engl.: Sodium-binding Benzofuran Isophthalate Gen des spannungsabhängigen Na <sup>+</sup> - Kanals Standardfehler, engl.: 'standard error of the mean' SR - Ca <sup>2+</sup> - ATPase Sarkoplasmatisches Retikulum

# 1. Einleitung

# 1.1. Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist definiert als ein Zustand, bei dem das Herz nicht mehr in der Lage ist, die peripheren Organe in Ruhe oder unter Belastung ausreichend mit Blut zu versorgen. Klinisch führt dies zu verminderter körperlicher Belastbarkeit mit teils massiver Volumenretention und erheblich reduzierter Lebenserwartung. Der Schweregrad wird anhand Kriterien der New York Heart Association (NYHA) bestimmt. Bei der chronischen Herzinsuffizienz handelt es sich um die häufigste kardiale Erkrankung in den Industrieländern. Sie betrifft weltweit mehrere Millionen Patienten und nimmt mit der derzeitigen demographischen Entwicklung weiter zu. Im Jahr 2007 lag die Herzinsuffizienz in der Statistik der häufigsten Hauptdiagnosen (ICD - 10 2007) vollstationär behandelter männlicher Patienten in Deutschland auf dem dritten, bei den Frauen sogar auf dem ersten Platz (International Statistical Classification of Diseases and related Health Problems 2007). Das Lebenszeitrisiko, an Herzinsuffizienz zu erkranken, beträgt für 40-jährige Männer laut Framingham Studie 21,0 %, für Frauen 20,3 % (Lloyd-Jones et al. 2002). Dies ist damit etwa doppelt so hoch wie das Lebenszeitrisiko einer Frau, an Brustkrebs zu erkranken (Feuer et al. 1993). Trotz Fortschritten in der Therapie sind Morbitiät und Mortalität der Herzinsuffizienz immer noch enorm hoch. Auf der Rangliste der häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik rangiert sie derzeit auf Platz 3 nach dem akuten Myokardinfarkt und der chronisch ischämischen Herzkrankheit (ICD-10 2007). In den letzten 20 Jahren konnte zwar die medikamentöse Therapie mit der Einführung der ACE - Hemmer, Aldosteron - Antagonisten und Einsatz der  $\beta$  - Blocker deutlich verbessert werden, allerdings ist der einzige kurative Ansatz nach wie vor die Herztransplantation. Es ist daher weiterhin notwendig, die Entwicklung neuer Therapiestrategien weiter voranzutreiben.

#### 1.1.1. Veränderungen am Myokard

Im herzinsuffizienten Myokard kommt es zu einer Reihe von pathophysiologischen Umbauprozessen, dem sogenannten "Remodeling", was in einer besonderen Anfälligkeit des Herzmuskels gegenüber Auslösern eventuell lebensbedrohlicher Arrhythmien resultiert. Dazu zählen unter anderem Veränderungen der Ionenströme und der Aktionspotentialmorphologie (Nattel et al. 2007). Die Aktionspotentialdauer in insuffizientem ventrikulären Myokard ist verlängert, unter anderem durch Herunterregulation von  $K^+$  - Kanälen, sowie die verstärkte Ausprägung des späten Na<sup>+</sup> - Stroms (Valdivia et al. 2005), was eine erhöhte intrazelluläre Na<sup>+</sup> - Konzentration bedingt (Pieske et al. 2002). Außerdem kommt es zu einer Abnahme der Myofilamente (Lowes et al. 1997), zu einer Zunahme der Mikrotubuli (Tagawa et al. 1998) und zu Veränderungen bei der elektromechanischen Kopplung (Bers 2002). Die Ca<sup>2+</sup> - Transienten sind bei Herzinsuffizienz aufgrund geringerer SR-Ca<sup>2+</sup> - Beladung weniger stark ausgeprägt, was zu Kontraktionsstörungen führt (Maier et al. 2003). Außerdem ist die Produktion von Sauerstoffradikalen gesteigert (Ide et al. 2000), ebenso wie der Expressionslevel der  $Ca^{2+}$  - Calmodulin - abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) (Hoch et al. 1999). In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass eine chronische CaMKII - Überexpression in Mäusen Herzinsuffizienz hervorruft (Zhang et al. 2003). Sowohl die CaMKII $\delta c$  als auch  $\delta b$  regulieren die MEF2 ("Myocyte enhancer factor 2")- Luciferase Genexpression, bewirken eine HDAC4 (Histondeacetylase 4) - Translokation vom Zellkern ins Plasma und sind so direkt an der Hypertrophieentwicklung beteiligt (Zhang et al. 2007). Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge sollen im Folgenden zunächst die (patho-) physiologischen Grundlagen näher erläutert werden. Von der Entstehung und Wirkung der Sauerstoffradikale im Myokard, über Aufbau und Funktion der Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin abhängigen Proteinkinase II, Einzelheiten zum Na<sup>+</sup> - Strom am Herzen, schließlich zu Ranolazin, einem Pharmakon, welches durch seine selektive Blockade des späten Na<sup>+</sup> - Stroms einen therapeutisch interessanten Ansatzpunkt bietet.

# 1.2. Radikale Sauerstoffspezies (ROS)

Hydroxyl- (·HO) und Superoxidradikale (· $O_2^-$ ) sind an einer Reihe von pathologischen Vorgängen beteiligt, unter anderem bei Ischämie, in der darauffolgenden Reperfusionsphase, bei Alterungsprozessen, sowie bei Herzinsuffizienz (Ide et al. 2000). Das Superoxi-

danion spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation von normaler Endothelfunktion. Das Hydroxylradikal ist äußerst reaktionsfreudig und hat eine Lebensdauer von ca. 2 Nanosekunden in wässriger Lösung und einen Diffusionsradius von ungefähr 20Å. Also kann es seine Wirkung (Peroxidation) nur entfalten, wenn es in unmittelbarer Nähe zum Zielobjekt entsteht oder aber über "second-messenger".

#### 1.2.1. Radikalwirkung in der Herzmuskelzelle

Sauerstoffradikale werden hauptsächlich in der Atmungskette in den Mitochondrien oder von Enzymen wie der Xanthinoxidase oder der NAD(P)H - Oxidase gebildet (Abbildung 1.1). Außerdem entstehen sie unter anderem Zyklooxygenase-vermittelt bei der Oxidation ungesättigter Fettsäuren, bei der Oxidation von Katecholaminen oder über Cytochrom P450. Sie haben wichtige Funktionen in Signaltransduktionswegen, beispielsweise interagieren sie mit Transkriptionsfaktoren oder fungieren als Modulatoren bei Entzündungsreaktionen (Zweier und Talukder 2006). Der Radikalproduktion steht ein Radikalfänger (engl.: Scavenger) - System gegenüber, welches die Zelle unter physiologischen Bedingungen vor Radikalschäden bewahrt. Kommt es jedoch in Situationen wie Ischämie oder in der darauffolgenden Reperfusionsphase zu einer vermehrten Produktion von Radikalen, ist das "Scavengersystem" überlastet und Membranschäden, Proteinveränderungen und DNA - Strangbrüche sind die Folge. Speziell in der Herzmuskelzelle kommt es zu einer radikalinduzierten Ca<sup>2+</sup> - Überladung, welche schließlich Kontraktionsstörungen und Arrhythmien verursacht. Zum einen steigern Radikale die Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors und hemmen die SERCA (Sarcoplasmatic Endoplasmatic Reticulum Calcium-transporting ATPase), was die Ca<sup>2+</sup> - Überladung im Zytosol fördert, zum anderen induzieren sie einen späten Na<sup>+</sup> - Einstrom ("Late  $I_{Na}$ ") und blockieren die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase. Dies resultiert in einer erhöhten intrazellulären Na<sup>+</sup> - Konzentration, welche eine Transportrichtungsänderung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> - Austauschers (NCX) bedingt. Der Natrium - Calcium - Austauscher ist ein Transmembranprotein in der Zellmembran von Wirbeltieren, welches 3 Na<sup>+</sup> - Ionen von der einen auf die andere Seite der Membran transportiert und 1  $Ca^{2+}$  - Ion in entgegengesetzter Richtung. Er wird daher auch als Antiporter bezeichnet. Die treibende Kraft für den Ionen - Austausch ist der Natrium - Gradient über der Membran. Natrium-Ionen werden von der Seite der höheren Natrium-Konzentration auf die Seite der niedrigeren transportiert. In seiner regulären Transportrichtung ("forward mode") wird Na<sup>+</sup> nach innen und Ca<sup>2+</sup> nach außen befördert. Wie oben erwähnt, kommt es unter Radikaleinfluss zu einem Anstieg des intrazellulären Na<sup>+</sup>, sodass der NCX nun Ca<sup>2+</sup> in das Zellinnere pumpt ("reverse mode"). Auf diese Weise wird die Ca<sup>2+</sup> - Überladung der Zelle unter übermäßigem Radikaleinfluss forciert (Giordano 2005).



Abbildung 1.1.: Radikale entstehen vor allem in 3 verschiedenen Enzymsystemen: in Myozyten hauptsächlich über die Atmungskette in den Mitochondrien, in Endothelzellen vor allem über die Xanthinoxidase und in Leukozyten vorwiegend über die NADPH - Oxidase. (modifiziert nach Zweier und Talukder 2006, S.185)

# 1.3. Elektromechanische Kopplung

Die Zellen des menschlichen Arbeitsmyokards besitzen in der Diastole ein Ruhemembranpotential von ca. -85 mV, welches weitestgehend einem  $K^+$  - Gleichgewichtspotentials entspricht. Das Schwellenpotential, bei dem die Herzmuskelzellen mit einem Aktionspotential antworten, liegt bei ca. -65 mV. Der Reiz hierfür stammt in der Regel aus dem Sinusknoten. Die Besonderheit des Aktionspotentials des Arbeitsmyokards (Abbildung 1.2) liegt in seiner außergewöhnlich langen Dauer von ungefähr 300 ms. Seine Form ist charakteristisch und wird in 3 Phasen eingeteilt (Depolarisation, Plateauphase und Repolarisation).



Abbildung 1.2.: Das Aktionspotential am Myokard stellt also ein komplexes Wechselspiel mehrerer Ionenkanäle und deren Einwärts- (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) und Auswärtsströme (v.a. K<sup>+</sup>) dar. Spannungsabhängige (schnelle) Na<sup>+</sup> - Kanäle liegen dem Aufstrich zu Grunde. Das Membranpotential steigt dabei auf ca. +40 mV. Die Depolarisation aktiviert einen spannungsabhängigen transienten Auswärtsstrom. Dieser Auswärtsstrom leitet die Repolarisation ein, die jedoch alsbald unterbrochen wird, weil auch spannungsabhängige T- und L-Typ Ca<sup>2+</sup> - Kanäle aktiviert werden. Außerdem werden weitere K<sup>+</sup> - Kanäle aktiviert. Die gleichzeitigen Aus- und Einwärtsströme balancieren sich, so dass das Potential auf konstantem Niveau verbleibt (Plateauphase). Während die Einwärtsströme langsam inaktivieren und die K<sup>+</sup> - Ströme stärker werden, setzt sich die Repolarisation fort.

Für die schnelle Depolarisation der Membran sind spannungsabhängige Na<sup>+</sup> - Kanäle verantwortlich, nach deren Öffnung ein starker Na<sup>+</sup> - Einstrom in die Zelle erfolgt. Triebkraft dafür ist der hohe Konzentrationsgradient für Na<sup>+</sup> (Na<sub>e</sub> 145 mmol/l  $\leftrightarrow$  Na<sub>i</sub> 12 mmol/l). Der Na<sup>+</sup> - Einstrom führt zur einer Umkehrung des Vorzeichens des Membranpotentials auf ca. +40 mV. Hierdurch wird die Membranleitfähigkeit für Ca<sup>2+</sup> -Ionen enorm verbessert, welche dann langsam ins Zellinnere strömen und zusammen mit dem transienten Auswärtsstrom (v.a. K<sup>+</sup>) für die Plateauphase verantwortlich sind. Die Ca<sup>2+</sup> - Konzentration liegt außerhalb der Zelle bei 1,25 mmol/l und innerhalb bei 0,0006 - 0,001 mmol/l; sie bleibt jedoch auch in der Systole innen noch deutlich geringer als außen. Daraufhin folgt eine Ca<sup>2+</sup> - induzierte - Ca<sup>2+</sup> - Freisetzung (Abbildung 1.3) aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den Ryanodinrezeptor, wodurch schließlich genügend Ca<sup>2+</sup> für die Kontraktion der Myofilamente zur Verfügung steht. Für die Repolarisation der Zellmembran sind K<sup>+</sup> - Ionen verantwortlich, deren nach außen gerichteter Konzentrationsgradient (K<sub>i</sub> 150 mmol/l  $\leftrightarrow$  K<sub>e</sub> 4 mmol/l) größer ist, als die nach innen gerichtete elektrische Triebkraft. An der Entfernung der Ca<sup>2+</sup> - Ionen aus dem Zytosol nach der Kontraktion sind vor allem die SERCA, die Ca<sup>2+</sup> ins SR zurückpumpt, und der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> - Austauscher (NCX) beteiligt. Die Na<sup>+</sup> - Ionen werden von der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase entfernt.



Abbildung 1.3.: Während des Aktionspotentials strömt  $Ca^{2+}$  über spannungsabhängige  $Ca^{2+}$  -Kanäle in die Zelle ein  $(I_{Ca})$ . Durch diesen  $Ca^{2+}$  - Einstrom wird weitere  $Ca^{2+}$  - Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) getriggert, was dann zusätzlich an die Myofilamente bindet und zur Kontraktion führt. In der Diastole wird  $Ca^{2+}$  über die SERCA wieder in das SR zurücktransportiert und über den Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> - Austauscher (NCX) im Austausch gegen Na<sup>+</sup> aus der Zelle geschleust. Phospholamban (PLB) inhibiert die SERCA, wenn PLB dephosphoryliert vorliegt. Im Kasten ist der zeitliche Ablauf eines Aktionspotentials, eines  $Ca^{2+}$  - Transienten  $[Ca^{2+}]_i$  und einer isometrischen Kontraktion dargestellt. (modifiziert nach Bers 2002, S.198)

# 1.4. Ca<sup>2+</sup> - Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK)

Ursprünglich wurde die CaMKII in Nervengewebe entdeckt und erst später im Herzen nachgewiesen (Jett et al. 1987). Es existieren 4 verschiedene Isoformen ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) von denen  $\alpha$  und  $\beta$  nur im Nervensystem vorkommen. Die vorherrschende Isoform im Herzen ist die CaMKII $\delta$  (Maier und Bers 2002), deren Splicevarianten  $\delta$ b im Zellkern und  $\delta$ c im Zytosol lokalisiert sind (Edman und Schulman 1994). Die CaMKII besteht aus 6-12 Untereinheiten, die sich zu einer rad-ähnlichen Struktur zusammenlagern (Maier und Bers 2002). Jedes einzelne CaMKII - Monomer besteht aus einer katalytischen Domäne am Aminoterminus, einer zentralen regulatorischen Domäne und einer Oligomerisierungsdomäne am Carboxyterminus (Abbildung 1.4).



Abbildung 1.4.: A: Die drei Hauptdomänen eines CaMKII Monomers B: 6-12 CaMKII - Monomere formen eine Radstruktur, welche auch gedoppelt vorkommen kann C: Die CaMKII wird durch Bindung von Ca<sup>2+</sup> - Calmodulin aktiviert und ist in der Lage, Zielproteine zu phosphorylieren. D: Durch nachfolgende Autophosphorylierung an Thr-286 kann die CaMKII auch nach Abdissoziation von Calmodulin aktiv bleiben (modifiziert nach Maier und Bers 2002, S.924)

#### 1.4.1. Funktionelle Aspekte der CaMKII

Während der CaMKII - Aktivierung bindet Ca<sup>2+</sup> - CaM an die regulatorische Domäne und blockiert dadurch die Autoinhibition. Durch Autophosphorylierung an Thr-286 kann die CaMKII einen autonomen Aktivitätszustand erreichen, wodurch ihre Affinität zum CaM - Komplex derartig ansteigt, dass selbst nach Absinken des Kalziumspiegels die Enzymaktivität noch sekundenlang erhalten bleiben kann (Meyer et al. 1992). Sogar nach Abdissoziation von CaM, bleibt noch eine Restaktivität von 20 - 80 % bestehen (Miller und Kennedy 1986). Als pharmakologische Inhibitoren der CaMKII werden KN-62 oder KN-93 eingesetzt. Sie wirken kompetitiv an der CaM - Bindungsstelle und sind verhältnismäßig selektiv (Ishii et al. 1991). Peptidinhibitoren wie z.B. AIP (Autocamtide-2-related Inhibitory Peptide) binden an der Autophosphorylierungsdomäne und wirken sehr spezifisch (Ishida et al. 1995). Die CaMKII phosphoryliert diverse Proteine, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind, mit weitreichenden funktionellen Konsequenzen. Sie phosphoryliert den L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal, den Ryanodinrezeptor, ebenso wie Phospholamban und nimmt damit Einfluss auf den Ca<sup>2+</sup> - Einstrom in die Zelle sowie die Ca<sup>2+</sup> - Ausschüttung aus und - Wiederaufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum (Maier und Bers 2002). Außerdem beeinflusst die CaMKII die Transkription bestimmter Gene und hat so Anteil an der Hypertrophieentstehung (Wu X. et al. 2006). Im herzinsuffizienten Myokard konnte eine erhöhte CaMKII - Expression und Aktivität nachgewiesen werden (Hoch et al. 1999). Die Details der CaMKII - abhängigen Signaltransduktionswege am Myokard sind allerdings noch nicht vollständig geklärt. Wagner et al. konnten 2006 zeigen, dass die CaMKII den kardialen spannungsabhängigen Na<sup>+</sup> - Kanal wahrscheinlich mittels Phosphorylierung reguliert, so den späten Na<sup>+</sup> - Einstrom verstärkt und in der Folge die intrazelluläre Na<sup>+</sup> - Konzentration erhöht.

#### 1.4.2. CaMKII - Aktivierung nach ROS - Exposition

Unklar ist weiterhin, wie es zur Aktivierung der CaMKII kommt und welches die Signalwege sind, die schließlich zur Herzinsuffizienz führen. Da radikale Sauerstoffspezies bei Herzinsuffizienz vermehrt entstehen, liegt der CaMKII - Aktivierung möglicherweise eine erhöhte ROS - Konzentration zugrunde. In Endothelzellen scheint die CaMKII eine entscheidende Rolle bei der ROS - vermittelten Induktion der endothelialen NO -Synthase zu spielen (Cai et al. 2001). In Betazellen des Pankreas wurde eine kalziumabhängige Aktivierung der CaMKII nach Radikalexposition nachgewiesen (Choi et al. 2006). Die Relevanz dieser Befunde für die pathophysiologische Bedeutung am Herzen ist aufgrund der viel zu hohen Radikalkonzentrationen jedoch fraglich. Interessanterweise deuten Daten aus derselben Arbeitsgruppe darauf hin, dass die Bindung von Calmodulin für die Radikal - bedingte Aktivierung der CaMKII unbedingt erforderlich ist (Howe et al. 2004). Eine mögliche Quelle für das die CaMKII aktivierende Kalzium stellt das Sarkoplasmatische Retikulum dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Steuerung des RyR2 durch den Redoxstatus der Zelle beeinflusst werden kann. Sauerstoffradikale steigern dabei die Einzelkanalöffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 (Boraso und Williams 1994). Neueste Ergebnisse weisen dagegen auf eine Ca<sup>2+</sup> - unabhängige, direkte Aktivierung der CaMKII $\delta$ c in vitro und *in vivo* hin (Erickson et al. 2008). Im CaMKII $\delta$ c - Aktivitätsessay konnte Radikal - induzierte CaMKII $\delta$ c - Aktivität gezeigt werden, die zwar unter Ca<sup>2+</sup> - Pufferung mit EGTA noch deutlich, aber ganz ohne Ca<sup>2+</sup>/CaM praktisch nicht mehr vorhanden ist. Möglicherweise werden zur CaMKII - Aktivierung geringe Mengen Ca<sup>2+</sup> benötigt.

# 1.5. Na<sup>+</sup> - Ströme am Herzen

### 1.5.1. Der Na $^+$ - Kanal

Der Na<sup>+</sup> - Kanal (Abbildung 1.5) gehört einer Ionenkanalsuperfamilie an, zu der auch spannungsgesteuerte Ca<sup>2+</sup> - und K<sup>+</sup> - Kanäle gehören. Er besteht aus mehreren Untereinheiten, von denen die  $\alpha$ -Untereinheit für die Funktion wesentlich ist. Deren Isoform Na<sub>v</sub> 1.5 (SCN5A) ist die vorherrschende Isoform im Herzen. Die  $\alpha$ -Untereinheit in kardialem Gewebe besteht aus 4 homologen Domänen (I-IV), die jeweils 6 Transmembransegmente beinhalten (S1-S6). Zwischen dem 5. und 6. Transmembransegment bilden die 4 Domänen jeweils die zentrale Öffnung, wobei die dazwischenliegende Verbindungsschleife die Selektivität für Na<sup>+</sup> - Ionen gewährleistet. Das vierte Transmembransegment jeder Domäne ist positiv geladen und fungiert so als Spannungssensor (Puglisi und Bers 2001).

#### 1.5.2. Modulation kardialer Na<sup>+</sup> - Ströme über die CaMKII

Wie zuvor beschrieben spielen Na<sup>+</sup> - Ströme bei der Entstehung von Aktionspotentialen am Herzen eine wesentliche Rolle. Modifikationen dieser Ströme verändern die Aktionspotentiale und begünstigen Arrhythmien. Da die CaMKII bei der Regulation der Na<sup>+</sup> -Kanäle beteiligt ist (Wagner et al. 2006), hat auch sie entscheidenden Anteil an der Ent-



Abbildung 1.5.: Der Na<sup>+</sup> - Kanal besteht aus 4 Domänen (I-IV) mit jeweils 6 homologen Transmembransegmenten (S1-S6). Die mehrfach positiv geladene Region der S4 Segmente ist mit ++++ gekennzeichnet. Außerdem sind die PKA und PKC Phosphorylierungsstellen, sowie die mögliche Bindungsstelle von Ca<sup>2+</sup> - CaM gekennzeichnet. (modifiziert nach Wagner und Maier 2006, S.27)

stehung von Herzrhythmusstörungen. Tan et al. konnten 2002 erstmalig eine Calmodulin abhängige Regulation spannungsabhängiger Na<sup>+</sup> - Kanäle nachweisen. Sie zeigten, dass durch  $Ca^{2+}$  aktiviertes Calmodulin an eine Stelle am Carboxyterminus der  $\alpha$  - Untereinheit des Na<sup>+</sup> - Kanals binden kann (siehe Abbildung 1.5). Durch diese Interaktion ändern sich die Steuerungseigenschaften des Kanals: die intermediäre Inaktivierung wird verstärkt und schränkt damit die Kanalfunktion ein. Diese Ca<sup>2+</sup> - abhängige Regulation der Na<sup>+</sup> - Kanalfunktion könnte als Rückkopplungsmechanismus der elektromechanischen Kopplung dienen. Die schnelle Inaktivierung wird dagegen verlangsamt. Eine andere Regulationsmöglichkeit der Na<sup>+</sup> - Kanal Aktivität besteht über die CaMKII. Erste, indirekte Anzeichen für eine CaMK Beteiligung an der Na<sup>+</sup> - Kanal Aktivierung ergab eine Studie von Deschenes et al. 2002. Sie konnten zeigen, dass der CaMK - Inhibitor KN-93 in der Lage war, die Steuerung des Na<sup>+</sup> - Kanals zu beeinflussen. Wagner et al. zeigten, dass eine 3 - 4fache Überexpression der CaMK zu einer signifikant verminderten Verfügbarkeit der Kanäle führt. Außerdem konnten sie eine direkte Assoziation der CaMK mit dem Na<sup>+</sup> - Kanal und mittels Backphosophorylierungsstudien eine CaMKII - abhängige Na<sup>+</sup> - Kanalphosphorylierung nachweisen (Wagner et al. 2006). Die genauen

Phosphorylierungsstellen sind jedoch noch nicht geklärt.

### 1.5.3. Der späte Na<sup>+</sup> - Einstrom ("Late $I_{Na}$ ")

Wie oben beschrieben, sind spannungsabhängige Na<sup>+</sup> - Kanäle an der Depolarisation der Zelle wesentlich beteiligt. Na<sup>+</sup> gelangt in die Zelle, bedingt dort zuerst eine weitere Depolarisierung, dann den Einstrom von Ca<sup>2+</sup> und gibt so letztlich den Anstoß zur Zellkontraktion. Normalerweise werden diese Kanäle schnell (im Millisekundenbereich) wieder inaktiviert, sodass nur wenig Na<sup>+</sup> in die Zelle gelangen kann und von der Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> - ATPase sofort eliminiert wird. Unter bestimmten Bedingungen ist die Inaktivierung unvollständig und/oder verlangsamt, was den Na<sup>+</sup> - Einstrom verlängert. Dieser Einstrom in der eigentlichen Inaktivierungsphase wird als später Na<sup>+</sup> - Einstrom (Late  $I_{Na}$ ) bezeichnet (Saint et al. 1992; Maltsev et al. 1998)(Abbildung 1.6). Interessanterweise ist auch bekannt, dass Mutationen im Bereich des Carboxyterminus arrhythmogen wirken. Sie können zur Entstehung des Brugada - Syndroms oder medikamenteninduzierten Rhythmusstörungen beitragen (Viswanathan und Balser 2004). Das LQT3 - Syndrom, eine Erkrankung mit erhöhtem Risiko für Synkopen und plötzlichen Herztod, welche durch eine Mutation im Gen SCN5A des spannungsabhängigen Na<sup>+</sup> - Kanals bedingt ist (Clancy et al. 2002), oder auch die vermehrte Phosphorylierung der Na<sup>+</sup> - Kanäle durch stressabhängige Kinasen (Light et al. 2003) werden mit dem späten Na<sup>+</sup> - Strom in Verbindung gebracht. Obwohl die Amplitude des späten Na $^+$  - Stroms nur 0.05%des Spitzenstroms ("peak  $I_{Na}$ ") beträgt, kann er aufgrund seiner Länge von mehreren hundert Millisekunden eine beträchtliche Wirkung entfalten. Ein verstärkter später Na<sup>+</sup> - Einstrom ist unter anderem in der Lage, Aktionspotentiale zu verlängern oder frühe Nachdepolarisationen (EADs) auszulösen, welche lebensbedrohliche Rhythmusstörungen hervorrufen können. Außerdem reagiert der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> - Austauscher (NCX) auf erhöhte Na<sup>+</sup> - Konzentrationen im Zytoplasma mit der Umkehr seiner Laufrichtung ("reverse mode") und fördert somit eine  $Ca^{2+}$  - Überladung der Zelle (Bers und Weber 2002).

### 1.5.4. Late $I_{Na}$ und radikale Sauerstoffspezies

Sauerstoffradikale ("ROS") verursachen unter anderem eine intrazelluläre  $Ca^{2+}$  - Überladung und Reperfusionsschäden nach Ischämie. Song et al. konnten kürzlich zeigen, dass eine Verstärkung des späten Na<sup>+</sup> - Stroms durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Exposition von ventrikulären Myozyten (Meerschweinchen/Kaninchen) zu elektrischer und kontraktiler Dysfunktion



Abbildung 1.6.: (A) Originalabbildung eines Na<sup>+</sup> - Stroms mit großem Peak und schneller Inaktivierung. (B) Ausschnittsvergrößerung zur besseren Darstellung des späten Anteils des Na<sup>+</sup> - Stroms (Late  $I_{Na}$ ). Dieser persistierende Na<sup>+</sup> - Einstrom in der eigentlichen Inaktivierungsphase von ca. 50 - 500 ms nach Kanalöffnung ist im Vergleich mit dem Spitzeneinstrom sehr klein, wird allerdings aufgrund seiner Dauer relevant.

beiträgt und vermuten, dass eine Inhibition des späten  $Na^+$  - Stroms einen Schutz vor radikalinduzierter  $Na^+$  - und  $Ca^{2+}$  - Überladung bewirken könnte (Song et al. 2006).

#### **1.5.5.** Late $I_{Na}$ und Herzinsuffizienz

Wie oben erwähnt, berichteten Maltsev et al. schon 1998 über einen äußerst langsam inaktivierenden Na<sup>+</sup> - Strom in humanen ventrikulären Kardiomyozyten, der zur Ausbildung des Aktionspotentialplateaus beiträgt. In Zellen von herzinsuffizienten Patienten war der späte Na<sup>+</sup> - Strom allerdings deutlich stärker ausgeprägt (Undrovinas et al. 1999; Valdivia et al. 2005; Maltsev und Undrovinas 2008). Aufgrund des Beitrags des Einstroms von Na<sup>+</sup> - Ionen zur Ausbildung des Aktionspotentialplateaus kommen Veränderungen in der Repolarisationsphase deutlich zum Tragen. Dies trägt, neben weiteren Veränderungen in der elektromechanischen Kopplung, wie z.B. der Herunterregulation von K<sup>+</sup> - Kanälen, entscheidend zur Prädisposition von Patienten mit Herzinsuffizienz für potentiell lebensbedrohliche Rhythmusstörungen bei (Tomaselli und Zipes 2004).

# 1.6. Ranolazin

Ranolazin  $((\pm) - N - (2, 6 - Dimethylphenyl) - (4(2 - hydroxy - 3 - (2 - methoxy))))$ phenoxy)propyl) - 1 - piperazine) ist ein Piperazinderivat, welches seit Januar 2006 in den USA, seit März 2009 auch in Deutschland als Antianginosum klinische Anwendung findet und sich vor allem dadurch auszeichnet, dass es im Gegensatz zu  $\beta$  - Blockern, Ca<sup>2+</sup> - Antagonisten und Nitraten seine Wirkung ohne Effekte auf Puls oder Blutdruck entfaltet (Chaitman et al. 2004). Ranolazin wirkt als selektiver Inhibitor des späten Na<sup>+</sup> - Stroms, d.h. es hemmt den späten Na<sup>+</sup> - Strom 38 mal stärker als den Spitzen - Na<sup>+</sup> - strom in Ventrikelmyozyten von Hunden mit Herzinsuffizienz (Undrovinas et al. 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ranolazin in der Lage ist, bei Meerschweinchen und Kaninchen mit LQT - Syndrom frühe Nachdepolarisationen (EADs) und Arrhythmien zu unterdrücken (Wu L. et al. 2004; Wu L. et al. 2006). Zusätzlich wird die Ca<sup>2+</sup> - Überladung der Zelle in Stresssituationen verhindert und so eine linksventrikuläre Dysfunktion positiv beeinflusst (Fraser et al. 2006). In Muskelstreifenpräparaten von herzinsuffizienten menschlichen Explantaten war Ranolazin in der Lage, die diastolische Dysfunktion ohne negativ inotropen Effekt auf die Kontraktilität um ca.  $30\,\%$  zu verbessern. Außerdem konnten mittels Ranolazin auch durch ATX induzierte Effekte, wie z.B. eine Verstärkung des späten  $Na^+$  - Einstroms, sowie ein  $Na^+$  - und  $Ca^{2+}$  - Anstieg, in isolierten ventrikulären Kaninchenmyozyten verringert werden (Sossalla et al. 2008).

### 1.6.1. Ranolazin als Antiarrhythmikum

Wie oben beschrieben ist der späte Na<sup>+</sup> - Strom in der akuten Ischämiephase sowie bei Herzinsuffizienz verstärkt (Undrovinas et al. 1999; Valdivia et al. 2005) und verursacht so potentielle Rhythmusstörungen. In einer pharmakologischen Versuchsreihe an Tieren konnte Ranolazin bereits ein Auftreten von Kammerflimmern verhindern (Gralinski et al. 1994). Die antiarrhythmische Wirkung von Ranolazin beim Menschen ist noch unbekannt, erscheint in der Therapie des LQT3 - Syndroms und erworbenen Rhythmusstörungen bei Ischämie und Herzinsuffizienz allerdings vielversprechend (Moss et al. 2008). Eine Subgruppenanalyse der MERLIN Studie zeigte das antiarrhythmische Potential (Scirica et al. 2007). Weitere klinische Studien im Bezug auf Wirkmechanismus und Einsatzmöglichkeiten werden hier allerdings noch benötigt.

# 1.7. Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit

Radikale Sauerstoffspezies entstehen vermehrt in der Reperfusionsphase nach Myokardischämie wie auch bei Herzinsuffizienz (Ide et al. 2000), wo die Empfindlichkeit des Myokards gegenüber Sauerstoffradikalen zusätzlich gesteigert ist (Tsutsui et al. 2001), und führen zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft. Möglicherweise tragen sie sogar wesentlich zur Progression der Herzinsuffizienz bei. Die radikalinduzierten Schäden auf Zellebene beruhen auf einer Verstärkung des späten Na<sup>+</sup> - Einstroms, was in einer intrazellulären Na<sup>+</sup> - Überladung resultiert (Song et al. 2006). Dies führt zu einer Umkehr der Transportrichtung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> - Austauschers, so dass dieser nun Na<sup>+</sup> aus der Zelle heraus und im Gegenzug  $Ca^{2+}$  ins Zellinnere transportiert. Die daraus folgende  $Ca^{2+}$ - Überladung der Zelle verursacht eine Dauerkontraktion der Myofilamente und bewirkt in letzter Konsequenz die Hyperkontrakturentwicklung (Wagner et al. 2003). Die hyperkontrahierten Zellen tragen im Gewebeverband nicht mehr zur Kontraktion bei, stören jedoch die Relaxation. Da die beobachteten Effekte erst nach Minuten auftreten, Sauerstoffradikale jedoch Halbwertszeiten im Sekundenbereich besitzen, ist ein Wirkprinzip über Second-Messenger naheliegend. Einen solchen Vermittler könnte die CaMKII darstellen. Bei Herzinsuffizienz sind Expression und Aktivität der CaMKII gesteigert (Hoch et al. 1999). Überdies konnten Wagner et al. 2006 zeigen, dass die CaMKII nicht nur  $Ca^{2+}$  - regulierte Proteine phosphoryliert, sondern auch den Na<sup>+</sup> - Kanal beeinflusst. CaMKII - Überexpression verstärkt den späten Na<sup>+</sup> - Strom und erhöht in der Folge die intrazelluläre Na<sup>+</sup> - Konzentration. Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Frage, ob die sauerstoffradikalinduzierte Steigerung des späten Na<sup>+</sup> - Einstroms, der intrazellulären Na<sup>+</sup> - Konzentration und die folgende Ca<sup>2+</sup> - Überladung der Zelle eventuell CaMKII vermittelt sind. Außerdem soll herausgefunden werden, ob die radikalvermittelten Effekte bei CaMKII - Überexpression durch Ranolazin verringert werden können, was einen therapeutischen Ansatz bei Herzinsuffizienz darstellen würde. Die Fragestellungen lauteten im einzelnen:

- Führt die Kombination aus CaMKII Überexpression und Radikalexposition zu einer Verstärkung des späten Na<sup>+</sup> -Stroms?
- Ist ein eventueller Effekt durch den CaMKII Hemmstoff AIP sowie Ranolazin reversibel?
- Führt die Kombination aus CaMKII Überexpression und Radikalexposition zu

einer Erhöhung der intrazellulären Na<sup>+</sup> - Konzentration?

- Führt die Kombination aus CaMKII Überexpression und Radikalexposition zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration?
- Kommt es zur Hyperkontrakturentwicklung?
- Sind eventuelle Effekte durch den CaMKII Hemmstoff KN-93 sowie Ranolazin reversibel?
- Welchen Effekt hat eine Ausschaltung des Sarkoplasmatischen Retikulums durch Inhibition der SERCA mittels Thapsigargin auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> - Konzentration?

# 2. Material und Methoden

## 2.1. Generierung von Reaktiven Sauerstoffspezies

Um Sauerstoffradikale zu erzeugen, wurde die Fenton Reaktion angewandt. Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte H.J.H. Fenton bei der Zugabe von  $H_2O_2$  und zweiwertigem Eisen zu Weinsäure eine violette Färbung, welche er später als das Oxidationsprodukt der Weinsäure 2,3 - Dihydroxy-Maleinsäure identifizieren konnte. Der genaue Mechanismus dieser Reaktion war Fenton jedoch noch unbekannt. Die deutschen Chemiker Fritz Haber und Richard Willstätter konnten im Jahr 1931 nachweisen, dass Hydroxylradikale dabei eine entscheidende Rolle spielen. Sie stellten folgende Reaktionsgleichungen auf:

$$\cdot OH + H_2 O_2 \to H_2 O + \cdot H O_2 \tag{2.1}$$

$$\cdot HO_2 + H_2O_2 \to \cdot O_2^- + H_2O + \cdot OH \tag{2.2}$$

Haber postulierte daraufhin 1932 zusammen mit Joseph Weiß die Beteiligung von Eisen als Katalysator bei der Zerlegung von Wasserstoffperoxyd.

$$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + \cdot OH + OH^-$$
 (2.3)

Heute bezeichnet man die Reduktion von Wasserstoffperoxyd durch  $Fe^{2+}$  zu Hydroxydanionen und Hydroxylradikalen als klassische Fentonreaktion. In engem Zusammenhang steht eine weitere Reaktion, bei der  $Fe^{3+}$  durch Superoxydanionen zu  $Fe^{2+}$  zurückreduziert werden.

$$\cdot O_2^- + Fe^{3+} \to O_2 + Fe^{2+}$$
 (2.4)

Beide Reaktionen ergeben zusammen den Haber - Weiß - Zyklus. Der Zerfall von Wasserstoffperoxyd erfolgt also unter Beteiligung von Eisen als Katalysator, sowie den Zwischenprodukten Hydroxylradikal und Sauerstoffsuperoxyd.

### 2.1.1. Praktische Durchführung

Unter Anwendung der Fentonreaktion, erfolgte die Generierung der Sauerstoffradikale mittels Wasserstoffperoxid und in den Zellen vorhandenem Eisen. Die gewünschte Konzentration des Wasserstoffperoxids von 200  $\mu mol/l$  wurde durch vorheriges Verdünnen mit Tyrode bzw. Badlösung erreicht. Da Radikale äußerst lichtempfindlich sind, erfolgte das Ansetzen der Lösung unmittelbar vor Versuchsbeginn, sowie die Durchführung der Experimente in einem lichtgeschützten Raum. Bei den Epifluoreszenzmessungen wurden die Zellen nach Erreichen einer konstanten Verkürzungsrate und Fluoreszenz - Ratio  $(F_{340}/F_{380}$  bzw.  $F_{405}/F_{485})$  unter Zuhilfenahme eines Perfusors (Braun Perfusor F) für 10 min den Radikalen ausgesetzt. Durch einen konstanten Zu - und Abfluss wurde die erforderliche Radikalkonzentration in der Messkammer erreicht. Im Patch - clamp - Versuch wurden nach Erfassung eines Basis - Stroms 200  $\mu l$  des zuvor verdünnten (400  $\mu mol/l$ ) Wasserstoffperoxids in 200  $\mu l$  Badlösung pipettiert, sodass auch hier die Endkonzentration von 200  $\mu mol/l$  erreicht wurde. Auf diese Weise konnten in den jeweiligen Versuchsanordnungen Radikalmengen erreicht werden, wie sie bei Herzinsuffizienz (Ide et al. 2000) oder in der Reperfusionsphase nach Ischämie (Zweier et al. 1987; Zweier et al. 1989) zustande kommen.

### 2.2. Adenoviral - vermittelter Gentransfer

Adenoviren (Abbildung 2.1) zählen zu den Doppelstrang - DNA Viren ohne Hüllmembran. Sie sind zwischen 60 und 90 nm groß und von ikosaedrischer Form. Außerdem zeichnen sie sich durch eine ungewöhnliche Stabilität gegenüber chemischen und physikalischen Einwirkungen aus, z.B. weisen sie eine große pH - Toleranz auf, was ihnen eine vergleichsweise lange Überlebenszeit außerhalb des Wirtskörpers ermöglicht. Beim Menschen verursachen sie hauptsächlich Erkrankungen der Atemwege, allerdings können abhängig vom jeweiligen Serotyp auch andere Erkrankungen hervorgerufen werden, beispielsweise Gastroenteritis, Konjunktivitis, Zystitis, etc. Adenoviren sind ideale Vehikel, um Fremdgene in Zellen einzubringen. Die genetische Manipulation erlaubt es, das Virusgenom mit Fremdsequenzen auszustatten, wobei die Größe des eingebrachten Materials von der Genomgröße und der Verpackungskapazität des bestreffenden Virus abhängt. Adenoviren sind einfach herzustellen, integrieren die Fremdgene stabil in das Wirtsgenom, sind außerdem nur geringgradig humanpathogen und vor allem nicht onkogen, sodass sie unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen in der virologischen und zellbiologischen Forschung mit großem Gewinn eingesetzt werden können.



Abbildung 2.1.: Das Adenovirus ist ein hüllenloses Virus mit spikebesetzter, ikosaedrischer Kapsel. Der Kern enthält lineare doppelsträngige DNA, welche aus 36 - 38 Kilobasenpaaren besteht.

Zur Aufnahme des Virus in eine Wirtszelle interagieren die Knaufdomänen des Viruskapsids mit spezifischen Rezeptoren auf der Wirtszellmembran und das Virus wird daraufhin über den Vorgang der Endozytose in die Zelle geschleust. Innerhalb der Zelle wird die endosomale Membran aufgelöst, so dass das Kapsid im Zytoplasma frei wird, zum Kern gelangen kann und dort die Expression der viralen Gene auslöst. Mittels Adenoviren, deren DNA für die CaMKII $\delta$ c kodiert, kann die Überexpression dieses Proteins in den Zielzellen, z.B. Kaninchenmyozyten untersucht werden. Um unspezifische Effekte der Transfektion von den spezifischen Effekten der Überexpression abzugrenzen, wurde als Kontrolle ein Virus verwendet, welches in seiner Erbinformation das Gen LacZ enhielt. Dieses Gen kodiert für das Bakterienprotein  $\beta$  - Galaktosidase ( $\beta$ gal). Bestimmte Bakterienstämme wie z.B. Escherichia coli befähigt es, Laktose durch Hydrolyse in Glukose und Galaktose zu spalten und so Energie zu gewinnen; in eukaryonten Zellen hat dieses Protein keinerlei Funktion.

#### 2.2.1. Isolation ventrikulärer Kaninchenmyozyten

Alle Tierexperimente wurden der örtlichen Tierschutzbehörde angezeigt (Tierversuchsanzeige Mai 2003 für die "Tötungen von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken" gemäß § 4 TierSchG, Aktenzeichen T 9.02, Bezirksregierung Braunschweig) und in Übereinstimmung mit dem "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council, 1996) durchgeführt. Vor Beginn der Isolation wurden die zu verwendenden Instrumente sterilisiert bzw. autoklaviert und die Lösungen (Tabelle 2.1) steril filtriert, mit Carbogen - Gas (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast und auf 37°C erwärmt.

Lösung	${f Ion/Substanz}$	Konzentration	
	NaCl	$137 \mathrm{~mmol/l}$	
	KCl	$5,4 \mathrm{~mmol/l}$	
Tyrode	$MgSO_4$	$1,2 \mathrm{mmol/l}$	gelöst in
ohne $Ca^{2+}$	$Na_2HPO_4$	$1,2 \mathrm{~mmol/l}$	$ddH_2O;$
	HEPES	$20 \mathrm{mmol/l}$	pH 7,54 bei RT
	Glukose	14,98  mmol/l	
	Penicillin	100  U/ml	
	Streptomycin	$0,02 \mathrm{mmol/l}$	
Tyrode mit $Ca^{2+}$	$CaCl_2$	1 mmol/l	
	Taurin	60  mmol/l	
	DL-Glutaminsäure	8 mmol/l	gelöst in Tyrode
Enzym-	DL-Carnitin	$2 \mathrm{mmol/l}$	ohne $Ca^{2+}$ ;
lösung	Kollagenase 2	$100 \mathrm{~mg/dl}$	pH 7,54 bei RT
	Protease XIV	$2,1~{ m mg/dl}$	
	$CaCl_2$	$0,025 \mathrm{~mmol/l}$	
Stopplösung	Albumin Fraktion V	$2000  \mathrm{mg/dl}$	gelöst in Tyrode
(2~%	Butandionmonoxim	$20 \mathrm{mmol/l}$	ohne $Ca^{2+}$ ;
Albumin)	$CaCl_2$	$0,05 \mathrm{~mmol/l}$	m pH 7,54 bei RT

Tabelle 2.1.: Lösungen zur Isolation der ventrikulären Kaninchenmyozyten

Die weiblichen Chinchilla-Bastard-Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 1,3 und 2 kg wurden zunächst mit in die Ohrvene appliziertem Thiopental (100 mg) betäubt. Danach erhielten sie einen intravenösen Heparinbolus (1000 I.E.), um möglichen Blutgerinnseln vorzubeugen. Nach Erreichen einer ausreichenden Anästhesietiefe mit Erlöschen des Kornealreflexes wurde das Abdomen eröffnet, das Zwerchfell durchtrennt und schließlich das Herz im Thorax freipräpariert und entnommen. Der verbleibende Stumpf der Aorta wurde kanüliert und das Herz mit einer 37°C warmen kalziumhaltigen Tyrodelösung gespült, bis es zu kontrahieren begann. Diese Perfusionsmethode, bei der durch die Aorta die Koronararterien retrograd versorgt werden, wurde schon 1895 von Langendorff beschrieben (Abbildung 2.2). Im Folgenden wurde die Perfusionslösung für 5 min auf eine Tyrode ohne Ca<sup>2+</sup> gewechselt, um Ca<sup>2+</sup> - abhängige intrazelluläre Verbindungen wie z.B. durch Cadherine und Integrine aufzuweichen. Im Anschluss wurde das Herz für 10 min mit kollagenasehaltiger Enzymlösung gespült, um das Gewebe aufzuweichen.



Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung der Anlage zur Isolation ventrikulärer Kaninchenmyozyten nach Langendorff

Dieser Vorgang wurde mit albuminhaltiger Stopplösung beendet, die außerdem das zytoprotektive Butandionmonoxim (BDM) enthielt (Mulieri et al. 1989). Danach wurde der Vorhof vorsichtig abgetrennt, das Ventrikelmyokard vorsichtig mit einer Schere zerkleinert, mehrfach gewaschen und schließlich steigenden  $Ca^{2+}$  - Konzentrationen ausgesetzt (0,05 mmol/l - 1 mmol/l). Dadurch sollte das Sarkoplasmatische Retikulum wieder mit  $Ca^{2+}$  aufgefüllt werden, ohne jedoch die Zelle mit  $Ca^{2+}$  zu überladen. Letztendlich wurden die Zellen in frisches Nährmedium (M199) überführt, in einer Neubauer Zählkammer gezählt, wobei mit Tryptanblau (50  $\mu l$  - 1:1) der Anteil der beschädigten Zellen bestimmt wurde. So konnte auf die Anzahl der vitalen Zellen geschlossen und die für die Transfektion benötigte Virusmenge errechnet werden.

## 2.3. Transfektionsprotokoll

Unmittelbar nach Isolation der Kaninchenmyozyten wurden diese mit dem Virus zur Überexpression der CaMKII $\delta$ c und dem Kontrollvirus transfiziert. Dazu wurden in jeweils 8 ml angewärmtes Kulturmedium M199 (Tabelle 2.2) je 100.000 Myozyten gegeben. Danach wurde eine errechntet Menge an Viruslösung (106 pfu/ $\mu$ l) hinzugefügt, sodass eine Endkonzentration (MOI - "multiplicity of infection") von 100 pfu/Zelle erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend durch vorsichtiges Schwenken vermischt und in zuvor beschriftete Petrischalen ( $\emptyset$ =66 mm) gegeben, wo sie über Nacht ( $24 \pm 4$  h) im Inkubationsschrank (37 °C, 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) verblieben. An Tag 2 wurde die Suspension mit 400 U/min 3 min lang bei 22 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in je 4 ml vorgewärmtem M199 resuspendiert. Nun wurden jeweils 600  $\mu l$  Zellsuspension, auf zuvor lamininbeschichtete Versuchskammern (1,3  $\mu l$ Laminin) gegeben. Laminine sind Glykoproteine, die, als Bestandteil der Basalmembran, Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren aufweisen und somit dafür sorgen, dass die Myozyten am Untergrund der Versuchskammern anhaften. Danach wurden die Kammern wiederum für ca. 15 min im Inkubationsschrank (37°C, 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) aufbewahrt. Alle Arbeiten wurden unter entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen in einem S2 - Labor durchgeführt. Mit diesem Protokoll konnte eine Transfektionsrate nahe 100 % erreicht werden (Donahue et al. 1997). Kohlhaas et al. zeigten 2006 außerdem mittels Western - Blot - Analysen, dass die Proteinexpression der CaMKII $\delta$ c im Vergleich zur Kontrollgruppe  $\beta$ gal sechsfach erhöht war (Abbildung 2.3). Außerdem wurde nachgewiesen, dass sowohl die Proteinexpression wie auch die Phosphorylierung der CaMKII $\delta$ c in Abhängigkeit von der biologischen Aktivität der Viruslösung (MOI 1, 10, 100) zunahm.

Lösung	Ion/Substanz	Konzentration	
	Taurin	$5 \mathrm{~mmol/l}$	
	DL-Carnitin	$5 \mathrm{~mmol/l}$	gelöst in M199
Modifiziertes	Kreatin	$5 \mathrm{~mmol/l}$	steril filtriert
M199	Penicillin	$100 \mathrm{~U/ml}$	und bei 4°C
	Streptomycin	$0,02 \mathrm{mmol/l}$	$_{ m gelagert}$
	L-Glutamin	$2 \mathrm{~mmol/l}$	

Tabelle 2.2.: M199: Medium zur Kultivierung der Kaninchenmyozyten



Abbildung 2.3.: (A) Expressionslevels der CaMKII $\delta c$  (n=5) vs. Kontrollgruppe  $\beta$ gal (n= 5) und MOI - abhängiger Phosphorylierungsstatus in Western Blots (MOI 100, 24h); (B) Licht- und Konfokalmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen der CaMKII $\delta c$  - Expression im Zytosol. In der Kontrollgruppe ist keine Färbung zu erkennen; \*P<0,05 vs.  $\beta$ gal. (Kohlhaas et al. 2006, S.237)

# 2.4. Epifluoreszenzmessung

In der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> Konzentration nach Einwirkung von Sauerstoffradikalen in Kardiomyozyten von Kaninchen bestimmt. Dies erfolgte mittels der Fluoreszenzindikatoren SBFI für  $[Na^+]_i$  und Indo - 1 für  $[Ca^{2+}]_i$ . Das Phänomen der Fluoreszenz beschreibt einen Vorgang, bei dem ein Photon angeregt, damit in einen höherenergetischen Zustand versetzt und kurze Zeit später wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt und dabei die erhaltene Energie in Form von Licht wieder abgibt. Der irische Physiker Sir George G. Stokes war Namensgeber für den als "Stokes Shift" bezeichneten Vorgang, der Verschiebung der Wellenlänge des emitierten Lichts gegenüber des absorbierten (Lakowicz 1983). Weil das Photon im angeregten Zustand einige Nanosekunden verbleibt, dabei in energieärmere angeregte Schwingungszustände übergeht und letztendlich nur aus dem untersten angeregten Schwingungszustand relaxieren kann (Franck - Condon Prinzip, Atkins und Friedman 2004), ist die Emissionswellenlänge immer länger also energieärmer als die Anregungswellenlänge. Fluoreszenzfarbstoffe geben also bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Durch Bindung an intrazelluläre Ionen können diese in der Epifluoreszenzmessung erfasst und quantitativ bestimmt werden. Ein limitierender Faktor hierbei ist das Phänomen des "Photobleaching". Es beinhaltet, dass das Fluoreszenzsignal im Laufe der Zeit immer schwächer wird, weil der Farbstoff im angeregten Zustand zerstört wird. Um diesen Effekt zu minimieren, wird versucht, die Anregungsinstensität so gering wie möglich zu halten; dazu muss im Gegenzug die Detektionssensitivität erhöht werden.

#### 2.4.1. Beladung mit AM - Ester (Acetoxymethylester) - Farbstoffen

Die einfach durchzuführende Beladung von Zellen mit AM - Ester Farbstoffen zählt zu den am häufigsten verwendeten Techniken. Die Fluoreszenzfarbstoffe bilden mit freien Ionen wie z.B. Na<sup>+</sup> Chelatkomplexe. Dadurch verändern sich unter anderem deren Anregungsund Emissionswellenlängen. Das abgestrahlte Fluoreszenzsignal ist dabei weit intensiver als die ursprüngliche Eigenfluoreszenz der Zellen. Die größte Problematik besteht vor allem darin, den polaren Farbstoff in die Zelle zu transportieren. Aus diesem Grund wurden die Carboxylgruppen des Farbstoffs zu Acetoxymethylgruppen verestert, was ihn zum einen membrangängig und zum anderen unempfindlich gegenüber den zu bindenden Ionen macht, welche außerhalb der Zelle noch nicht an die Farbstoffmoleküle gebunden werden sollen. Der Esterrest wird nach Aufnahme in die Zelle abgespalten, ermöglicht so die Bindung an das jeweilige Ion und verhindert gleichzeitig den Wiederaustritt des Farbstoffs aus der Zelle (Abbildung 2.4).



Abbildung 2.4.: Beladung der Zelle mit AM - Ester Farbstoffen am Beispiel von SBFI: Das Farbstoffmolekül gelangt per Diffusion über die Zellmembran. Im Zellinneren wird der Acetoxymethylesterrest von Esterasen abgespalten, sodass das Farbstoffmolekül nicht mehr membrangängig ist.

Im Allgemeinen wird angenommen, dass sich der Farbstoff gleichmäßig verteilt. Es ist jedoch möglich, dass in jedem membranumgrenzten Bereich der Zelle Farbstoff akkumuliert, wo er weiterhin fluoreszieren, allerdings nicht mehr auf Veränderungen im zytosolischen Ionenhaushalt reagieren würde. Dieses Phänomen bezeichnet man als "Kompartimentalisierung". Hauptsächlich kommt sie jedoch in pflanzlichen Zellen vor und soll durch eine Beladungstemperatur von unter 37°C vermieden werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen vor Messbeginn 10 min mit Tyrodelösung gespült, um Reste von unhydrolysiertem Farbstoff außerhalb der Zellen zu entfernen.

#### 2.4.2. Messung der Natriumkonzentration mit SBFI

SBFI ist ein Farbstoff, der eine ratiometrische Messung der Fluoreszenz ermöglicht, und dabei abwechselnd bei 340 und 380 nm angeregt wird. Ratiometrische Messungen zeich-

nen sich dadurch aus, dass sie relativ unempfindlich gegenüber ungleicher Beladung, verschiedener Zelldicke, "Photobleaching" und Farbstoffverlusten sind. Wenn ein Na<sup>+</sup> - Ion an SBFI bindet, erhöht sich die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs, die Anregungsspitze wird schmaler, und das Anregungsmaximum verschiebt sich in Richtung kürzerer Wellenlängen, was eine signifikante Veränderung im Verhältnis der Fluoreszenzen (abwechselnd angeregt bei 340 und 380 nm) nach sich zieht (Abbildung 2.5). Obwohl SBFI für Na<sup>+</sup> Ionen relativ selektiv ist, hat K<sup>+</sup> einen gewissen Effekt auf die Affinität von SBFI auf Na<sup>+</sup> (Abbildung 2.6). SBFI ist allerdings ungefähr 18 mal sensitiver für Na<sup>+</sup> als für K<sup>+</sup>. Die Dissoziationskonstante  $(K_d)$  von SBFI für Natrium ist 11,3 mmol/l in einer Lösung mit kombinierter Na<sup>+</sup> - und K<sup>+</sup> - Konzentration von 135 mmol/l, was ungefähr physiologischen Verhältnissen entspricht. Die Dissoziationskonstante aller Farbstoffe ist abhängig von Faktoren wie z.B. pH - Wert, Temperatur, Ionenstärke, Konzentrationen anderer Ionen und Farbstoff-Protein Interaktionen. Die verwendete Farbstofflösung enthielt in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöstes SBFI AM (100  $\mu$ g, Molekulargewicht 1127.07 g/mol, Molecular Probes, S-1264, special packaging), sowie Pluronic (Molecular Probes, P-3000, F-127, 20 % ige Lösung in DMSO), was als oberflächenaktive Substanz die Dispersion der unpolaren Farbstoffmoleküle im Beladungsmedium unterstützt. Mit Messtyrode wurde die Lösung noch weiter auf eine Endkonzentration von 10  $\mu mol/l$  verdünnt und in 300  $\mu l$  Aliquots in lichtundurchlässigen Eppendorfcups bei -20 °C gelagert. Das Ansetzen des Farbstoffs sowie die Beladung der Zellen erfolgte im Dunkeln, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden. Die beladenen Zellkammern wurden für weitere 2 h (Levi et al. 1994) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.



Abbildung 2.5.: Fluoreszenzanregungs- (gemessen bei 505 nm) und Emissionsspektren (angeregt bei 340 nm) von SBFI bei einem pH Wert von 7,0 bei 135 mmol/l (A) oder 0 mmol/l (B) Na<sup>+</sup>.

Bei den Epifluoreszenzexperimenten wurde das Setup der Firma Ion Optix (IonOp-


Abbildung 2.6.: Anpassung der SBFI Fluoreszenz an unterschiedliche Na<sup>+</sup> - Konzentration in vitro: (A) in K<sup>+</sup> freier Lösung und (B) Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> = 135 mmol/l. Steigende Na<sup>+</sup> - Konzentrationen führen zu einer verstärkten Emissionsintensität, gemessen bei 505 nm. Die Emissionsintensität bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm bleibt hingegen relativ konstant.

tix Corporation, Boston, MA) verwendet (Abbildung 2.7). Mit einer Kamera (IonOptix MyoCamTM) wurde die Zelle in der Versuchskammer aufgenommen und in ein Computerprogramm (IonWizard Acquire Version 4.4) übermittelt, wo die Sarkomerlänge bzw. die Zellverkürzung ermittelt werden konnte. Die Farbstoffanregung erfolgte mittels einer UV Lampe (XENON SHORT ARC Lamp Typ UXL-75XE von USHIO Inc., Japan), deren Strahlengang in Abbildung 3.5 dargestellt ist. Das emittierte Licht wurde mittels eines rotierenden Spiegels (Hyper Switch, Frequenz 250 Hz) alternierend durch einen 380 und 340 nm Filter (Filter D380  $\pm$  5 nm und D340  $\pm$  5 nm) geleitet. Um das Licht beider Wellenlängen zu bündeln, wurde der Lichtstahl mit 340 nm Wellenlänge anschließend durch einen dichroitischen Spiegel (370 DC long pass) abgelenkt. Der gebündelte Lichtstrahl wurde dann letztendlich über einen zusätzlichen Spiegel (400 DC long pass) auf die Zelle fokussiert. Das emittierte Licht der Farbstoffe wurde durch einen weiteren dichroitischen Spiegel (635 DC long pass) in sichtbares Licht und UV Licht getrennt, welches daraufhin nach Passage eines Emissionsfilters (D535  $\pm$  20 nm) zum Photomultiplier (electron tubes limited, USA) weitergeleitet wurde, wo es aufgenommen, verstärkt und an den Computer weitergeleitet wurde. Alle verwendeten Spiegel stammen von der Firma Chroma Technology Corp., USA. Um das Ausbleichen des Farbstoffs zu minimieren, wurde der 400 nm Spiegel zwischen den Messungen herausgedreht. Die durch Streulicht, Autofluoreszenz und Farbstoffreste außerhalb der Zellen entstandene Hintergrundfluoreszenz wurde von den Anregungswellenlängen abgezogen und das Verhältnis der Werte



Abbildung 2.7.: Strahlengang am Mikroskop bei der Messung mit SBFI: 1. UV Lampe, 2. Spiegel, 3. Rotierender Spiegel (Hyperswitch) 250 Hz, 4. Filter D380±5 nm, 5. Dichroitischer Spiegel 370 DC long pass, 6. Filter 340±5 nm, 7. Objekttisch mit Myozyten, 8. Rotlichtlampe mit 595 nm long pass Filter, 9. Dichroitischer Spiegel 400 DC long pass, 10. Spiegel, 11. Dichroitischer Spiegel 685 DC long pass, 12. Spiegel, 13. Filter D535+20 nm, 14. Photomultiplier, 15. Kamera

gebildet:

$$\frac{F_{340}}{F_{380}} = \frac{(F_{340} - F_{340 \ Hintergrund})}{(F_{380} - F_{380 \ Hintergrund})} \tag{2.5}$$

Mit in den Kalibrierungsexperimenten gewonnenen Daten konnte der Quotient (Ratio) in tatsächliche Na<sup>+</sup> - Konzentrationen umgerechnet werden.

### 2.4.3. Kalibrierung

Weil SBFI in zellfreier Lösung andere Fluoreszenzeigenschaften aufweist als im intrazellulären Milieu, wurde eine *in* - *situ* - Kalibrierungsmessung in der Zelle durchgeführt. Zur Versuchsdurchführung wurden 4 Lösungen mit verschiedenen Na<sup>+</sup> - Konzentrationen verwendet (0, 5, 10 und 20 mmol/l)(Tabelle 2.3). Der pH-Wert wurde bei Raumtemperatur mit TRIS Base auf 7,3 eingestellt, was dem physiologischen intrazellulären pH-Wert von 7,2 bei 37°C entspricht. Strophantidin wurde als Inhibitor der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (50  $\mu mol/l$ ) eingesetzt und Gramicin D (10  $\mu mol/l$ ) und Monensin (80  $\mu mol/l$ ) als Ionophoren, um die Zellwand für Na<sup>+</sup> - Ionen durchgängig zu machen. Diese lagern sich in die Zellmembran ein und bilden dort Poren, durch welche Na<sup>+</sup> ein- und ausströmen kann, sodass sich die intra- und extrazelluläre Konzentration angleicht. Während eines Kalibrierungsexperiments wurde die Zelle steigenden Na<sup>+</sup> - Konzentrationen ausgesetzt und am Ende wieder auf 0 mmol/l Na<sup>+</sup> zurückgesetzt. Bei den verschiedenen Konzentrationsstufen wurden jeweils das Äquilibrium zwischen Intra- und Extrazellulärraum abgewartet. Die Ratio (F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>) des Kalibrierungsexperiments wurde dann, abzüglich Hintergrundfluoreszenz, mittels einer linearen Regression als Funktion der Na<sup>+</sup> - Konzentration dargestellt. Die erstellte Eichkurve konnte im Folgenden dazu verwendet werden, die gewonnenen Ratiowerte in tatsächliche Na<sup>+</sup> - Konzentrationen umzurechen.

(A) Lösung	$\mathbf{Ion}/\mathbf{Substanz}$	Konzentration				
	NaCl	$140 \mathrm{~mmol/l}$	gelöst in ddH <sub>2</sub> O;			
Natriumlösung	HEPES	10 mmol/l	$_{ m pH}$ 7,3 mit			
	EGTA	1 mmol/l	TRIS Base bei RT			
	KCl	$140 \mathrm{~mmol/l}$	gelöst in $ddH_2O$ ;			
Kaliumlösung	HEPES	10 mmol/l	$_{ m pH}$ 7,3 mit			
	EGTA	1 mmol/l	TRIS Base bei RT			
(B)[Na <sup>+</sup> ](mmol/l)	Natriumlösung (ml)	Kaliumlösung (ml)	Gesamtvolumen (ml)			
0	0	100				
5	3,6	96,4	100			
10	7,1	92,9				
20	14,3	85,7				
(C)	$\mathbf{Ion}/\mathbf{Substanz}$	Konzentration				
	Gramicidin D	$10 \ \mu mol/l$				
Natriumionophore	Monensin	$80 \ \mu mol/l$				
	Strophantidin	$50 \ \mu mol/l$				

Tabelle 2.3.: (A) Kalibrierungslösung für die in - situ - Kalibrierung von SBFI; (B) Mischungsverhältnis der einzelnen Kalibrierungslösungen mit definierter Na<sup>+</sup> - Konzentration; (C) zusätzlich verwandte Natriumionophore und Hemmstoff der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase

### 2.4.4. Messung der Kalziumkonzentration mit Indo - 1

Indo - 1 ist ebenfalls ein ratiometrischer Farbstoff, der wie SBFI als AM - Ester vorliegt. Die Beladung der Zellen erfolgt wie zuvor beschrieben. Die Anregungswellenlänge von Indo - 1 liegt bei 338 nm. Das Emissionsmaximum bewegt sich von ca. 475 nm im Ca<sup>2+</sup> - freien Medium zu ca. 400 nm, wenn der Farbstoff mit Ca<sup>2+</sup> gesättigt ist (Abbildung 2.8). Beim Ansetzen des Farbstoffs wurde zunächst mit Indo - 1 - AM (Indo - 1 - AM Ester, I-1203, 1 mg, Molecular Probes, Molekulargewicht 1009,93 g/mol) und DMSO ein Stock mit der Konzentration 1 mmol/l hergestellt, später mit Messtyrode (1 mmol/l Ca<sup>2+</sup>) und Pluronic auf eine Endkonzentration von 10  $\mu mol/l$  verdünnt und in 200  $\mu l$  Aliquots in lichtundurchlässigen Eppendorfcups bei -20 °C gelagert. Die Herstellung der Färbelösung sowie die Beladung der Zellen erfolgte im Dunkeln, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden. Die beladenen Zellkammern wurden im Gegensatz zu SBFI nur 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dissoziationskonstante von Indo - 1 entspricht ungefähr dem basalen Ca<sup>2+</sup> - Level in Säugetierzellen (ca. 100 nmol/l). Außerdem ist die Selektivität des Farbstoffs für Ca<sup>2+</sup> wesentlich höher als für andere zweiwertige Ionen wie zum Beispiel Mg<sup>2+</sup>.



Abbildung 2.8.: (A) Fluoreszenzemisionsspektren von Indo - 1 bei verschiedenen  $Ca^{2+}$  - Konzentrationen zwischen 0 und 39,8  $\mu mol/l Ca^{2+}$ . Das Emissionsmaximum verschiebt sich dabei von 475 nm in Ca<sup>2+</sup>- freien Medium zu 400 nm bei gesättigtem Farbstoff. (B) Molekülformel von Indo - 1

Die Ermittlung des Fluoreszenzsignals bei den Messungen mit Indo - 1 erfolgte prinzipiell ähnlich wie bei SBFI, allerdings erfolgte die Anregung des Farbstoffs bei nur einer Wellenlänge und die Emission wurde bei zwei Wellenlängen ermittelt. Das Anregungs-



Abbildung 2.9.: Strahlengang am Mikroskop bei der Messung mit Indo-1: 1 UV-Lampe, 2 Filter  $(D365 \pm 5 \text{ nm})$ , 3 Untersuchungsobjekt, 4 Rotlichtlampe mit Filter (695 nm long pass), 5 Dichroitischer Spiegel (D380 DCLP), 6 Spiegel, 7 Dichroitischer Spiegel (D685 DCLP), 8 Dichroitischer Spiegel (440 DCLP), 9 Filter (D485 ± 12,5 nm), 10 Filter (D405 ± 15 nm), 11 Photomultiplier, 12 Kamera

licht  $(365 \pm 5 \text{ nm})$  wurde über einen 380 DC long pass Spiegel auf die Zelle geleitet. Das Durchlicht des Mikroskops, sowie die Farbstoffemission wurden über einen dichroitischen Spiegel (685 DC long pass) getrennt und das UV Licht zu den Photomultipliern geleitet, wo es kurz zuvor durch einen weiteren dichroitischen Spiegel (440 DC long pass) in die beiden Emissionswellenlängen aufgeteilt wurde. Ein Photomultiplier (D485 ± 12,5 nm) erfasste das Licht über 450 nm Wellenlänge, der andere (D405 ± 15 nm) Licht unter 450 nm Wellenlänge (Abbildung 2.9). So konnte auch hier, nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz, der Quotient aus 2 Wellenlängen ermittelt werden.

$$\frac{F_{405}}{F_{485}} = \frac{(F_{405} - F_{405 \ Hintergrund})}{(F_{485} - F_{485 \ Hintergrund})}$$
(2.6)

### 2.4.5. Versuchsprotokoll

Die Änderung der Na<sup>+</sup> - bzw. Ca<sup>2+</sup> - Konzentration nach Radikalzugabe über die Zeit wurde bei einer konstanten Verkürzungsfrequenz der Kardiomyozyten von 0,5 Hz bei ca. 37 °C in der Messkammer untersucht. Die Verkürzung der Zellen wurde dabei über elektrische Feldstimulation (biphasische Impulse, 0,5 Hz, 20 V) erreicht. Nach Einstellen einer Zelle im Sichtfenster wurde mit Tyrode (Tabelle 2.4) ca. 10 min gespült, um eventuelle Farb- und Zellreste aus der Kammer zu entfernen und damit die Hintergrundfluoreszenz möglichst gering zu halten. Außerdem sollte eine ausreichende Inkubation der z.T. in der Tyrode enthaltenen Wirkstoffe wie KN-93 oder Ranolazin gewährleistet sein. Zu Beginn der Messung wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz möglichst nahe an der zu messenden Zelle aufgenommen. Bei Erreichen einer gleichbleibenden Fluoreszenz ("steady state") wurde für 10 min die Wasserstoffperoxydlösung dazugeschaltet (20 mmol/l), um bei konstantem Zu- und Abfluss eine Endkonzentration von 200  $\mu mol/l$  in der Messkammer zu erreichen. Ratio und Zelllänge wurden alle 2 min bis zur Hyperkontraktur bzw. maximal 30 min erfasst. Am Ende des Experiments wurde die Hintergrundfluoreszenz erneut gemessen (Abbildung 2.12).



Abbildung 2.10.: Messprotokoll zur Erfassung der Na<sup>+</sup> - bzw. Ca<sup>2+</sup> - Konzentration nach Radikalzugabe mittels SBFI bzw. Indo - 1

#### 2.4.6. Längenmessung

Über eine CCD Kamera (Phillips FTM800NH) wurde ein Videosignal (240 Hz) des Bildbereichs (Objektiv mit 40 facher Vergrößerung) generiert, digitalisiert und die Sarkomerlänge der Zelle mittels Kontrasterkennungsverfahren ermittelt. Nach Kalibrierung konnten die Werte der longitudinalen Sarkomerlänge als Funktion der Zeit aufgezeich-



net werden (240 Hz) (Abbildung 2.11). Bei der Auswertung wurden im besonderen die Verkürzungsfraktion und die diastolische Zelllänge untersucht.

Abbildung 2.11.: Zur Messung der Zelllänge als Funktion der Zeit wurde eine 40 fache Vergrößerung gewählt und die Bildwiederholungsfrequenz auf 240 Hz eingestellt.

Lösung	Ion/Substanz	Konzentration	
	NaCl	140 mmol/l	
Messtyrode für	KCl	4 mmol/l	gelöst in $ddH_2O$ ;
Epifluoreszenz-	Glukose	10  mmol/l	pH 7,4 mit
${ m messungen}$	HEPES	$5 \mathrm{~mmol/l}$	NaOH bei 37 °C
	$MgCl_2$	1 mmol/l	
	$CaCl_2$	$2 \mathrm{mmol/l}$	
optional	KN-93	$1~\mu mol/l$	

Tabelle 2.4.: Messtyrode für Epifluoreszenzmessungen



Abbildung 2.12.: Schematische Darstellung des Epifluoreszenzsetups: Auf dem Objekttisch befinden sich die Myozyten in der Versuchskammer und werden konstant mit Messtyrode bei 37 °C überspült und mit einem elektrischen Puls von 20 V bei 0,5 Hz stimuliert. Zur Generierung der Radikale in der Kammer wird außerdem  $H_2O_2$  (20 mmol/l) zugeleitet (Flussgeschwindigkeit 1 ml/h). In der Messkammer wird dann die Endkonzentration von 200  $\mu$ mol/l erreicht.

# 2.5. Die Patch - Clamp - Technik

Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelten 1976 die Technik der "Patch - Clamp" - Messung und erhielten dafür 1991 den Nobelpreis für Medizin. Das Außergewöhnliche dieser Methode bestand in der Möglichkeit, eine Fläche von ca. 1  $\mu$ m Durchmesser ("patch") zu isolieren, die nur einige wenige Ionenkanäle enthielt. Außerdem ermöglichte ein zusätzlicher Verstärker die Erfassung von sehr kleinen Strömen im pA Bereich mit relativ hoher zeitlicher Auflösung von 100 - 300 kHz (Bandbreite des Verstärkers). Zwischen der Zellmembran und dem Rand der Glaspipette ist eine sehr dichte Verbindung nötig um den "Patch" elektrisch von seiner Umgebung zu isolieren. Dazu wird die Pipette auf die Membran aufgesetzt und mit leichtem Unterdruck ein Stück der Membran vorsichtig angesaugt. Liegt der Kriechwiderstand zwischen Glas und Membran im Bereich einiger G $\Omega$ , spricht man von einem Gigaseal (engl.: to seal = verschließen). Nach der Bildung eines solchen Gigaseals kann der Strom bei unterschiedlichen Spannungen ("voltage clamp") oder die Spannung bei vorgegebenem Strom ("current clamp") bestimmt werden. Die elektrophysiologischen Grundlagen hierfür ergeben sich wie folgt: Die elektrische bzw. chemische Triebkraft für den Ionentransport über eine Membran stellen eine Potentialdifferenz bzw. eine Konzentrationsdifferenz über diese Membran dar. Da die Kombination der chemischen und elektrischen Triebkraft mit Hilfe der Nernst-Gleichung ebenfalls in ein Potential umgerechnet werden kann, kann die Summe beider Triebkräfte auch als elektrochemisches Potential  $E_x$  angegeben werden:  $E_x$  stellt gleichzeitig das Gleichgewichts- oder auch Nernstpotential für das Ion X dar, bei dem kein Nettostrom über die Membran fließt. Es lässt sich anhand der Nernst-Gleichung berechnen.

$$E_x = \frac{R \cdot T}{F \cdot z} \ln(\frac{c_a}{c_i}) \tag{2.7}$$

R ist hier die allgemeine Gaskonstante  $(8,314 \text{ J} \cdot \text{K-1} \cdot \text{mol}^{-1})$ , T die absolute Temperatur, F die Faraday - Konstante (96485 As· mol<sup>-1</sup>) und z die Wertigkeit des jeweiligen Ions.

Für Na<sup>+</sup> ergibt sich so ein Gleichgewichtspotential von 68 mV. Zur Ermittlung der Leitfähigkeit g, die letztlich die Anzahl der geöffneten Ionenkanäle widerspiegelt, werden noch einige zusätzliche Größen benötigt: Der auf die Membrankapazität normalisierte Messstrom I, nach dem Ohm'schen Gesetz,

$$I = \frac{U}{R} \tag{2.8}$$

der Kehrwert des Widerstands (Leitfähigkeit g; Einheit: Siemens),

$$I = U \cdot g \ oder \ g = \frac{I}{U}$$
(2.9)

und die Spannung U, die sich aus der im Messprotokoll vorgegebenen Spannung U<sub>soll</sub> abzüglich des Gleichgewichtspotentials  $E_x$  ergibt. Daraus folgt:

$$g = \frac{I}{U_{soll} - E_x} \tag{2.10}$$

Bei der "Voltage - clamp" Messung wird die zu untersuchende Zelle, um Änderungen des Membranpotentials zu verhindern, auf eine bestimmte Spannung "festgeklemmt". Dies geschieht mittels eines Kompensationsstroms, der genauso groß ist wie der über die Membran fließende Strom, aber entgegengesetzt gerichtet ist. Der HEKA - Verstärker misst das vorhandene Membranpotential, vergleicht es mit der Sollspannung und erzeugt daraufhin den Kompensationsstrom. So kann schließlich nach Abzug des Kompensationsstroms der tatsächliche Messstrom ermittelt werden, welcher letztendlich Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der zu untersuchenden Na<sup>+</sup> - Kanäle erlaubt.

### 2.5.1. Patch - Clamp - Setup

Um den Versuchsaufbau gegen elektrische Störquellen abzuschirmen, befand er sich innerhalb eines Faradaykäfigs. Alle Netzgeräte waren außerhalb positioniert. Zum Schutz gegen Gebäudeschwingungen stand der Aufbau zusätzlich auf einem schwingungsgedämpften Tisch. In einer Vertiefung in der Mitte des Objekttischs befand sich die Messkammer über dem inversen Mikroskop (Nikon Eclipse TE-2000) mit 400-facher Gesamtvergrößerung (40 x Objektiv und 10 x Okular). Von oben konnte die Pipettenelektrode mit einem Anschluss für Unter- und Überdruck mittels Steuerungshebel direkt in die Versuchskammer abgesenkt und über den Mikromanipulator genau positioniert werden (Abbildung 2.13). Pipetten- und Referenzelektrode waren über einen Vorverstärker (Probe) mit einem Patch - clamp - Verstärker (EPC 10 von HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) mit integriertem AD/DA - Wandler verbunden, welcher das Signal filtern, verstärken und umwandeln konnte, sodass die Datenaufnahme in den Computer mittels des Programms Patchmaster 2.0 (HEKA Elektronik) möglich war. Für die Pipetten wurden Borosilikatglaskapillaren (TW150F-3 World Precision Instruments, Inc.) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm, einem Innendurchmesser von 1,2 mm und einer Länge von 76 mm verwendet, welche auf einem Ziehgerät (DMZ Universal Puller) der Firma Zeitz -Instruments GmbH in zwei Heizstufen vor jedem Messvorgang frisch auseinandergezogen wurden, sodass aus einem Glasröhrchen jeweils 2 Spitzen entstanden. Durch Variation von Zugkraft, Hitze und Zugintervall wurden die Pipettenspitzen so optimiert, dass der Widerstand nach dem Befüllen zwischen 2,8 und 4,5 M $\Omega$  lag. Jede Pipette konnte nur einmal verwendet werden, da für die Sealbildung ihre Öffnung absolut sauber und frei von Membranresten sein muss. Die Messelektrode sowie die Badelektrode bestanden beide aus chloriertem Silberdraht.

#### 2.5.2. Versuchsdurchführung

In der Badlösung wurde die Zusammensetzung der einzelnen Ionen so gewählt, dass sie der des Extrazellularraums entsprach. Allerdings wurde  $K^+$  durch  $Cs^+$  ersetzt, da ein



Abbildung 2.13.: Schematische Darstellung des Patch clamp setups: 1 Schwingungsgedämpfter Tisch, 2 Faradaykäfig, 3 Zulauf für Badlösung, 4 inverses Mikroskop, 5 Referenzelektrode in Badlösung, 6 Motoreinheit des Mikromanipulators, 7 Vorverstärker (Probe) mit Pipettenhalter und Pipette, 8 Versuchskammer mit Myozyten, 9 Steuereinheit des Mikromanipulator, 10 Patch-Clamp-Verstärker (Amplifier) mit integriertem AD/DA-Wandler, 11 Bildschirm, 12 Computer, 13 Steuerungshebel

 $Cs^+$  - Ion weit größer ist als ein  $K^+$  - Ion, somit nicht durch  $K^+$  - Kanäle passt und dadurch Leckströme verhindert werden. Die Ionenzusammensetzung der Pipettenlösung entspricht der des Intrazellularraums.  $K^+$  wurde wiederum durch  $Cs^+$  ersetzt. Da die Aktivierung der CaMKII Ca<sup>2+</sup> abhängig erfolgt, wurde kein Ca<sup>2+</sup> - Puffer verwendet. Um die Effekte einer CaMKII - Hemmung zu untersuchen, wurde der Inhibitor AIP in der Konzentration 100 nmol/l eingesetzt. Außerdem enthielt die Pipettenlösung Strophantidin (0,004 mmol/l) zur Hemmung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase, Nifedipin (0,02 mmol/l) zur Blockade spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup> - Kanäle und Niflumat (0,03 mmol/l) zur Hemmung Ca<sup>2+</sup> - aktivierter Cl<sup>-</sup> - Kanäle (Tabelle 2.5).

Die Beladung der Versuchskammern mit Myozyten erfolgte wie bei der Epifluoreszenzmessung beschrieben. Anschließend erfolgte der Austausch des Kulturmediums gegen die Badlösung. Vor Eintauchen der Pipette in die Lösung wurde ein geringer Überdruck angelegt, um zum einen eine Verschmutzung der Spitze zu vermeiden und zum anderen die

Lösung	${f Ion/Substanz}$	Konzentration			
	NaCl	$10 \mathrm{mmol/l}$			
	${\it Tetramethylammoniumchlorid}$	$130 \mathrm{~mmol/l}$	gelöst in $ddH_2O$ ;		
Badlösung	m CsCl	4  mmol/l	pH 7,4 mit TRIS		
	$MgCl_2$	1  mmol/l	bei RT		
	$\operatorname{Glukose}$	10  mmol/l			
	HEPES	$10 \mathrm{mmol/l}$			
	CsCl	40 mmol/l			
	Cs-Glutamat	80  mmol/l			
	NaCl	$5 \mathrm{~mmol/l}$			
	$MgCl_2$	$0.92 \mathrm{mmol/l}$			
$\operatorname{Pipettenl{\"o}sung}$	Mg-ATP	$\begin{tabular}{ c c c c } \hline Konzentration & & & & \\ \hline 10 \mmol/l & & & & \\ \hline 10 \mmol/l & & & & \\ \hline 4 \mmol/l & & & & \\ \hline 10 \mmol/l & & & & \\ \hline 0.92 \mmol/l & & & \\ \hline 0.92 \mmol/l & & & \\ \hline 0.03 \mmol/l & & & \\ \hline 0.02 \mmol/l & & & \\ \hline 0.02 \mmol/l & & & \\ \hline 10 \mmol/l & & & \\ \hline 10 \mmol/l & & \\ \hline \end{array}$	gelöst in $ddH_2O$ ;		
	Li-GTP	$0.3 \mathrm{~mmol/l}$	pH 7,2 mit CsOH		
	Nifluminsäure	$0.03 \mathrm{~mmol/l}$	bei RT		
	Nifedipin	$0.02 \mathrm{~mmol/l}$			
	$\operatorname{Strophantidin}$	$4 \ \mu mol/l$	1		
	HEPES	10  mmol/l	1		
optional	AIP	100  nmol/l			

Tabelle 2.5.: Bad- und Pipettenlösung ohne Ca<sup>2+</sup> - Puffer

spätere Annäherung an die Zelle zu erleichtern. Dann wurde die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators unter Sicht langsam an die Zelle herangefahren. Unter Beobachtung des Widerstands am Computermonitor wurde die Pipettenspitze noch näher an die Membran gebracht. Wenn sich der Widerstand deutlich erhöht hatte, konnte der Überdruck abgelassen werden, sodass ein lückenloser Kontakt der Pipette zur Membran hergestellt wurde (Gigaseal). Anschließend wurde durch kurzes Anlegen eines größeren Unterdrucks versucht, das Membranstück in der Pipette zu zerstören ("rupturing"). Dadurch wurde die "Whole-cell" - Konfiguration erreicht, bei der die Ströme nicht nur über den "Patch", sondern über die gesamte Zellmembran gemessen werden. Waren bei dieser Prozedur keine Leckströme entstanden, wurde weitere 5 min abgewartet, um die gleichmäßige Verteilung der Ionen in der Pipette und im Intrazellularraum, sowie eine entsprechende Einwirkzeit der Pharmaka (z.B. AIP) zu gewährleisten. Nach Einstellen eines Ruhemembranpotentials von -120 mV konnte schließlich mit der Messung der Natriumströme begonnen werden. Das Membranpotential  $E_m$  wurde für 1000 ms auf - 20 mV depolarisiert, um eine maximale Anzahl von Na<sup>+</sup> - Kanälen zu aktivieren. Um den Einfluss der Sauerstoffradikale auf die Menge des Na<sup>+</sup> - Einstroms in die Zelle zu untersuchen, wurde nach Erfassen des

baseline Wertes 200  $\mu l$  einer Wasserstoffperoxydlösung (400  $\mu mol/l$ ) in die Messkammer pipettiert, um dort die Endkonzentration von 200  $\mu mol/l$  zu erreichen. Bis zum Ende des Experiments bei Hyperkontraktur der Zelle bzw. spätestens 30 min nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Zugabe wurde die Messung alle 2 min wiederholt. Abbildung 2.14 zeigt das Protokoll zur Erfassung der Na<sup>+</sup> - Ströme. Zur Auswertung wurden die aufgezeichneten Ströme in Microsoft Excel importiert. Der Strom am Ende des Depolarisationsschrittes (nach 950 - 1000 ms) - der Messung vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Zugabe - wurde als konstant angesehen und jeweils als "Leakstrom" abgezogen.



Abbildung 2.14.: Messprotokoll zur Erfassung des späten Na<sup>+</sup> - Stroms nach Radikaleinwirkung

# 2.6. Pharmakologische Interventionen

Die verwendeten Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. ddH<sub>2</sub>O (KN-93) gelöst und der Messtyrode in den entsprechenden Mengen zugeführt. Da DMSO selbst gewisse Radikalfängereigenschaften nachgewiesen werden konnte (Koulkes-Pujo et al. 1981), wurden Kontrollexperimente mit der gleichen Menge DMSO durchgeführt. Vor Beginn der Messungen wurden die Zellen mindestens 10 min mit der den Wirkstoff enthaltenden Tyrode gespült, um eine ausreichende Einwirkzeit zu gewährleisten.

#### 2.6.1. KN-93

KN-93 (Bestellnr. 120831 SEIKAGAKU America, Molekulargewicht: 501,1 g/mol) ist ein potenter, selektiver und membrangängiger kompetitiver Inhibitor der CaMKII, welcher mit CaM um die Bindungsstelle konkurriert (IC<sub>50</sub> = 370 nmol/l) und außerdem die Proteinkinase A nicht signifikant in ihrer Funktion hemmt (Mamiya et al. 1993). Um auszuschließen, dass KN-93 selbst Radikalfängereigenschaften besitzt, wurden Kontrollexperimente mit dessen Analogon KN-92 (Bestellnr. 120830 SEIKAGAKU America, Molekulargewicht: 555,0 g/mol) durchgeführt, welches keine CaMKII - hemmende Wirkung besitzt. Beide Stoffe wurden in einer Konzentration von 1  $\mu mol/l$  eingesetzt.

## 2.6.2. AIP

AIP ("Autocamtide-2-related Inhibitory Peptide") (verwendete Konzentration: 100 nmol/l, Bestellnr. A3400-1MG Th. Geyer Molekulargewicht 1498,0 g/mol) ist ebenfalls ein hoch potenter und spezifischer CaMKII - Inhibitor, dessen Proteinsequenz von Autocamtide-2 abgeleitet ist. In einer Konzentration von 1  $\mu$ mol/l hemmt AIP die CaM-KII komplett, ohne dabei PKC, PKA oder CaMKIV zu beeinflussen (Ishida et al. 1995).

#### 2.6.3. Ranolazin

Ranolazin (Bestellnr. R6152 Th. Geyer, 10  $\mu mol/l$  gelöst in 0,1 N HCl, Molekulargewicht 427,5 g/mol) ist ein selektiver Hemmstoff des späten Na<sup>+</sup> - Stroms, d.h. es hemmt den späten Na<sup>+</sup> - Strom 38 mal stärker als den Spitzenstrom in Ventrikelmyozyten von Hunden mit Herzinsuffizienz (Undrovinas et al. 2006).

## 2.6.4. Thapsigargin

Thapsigargin (Bestellnr. T9033-5MG Th. Geyer, Molekulare Masse 650,76 g/mol) ist ein hochpotenter Hemmstoff der sarkoplasmatischen  $Ca^{2+}$  - ATPase und verhindert so einen Rücktransport von  $Ca^{2+}$  - Ionen in das Sarkoplasmatische Retikulum nach der Kontraktion und der intrazelluläre  $Ca^{2+}$  - Speicher leert sich. Somit werden Untersuchungen zur Beteiligung des aus dem SR freigesetzten  $Ca^{2+}$  an den Radikaleffekten ermöglicht.

# 2.7. Datenerfassung und Auswertung

Die Daten der Patch clamp Messungen wurden mit der Software Patchmaster<sup>TM</sup> (HE-KA Elektronik, Dr. Schulze GmbH) erfasst, in Microsoft Excel importiert, dort weiter bearbeitet und verwaltet. Die Endauswertung, statistische Testung, sowie die graphische

Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism  $4^{TM}$  (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die Epifluoreszenzexperimente wurden mit IonWizard Acquire Version 4.4 von IonOptix aufgezeichnet und mit IonWizard 5.0 ausgewertet. Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte ebenfalls mit Microsoft Excel, sowie GraphPad Prism<sup>TM</sup>. Sämtliche Daten sind im Folgenden als Mittelwerte dargestellt, wobei sich deren Standardfehler wie folgt berechnen lässt:

$$S.E.M. = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$
(2.11)

(S.E.M. = Standardfehler; engl.: standard error of the mean;  $\sigma^2$  = Varianz;  $\sigma$  = Standardabweichung; n = Anzahl der Beobachtungen)

Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test bzw. ANOVA zum Vergleich longitudinaler Daten mehrerer Gruppen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von P < 0.05 wurde dabei zweiseitig als statistisch signifikant angesehen.

# 3. Ergebnisse

# 3.1. Wirkung von Sauerstoffradikalen auf den späten Na<sup>+</sup> -Einstrom ("late $I_{Na}$ ")

Zur Erfassung des späten Na<sup>+</sup> - Einstroms wurden die transfizierten Kaninchenmyozyten auf - 120 mV geclampt und für 1000 ms auf - 20 mV depolarisiert. Abbildung 3.1 zeigt in Teil A einen kompletten Na<sup>+</sup> - Strom mit sehr großem Spitzenstrom und schneller Inaktivierung. Ein geringer Teil der Natriumkanäle geht jedoch nicht in einen inaktiven Zustand über, sondern bleibt aktiviert oder springt in schnellem Wechsel zwischen inaktiven und aktiven Zustand hin und her (sog. "burst mode"). Deshalb bleibt ein im Vergleich zur Gesamtamplitude sehr kleiner (< 1%), aber durch seine Länge von mehreren 100 ms doch relevanter Reststrom bestehen. Dies ist der sogenannte persistierende oder auch späte Na<sup>+</sup> - Strom. In der Vergrößerung (Abbildung 3.1 B) ist nur der späte Na<sup>+</sup> - Strom von ungefähr 50 - 500 ms nach Kanalöffnung dargestellt, welcher wie bei Wagner et al. 2006 schon zu Ausgangsbedingungen in der CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Zelle etwas größer war als im Vergleich zur  $\beta$ gal Kontrolle. Nach Radikalexposition wurden die normalisierten Integrale nochmals deutlich größer.

Abbildung 3.2 zeigt gemittelte Integrale über den späten Na<sup>+</sup> - Einstrom (50 - 500 ms). Nach Zugabe der Radikale nahm der Na<sup>+</sup> - Strom in der CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Gruppe (N=16) stark zu, in der Kontrollgruppe  $\beta$ gal (N=17) fiel der Effekt signifikant schwächer aus. Unter Verwendung des CaMKII - Inhibitors AIP (N=14) konnten die Werte quasi auf Kontrollniveau reduziert werden. Die Zellgruppe  $\beta$ gal + AIP (N=16) unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe  $\beta$ gal, allerdings ist auch hier ein deutlicher Trend zur Minimierung der Ströme erkennbar.



Abbildung 3.1.: (A) Originalabbildung eines Na<sup>+</sup> - Stroms mit großem Peak und schneller Inaktivierung. (B) Ausschnittsvergrößerung zur besseren Darstellung des späten Anteils des Na<sup>+</sup> -Stroms ("late  $I_{Na}$ "). Dieser persistierende Na<sup>+</sup> - Einstrom in der eigentlichen Inaktivierungsphase von ca. 50 - 500 ms nach Kanalöffnung ist im Vergleich mit dem Spitzeneinstrom sehr klein, wird allerdings aufgrund seiner Dauer relevant. Schon zu Beginn der Messung war der späte Na<sup>+</sup> -Einstrom in der CaMKII\deltac - überexprimierenden Zelle etwas größer als in der Kontrollzelle. Nach Radikalexposition nahmen die normalisierten Integrale in beiden Zellen nochmals deutlich zu.



Abbildung 3.2.: Nach Zugabe der Sauerstoffradikale nahm der späte Na<sup>+</sup> - Strom in der CaMKII $\delta c$  - überexprimierenden Gruppe signifikant stärker zu als in der Kontrollgruppe. Der CaMKII $\delta c$  - Hemmstoff AIP bewirkte eine deutliche Reduktion des späten Na<sup>+</sup> - Stroms, knapp unter Kontrollniveau. Die Behandlung der Kontrollgruppe mit AIP führte ebenfalls zu einer leichten Verringerung der Werte. (\* P < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe  $\beta$ gal)

# 3.2. Einfluss der Sauerstoffradikalwirkung auf die intrazelluläre Na<sup>+</sup> - Konzentration $[Na^+]_i$

Um darzustellen, welchen Einfluss die Verstärkung des späten  $Na^+$  - Einstroms auf den Gesamtnatriumgehalt der Zellen hat, wurden Experimente am Epifluoreszenz - Setup durchgeführt. Unter Verwendung des  $Na^+$  - sensitiven Farbstoffs SBFI wurde die intrazelluläre  $Na^+$  - Konzentration nach Zugabe der Wasserstoffperoxydlösung über eine Zeit von 30 min erfasst. Mit Hilfe einer *in - situ* - Kalibrierung konnten die erhobenen Ratiowerte später auf tatsächliche  $Na^+$  - Konzentrationen umgerechnet werden.

## 3.2.1. In - situ - Kalibrierung von SBFI

Bei der *in - situ* - Kalibrierung von SBFI sorgte die Verwendung der Ionophoren Gramicidin und Monensin für ausreichende Porenbildung in der Zellmembran und somit für den Ausgleich der intra- und extrazellulären Na<sup>+</sup> - Konzentration. So konnten auch im Zellinneren die vorgegebenen Na<sup>+</sup> - Werte erreicht werden.



Abbildung 3.3.: Repräsentatives SBFI - Kalibrierungsexperiment: Nach Permeabilisierung der Membran (Monensin, Gramicidin) stieg die Fluoreszenzintensität  $(F_{340}/F_{380})$  mit der Erhöhung der Na<sup>+</sup> - Konzentration schrittweise an.

Auf der Abbildung 3.3 ist ein repräsentatives Kalibrierungsexperiment zu sehen, wobei die Fluoreszenzratio ( $F_{340}/F_{380}$ ) mit der schrittweisen Erhöhung der Na<sup>+</sup> - Konzentration ebenfalls bis zum Erreichen einer Plateauphase anstieg. Nach Umstellung auf 0 mmol/l Na<sup>+</sup> am Ende der Messung sank der Fluoreszenzwert nicht ganz auf den Ausgangswert, was damit zusammenhängen könnte, dass die Farbstoffintensität im Laufe der Messung immer weiter abnimmt, was bei einer längeren Messung den Fehler nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz vergrößern würde. Außerdem wäre denkbar, dass ein Anstieg der intrazellulären Na<sup>+</sup> - Konzentration auf 20 mmol/l so enorm ist, dass die Na<sup>+</sup> - Ionen nicht mehr vollständig eliminiert werden können (Maier et al. 1997). Die Fluoreszenzratio ( $F_{340}/F_{380}$ ) wurde abzüglich der Hintergrundfluoreszenz aus insgesamt 12 Kalibrierungsexperimenten mittels linearer Regression als Funktion der Natriumkonzentration dargestellt. Dies ergab folgende Eichkurve (Abbildung 3.4) mit deren Verwendung die in den Epifluoreszenzmessungen ermittelten Ratiowerte in tatsächliche Na<sup>+</sup> - Konzentrationen umgerechnet werden konnten. Die dafür verwendete Formel lautet:

$$[Na^{+}]_{i} = \frac{\frac{F_{340} - F_{340} \quad Hintergrund}{F_{380} - F_{380} \quad Hintergrund} - 0,541}{0,014} (mmol/l)$$
(3.1)



Abbildung 3.4.: Eichkurve (y(x) = 0,014 x + 0,541) mit linearer Regressionsgeraden und 95 % Konfidenzintervall der Regression für die intrazelluläre in - situ - Kalibrierung von SBFI (N=12).

# 3.2.2. Änderung der $[Na^+]_i$ nach Zugabe von $H_2O_2$

Abbildung 3.5 zeigt exemplarisch eine Originalregistrierung der Epifluoreszenzmessung mit SBFI an ventrikulären Kaninchenmyozyten, die entweder mit dem CaMKII $\delta$ c- oder dem Kontrollvirus  $\beta$ gal transfiziert wurden. Zunächst wurde ein Basiswert ermittelt und dann mit der Sauerstoffradikalgenerierung durch Superfusion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> begonnen. Schon zu Beginn der Messungen war das Fluoreszenzniveau in der CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Unter Radikaleinfluss stieg die Ratio in beiden Zellgruppen deutlich an, in den CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Zellen allerdings wesentlich stärker als in der Kontrollgruppe.

In Abbildung 3.6 sind die kalibrierten Mittelwerte der SBFI Messungen nach Wasserstoffperoxydzugabe über eine Zeit von 20 min dargestellt. Es zeigte sich in allen Gruppen ein Anstieg der Na<sup>+</sup> - Konzentration nach Einwirken der Sauerstoffradikale. In den CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Zellen (N=26) war dieser Effekt signifikant stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe (N=28). 20 min nach Beginn der Radikalexposition war [Na]<sub>i</sub> 21,1 ± 3,6 mmol/l in der CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Gruppe gegenüber 13,2 ± 1,8 mmol/l in der Kontrollgruppe. Wurde der CaMKII - Inhibitor KN-93 oder der Hemmstoff des späten Na<sup>+</sup> - Stroms Ranolazin eingesetzt, entsprach der Radikalinduzierte Na<sup>+</sup> - Konzentrationsanstieg dem der Kontrollgruppe  $\beta$ gal. Die intrazelluläre



Abbildung 3.5.: Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Originalexperiment der Veränderung der SBFI Fluoreszenz zu baseline Bedingungen und zu verschiedenen Zeitpunkten nach  $H_2O_2$  Zugabe. In Rot ist die CaMKII $\delta c$  - überexprimierende Zelle dargestellt, in schwarz die mit dem Kontrollvirus ( $\beta$ gal) transfizierte Zelle. Das Verhältnis der Lichtintensität der Wellenlängen 340 und 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) ist dabei Maß für die intrazelluläre Na<sup>+</sup> - Konzentration. Die Na<sup>+</sup> - Konzentration in der Zelle stieg nach Radikalzugabe in der CaMKII $\delta c$  - überexprimierenden Zelle deutlich stärker an als in der Kontrollzelle.

Na<sup>+</sup> - Konzentration betrug  $9,4 \pm 1,9 \text{ mmol/l}$  in der mit KN-93 behandelten Gruppe (N=9), mit Ranolazin (N=9)  $10,7 \pm 1,8 \text{ mmol/l}$ . In den Kontrollgruppen  $\beta$ gal + KN-93 (N=14) war der Na<sup>+</sup> - Anstieg nicht signifikant im Vergleich zu  $\beta$ gal bzw. bei  $\beta$ gal + Ranolazin (N=9) sogar signifikant niedriger (Tabelle 3.1). Dies lässt darauf schließen, dass sowohl die CaMKII $\delta$ c als auch der späte Na<sup>+</sup> - Einstrom maßgeblich an der Na<sup>+</sup> - Überladung der Zelle beteiligt sein müssen und diese Effekte auch ohne artifizielle Steigerung der CaMKII - Level von Bedeutung sind. Durch Verwendung des KN-93 - Analogons ohne CaMKII - inhibitorischen Effekt (KN-92) konnte ausgeschlossen werden, dass dieser Stoff selbst Radikalfängereigenschaften aufweist. Die mit KN-92 behandelten Zellen unterschieden sich nicht signifikant von den unbehandelten Zellen (Tabelle 3.1).



Abbildung 3.6.: Kalibrierte Mittelwerte der SBFI Epifluoreszenzmessungen der einzelnen Zellgruppen nach Wasserstoffperoxidzugabe über 20 min. Dargestellt sind Daten aus transfizierten ventrikulären Kaninchenmyozyten (CaMKII&c bzw.  $\beta$ gal) kurz vor, während und nach Exposition mit Sauerstoffradikalen. Die Na<sup>+</sup> - Konzentration in den CaMKII&c - überexprimierenden Zellen stieg signifikant stärker an als in der Kontrollgruppe, bzw. den mit Ranolazin oder KN-93 behandelten Zellen.(\* P < 0.05 im Vergleich zur Kontrollgruppe  $\beta$ gal;  $\dagger P < 0.05$  im Vergleich zur CaMKII&c - Gruppe)

	δ	с	δc KN-92		$\beta \mathbf{g}$	$\beta$ gal $\beta$ gal KI		$\beta$ gal KN-93 $\beta$ gal KN-93		etagal Ran		
	N =	26	N = 14		N = 28 N =		= 8	N = 14		N = 9		
$[Na^+]_i$	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
0 min	6,6	$^{1,9}$	7,8	$^{1,7}$	4,0	$^{1,3}$	4,8	$^{3,8}$	$^{3,6}$	$^{2,6}$	1,5	$^{2,1}$
$2 \min$	9,4	$^{1,8}$	9,9	1,9	5,3	$^{1,4}$	6,6	$^{2,6}$	$^{5,5}$	$^{2,7}$	2,2	$^{2,2}$
4 min	11,3	1,9	$12,\!6$	1,9	6,3	1,3	5,3	$^{3,8}$	6,0	$^{2,6}$	$^{2,6}$	$^{2,4}$
6 min	$13,\!8$	$^{2,4}$	$13,\!6$	$^{2,0}$	7,1	1,6	5,9	$^{3,8}$	6,7	$^{2,6}$	$^{2,8}$	$^{2,4}$
$8 \min$	14,9	$^{2,2}$	14,0	$^{2,0}$	7,4	1,2	7,2	$^{4,1}$	7,7	$^{2,5}$	3,2	$^{2,5}$
$10 \min$	16,3	$^{2,4}$	14,9	$^{2,3}$	8,4	$^{1,3}$	7,9	$^{4,0}$	$^{8,5}$	2,7	3,4	2,7
$12 \min$	16,3	$^{2,4}$	16,3	$^{2,0}$	9,0	1,3	9,1	4,6	9,3	$_{3,2}$	4,2	$^{2,7}$
$14 \min$	18,7	$_{3,0}$	17,3	$^{2,7}$	9,7	1,4	8,3	$^{4,3}$	7,8	$^{2,6}$	4,7	$^{2,7}$
$16 \min$	17,0	$^{2,7}$	17,1	$^{3,2}$	10,6	1,4	10,4	4,9	$^{7,2}$	2,5	5,5	$^{2,8}$
$18 \min$	19,2	$^{3,2}$	20,5	$_{3,9}$	11,8	$^{1,6}$	13,9	$^{5,1}$	$^{5,8}$	1,9	8,4	3,1
$20 \min$	21,1	3,6	21,1	4,3	13,2	1,8	16,7	6,8	6,7	2,5	8,8	3,2

Tabelle 3.1.: Kalibrierte Mittelwerte (mmol/l) der Epifluoreszenzmessungen mit SBFI, die in Abbildung 3.6 aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt wurden. In den mit KN-92 behandelten Zellen war ein Na<sup>+</sup> - Anstieg, entsprechend der unbehandelten Zellgruppen, festzustellen. Dies zeigt, dass KN-92 und damit auch sein Analogon mit CaMKII - inhibitorischer Wirkung KN-93 keine Radikalfängereigenschaften besitzen. Bei Behandlung der Kontrollgruppe mit KN-93 bzw. Ranolazin war der Anstieg der Na<sup>+</sup> - Konzentration gegenüber den  $\beta$ gal Zellen ohne Behandlung vermindert. (Mean = Mittelwert, SEM = Standardfehler)

## 3.2.3. Zeit bis zum Eintreten der Hyperkontraktur

Der schnellere und stärkere Na<sup>+</sup> - Anstieg der Zellen mit CaMKII $\delta$ c - Überexpression lässt vermuten, dass durch die nachfolgende Ca<sup>2+</sup> - Überladung diese Zellgruppe auch schneller in die Hyperkontraktur übergeht und zum großen Teil das Ende der Messung von 30 min nicht erreicht. Wie aus Abbildung 3.7 ersichtlich, waren am Schluss der Messung noch 38,5 % der CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Zellen (N=26) am Leben, von der Kontrollgruppe (N=28) noch 42,9 %. Ranolazin bewirkte eine Steigerung der Überlebensquote auf 55,6 % (N=9), KN-93 sogar auf 88,8 % (N=9). Auch in der  $\beta$ gal - Gruppe konnte die Überlebensrate durch Ranolazin (N=9) auf 55,6 bzw. durch KN-93 (N=14) auf 64,3 % erhöht werden. Der Zusatz von KN-92 bewirkte kein verbessertes Überleben (Tabelle 3.2).



Abbildung 3.7.: Das prozentuale Überleben der Zellen nach Radikalexposition, dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve. Mit Ende der Messung nach 30 min sind von den CaMKIIδc - überexprimierenden Zellen noch 38,5% am Leben, von den kontrolltransfizierten Zellen noch 42,9%. Die Behandlung mit KN-93 bzw. Ranolazin verlängerte die Überlebenszeit deutlich über Kontrollniveau (KN-93 88,8%, Ranolazin 55,6%).

	$\delta \mathbf{c}$	δc KN-92	$eta \mathbf{gal}$	etagal KN-92	etagal KN-93	etagal Ran
Zellzahl	N = 26	N = 14	N = 28	N = 8	N = 14	N = 9
0 min	100 %	100~%	100 %	100 %	100 %	100 %
$5 \min$	100%	$100 \ \%$	$100 \ \%$	100 %	$100 \ \%$	100%
$10 \min$	$100 \ \%$	92.9~%	$100 \ \%$	100 %	$100 \ \%$	$100 \ \%$
$15 { m min}$	88.5~%	85.7~%	92.9~%	100 %	$100 \ \%$	100 %
$20 \min$	69.2~%	78.6~%	85.7~%	87.5 %	92.9~%	100 %
$25 \min$	50 %	57.1~%	64.3~%	62.5 %	85.7~%	66.7~%
$30 \min$	38.5~%	42.9~%	42.9 %	50 %	64.3~%	55.6~%

Tabelle 3.2.: Tabellarische Darstellung des prozentualen Überlebens der Zellgruppen, die in Abbildung 3.7 nicht dargestellt sind. Nach 30 min waren von den mit KN-92 behandelten Zellen ähnlich viele hyperkontrahiert wie in ihrer jeweiligen Kontrollgruppe. KN-93 und Ranolazin konnten das Überleben auch in der  $\beta$ gal - Gruppe etwas verbessern.

# 3.3. Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> - Konzentration mit Indo - 1

Laut Hypothese folgt dem radikalinduzierten intrazellulären  $Na^+$  - Anstieg eine Steigerung des  $Ca^{2+}$  - Gehalts im Zytosol, welche letztendlich zur Hyperkontraktur führt. Um diesen Sachverhalt zu prüfen, wurden weitere Messungen mit dem oben beschriebenen Versuchsaufbau, unter Verwendung eines  $Ca^{2+}$  - bindenden Farbstoffs (Indo - 1), durchgeführt.

# 3.3.1. Einfluss der Sauerstoffradikalwirkung auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> - Konzentration $[Ca^{2+}]_i$

Abbildung 3.8 zeigt eine repräsentative Originalregistrierung einer Epifluoreszenzmessung mit dem  $Ca^{2+}$  - sensitiven Farbstoff Indo - 1. Das Verhältnis der Lichtintensitäten der Wellenlängen 405 und 485 nm  $(F_{405}/F_{495})$  ist dabei Maß für die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ - Konzentration. Zu Beginn der Messung waren sowohl in der CaMKII $\delta c$  - überexprimierenden Zelle als auch in der kontrolltransfizierten Zelle  $Ca^{2+}$  - Transienten vorhanden. Nach Zugabe der Wasserstoffperoxydlösung wurden die Transienten in beiden Gruppen kleiner und verschwanden schließlich ganz. Hatte sich der diastolische  $Ca^{2+}$  - Wert an den systolischen angenähert, war die Zelle nicht mehr in der Lage zu kontrahieren. Insgesamt war der intrazelluläre  $Ca^{2+}$  - Gehalt in der CaMKII $\delta c$  - überexprimierenden Zelle am Ende deutlich höher im Vergleich zur Kontrollzelle.



Abbildung 3.8.: Die Abbildung eines repräsentativen Originalexperiments zeigt das Verhältnis der Lichtintensitäten der Wellenlängen 405 und 485 nm  $(F_{405}/F_{495})$  nach Abzug der Hintergrund-fluoreszenz als Maß für die intrazelluläre  $Ca^{2+}$  - Konzentration zu Beginn der Messung und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Sauerstoffradikale. Zu Anfang waren in beiden Zellen noch deutliche  $Ca^{2+}$  - Transienten erkennbar, nach  $H_2O_2$  - Zugabe wurden diese zunächst kleiner, bis sich die diastolische  $Ca^{2+}$  - Konzentration an den systolischen Wert angenähert hatte. Unter diesen Umständen sind der Zelle keine Kontraktionen mehr möglich. Der  $Ca^{2+}$  - Anstieg fiel in der CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Zelle insgesamt deutlich stärker aus als in der Kontrollzelle.

In Abbildung 3.9 sind auf den Ausgangswert normalisierte diastolische  $Ca^{2+}$  - Werte gezeigt, welche in Epifluoreszenzmessungen mit dem Farbstoff Indo - 1 erhoben wurden.

Nach Exposition der transfizierten ventrikulären Kaninchenmyozyten mit Sauerstoffradikalen stieg das diastolische Ca<sup>2+</sup> in allen Gruppen deutlich an. Der signifikant stärkste Anstieg war in der Gruppe der CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Zellen zu verzeichnen. 20 min nach Beginn der Radikalexposition war die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> - Konzentration in den CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Zellen auf den 1,4 ± 0,1 - fachen Ausgangswert angestiegen. Die Ca<sup>2+</sup> - Werte der mit Ranolazin bzw. KN-93 behandelten Zellen blieben tendenziell (Ranolazin 1,2 ± 0,03, KN-93 1,2 ± 0,1), jedoch nicht signifikant unter Kontrollniveau (1,3 ± 0,1). In den Kontrollgruppen  $\beta$ gal + KN-93 (N=8) und  $\beta$ gal + Ranolazin (N=10) war im Vergleich zu  $\beta$ gal der Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> ebenfalls etwas geringer (Tabelle 3.3). KN-92 verursachte einen den Zellgruppen ohne Behandlung entsprechenden Ca<sup>2+</sup>-Anstieg.



Abbildung 3.9.: Dargestellt sind auf den Ausgangswert normalisierte diastolische Ca<sup>2+</sup> - Werte aus Epifluoreszenzmessungen mit Indo - 1. Nach Radikalexposition stiegen die diastolischen Ca<sup>2+</sup> - Werte in allen 4 Gruppen stark an. Den signifikant größten Anstieg zeigten die CaMKII $\delta c$  überexprimierenden Zellen. Die mit Ranolazin und KN-93 behandelten Zellen blieben im Ca<sup>2+</sup> -Anstieg tendenziell, jedoch nicht signifikant unter dem Kontrollniveau. \*P < 0,05 vs. Kontrolle ( $\beta$ gal);  $\dagger P < 0,05$  vs. CaMKII $\delta c$ 

	δ	с	δc KN-92		$\beta$ gal $\beta$ gal ]		gal KN-92		etagal KN-93		etagal Ran	
	N =	: 11	N = 8		$\mathrm{N}=11$ $\mathrm{N}=12$		N = 8		N = 10			
$[Ca^2+]_i$	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
0 min	1	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
$2 \min$	1,02	0,01	1,03	0,01	1,02	0,01	1,03	0,01	1,01	0,01	1,02	0,01
$4 \min$	1,06	0,01	1,05	0,01	1,04	0,01	1,07	0,01	1,04	0,01	1,06	0,01
$6 \min$	1,1	0,02	1,10	0,02	1,07	0,02	1,12	0,01	1,07	0,01	1,10	0,02
$8 \min$	1,1	0,02	$1,\!14$	0,02	1,11	0,03	1,17	0,01	1,10	0,01	$1,\!15$	0,02
$10 \min$	1,21	0,02	1,20	0,03	1,18	0,03	1,21	0,01	1,12	0,02	1,22	0,03
$12 \min$	1,26	0,03	1,26	0,03	1,22	0,04	1,26	0,01	$1,\!14$	0,02	1,27	0,04
14 min	1,31	0,04	1,27	0,04	1,26	0,06	1,29	0,02	1,16	0,02	1,28	0,05
$16 \min$	1,37	0,06	1,30	0,04	1,27	0,06	1,32	0,04	$1,\!18$	0,02	1,29	0,05
$18 \min$	1,36	0,05	1,32	0,05	1,28	0,07	1,29	0,03	1,22	0,02	1,26	0,04
$20 \min$	1,42	0,07	1,37	0,06	1,30	0,08	1,33	0,04	$1,\!24$	0,03	1,27	0,04

Tabelle 3.3.: Auf den Ausgangswert normalisierte Mittelwerte der Epifluoreszenzmessungen mit Indo-1, die in Abbildung 3.9 aus Übersichtlichkeitsgründen nicht gezeigt wurden. Der Ca<sup>2+</sup> -Anstieg in den mit KN-92 behandelten Zellgruppen entsprach den Zellen ohne pharmakologische Beeinflussung. Dies belegt, dass weder KN-92 noch sein Analogon KN-93 Radikalfängereigenschaften besitzen. KN-93 und Ranolazin führen auch in den  $\beta$ gal transfizierten Zellen zu einem verringerten Anstieg der diastolischen Ca<sup>2+</sup> - Konzentration. (Mean = Mittelwert, SEM = Standardfehler)

#### 3.3.2. Verkürzungsfraktion

Zur Auswertung der Verkürzungsfraktion wurden nur Zellen verwendet, die unter Ausgangsbedingungen eine Verkürzung von über 1% der Ausgangszelllänge aufwiesen. Dies war ein grundlegendes Qualitätskriterium, da einige Zellen bei starker Farbstoffbeladung eine zu geringe Verkürzungsfraktion aufwiesen, als dass sich dort noch kleine Änderungen hätten nachweisen lassen. Abbildung 3.10 zeigt eine repräsentative Originalregistrierung der prozentualen Verkürzung der Zellen (engl.: "fractional shortening"), normalisiert auf die Ausgangszelllänge. Zu Beginn der Messung unterschied sich die Verkürzung der beiden Zellen nur unwesentlich. Nach 6 min Wasserstoffperoxydexposition kam es unter Kontrollbedingungen zu einer Abnahme der diastolischen Zelllänge und einem Rückgang der Verkürzungsfraktion. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei CaMKII - Überexpression ein deutlicher Anstieg der Verkürzungsfraktion bei ähnlicher Abnahme der diastolischen Zelllänge, was auf eine beschleunigte Ca<sup>2+</sup> - Wiederaufnahme in das SR bei ähnlicher diastolischer intrazellulärer Ca<sup>2+</sup> - Konzentration hindeuten könnte. Interessanterweise konnte ein Teil des positiv inotropen Effektes der Sauerstoffradikale durch Blockade des späten Na<sup>+</sup> - Einstroms (mittels Ranolazin) reduziert werden (Abbildung 3.11), was auf eine Beteiligung des Na<sup>+</sup> - Einstroms via Na<sub>v</sub>1.5 hindeutet. Möglicherweise kommt es durch Sauerstoffradikale über eine Steigerung der Na<sup>+</sup> - Konzentration und der diastolischen Ca<sup>2+</sup> - Konzentration zunächst zu einer Aufladung des SR. Aufgrund einer gesteigerten RyR - Phosphorylierung kann dieser jedoch die gesteigerte Ca<sup>2+</sup> - Konzentration nur halten, wenn sich auch die Ca<sup>2+</sup> - Wiederaufnahme beschleunigt. Hierfür ist die SERCA verantwortlich. Bei CaMKII - Überexpression kommt es nun sowohl zu einer Ca<sup>2+</sup> - Überladung des Zytosols als auch des SR wodurch sich die Kontraktilität kurzfristig verbessert. In späteren Stadien, wenn die zytosolische Ca<sup>2+</sup> - Konzentration weiter steigt, kann die gesteigerte SERCA Aktivität dies nicht mehr kompensieren und die Differenz zwischen diastolischer und systolischer Ca<sup>2+</sup> - Konzentration wird wieder kleiner.



Abbildung 3.10.: Originalabbildung einer Kontraktion bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz. Zu Beginn unterschieden sich die beiden Zellen in der prozentualen Verkürzung nicht. Nach Radikalzugabe verbesserte sich die Kontraktion bei CaMKII - Überexpression zunächst. Später, nach weiterer Zunahme der Ca<sup>2+</sup> - Konzentration sistiert die Verkürzung komplett. In der diastolischen Zelllänge und deren Abnahme nach Radikalexposition unterscheiden sich die einzelnen Zellen nicht wesentlich.



Abbildung 3.11.: Zu Beginn der Messung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen Verkürzung der einzelnen Zellgruppen. Nach Radikalexposition wurde die Kontraktion bei CaMKII - Überexpression evt. aufgrund des stärkeren Ca<sup>2+</sup> - Anstiegs in diesen Zellgruppen zunächst besser. Wenig später verschlechterte sich die Verkürzung in allen Zellgruppen.

## 3.3.3. Thapsigargin

Um die Beteiligung des sarkoplasmatischen Retikulums an den Radikaleffekten weitergehend zu untersuchen, wurden zusätzliche Experimente mit Zusatz von Thapsigargin (5  $\mu$ mol/l) durchgeführt. Dies hemmt die SR - Ca<sup>2+</sup> - ATPase und führt so zunächst zu einer reduzierten SR - Ca<sup>2+</sup> - Aufnahme und im "steady state" letztlich zur Entleerung der SR - Ca<sup>2+</sup> - Speicher. Die Mittelwertdarstellung der Ca<sup>2+</sup> - Messungen mit Indo - 1 unter Verwendung des SR - Ca<sup>2+</sup> - ATPase Inhibitors Thapsigargin (Abbildung 3.12) zeigte zu Anfang keinen signifikanten Unterschied im diastolischen Ca<sup>2+</sup> - Gehalt der einzelnen Gruppen. Nach Zugabe der Radikale stieg das diastolische Ca<sup>2+</sup> in den CaMKII $\delta$ c - überexprimierenden Zellen wie erwartet an, in den mit Thapsigargin vorbehandelten Zellen war der Ca<sup>2+</sup> - Anstieg nicht mehr nachweisbar. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Radikale die Ca<sup>2+</sup> - Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum benötigen, um an der CaMKII $\delta$ c ihre Effekte zu vermitteln.



Abbildung 3.12.: Die diastolische Ca<sup>2+</sup> - Konzentration stieg in den nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Kontrollzellen nach Radikalzugabe, wie erwartet, signifikant an. Unter Verwendung des SERCA - Inhibitors Thapsigargin entstand kein signifikanter Effekt (\* P < 0.05).

# 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Wirkung von Sauerstoffradikalen am Herzen CaMKII $\delta$ c - vermittelt ist. Die Radikale führen über eine gesteigerte Ca<sup>2+</sup> - Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum zur CaMKII $\delta$ c Aktivierung. Dies bedingt eine Verstärkung des späten Na<sup>+</sup> - Stroms, was wiederum eine Na<sup>+</sup> - und schließlich Ca<sup>2+</sup> - Überladung der Zelle zur Folge hat und letztendlich zur Hyperkontraktur führt. Dieser Effekt ist bei Überexpression der CaMKII $\delta$ c deutlich verstärkt und bei Inhibition mit KN-93 deutlich gemindert. Dies ist von besonderer klinischer Relevanz, da sowohl die Radikalproduktion als auch die CaMKII $\delta$ c - Expression im herzinsuffizienten Myokard gesteigert ist.

# 4.1. Sauerstoffradikalwirkung und antioxidative Therapiemöglichkeiten

In den letzten Jahren haben sich die Erkenntnisse über die komplexen Effekte der freien Radikale bzw. radikalen Sauerstoffspezies in biologischen Systemen extrem erweitert. Sauerstoffradikale sind ein relativ neues Konzept in der Biologie, welches erst vor 50 Jahren überhaupt beschrieben und zu dieser Zeit wegen Beteiligung an Alterungsprozessen und Krebs noch sämtlich als schädlich eingestuft wurde (Commoner et al. 1954). Heute weiß man jedoch, dass die Wirkung von Sauerstoffradikalen sowohl zerstörerisch als unter Umständen auch protektiv sein kann. Eine große Anzahl an Literaturangaben belegt das Auftreten von Reperfusionsschäden, wenn Sauerstoff wieder in das zuvor ischämische Gewebe strömt (Hess und Manson 1984; Opie 1991; Park und Lucchesi 1999). Dieser Effekt wurde an Niere, Leber, Lunge, Darm und natürlich auch am Herzen beobachtet. Außerdem konnte auf Einzelzellebene ein vermehrter Zelltod in der Reperfusionsphase nachgewiesen werden (Vanden Hoek et al. 1996; Vanden Hoek et al. 1997a; Vanden Hoek et al. 1997b; Vanden Hoek et al. 1998; Becker et al. 1999; Vanden Hoek et al. 2000). Protektiv wirken Sauerstoffradikale möglicherweise über eine radikalinduzierte Präkon-

ditionierung der Gewebe in kurzen Hypoxiephasen, die diese vor weiteren Schäden bewahrt (Vanden Hoek et al. 1998). Neuere Studien zeigen, dass Sauerstoffradikale, auch wenn dies zunächst paradox erscheint, schon während der Ischämie entstehen (Kevin et al. 2003). Auch bei - für metabolische Prozesse - unzureichender Sauerstoffzufuhr ist immer noch molekularer Sauerstoff vorhanden. Ein Zustand absoluter Anoxie ist auch bei klinisch relevanter Ischämie äußerst unwahrscheinlich. Die Enzyme der Atmungskette verlieren dabei Elektronen direkt an diese Sauerstoffmoleküle und produzieren so eine große Menge an Superoxidanionen (Nohl und Jordan 1986). Der Entstehungsort von Sauerstoffradikalen in der Reperfusionsphase ist möglicherweise ein anderer und noch nicht eindeutig identifiziert (Becker 2004). Während die Beweislage für signifikante Reperfusionsschäden nach simulierter Ischämie in zellulären Systemen relativ gut ist, stellt sich die Situation für ganze Organe bzw. am Tiermodell etwas widersprüchlich dar. Jolly et al. berichteten schon in den 80er Jahren, dass Superoxiddismutase und Katalase während der frühen Reperfusionsphase die Infarktgröße 24 h nach Ischämie bei Hunden um die Hälfte verringern konnte (Jolly et al. 1984). Kurze Zeit später konnten Miura et al. im selben Ansatz bei Kaninchen 3 Tage nach Ischämie keinen signifikanten Effekt nachweisen (Miura et al. 1988). Horwitz et al. zeigten eine Reduktion der Infarktgröße durch Anwendung eines Antioxidans (2-mercaptoproprionyl-glycin) in der Reperfusionsphase bei Hunden um 60 % (Horwitz et al. 1994), während Miki et al. keinen protektiven Effekt der selben Substanz im Kaninchenmodell nachweisen konnte (Miki et al. 1999). Diese widersprüchlichen Ergebnisse werfen viele technische Fragen auf bezüglich Unterschiede in der Physiologie verschiedener Spezies, Techniken zur Ermittlung der Infarktgröße, unterschiedlicher pharmakologischer Interventionen, Zeitansatz für Ischämie und Reperfusion, Messmethoden zur Effektivität der Antioxidantien, usw. Entscheidend wäre, zu klären, ob die Zunahme der Schäden in der Reperfusionsphase tatsächlich erst zu dieser Zeit zustande kommt oder ob schon während der Ischämie der unausweichliche Zelltod programmiert wurde, der eben erst bei Reperfusion manifest wird. Nach wie vor ist also unklar, ob die auf zellulärer Ebene beobachteten Effekte im ganzen Tier überhaupt in gleicher Weise vorhanden sind. Um daraus effektive klinische Therapieformen zu entwickeln, muss zunächst das Gesamtverständnis der Radikalentstehung und -wirkung noch deutlich erweitert werden. Möglicherweise sind klinische Anwendungen antioxidativer Substanzen fehlgeschlagen, weil sie manche Gewebe zwar schützen, aber in angrenzenden Bereichen zusätzliche Schäden verursachen. Ein Infarkt ist kein homogener Bereich. Manche Bezirke sind mehr, manche weniger vom Sauerstoffmangel betroffen. Daher wäre denkbar, dass Zonen größter Ischämie von Antioxidantien profitieren, während angrenzenden Bereichen die radikalinduzierte Präkonditionierung fehlt (Vanden Hoek et al. 2000). Aus diesem Grund gestaltet sich die effektive anti-radikale Therapie äußerst schwierig, da spezifische Ansätze zum Einsatz kommen sollten, die auf eine spezielle Gruppe Radikale oder ein Zellkompartiment zugeschnitten sind und außerdem zum genau richtigen Zeitpunkt eingesetzt werden müssten um zuverlässigen klinischen Erfolg zu erreichen (Becker 2004). Da dies fast unmöglich scheint, muss die Radikalwirkung aus anderen Perspektiven betrachtet werden. Diese Arbeit bietet einen solch neuen Ansatz, die Wirkung von Sauerstoffradikalen in Herzmuskelzellen genauer zu analysieren.

# 4.2. Sauerstoffradikal-bedingte Effekte auf den zellulären Natriumhaushalt und den Einfluss der CaMKⅢδc

## 4.2.1. Der späte Na<sup>+</sup> - Strom

Sauerstoffradikale verursachen eine Verstärkung des späten Na<sup>+</sup> - Stroms. Ma et al. demonstrierten bereits 2004 in ventrikulären Kardiomyozyten von Meerschweinchen eine konzentrationsabhängige Steigerung des späten  $Na^+$  - Stroms durch  $H_2O_2$  (Ma et al. 2004). Song et al. bestätigten dieses Ergebnis zwei Jahre später an Meerschweinchen und Kaninchen, und brachten diesen Effekt in Verbindung mit Störungen der elektromechanischen Kopplung und kontraktiler Dysfunktion. Interessanterweise waren die radikalinduzierten Effekte durch Blockade des späten Na<sup>+</sup> - Stroms mittels Ranolazin reversibel (Song et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine signifikante Verstärkung des späten Na<sup>+</sup> - Stroms durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Exposition gezeigt werden. In den Zellen mit CaMKII $\delta c$  - Überexpression war die Radikalwirkung signifikant stärker ausgeprägt, was auf eine Beteiligung des Enzyms an dieser Effektkaskade hindeutet. Schon zu Beginn der Messung, ohne Radikalwirkung, war der späte Na<sup>+</sup> - Strom in der CaMKII $\delta c$ - Gruppe stärker ausgeprägt. Dies bestätigt Ergebnisse von Wagner et al. aus dem Jahr 2006. Dort wurde, sowohl bei akuter Überexpression in Kaninchenmyozyten als auch bei chronischer Überexpression im Maus - Modell, gezeigt, dass der späte Na<sup>+</sup> - Strom sowie in der Folge auch die intrazelluläre Na<sup>+</sup> - Konzentration bei vermehrter Expression der CaMKII $\delta$ c erhöht ist. Es wurde damals postuliert, dass es sich hierbei um einen möglicherweise durch Phosphorylierung der  $\alpha$  - Untereinheit des Natriumkanals vermit-

telten direkten CaMKII-bedingten Effekt handeln könnte. Eine Hemmung der CaMKII konnte sowohl die Steigerung des späten Natriumstroms, als auch die erhöhte intrazelluläre Na<sup>+</sup> - Konzentration zumindest im akuten Überexpressionsmodell der CaMKII (Kaninchen) nahezu komplett verhindern (Wagner et al. 2006). Neben einer Steigerung des späten Natriumeinstroms konnten Wagner et al. weitere CaMKII $\delta$ c - bedingte Effekte auf das Natriumkanal-Gating nachweisen. So wurde auch der Spitzennatriumstrom ("Peak  $I_{Na}$ ") beeinflußt, die Natriumkanalverfügbarkeit reduziert, die intermediäre Inaktivierung beschleunigt und die Erholung nach Inaktivierung verzögert (Wagner et al. 2006). Ähnliche Störungen der Inaktivierung konnten in kultivierten atrialen Kardiomyozyten von Mäusen (HL-1), in HEK 293 Zellen, wie auch in vitalen Kardiomyozyten aus der epikardialen Grenzzone eines Herzinfarktes in Hunden nachgewiesen werden (Fukuda et al. 2005). In solchen Grenzzonen ist die Radikalentstehung extrem gesteigert (Fukuda et al. 2005). Kürzlich konnte darüberhinaus direkt nachgewiesen werden, dass Sauerstoffradikale das Gating des Na<sup>+</sup> - Kanals beeinflussen. Die Autoren argumentierten, dass dies möglicherweise über Veränderungen der Membran (Lipid Peroxidation) geschieht. Denkbar wäre jedoch auch die Vermittlung über second messenger wie z.B. die CaMKII (Boyden et al. 2007).

### 4.2.2. Die intrazelluläre Na<sup>+</sup> - Konzentration

Auch in dieser Arbeit resultierte aus der Verstärkung des späten  $Na^+$  - Einstroms eine Erhöhung der intrazellulären  $Na^+$  - Konzentration. Beides war schon vor Radikalzugabe in den CaMKII $\delta c$  - überexprimierenden Zellen höher und bestätigt damit vorpublizierte Daten (Wagner et al. 2006). Nach Zugabe der radikalen Sauerstoffspezies fanden sich eine Steigerung des späten Natriumstroms sowie ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration (Abbildung 3.1). Die vorliegende Arbeit konnte jedoch erstmals zeigen, dass gesteigerte CaMKII $\delta c$  - Level diese Radikal - bedingte Steigerung des späten Natriumstroms und in der Folge die intrazelluläre Natriumakkumulation signifikant verstärken. Mehr noch, die Hemmung der CaMKII $\delta c$  mittels AIP konnte die Radikal vermittelten Effekte auf späten Natriumstrom und Natriumkonzentration nahezu verhindern bzw. deutlich verzögern (Abbildung 3.2). Dies lässt auf eine direkte Beteiligung der CaMKII $\delta c$  an den ROS - vermittelten Effekten auf den Natriumhaushalt der Zelle schließen. Aufgrund ihrer integrativen Funktion stellt die CaMKII $\delta c$  möglicherweise einen zentralen Second - messenger für Sauerstoffradikale dar (siehe unten). Die Tatsache, dass Ranolazin, ein Hemmstoff des späten Natriumstroms ebenfalls die intrazelluläre Natriumakkumulation verhindern konnte, bestätigt den ursächlichen Zusammenhang zwischen Natriumioneneinstrom über spannungsabhängige Natriumkanäle und zellulärer Natriumkonzentration.

# 4.2.3. Einfluss von Sauerstoffradikalen und CaMKII $\delta$ c auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> - Konzentration

Die Beziehung zwischen post-ischämischen Radikal-vermittelten Schäden am Myokard und intrazellulärer  $Ca^{2+}$  - Überladung war lange unklar. 1991 gelang es Josephson et al. nachzuweisen, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Exposition in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte zu einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> - Konzentration und schließlich zur Hyperkontraktur führt (Josephson et al. 1991). Als Ursache der Kalziumüberladung wird eine intrazelluläre Natriumakkumulation mit in der Folge Aktivierung des Natrium/Kalzium - Austauschers und Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum angeschuldigt (Bers und Weber 2002, Wagner et al. 2006). Hierfür spricht, dass eine Hemmung des NCX mittels KB-R7943 den Anstieg der Kalziumkonzentration und die Hyperkontrakturentwicklung verlangsamen bzw. aufhalten kann (Inserte et al. 2002, McDonald und Howlett 2008, Wagner et al. 2003). Umgekehrt führt eine Steigerung der NCX - Dichte in der Membran - wie sie auch bei Herzinsuffizienz gefunden wird (Pogwizd et al. 2000) zu einer signifikanten Steigerung der zellulären Empfindlichkeit gegenüber radikaler Sauerstoffspezies (Wagner et al. 2003). Auch in der vorliegenden Arbeit kam es unter ROS - Exposition zu einer signifikanten Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Interessanterweise war diese Steigerung nach Überexpression der CaMKII $\delta$ c massiv verstärkt und konnte durch CaMKII $\delta$ c - Inhibition auf das Kontrollniveau abgesenkt werden (Abbildung 3.9). Dies lässt darauf schließen, dass die CaMKII& analog zu den Radikal - bedingten Effekten auf den späten Natriumeinstrom und die Natriumkonzentration einen entscheidenden Anteil an dieser Entwicklung hat. Aufgrund der zellulären Hyperkontraktur von Einzelzellen im Gewebeverband kommt es zu einer Beeinträchtigung der myokardialen Funktion und einer Begünstigung von Arrhythmien. Bereits 2006 konnten Arbeiten an isolierten Langendorff - perfundierten Rattenherzen zeigen, dass eine  $CaMKII\delta c$  - Inhibition nach Ischämie und anschließender Reperfusion die Kontraktiliät verbessert und den Zelltod reduziert (Vila-Petroff et al. 2007).

# 4.2.4. Einfluss von Sauerstoffradikalen und CaMKII∂c auf die Kontraktilität

Wagner et al. konnten 2003 zeigen, dass es unter ROS Exposition zu einer Annäherung der diastolischen  $Ca^{2+}$  - Konzentration an die systolische mit der daraus resultierenden Abnahme der  $Ca^{2+}$  - Transienten kommt. Kurz vor der Hyperkontrakturentwicklung verschwindet der  $Ca^{2+}$  - Transient vollständig. Damit einher ging ein Sistieren der regelmäßigen Zellverkürzung. Diese Effekte konnten auch in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Unter Radikalexposition nahm die diastolische Zelllänge ab, die Zellverkürzung wurde schlechter und die beschriebene Verminderung des Kalziumtransienten stellte sich ein. Mit Angleichung von systolischer und diastolischer Kalziumkonzentration kam es zum Kontraktionsstillstand und letztendlich zur Hyperkontraktur. Interessanterweise zeigte sich bei CaMKII - Überexpression zu Beginn der Radikalwirkung eine kurzzeitige Verbesserung der Kontraktion. Dies könnte auf den nachgewiesenen schnelleren  $Ca^{2+}$  - Anstieg in dieser Gruppe zurückzuführen sein.

# 4.2.5. Die Bedeutung des Sarkoplasmatischen Retikulums für die Radikal-vermittelte Zytotoxizität

Es ist bekannt, dass in der Herzinsuffizienz die SR Ca<sup>2+</sup> Aufnahme, Speicherung und Abgabe reduziert ist (Hobai und O'Rourke 2001, Pieske et al.1996). Eine verminderte SR Ca<sup>2+</sup> Beladung ließe sich unter anderem mit der schlechteren SERCA Funktion oder aufgrund des vermehrten Ca<sup>2+</sup> Verlust durch erhöhte NCX - Aktivität erklären (Hasenfuß et al. 1994, Studer et al. 1994). Darüber hinaus konnte ein verstärktes SR Ca<sup>2+</sup> Leck und eine geminderte Ca<sup>2+</sup> Beladung in verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen direkt nachgewiesen werden (Shannon et al. 2003, Yamamoto et al. 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass chronisch sympathische Überstimulation zu einer vermehrten PKA Phosphorylierung an Ser2808 und einer herabgesetzten Bindung der kanalstabilisierenden Untereinheit Calstabin2 (FKBP12.6) führt, was zu einer weiteren Verstärkung des diastolischen Ca<sup>2+</sup> Lecks beiträgt (Marx et a. 2000, Reiken et al. 2001, Yano et al. 2000). An dieser Stelle setzt die Therapie mit  $\beta$  - Blockern an, die die kardiale Funktion nachgewiesenermaßen bessern und die Mortalität senken kann (Packer et al. 2001), in dem sie die chronische Hyperphosphorylierung des RyR2 verhindert, so indirekt die Calstabin Bindung verbessert und das Ca<sup>2+</sup> - Leck reduziert (Reiken et al. 2001).

Auch die CaMKII - abhängige Phosphorylierung des Ryanodin - Rezeptors (RyR2)
führt zu einem erheblichen diastolischen SR -  $Ca^{2+}$  - Leck (Wehrens et al. 2004). CaM-KII - Überexpression verstärkt diesen Effekt weiter (Kohlhaas et al. 2006). In CaMKII transgenen Mäusen kommt es zu einem erhöhten  $Ca^{2+}$  - Verlust aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, welcher zumindest in jungen Mäusen, die noch keine klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz aufwiesen, durch Inhibition der CaMKII verringert werden konnte (Maier et al. 2003).

Radikalexposition steigert ebenfalls die Einzelkanalöffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 (Boraso und Williams 1994), wobei die Oxidation von Cysteinresten zur Aktivierung des Kanals führt (Xu et al. 1998). Möglicherweise können ROS zentrale Anteile des RyR2 direkt oxidieren, eine gestörte Interdomänen - Interaktion bedingen und in der Folge die RyR2 - Öffnungswahrscheinlichkeit steigern. Eine radikal - bedingte  $Ca^{2+}$  - Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum könnte die CaMKII $\delta c$  - Aktivität triggern, was die beobachteten Effekte auf späten Natriumstrom, Natrium- und Kalziumkonzentration dann zur Folge hätte.

Um die Frage zu beantworten, ob die radikalvermittelte SR -  $Ca^{2+}$  - Freisetzung an der Signalkaskade, die schließlich zur Kalziumüberladung führt, beteiligt ist, wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Experimente unter SERCA - Blockade mit Hilfe von Thapsigargin durchgeführt. Dabei war nach Radikalexposition kein signifikanter Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration mehr zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise der radikal - bedingten CaMKII $\delta$ c Aktivierung eine Freisetzung von Kalzium aus dem SR vorrausgehen muss. Um diesen Zusammenhang zu beweisen, sind weitere Experimente vonnöten. Dies hätte allerdings den Umfang der vorliegenden Dissertation deutlich überschritten. Erste Experimente unserer Arbeitsgruppe konnten bereits eine verstärkte Autophosphorylierung und damit Aktivierung der CaMKII $\delta$ c nach Radikalexposition nachweisen. Diese Verstärkung der Autophosphorylierung war nach Ausschaltung des SR mittels Thapsigargin oder massiver Ca<sup>2+</sup> - Pufferung mittels BAPTA nicht mehr nachweisbar (Weber et al. 2008).

#### 4.2.6. Direkte CaMKII - Aktivierung nach Radikalexposition?

Obwohl sich Hinweise auf eine pathophysiologisch relevante Rolle der CaMKIIδc bei der Herzinsuffizienzentstehung und ihre Bedeutung für das Fortschreiten der Erkrankung verdichten, ist immernoch unklar, wie es zur CaMKII - Aktivierung kommt und welches die genauen Signalwege sind, die letztendlich zur Herzinsuffizienz führen. Möglicherweise spielen reaktive Sauerstoffspezies hierbei eine wichtige Rolle. Erste Hinweise auf eine direkte Aktivierung der CaMKII durch Sauerstoffradikale wurden 2005 auf der Tagung der "American Heart Association" in Dallas, Texas präsentiert (Oddis et al. 2005). Kürzlich erschien die zugehörige Veröffentlichung und bestätigt die vorherigen Ergebnisse umfassend in vitro und in vivo. Die Radikalgenerierung erfolgte dabei über Angiotensin II vermittelte Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase (Doerries et al. 2007) bzw. durch Exposition mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dabei können Sauerstoffradikale die durch CaM aktivierte CaMKII an M281/282 oxidieren und damit zur autonomen Aktivierung führen (ähnlich der Phosphorylierung). Es konnte gezeigt werden, dass ein CaMKII - Knockdown in isolierten Kardiomyozyten von Ratten gegen Radikalschäden schützt. Außerdem ist Radikal-induzierte  $CaMKII\delta c$  - Aktivität im  $CaMKII\delta c$  - Aktivitätsessay zwar unter  $Ca^{2+}$  - Pufferung mit EGTA noch deutlich, aber interessanterweise ganz ohne Ca<sup>2+</sup>/CaM praktisch nicht mehr vorhanden (Erickson et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit war, wie in 3.3.3 erwähnt, kein signifikanter  $Ca^{2+}$  - Anstieg unter Entleerung des intrazellulären  $Ca^{2+}$  - Speichers durch Thapsigargin zu verzeichnen. Dies passt zu der Annahme, dass der CaMKII $\delta$ c -Aktivierung durch Sauerstoffradikale (CaMKII Oxidation) die vorhergehende Aktivierung durch CaM unbedingt vorausgehen muss. Auch in Endothelzellen ist die CaMKII an der Radikal-vermittelten Induktion der endothelialen NO - Synthase beteiligt. Dieser Vorgang ist dabei ebenfalls kalziumabhängig und konnte durch Inhibition der CaMKII gestoppt werden (Cai et al. 2001), ebenso in Betazellen des Pankreas. Dort konnte eine zur Apoptose führende, kalziumabhängige, Radikal-induzierte Aktivierung der CaMKII nachgewiesen werden, welche durch starke Kalziumpuffer und Hemmung der CaMKII unterbunden werden konnte (Choi et al. 2006). Das für die CaMKII - Aktivierung nötige Ca<sup>2+</sup> stammt möglicherweise aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum.

#### 4.3. Ranolazin

In den durchgeführten Experimenten verhindert Ranolazin durch Hemmung des späten  $Na^+$  - Einstroms den Radikal - induzierten Anstieg der intrazellulären  $Na^+$  - und  $Ca^{2+}$  - Konzentration. Dies bestätigen mehrere Vorbefunde: Zum Beispiel konnte an isolierten perfundierten Rattenherzen demonstriert werden, dass Ranolazin in der Lage ist, eine durch ATX-II (Anemonia Sulcata Toxin II), induzierte Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$  zu vermindern (Fraser et al. 2006). ATX verursacht ähnlich wie Sauerstoffradikale eine Verstärkung des späten  $Na^+$  - Stroms und löst somit eine intrazellulären  $Na^+$ 

- Überladung aus. In Muskelstreifenpräparaten von herzinsuffizienten menschlichen Explantaten war Ranolazin in der Lage, die diastolische Dysfunktion um ca. 30 % zu verbessern, ohne den SR - Ca<sup>2+</sup> - Gehalt zu beeinflussen, also ohne negativ inotropen Effekt auf die Kontraktilität. Außerdem konnten in derselben Arbeit auch ATX - Effekte, wie eine Verstärkung des späten Na<sup>+</sup> - Einstroms, sowie Na<sup>+</sup> - und Ca<sup>2+</sup> - Anstieg, in isolierten ventrikulären Kaninchenmyozyten durch Ranolazin verringert werden (Sossalla et al. 2008). Auch antiarrhythmische Effekte von Ranolazin sind *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. In isolierten Herzen von Meerschweinchen vermindert Ranolazin ATX induzierte ventrikuläre Arrhythmien und reduziert die Aktionspotentialdauer (Wu L. et al. 2004). Außerdem konnte in der kürzlich erschienenen MERLIN - TIMI 36 Studie die Anzahl erneuter Ischämien und das Auftreten von Arrhythmien an 6560 Patienten mit akutem Koronarsyndrom signifikant reduziert werden (Morrow et al. 2007).

### 4.4. Herzinsuffizienz

In dieser Arbeit konnte erstmalig eine Beteiligung der CaMKII $\delta c$  an radikal-induzierten Effekten am Myokard gezeigt werden. Dies ist von besonderer Bedeutung bei Herzinsuffizienz, da schon längere Zeit bekannt ist, dass oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Herzinsuffizienz spielt. Die enorme Menge an Sauerstoffradikalen entsteht hierbei hauptsächlich in den Mitochondrien (Ide et al. 1999). Myozyten aus insuffizienten Herzen sind dabei auch wesentlich anfälliger für radikal-induzierte Schäden. Die Hyperkontrakturentwicklung erfolgt dabei früher als in gesunden Zellen (Tsutsui et al. 2001). Außerdem ist bekannt, dass chronische Herzinsuffizienz den späten Na<sup>+</sup> -Strom verstärkt und verlängert und so zu Na<sup>+</sup> - Überladung und erhöhter Aktionspotentialvariabilität beiträgt (Maltsev et al. 2007). Die Funktion der  $Na^+/K^+$  - ATPase ist dabei nicht beeinträchtigt (Despa et al. 2002), die Expression des NCX allerdings hochreguliert (Pogwizd et al. 1999), sodass dieser vor allem zur Elimination von Na<sup>+</sup> aus dem Zytosol beiträgt und damit im Gegenzug die Ca<sup>2+</sup> - Überladung der Zelle fördert. Einen therapeutischen Ansatz in diesem Fall könnte der Inhibitor des späten Na<sup>+</sup> -Stroms Ranolazin darstellen. Ranolazin ist in der Lage, in isolierten Kardiomyozyten von Hunden den späten Na<sup>+</sup> - Strom zu inhibieren, die Aktionspotentialdauer zu verkürzen und Nachkontraktionen zu verhindern (Undrovinas et al. 2006). In der klinischen Anwendung konnte das antiarrhythmische Potential von Ranolazin bestätigt werden (Morrow et al. 2007). Überdies ist bekannt, dass eine Überexpression der CaMKII $\delta$ c in transgenen Mäusen zu dilatativer Kardiomyopathie führt, was mit einem vorzeitigen Tod einhergeht. Die aus diesen Herzen isolierten Kardiomyozyten sind vergrößert und fallen durch verminderte Kontraktilität und veränderte  $Ca^{2+}$  - Homöostase auf (Zhang et al. 2003).

# 5. Zusammenfassung

Sauerstoffradikale sind an einer Reihe von pathologischen Vorgängen beteiligt, wie z.B. an Ischämie, der darauffolgenden Reperfusionsphase, an Alterungsprozessen sowie bei Herzinsuffizienz. Sie verursachen Zellschäden, haben allerdings auch wichtige Funktionen in Signaltransduktionswegen. Sauerstoffradikale erhöhen die intrazelluläre Na<sup>+</sup>- und in der Folge auch die intrazelluläre  $Ca^{2+}$  - Konzentration, was letztendlich zur Hyperkontraktur führt. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Beteiligung der Kalzium - Calmodulin - abhängigen - Proteinkinase II  $\delta c$  (CaMKII $\delta c$ ) an der Radikal-vermittelten Zytotoxizität in ventrikulären Kaninchenmyozyten. Zu diesem Zweck wurde die CaMKII $\delta$ c in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von Kaninchen mittels adenoviralem Gentransfer akut überexprimiert. In diesen Zellen wurde unter Radikalexposition der späte Na<sup>+</sup> - Strom mit Hilfe der Whole-cell-Patch-Clamp-Technik untersucht, ebenso wie der intrazelluläre Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup> - Stoffwechsel mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Zum Test der Gegenhypothese wurden die Inhibitoren KN-93 und Ranolazin eingesetzt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Sauerstoffradikale über eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Aktivierung der CaMKIIδc eine Verstärkung des späten Na<sup>+</sup> - Stroms verursachen, was wiederum eine  $Na^+$  - und  $Ca^{2+}$  - Überladung der Zelle bedingt und letztendlich zur Hyperkontraktur führt. Dieser Effekt war bei Überexpression der CaMKII deutlich verstärkt und bei Inhibition mit KN-93 und Ranolazin deutlich gemindert. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Radikalschäden CaMKII $\delta c$  - vermittelt sind. Dies ist von klinischer Relevanz, da in herzinsuffizientem Myokard sowohl die Radikalproduktion als auch die CaMKII $\delta c$  - Expression gesteigert ist. Die genauen Mechanismen der CaMKII $\delta c$  - Aktivierung sowie die Auswirkungen der Radikaleffekte in vivo müssen jedoch Gegenstand weiterer Forschung sein, um ein genaueres Verständnis der Bedeutung der CaMKII $\delta c$  für die Radikal-vermittelten Schäden am Myokard zu erlangen und damit die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze voranzutreiben.

## 6. Literaturverzeichnis

Atkins PW und RS Friedman: "Molecular Quantum Mechanics", Oxford University Press, Oxford 2004.

**Becker** LB (2004). "New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology." Cardiovasc Res 61(3): 461-70.

**Becker** LB, TL Vandenhoek, ZH Shao, CQ Li und PT Schumacker (1999). "Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion." Am J Physiol 277(6 Pt 2): H2240-6.

Bers DM (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling" Nature 415(6868):198-205 Bers DM und CR Weber (2002). "Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes."Ann N Y Acad Sci 976: 500-12.

**Boraso** A und AJ Williams (1994). "Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel by H2O2 and dithiothreitol." Am J Physiol 267(3 Pt 2): H1010-6.

**Boyden** PA, SS Davies, PC Viswanathan, V Amarnath, JR Balser, LJ Roberts 2nd (2007). "Potential role of isoketals formed via the isoprostane pathway of lipid peroxidation in ischemic arrhythmias"J Cardiovasc Pharmacol. 50(5):480-6

Cai H, ME Davis, GR Drummond und DG Harrison (2001). "Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(10): 1571-6.

**Chaitman** BR, SL Skettino, JO Parker, P Hanley, J Meluzin, J Kuch, CJ Pepine, W Wang, JJ Nelson, DA Hebert und AA Wolff (2004). "Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina." J Am Coll Cardiol 43(8): 1375-82.

**Choi** SE, SH Min, HC Shin, HE Kim, MW Jung und Y Kang (2006). "Involvement of calcium-mediated apoptotic signals in H2O2-induced MIN6N8a cell death." Eur J Pharmacol 547(1-3): 1-9.

Clancy CE, M Tateyama und RS Kass (2002). "Insights into the molecular mechanisms

of bradycardia-triggered arrhythmias in long QT-3 syndrome." J Clin Invest 110(9): 1251-62.

**Commoner** B, J Townsend und GE Pake (1954). "Free radicals in biological materials." Nature 174(4432): 689-91.

**Despa** S, MA Islam, CR Weber, SM Pogwizd und DM Bers (2002). "Intracellular Na(+) concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged." Circulation 105(21): 2543-8.

**Doerries** C, K Grote, D Hilfiker-Kleiner, M Luchtefeld, A Schaefer, SM Holland, S Sorrentino, C Manes, B Schieffer, H Drexler und U Landmesser (2007). "Critical role of the NAD(P)H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction." Circ Res 100(6): 894-903.

Donahue JK, K Kikkawa, DC Johns, E Marban und JH Lawrence (1997). "Ultrarapid, highly efficient viral gene transfer to the heart." Proc Natl Acad Sci U S A 94(9): 4664-8.
Edman CF und H Schulman (1994). "Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulindependent protein kinase isoforms." Biochim Biophys Acta 1221(1): 89-101.

Erickson JR, ML Joiner, X Guan, W Kutschke, J Yang, CV Oddis, RK Bartlett, JS Lowe, SE O'Donnell, N Aykin-Burns, MC Zimmerman, K Zimmerman, AJ Ham, RM Weiss, DR Spitz, MA Shea, RJ Colbran, PJ Mohler und ME Anderson (2008). "A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation." Cell 133(3): 462-74.

Feuer EJ, LM Wun, CC Boring, WD Flanders, MJ Timmel und T Tong (1993). "The lifetime risk of developing breast cancer." J Natl Cancer Inst 85(11): 892-7.

**Fraser** H, L Belardinelli, L Wang, PE Light, JJ McVeigh und AS Clanachan (2006). "Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts." J Mol Cell Cardiol 41(6): 1031-8.

**Fukuda** K, SS Davies, T Nakajima, BH Ong, S Kupershmidt, J Fessel, V Amarnath, ME Anderson, PA Boyden, PC Viswanathan, LJ Roberts, 2nd und JR Balser (2005). "Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels." Circ Res 97(12): 1262-9.

Giordano FJ (2005). "Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure." J Clin Invest 115(3): 500-8.

Gralinski MR, SC Black, KS Kilgore, AY Chou, JG McCormack und BR Lucchesi

(1994). "Cardioprotective effects of ranolazine (RS-43285) in the isolated perfused rabbit heart." Cardiovasc Res 28(8): 1231-7.

Hasenfuss G, H Reinecke, R Studer, M Meyer, B Pieske, J Holtz, C Holubarsch, H Posival, H Just und H Drexler (1994). "Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium." Circ Res 75(3): 434-42.

Hess ML und NH Manson (1984). "Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury." J Mol Cell Cardiol 16(11): 969-85.

**Hobai** IA und B O'Rourke (2001). "Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure."Circulation 103(11): 1577-84.

Hoch B, R Meyer, R Hetzer, EG Krause und P Karczewski (1999). "Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional  $Ca^{2+}/calmodulin-dependent$  protein kinase in failing and nonfailing human myocardium." Circ Res 84(6): 713-21.

Horwitz LD, PV Fennessey, RH Shikes und Y Kong (1994). "Marked reduction in myocardial infarct size due to prolonged infusion of an antioxidant during reperfusion." Circulation 89(4): 1792-801.

Howe CJ, MM Lahair, JA McCubrey und RA Franklin (2004). "Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases." J Biol Chem 279(43): 44573-81.

ICD-10 WHO International Statistical Classification of Diseases and related Health Problems 2007.

Ide T, H Tsutsui, S Kinugawa, H Utsumi, D Kang, N Hattori, K Uchida, K Arimura, K Egashira und A Takeshita (1999). "Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium." Circ Res 85(4): 357-63. Ide T, H Tsutsui, S Kinugawa, N Suematsu, S Hayashidani, K Ichikawa, H Utsumi, Y Machida, K Egashira und A Takeshita (2000). "Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium." Circ Res 86(2): 152-7.

Inserte J, D Garcia-Dorado, M Ruiz-Meana, F Padilla, JA Barrabés, P Pina, L Agulló, HM Piper, J Soler-Soler (2002). "Effect of inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death" Cardiovasc Res. 55(4):739-48.

Ishida A, I Kameshita, S Okuno, T Kitani und H Fujisawa (1995). "A novel highly spe-

cific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II." Biochem Biophys Res Commun 212(3): 806-12.

Ishii A, K Kiuchi, R Kobayashi, M Sumi, H Hidaka und T Nagatsu (1991). "A selective  $Ca^{2+}/calmodulin-dependent$  protein kinase II inhibitor, KN-62, inhibits the enhanced phosphorylation and the activation of tyrosine hydroxylase by 56 mM K+ in rat pheochromocytoma PC12h cells." Biochem Biophys Res Commun 176(3): 1051-6.

Jett MF, CM Schworer, M Bass und TR Soderling (1987). "Identification of membranebound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart." Arch Biochem Biophys 255(2): 354-60.

**Jolly** SR, WJ Kane, MB Bailie, GD Abrams und BR Lucchesi (1984). "Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase." Circ Res 54(3): 277-85.

**Josephson** RA, HS Silverman, EG Lakatta, MD Stern und JL Zweier (1991). "Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes." J Biol Chem 266(4): 2354-61.

**Kevin** LG, AK Camara, ML Riess, E Novalija und DF Stowe (2003). "Ischemic preconditioning alters real-time measure of O2 radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol 284(2): H566-74.

Kohlhaas M, T Zhang, T Seidler, D Zibrova, N Dybkova, A Steen, S Wagner, L Chen, JH Brown, DM Bers und LS Maier (2006). "Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes." Circ Res 98(2): 235-44.

Koulkes-Pujo AM, M Moreau und J Sutton (1981). "Methane formation from the reactions of hydroxyl radicals and hydrogen atoms with dimethyl sulfoxide (DMSO)." FEBS Lett 129(1): 52-4.

Lakowicz JR: "Principles of Fluorescence Spectroscopy". Plenum Press, New York 1983. Levi AJ, CO Lee und P Brooksby (1994). "Properties of the fluorescent sodium indicator "SBFI," in rat and rabbit cardiac myocytes." J Cardiovasc Electrophysiol 5(3): 241-57. Light PE., CH Wallace und JR Dyck (2003). "Constitutively active adenosine monophosphate-

activated protein kinase regulates voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes." Circulation 107(15): 1962-5.

Lloyd-Jones DM, MG Larson, EP Leip, A Beiser, RB D'Agostino, WB Kannel, JJM Murabito, RS Vasan, EJ Benjamin und D Levy (2002). "Lifetime risk for developing con-

gestive heart failure: the Framingham Heart Study." Circulation 106(24): 3068-72.

Lowes BD, W Minobe, WT Abraham, MN Rizeq, TJ Bohlmeyer, RA Quaife, RL Roden, DL Dutcher, AD Robertson, NF Voelkel, DB Badesch, BM Groves, EM Gilbert und MR Bristow (1997). "Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium." J Clin Invest 100(9): 2315-24.

**Ma** JH, XP Wang und PH Zhang (2004). "[Nitric oxide increases persistent sodium current of ventricular myocytes in guinea pig during normoxia and hypoxia]." Sheng Li Xue Bao 56(5): 603-8.

Maier LS und DM Bers (2002). "Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond." J Mol Cell Cardiol 34(8): 919-39.

Maier LS, B Pieske und DG Allen (1997). "Influence of stimulation frequency on [Na<sup>+</sup>] i and contractile function in Langendorff-perfused rat heart." Am J Physiol 273(3 Pt 2): H1246-54.

Maier LS, T Zhang, L Chen, J DeSantiago, JH Brown und DM Bers (2003). "Transgenic CaMKIIdeltaC overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release." Circ Res 92(8): 904-11.

Maltsev VA, HN Sabbah, RS Higgins, N Silverman, M Lesch und AI Undrovinas (1998). "Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes." Circulation 98(23): 2545-52.

Maltsev VA, N Silverman, HN Sabbah und AI Undrovinas (2007). "Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability." Eur J Heart Fail 9(3): 219-27.

Maltsev VA und A Undrovinas (2008). "Late sodium current in failing heart: friend or foe?" Prog Biophys Mol Biol 96(1-3): 421-51.

Mamiya N, JR Goldenring, Y Tsunoda, IM Modlin, K Yasui, N Usuda, T Ishikawa, A Natsume und H Hidaka (1993). "Inhibition of acid secretion in gastric parietal cells by the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor KN-93." Biochem Biophys Res Commun 195(2): 608-15.

Marx SO, S Reiken, Y Hisamatsu, T Jayaraman, D Burkhoff, N Rosemblit und AR Marks (2000). "PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts."Cell 101(4): 365-76. McDonald AC und SE Howlett (2008). "Differential effects of the sodium calcium ex-

change inhibitor, KB-R7943, on ischemia and reperfusion injury in isolated guinea pig ventricular myocytes". Eur J Pharmacol 580(1-2):214-23

Meyer T, PI Hanson, L Stryer und H Schulman (1992). "Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase." Science 256(5060): 1199-202.

Miki T, MV Cohen und JM Downey (1999). "Failure of N-2-mercaptopropionyl glycine to reduce myocardial infarction after 3 days of reperfusion in rabbits." Basic Res Cardiol 94(3): 180-7.

Miller SG und MB Kennedy (1986). "Regulation of brain type II  $Ca^{2+}/calmodulin-$ dependent protein kinase by autophosphorylation: a  $Ca^{2+}$ -triggered molecular switch." Cell 44(6): 861-70.

Miura T, JM Downey, D Hotta und O Iimura (1988). "Effect of superoxide dismutase plus catalase on myocardial infarct size in rabbits." Can J Cardiol 4(8): 407-11.

Morrow DA, BM Scirica, E Karwatowska-Prokopczuk, SA Murphy, A Budaj, S Varshavsky, AA Wolff, A Skene, CH McCabe und E Braunwald (2007). "Effects of ranolazine on recurrent cardiovascular events in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: the MERLIN-TIMI 36 randomized trial." JAMA 297(16): 1775-83.

Moss AJ, W Zareba, KQ Schwarz, S Rosero, S McNitt, JL Robinson (2008). "Ranolazine shortens repolarization in patients with sustained inward sodium current due to type-3 long-QT syndrome.". J Cardiovasc Electrophysiol 19(12):1289-93.

Mulieri LA, G Hasenfuss, F Ittleman, EM Blanchard und NR Alpert (1989). "Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime." Circ Res 65(5): 1441-9.

**Nattel** S, A Maguy, S Le Bouter und YH Yeh (2007). "Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation." Physiol Rev 87(2): 425-56.

Nohl H und W Jordan (1986). "The mitochondrial site of superoxide formation." Biochem Biophys Res Commun 138(2): 533-9.

**Oddis** CV, RK Bartlett, Y Yang, WH Thiel, CE Grueter, RJ Colbran und ME Anderson: "Reactive Oxygen Intermediates directly regulate CaMKII in the Heart". American Heart Association Congress. Dallas, Texas, USA 2005.

**Opie** LH (1991). "Reperfusion injury–fad, fashion, or fact?" Cardiovasc Drugs Ther 5 Suppl 2: 223-4.

Packer M, AJ Coats, MB Fowler, HA Katus, H Krum, P Mohacsi, JL Rouleau, M

Tendera, A Castaigne, EB Roecker, MK Schultz, DL DeMets; Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group (2001). "Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure" N Engl J Med. 344(22):1651-8

**Park** JL und BR Lucchesi (1999). "Mechanisms of myocardial reperfusion injury." Ann Thorac Surg 68(5): 1905-12.

**Pieske** B, LS Maier, V Piacentino, 3rd, J Weisser, G Hasenfuss und S Houser (2002). "Rate dependence of [Na<sup>+</sup>]i and contractility in nonfailing and failing human myocardium." Circulation 106(4): 447-53.

**Pieske** B, M Sutterlin, S Schmidt-Schweda, K Minami, M Meyer, M Olschewski, C Holubarsch, H Just und G Hasenfuss (1996). "Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular Ca2+ handling." J Clin Invest 98(3): 764-76.

**Pogwizd** SM, M Qi, W Yuan, AM Samarel und DM Bers (1999). "Upregulation of Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure." Circ Res 85(11): 1009-19.

**Puglisi** JL und DM Bers (2001). "LabHEART: an interactive computer model of rabbit ventricular myocyte ion channels and Ca transport." Am J Physiol Cell Physiol 281(6): C2049-60.

**Reiken** S, M Gaburjakova, J Gaburjakova, KL He Kl, A Prieto, E Becker, GH Yi Gh, J Wang, D Burkhoff und AR Marks (2001). "beta-adrenergic receptor blockers restore cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) structure and function in heart failure."Circulation 104(23): 2843-8.

Saint DA, YK Ju und PW Gage (1992). "A persistent sodium current in rat ventricular myocytes." J Physiol 453: 219-31.

Scirica BM, DA Morrow, H Hod, SA Murphy, L Belardinelli, CM Hedgepeth, P Molhoek, FW Verheugt, BJ Gersh, CH McCabe und E Braunwald (2007). "Effect of ranolazine, an antianginal agent with novel electrophysiological properties, on the incidence of arrhythmias in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome: results from the Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Thrombolysis in Myocardial Infarction 36 (MERLIN-TIMI 36) randomized controlled trial." Circulation 116(15): 1647-52.

Shannon TR, SM Pogwizd und DM Bers (2003). Élevated sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure."Circ Res 93(7): 592-4.

**Song** Y, JC Shryock, S Wagner, LS Maier und L Belardinelli (2006). "Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction." J Pharmacol Exp Ther 318(1): 214-22.

**Sossalla** S, S Wagner, EC Rasenack, HM Ruff, SL Weber, FA Schondube, T Tirilomis, G Tenderich, G Hasenfuss, L Belardinelli und LS Maier (2008). "Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts - Role of late sodium current and intracellular ion accumulation." J Mol Cell Cardiol.

Studer R, H Reinecke, J Bilger, T Eschenhagen, M Bohm, G Hasenfuss, H Just, J Holtz und H Drexler (1994). "Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca2+ exchanger in endstage human heart failure."Circ Res 75(3): 443-53.

**Tagawa** H, M Koide, H Sato, MR Zile, BA Carabello und GT Cooper (1998). "Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading." Circ Res 82(7): 751-61.

**Tomaselli** GF und DP Zipes (2004). "What causes sudden death in heart failure?" Circ Res 95(8): 754-63.

**Tsutsui** H, T Ide, S Hayashidani, N Suematsu, H Utsumi, R Nakamura, K Egashira und A Takeshita (2001). "Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury." Cardiovasc Res 49(1): 103-9.

Undrovinas AI, VA Maltsev und HN Sabbah (1999). "Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current." Cell Mol Life Sci 55(3): 494-505.

**Undrovinas** AI, L Belardinelli, NA Undrovinas und HN Sabbah (2006). "Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current." J Cardiovasc Electrophysiol 17 Suppl 1: S169-S177.

Valdivia CR, WW Chu, J Pu, JD Foell, RA Haworth, MR Wolff, TJ Kamp und JC Makielski (2005). "Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart." J Mol Cell Cardiol 38(3): 475-83.

Vanden Hoek TL, Z Shao, C Li, R Zak, PT Schumacker und LB Becker (1996). "Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia." Am J Physiol 270(4 Pt 2): H1334-41.

Vanden Hoek TL, C Li, Z Shao, PT Schumacker und LB Becker (1997a). "Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to re-

perfusion." J Mol Cell Cardiol 29(9): 2571-83.

Vanden Hoek TL, Z Shao, C Li, PT Schumacker und LB Becker (1997b). "Mitochondrial electron transport can become a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol 29(9): 2441-50.

Vanden Hoek TL, LB Becker, Z Shao, C Li und PT Schumacker (1998). "Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes." J Biol Chem 273(29): 18092-8.

Vanden Hoek T, LB Becker, ZH Shao, CQ Li und PT Schumacker (2000). "Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion." Circ Res 86(5): 541-8.

Vila-Petroff M, MA Salas, M Said, CA Valverde, L Sapia, E Portiansky, RJ Hajjar, EG Kranias, C Mundina-Weilenmann und A Mattiazzi (2007). "CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury." Cardiovasc Res 73(4): 689-98.

**Viswanathan** PC und JR Balser (2004). "Inherited sodium channelopathies: a continuum of channel dysfunction." Trends Cardiovasc Med 14(1): 28-35.

**Wagner** S und LS Maier (2006)."Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents by CaM and CaMKII." J Cardiovasc Electrophysiol. 2006 May;17 Suppl 1:S26-S33

Wagner S, T Seidler, E Picht, LS Maier, V Kazanski, N Teucher, W Schillinger, B Pieske, G Isenberg, G Hasenfuss und H Kogler (2003). "Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury." Cardiovasc Res 60(2): 404-12.

Wagner S, N Dybkova, EC Rasenack, C Jacobshagen, L Fabritz, P Kirchhof, SK Maier, T Zhang, G Hasenfuss, JH Brown, DM Bers und LS Maier (2006). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulindependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels." J Clin Invest 116(12): 3127-38.

Weber SL, S Wagner, HM Ruff und LS Maier (2008). "Reactive oxygen species activate CaMKII via SR Ca<sup>2+</sup> release". 74. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie. Mannheim.

Wehrens XH, SE Lehnart, SR Reiken und AR Marks (2004). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor." Circ Res 94(6): e61-70.

**Wu** L, JC Shryock, Y Song, Y Li, C Antzelevitch und L Belardinelli (2004). "Antiarrhythmic effects of ranolazine in a guinea pig in vitro model of long-QT syndrome." J Pharmacol Exp Ther 310(2): 599-605.

Wu L, JC Shryock, Y Song und L Belardinelli (2006). "An increase in late sodium current potentiates the proarrhythmic activities of low-risk QT-prolonging drugs in female rabbit hearts." J Pharmacol Exp Ther 316(2): 718-26.

Wu X, T Zhang, J Bossuyt, X Li, TA McKinsey, JR Dedman, EN Olson, J Chen, JH Brown und DM Bers (2006). "Local InsP3-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling." J Clin Invest 116(3): 675-82.

Xu L, JP Eu, G Meissner und JS Stamler (1998). "Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation." Science 279(5348): 234-7. Yamamoto T, M Yano, M Kohno, T Hisaoka, K Ono, T Tanigawa, Y Saiki, Y Hisamatsu,

T Ohkusa und M Matsuzaki (1999). Äbnormal Ca2+ release from cardiac sarcoplasmic reticulum in tachycardia-induced heart failure." Cardiovasc Res 44(1): 146-55.

**Yano** M, K Ono, T Ohkusa, M Suetsugu, M Kohno, T Hisaoka, S Kobayashi, Y Hisamatsu, T Yamamoto, M Kohno, N Noguchi, S Takasawa, H Okamoto und M Matsuzaki (2000). Ältered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) leak through ryanodine receptor in heart failure."Circulation 102(17): 2131-6.

**Zhang** T, LS Maier, ND Dalton, S Miyamoto, J Ross Jr., DM Bers und JH Brown (2003). "The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure." Circ Res 92(8): 912-9.

**Zhang** T, M Kohlhaas, J Backs, S Mishra, W Phillips, N Dybkova, S Chang, H Ling, DM Bers, LS Maier, EN Olson und JH Brown (2007). "CaMKIIdelta isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses." J Biol Chem 282(48): 35078-87.

Zweier JL, BK Rayburn, JT Flaherty und ML Weisfeldt (1987). "Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium." J Clin Invest 80(6): 1728-34.

**Zweier** JL, P Kuppusamy, R Williams, BK Rayburn, D Smith, ML Weisfeldt und JT Flaherty (1989). "Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart." J Biol Chem 264(32): 18890-5.

**Zweier** JL und MA Talukder (2006). "The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury." Cardiovasc Res 70(2): 181-90.

# A. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Lars Maier für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, sowie die Bereitschaft, jederzeit für Anregungen und Diskussion zur Verfügung zu stehen. Mein besonderer Dank gilt Dr. Stefan Wagner für die hervorragende Betreuung und sein Vertrauen in meine Arbeit. Besonders hilfreich war seine stetige Ansprechbarkeit auch bei kleineren Problemen. In schwierigen Arbeitsabschnitten verstand er es, für den Erhalt meiner Motivation zu sorgen. Auch danke ich ihm für die sehr zügige Durchsicht meines Manuskriptes und seine konstruktiven Anregungen. Außerdem möchte ich Gudrun Müller danken, die mit der ausgezeichneten Myozytenisolation die Grundlage zu dieser Arbeit schuf. Den Mitarbeitern des Labors, besonders Sarah Weber, bin ich zu großem Dank verpflichtet für die tatkräftige Mithilfe und wunderbare Zusammenarbeit. Meinen Mitdoktoranden danke ich für die unterhaltsamen Stunden im Labor zu außergewöhnlichen Tages- und Nachtzeiten ebenso wie allen anderen, die mich bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt haben.

## B. Lebenslauf

Am 30. Mai 1983 wurde ich, Hanna Maria Ruff, als erstes von drei Kindern der Eheleute Petra Ruff, geb. Stegmann, und Hans-Joachim Ruff in Reutlingen geboren. Nach dem Besuch der Grundschule in Tübingen-Bühl (1989-1990) und Tübingen-Hagelloch (1990-1993), wechselte ich auf das Johannes-Kepler-Gymnasium in Tübingen und legte dort 2002 das Abitur ab. Danach verbrachte ich ein halbes Jahr als Au Pair in West Barnstable, Massachusetts, USA. Anschließend nahm ich zum Sommersemester 2003 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Im März 2005 konnte ich den vorklinischen Abschnitt abschließen. Famulaturen leistete ich in Krankenhäusern (Anästhesie, Unfallchirurgie, Neurologie und Gynäkologie) und in der pädiatrischen Praxis von Dr. K. v. Puttkamer in Tübingen ab. Mein praktisches Jahr habe ich im Victoria Hospital, Mahé auf den Seychellen (Innere Medizin), am Universitätsklinikum Göttingen (Innere Medizin, Anästhesie) und im Kantonsspital Winterthur in der Schweiz (Chirurgie) verbracht. Mit dem Staatsexamen im November 2009 konnte ich mein Studium abschließen.