

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

**Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die
elektromechanische Kopplung und den intrazellulären
Ca²⁺-Haushalt in isolierten Herzmuskelzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt

von

Kay Neumann

aus

Hannover

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2012

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis, Tabellenverzeichnis, Formelverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Strahlentherapeutische Therapieverfahren und ihre Bedeutung für das Herz.....	7
1.1.1 Klinische Komplikationen nach Strahlenexposition des Herzens	7
1.1.2 Pathomechanismen von klinischen Komplikationen nach Strahlenexposition des Herzens	9
1.2 Aufbau und Funktion von Herzmuskelzellen	10
1.2.1 Ultrastruktur der einzelnen Herzmuskelzelle.....	10
1.2.2 Elektrische Erregung der Herzmuskelzelle	10
1.2.3 Elektromechanische Kopplung von Herzmuskelzellen.....	11
1.2.4 Bedeutung und Regulation des Ca ²⁺ -Haushalts	11
1.2.5 Regulation des SR-Ca ²⁺	12
1.3 Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)	14
1.3.1 Struktur der CaMKII.....	14
1.3.2 Aktivierung und Inaktivierung der CaMKII.....	15
1.3.3 Die Funktion der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung	17
1.3.4 Einfluss der CaMKII auf das Erregungsleitungssystem.....	18
1.3.5 Pathophysiologische Prozesse in Verbindung mit der CaMKII.....	19
1.4 Wirkmechanismus ionisierender Strahlung und Einfluss des Redoxstatus auf die Herzmuskelzelle.....	20
1.4.1 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zelle im Allgemeinen	20
1.4.2 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Herzmuskelzellen und deren Wirkung	21
1.4.3 Mechanismen ROS-induzierter Effekte.....	22
1.4.4 ROS-Wirkung auf den Ca ²⁺ -Haushalt von Herzmuskelzellen.....	22
1.5 Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit.....	24
I.) Untersuchungen zur dosisabhängigen Wirkung ionisierender Strahlung auf Ca ²⁺ - Haushalt und Kontraktion isolierter Kardiomyozyten:	24
II.) Untersuchungen zum Wirkmechanismus ionisierender Strahlung auf isolierte Kardiomyozyten:.....	25
III.) Untersuchungen zur Identifizierung von Proteinen, welche die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Herzmuskelzelle vermitteln könnten:.....	26

2	Material und Methoden	27
2.1	Zu den Versuchsmäusen.....	27
2.1.1	Versuchsaufbau zur Isolation von Herzmuskelzellen aus Mäuseherzen	27
2.2	Messung von intrazellulären Ca²⁺-Parametern und Myozytenverkürzung sowie Radikalnachweis an der isolierten Herzmuskelzelle	29
2.2.1	Zum Prinzip der Epifluoreszenzmessung	30
2.2.2	Die Messung von intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentrationen mit Fura-2.....	31
2.2.3	Der Nachweis von intrazellulären Radikalen anhand des Fluoreszenzfarbstoffs CM-H ₂ DCFDA	32
2.2.4	Das Messen der fraktionellen Myozytenverkürzung.....	34
2.3	Pharmakologische Interventionen: Derivat des Autocamtide-2-Peptids (AIP) und Melatonin.....	34
2.4	Versuchsprotokoll zur Messung von Ca²⁺-Fluoreszenz, Myozytenverkürzung und Bestrahlung	35
2.4.1	Versuchsprotokoll zur Messung von Radikal-Fluoreszenz.....	36
2.5	Datenauswertung.....	36
2.5.1	Statistische Analyse.....	37
2.6	Lösungen	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Untersuchungen zur dosisabhängigen Wirkung ionisierender Strahlung auf Ca²⁺-Haushalt und Kontraktion von isolierten Kardiomyozyten.....	41
3.1.1	Die Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca ²⁺ , Ca ²⁺ -Transienten-Amplitude und Ca ²⁺ -Relaxationskinetik.....	41
3.1.2	Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Ca ²⁺ -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie auf die fraktionelle Ca ²⁺ -Freisetzung	44
3.1.3	Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kontraktionsstärke.....	45
3.2	Untersuchungen zum Wirkmechanismus ionisierender Strahlung auf den Ca²⁺-Haushalt in isolierten Herzmuskelzellen	47
3.2.1	Die Generierung von Radikalen durch ionisierende Strahlung.....	47
3.2.2	Der Einfluss des Radikalfängers Melatonin auf die strahleninduzierte Generierung von Radikalen in isolierten Herzmuskelzellen	48
3.2.3	Die Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca ²⁺ , auf Ca ²⁺ -Transienten-Amplitude und Ca ²⁺ -Relaxationskinetik nach Inkubation mit Melatonin in isolierten Herzmuskelzellen	50
3.2.4	Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Ca ²⁺ -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie auf die fraktionelle Ca ²⁺ -Freisetzung nach Inkubation mit Melatonin in isolierten Herzmuskelzellen	54

3.2.5 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kontraktionsstärke nach Inkubation mit Melatonin in isolierten Herzmuskelzellen	56
3.3 Untersuchungen zur Wirkung der strahleninduzierten ROS-Generierung auf Proteine	58
3.3.1 Die Wirkung ionisierender Strahlung bei selektiver Inhibition der CaMKII auf diastolisches Ca ²⁺ , auf Ca ²⁺ -Transienten-Amplitude und Ca ²⁺ -Relaxationskinetik in isolierten Herzmuskelzellen	58
3.3.2 Die Wirkung ionisierender Strahlung bei selektiver Inhibition der CaMKII auf die Ca ²⁺ -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie auf die fraktionelle Ca ²⁺ -Freisetzung in isolierten Herzmuskelzellen	62
3.3.3 Die Wirkung ionisierender Strahlung bei selektiver Inhibition der CaMKII auf die Kontraktionsstärke in isolierten Herzmuskelzellen	64
4 Diskussion.....	66
4.1 Zur Generierung von Radikalen durch ionisierende Strahlung und Einfluss des Radikalfängers Melatonin in isolierten Herzmuskelzellen	66
4.1.1 Zum ROS-abhängigen Aktivierungsmechanismus der CaMKII	68
4.1.2 Zur Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca ²⁺ , Ca ²⁺ -Transienten-Amplitude und fraktionelle Ca ²⁺ -Freisetzung in isolierten Herzmuskelzellen	68
4.1.3 Zur Wirkung ionisierender Strahlung auf Ca ²⁺ -Relaxationskinetik und Ca ²⁺ -Beladung des SR in isolierten Herzmuskelzellen	70
4.1.4 Zur Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kontraktionsstärke in isolierten Herzmuskelzellen	71
4.2 Mögliche klinische Folgen einer strahleninduzierten CaMKII-Aktivierung	72
4.2.1 ANF-Anstieg nach Strahlenexposition des Mediastinums: Hinweis für CaMKII-Aktivierung?	74
4.2.2 Zu einem möglichen, therapeutischen Ansatz bei mediastinaler Strahlenexposition	75
5 Zusammenfassung.....	76
6 Literaturverzeichnis	77
Preise und Auszeichnungen, die sich auf diese Arbeit beziehen	94
Publikationen und Abstracts, die sich auf diese Arbeit beziehen.....	94

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: S. 8	Abb. 3.25: S. 64
Abb. 1.2: S. 13	Abb. 3.26: S. 65
Abb. 1.3: S. 16	Abb. 4.1: S. 72
Abb. 1.4: S. 16	Abb. 4.2: S. 73
Abb. 1.5: S. 18	Abb. 4.3: S. 74
Abb. 2.1: S. 28	
Abb. 2.2: S. 29	
Abb. 2.3: S. 33	
Abb. 2.4: S. 33	
Abb. 2.5: S. 34	
Abb. 2.6: S. 35	
Abb. 3.1: S. 41	
Abb. 3.2: S. 42	
Abb. 3.3: S. 43	
Abb. 3.4: S. 44	
Abb. 3.5: S. 45	
Abb. 3.6: S. 45	
Abb. 3.7: S. 46	
Abb. 3.8: S. 47	
Abb. 3.9: S. 48	
Abb. 3.10: S. 49	
Abb. 3.11: S. 50	
Abb. 3.12: S. 51	
Abb. 3.13: S. 52	
Abb. 3.14: S. 53	
Abb. 3.15: S. 54	
Abb. 3.16: S. 55	
Abb. 3.17: S. 56	
Abb. 3.18: S. 57	
Abb. 3.19: S. 58	
Abb. 3.20: S. 59	
Abb. 3.21: S. 60	
Abb. 3.22: S. 61	
Abb. 3.23: S. 62	
Abb. 3.24: S. 63	

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: S. 38
Tab. 2.2: S. 39
Tab. 2.3: S. 40

Formelverzeichnis

Formel 2.1: S. 36
Formel 2.2: S. 37
Formel 2.3: S. 37

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AM	Azetoxymethylester
AIP	Derivat des autocamtide-2 Peptids, CaMKII-Inhibitor
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKII δ_B	nukleäre Isoform der CaMKII δ
CaMKII δ_C	zytosolische Isoform der CaMKII δ
DZL	diastolische Zelllänge
EKG	Elektrokardiogramm
KN-92	inaktives Derivat analog zu KN-93
KN-93	CaMKII-Inhibitor
Mel.	Melatonin
$[Na^+]_i$	intrazelluläre Natrium-Konzentration
NCX	Na^+ / Ca^{2+} -Antiporter
n.s.	nicht signifikant
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
ROS	freie Sauerstoffradikale
RT 80%	Zeit bis zum 80% Absinken der systolischen Ca^{2+} -Konzentration
RyR	Ryanodin-Rezeptoren
SERCA2a	SR- Ca^{2+} -ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
τ_{Ca}	monoexponentielle Zeitabfallskonstante des Ca^{2+} -Transienten
TG	Transgen

1 Einleitung

1.1 Strahlentherapeutische Therapieverfahren und ihre Bedeutung für das Herz

In der Onkologie wird die Strahlentherapie zur Therapie von Tumoren verwendet. Das Prinzip einer strahlentherapeutischen Behandlung ist die Elimination von Tumorzellen durch ionisierende Strahlung.

Die strahlentherapeutische Behandlung von Tumoren im Brustbereich (z.B. Hodgkin-Lymphom-, Bronchial-, Mamma-, Ösophagus und Magen-Karzinom) kann aber auch das Herz ionisierender Strahlung exponieren. Je nach Lage und Stadium des Tumors kann die Strahlenbelastung des Herzens bis zu 60 Gy betragen.

Experimentell ist als Folge einer Strahlenexposition des Herzens bisher lediglich eine indirekte Schädigung über das Endothel der Koronarien bekannt (SCHULTZ-HECTOR und TROTT 2006). Eine direkte Wirkung auf die Herzmuskelzelle ist bislang nicht untersucht worden, weshalb diese Arbeit sich der direkten Wirkung ionisierender Strahlung auf das Myokard widmen soll.

1.1.1 Klinische Komplikationen nach Strahlenexposition des Herzens

Die klinischen Folgen einer Strahlenexposition des Herzens reichen von Herzinsuffizienzen und Myokardinfarkten bis zu Klappenvitien und sollen in diesem Kapitel dargestellt werden.

Die Komplikationen scheinen von Gesamtdosis und Menge des exponierten Herzens sowie Fraktionierung abzuhängen (GIRAUD und COSSET 2004).

Eine akute Wirkung ionisierender Strahlung auf das Herz wird in elektrokardiographischen Ableitungen (EKG) nach therapeutischem Einsatz ionisierender Strahlung evident. So treten direkt nach Bestrahlung von Patientinnen mit linksseitigem Mamma-Karzinom u.a. Senkungen von ST-Strecken, Änderungen der T-Wellen (flach, negativ), verkleinerte Amplituden der QRS-Komplexe, Verschiebung des QRS-Komplexes nach rechts, ein verlängertes QT-Intervall und Sinustachykardien auf (BILLER et al. 1979, WEHR et al. 1982, LINDAHL et al. 1983, ANIGBOGU et al. 2008).

Die langfristig wichtigste klinische Komplikation nach Strahlenexposition des Herzens im Rahmen von radioonkologischen Therapieverfahren ist die Herzinsuffizienz. So ist das Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ca. 6-fach erhöht. Risikofaktoren scheinen die

Dosis (>15 Gy), Alter bei Diagnose (Kinder <10 Jahre) und das Geschlecht (Frauen sind häufiger betroffen) zu sein (MULROONEY et al. 2009).

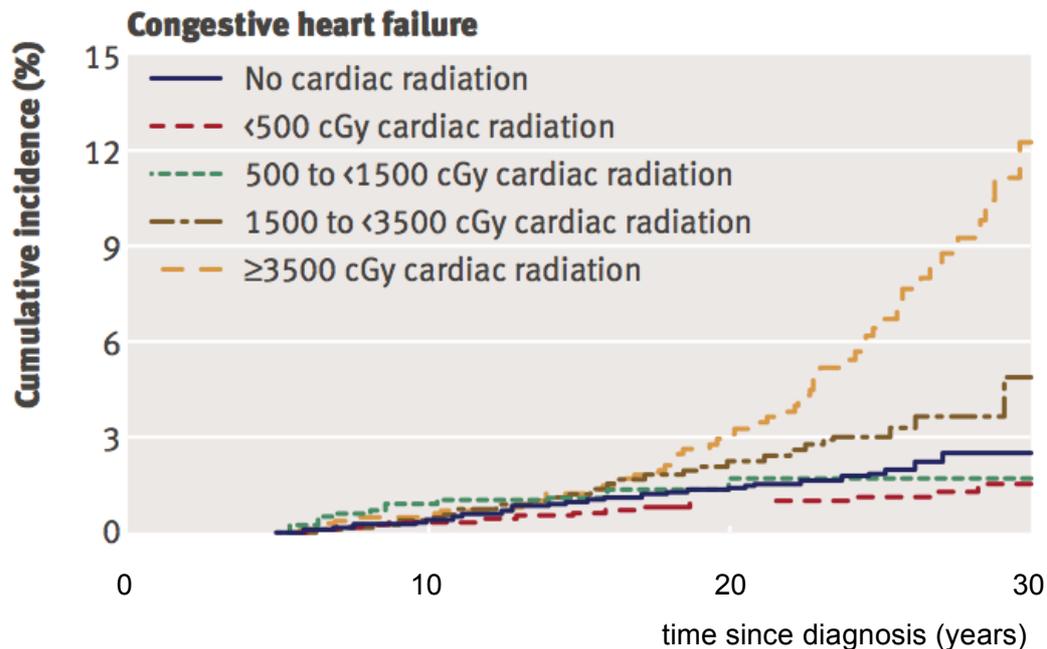


Abb. 1.1 Die Komplikation Herzinsuffizienz steigt in Abhängigkeit von der Strahlendosis nach radioonkologischer Behandlung thorakaler Tumore. Modifiziert nach MULROONEY et al. 2009.

Langfristig können als Komplikation dilatative Kardiomyopathien auftreten. Bei der dilatativen Kardiomyopathie steht eine systolische, kontraktile Dysfunktion im Vordergrund, die auf einer Erkrankung des einzelnen Kardiomyozyten beruht. Nach Kombination von Strahlentherapie mit Anthrazyklinen können Kardiomyopathien sogar akut auftreten (SCHULTZ-HECTOR und TROTT 2006).

In Langzeitstudien an den Überlebenden der Atombombenabwürfe auf Japan wurde 40 Jahre nach Strahlenexposition ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere für Myokardinfarkte und Kardiomyopathien, festgestellt (PRESTON et al. 2003, YAMADA et al. 2004).

Dies stimmt mit Ergebnissen aus Langzeitstudien zur Nebenwirkung von therapeutischem Strahleneinsatz nach Mamma-Karzinom überein. In einem Zeitraum, von >10 Jahre nach Behandlung von linksseitigem Mamma-Karzinom verglichen zum rechtsseitigen Mamma-Karzinom konnte ein erhöhtes Risiko von 44% für kardiovaskuläre Erkrankungen ermittelt werden (CLARKE et al. 2005).

Passend hierzu zeigten die Untersuchungen von PASZAT et al. 1998 und DARBY et al. 2005 zum linksseitigen Mamma-Karzinom, dass die adjuvante Strahlentherapie zwar effektiv die Erkrankung therapiert, aber dieser Erfolg >10 Jahre nach Behandlung von einer um 30% erhöhten Sterblichkeitsrate pro Jahr aufgrund von Herz-Kreislauf-Komplikationen überschattet wird.

Nach Strahlentherapie des Hodgkin-Lymphoms wird von einem pro Jahr um 0,1% bis 0,5 % zunehmenden, zusätzlichem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (hauptsächlich Myokardinfarkte) berichtet (HANCOCK et al. 1993; REINDERS et al. 1999; ALEMAN et al. 2003).

Auch Klappenschädigungen werden nach Strahlenexposition des Herzens beobachtet. Betroffen können Mitral-, Aorten-, Trikuspidal- und Pulmonal-Klappe sein. Es kommen sowohl Insuffizienzen als auch Stenosen vor (CARLSON et al. 1991).

1.1.2 Pathomechanismen von klinischen Komplikationen nach Strahlenexposition des Herzens

Die Pathomechanismen nach Strahlenexposition des Herzens sind vor allem experimentell im Tiermodell untersucht worden.

Die dilatative Kardiomyopathie (Hypertrophie und Vergrößerung des Herzens, „Remodelling“) tritt im Kaninchenmodell bei 56% (Dosis 20 Gy) auf und endet meist letal (FARJADO und STEWART 1970).

Untersuchungen der Koronarien zeigen eine verminderte Dichte der Kapillaren, Schädigung der Intima (FARJADO und STEWART 1971) sowie einen Verlust der endothelialen Alkaline-Phosphatase. Dieses Protein ist in die Regulation der Endothelzell-Proliferation involviert, die Bedeutung eines Verlustes ist ungeklärt (LAUK 1987). Des Weiteren sind pro-inflammatorische Moleküle (P-Selektion, E-Selektion, NF-kB) hochreguliert (BAEUML 1997). Zusätzlich wird von bestrahlten Endothelzellen der von-Willebrand-Faktor freigesetzt, weswegen über eine pro-thrombotische Wirkung ionisierender Strahlung spekuliert wird (VERHEIJ et al. 1994; BOERMA et al. 2004). Es wird vermutet, dass diese Mechanismen in die erhöhte Myokardinfarkt-Prävalenz involviert sind (SCHULTZ-HECTOR und TROTT 2006).

Hämodynamische Untersuchungen von Ratten nach mediastinaler Strahlenexposition (20 Gy) zeigen langfristig eine Abnahme der Herzleistung. Der Auswurf des Herzens, also die linksventrikuläre Pumpleistung, sinkt nach 80-100 Tagen nach Bestrahlung auf rund 60% während das enddiastolische Volumen auf rund 180% der Ausgangswerte ansteigt. Das Herz dilatiert also nach Bestrahlung massiv. Nach ungefähr 250 Tagen manifestiert sich eine dilatative Kardiomyopathie, die Herzleistung sinkt noch weiter ab (SCHULTZ-HECTOR et al. 1992). Die Applikation eines Radikalfängers (Amifostin) vor der Strahlenexposition verhinderte die Abnahme der Herzleistung sowie die Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie im Tiermodell (KRUSE et al. 2003).

1.2 Aufbau und Funktion von Herzmuskelzellen

1.2.1 Ultrastruktur der einzelnen Herzmuskelzelle

Das Sarkolemm der Kardiomyozyten besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, in der verschiedenste Proteine verankert sind. So befinden sich z.B. Rezeptoren, Ionenpumpen, Ionenkanäle oder auch G-Proteine im Sarkolemm. Diese dienen der Zellkommunikation und auch der Homöostase des Zellmilieus. Ionentransporte über die Zellmembran unterliegen dem chemischen, elektrischen und osmotischen Gleichgewicht, sie können entweder aktiv unter ATP-Verbrauch oder passiv entlang eines Gradienten erfolgen (SCHMIDT et al. 2004). Eine Besonderheit der ventrikulären Kardiomyozyten sind die starken Einbuchtungen in das Sarkolemm, die T-Tubuli. So findet eine Oberflächenvergrößerung statt und das Aktionspotential kann entlang des Sarkolemm tief in den Kardiomyozyten eindringen, was für die elektromechanische Kopplung eine bedeutende Rolle spielt.

Ein Charakteristikum der Muskelzelle ist der kontraktile Apparat, das Sarkomer. Das Sarkomer ermöglicht die Kontraktion, indem es sich Ca^{2+} -abhängig verkürzt. Es bedingt bei den Herzmuskelzellen die charakteristische Querstreifung, die durch hintereinander liegende Sarkomere hervorgerufen wird.

Zu einer Kontraktion kommt es durch die kalziumabhängige Verkürzung vieler, in Serie geschalteter Sarkomere. Die Weiterleitung der Zugkraft erfolgt über die Z-Scheiben.

Das Kontraktionsausmaß (Zellverkürzung) wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand einer optischen Messung der Länge der Sarkomere einer Herzmuskelzelle bestimmt.

Des Weiteren werden für die Aufrechterhaltung der Zellphysiologie weitere Organellen wie z.B. sarkoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Peroxisomen, usw. benötigt (SCHMIDT et al. 2004).

1.2.2 Elektrische Erregung der Herzmuskelzelle

In dem Versuchsaufbau dieser Arbeit übernahm Anstelle des Reizleitungssystems eine Stimulationselektrode die elektrische Reizung der Kardiomyozyten.

Die Arbeitsmyokardzelle verfügt über ein Ruhemembranpotential von ca. -90 mV. Wenn es nun über Gap-Junctions oder unter experimentellen Bedingungen durch eine Stimulationselektrode zu einer Depolarisation über -70 mV kommt, öffnen sich spannungsabhängige Na^+ -Kanäle (Aufstrichphase). Dadurch verschiebt sich das Membranpotential zu Werten bis +20 mV (Overshoot). Die darauf folgende Plateauphase (ca. 200-400 ms) wird von einem langsamen Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ-Kanäle getragen, in

dieser Phase findet die Kontraktion statt. Durch eine Inaktivierung der Ca^{2+} -Kanäle nimmt der Einfluss repolarisierender Ströme (besonders des K^+ -Ausstroms) zu, die Zelle repolarisiert. Um eine rhythmische Pumpfunktion des Herzens sicherzustellen, ist die Arbeitsmyokardzelle während der Plateauphase refraktär, nach Repolarisation ist im Prinzip zwar wieder ein AP auslösbar (relative Refraktärzeit), aber nur durch starke und lange Depolarisationen (SCHMIDT et al. 2004).

1.2.3 Elektromechanische Kopplung von Herzmuskelzellen

Die Arbeitsmyokardzelle wird von einem elektrischen Reiz stimuliert, den sie in eine mechanische Bewegung übersetzt.

Der Ca^{2+} -Einstrom in der Plateauphase hält einerseits die Herzmuskelzelle depolarisiert andererseits triggert er durch die räumliche Nähe eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), was als Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung bekannt ist (FABIATO A und FABIATO F 1975). In der Summe steigt die zytosolische Kalziumkonzentration von diastolisch ca. 100 nM auf über 1 μM in der Systole an. Über die Bindung von Ca^{2+} an Troponin C führt dies zur Aktivierung der Myofilamente (BLINKS 1986). Nach der Gleitfilamenttheorie (HUXLEY 1969) ändert der Troponin-Komplex nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen nun seine Konformation und Tropomyosin gibt die Bindungsstellen des Aktins frei. Die Myosin-Köpfe des Sarkomers können nun an das Aktin binden. Somit ist die Kalziumkonzentration von entscheidender Bedeutung für die Kontraktion. Durch die Hydrolyse von ATP zu ADP + P_i kippt der Myosin-Kopf in Richtung Aktin, es kommt zur Querbrückenbildung. Jetzt werden nacheinander P_i und ADP freigesetzt, wodurch sich der Winkel zwischen Myosin-Kopf und Myosin-Schwanz von 90° zu 45° verkleinert (Kraftschlag), es kommt zu einer Verkürzung um 1% (ungefähr 10 nm) der Zelllänge. Nach erneuter Bindung von ATP seitens des Myosins verringert sich die Affinität zum Aktin wieder und der Zyklus beginnt von neuem. Pro Sekunde laufen 10-100 Querbrückenzyklen ab (SCHMIDT et al. 2004).

1.2.4 Bedeutung und Regulation des Ca^{2+} -Haushalts

An der Regulation der diastolischen (ca. 100 nM) und systolischen (über 1 μM) Ca^{2+} -Konzentrationen sind verschiedene Proteine beteiligt.

Über im Sarkolemm lokalisierte L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, die in räumlicher Nähe mit den Ryanodin-Rezeptoren (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) stehen, kommt es zu einem initialen Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär (Plateauphase). Dieser Einstrom triggert wiederum einen Ausstrom von Ca^{2+} aus dem SR über Ryanodin-Rezeptoren (FABIATO A

und FABIATO F 1975). Das $[Ca^{2+}]_i$ in der Systole aktiviert nun die Myofilamente, wobei beim Menschen 60-70% vom $[Ca^{2+}]_i$ aus dem SR stammt. Bei der Maus stammen sogar 90% der systolischen Kalziumkonzentration aus dem SR und nur 10% stammt aus dem Extrazellulärraum (MAIER et al. 2000, BERS 2001).

Die Ca^{2+} -Konzentration in der Systole korreliert dabei mit der Inotropie. Somit ist der prozentuale Anteil der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung in Bezug auf den Gesamtgehalt von Ca^{2+} im SR von essentieller Bedeutung für die Kontraktion. Unter experimentellen Bedingungen lässt sich durch das Applizieren von Koffein (10 mmol/l) ein Öffnen der Ryanodin-Rezeptoren induzieren (ROUSSEAU und MEISSNER 1987). Dabei zeigt die Höhe der Amplitude des Ca^{2+} -Ausstroms die Ca^{2+} -Beladung des SR an. Das Verhältnis von Ca^{2+} -Transienten-Amplitude unter Gleichgewichtsbedingungen zu der Koffein-induzierten Amplitude stellt die prozentuale Ca^{2+} Freisetzung (fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung) aus dem SR dar. Dieses Verfahren wurde auch in dieser Arbeit verwendet, um fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung und Ca^{2+} -Beladung des SR zu bestimmen.

1.2.5 Regulation des SR- Ca^{2+}

Um die Hauptfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums, die Ca^{2+} Speicherung, zu regulieren, sind verschiedene Proteine notwendig.

Die Aufnahme des sarkoplasmischen Ca^{2+} in das SR hinein wird von SR-Membran ständigen Proteinen katalysiert, der SR- Ca^{2+} -ATPasen (SERCA2a).

Die SR- Ca^{2+} -ATPase ist, im Gegensatz zu den im Bereich der terminalen Zisternen vorkommenden Ryanodin-Rezeptoren, im Bereich der longitudinalen-Tubuli des SR lokalisiert. Ihre Hauptfunktion ist es, zwei Ca^{2+} -Ionen unter Verbrauch eines Moleküls ATP aus dem Sarkoplasma in das Lumen des SR zu pumpen (TADA et al. 1982, TADA und INUI 1983). So kann durch einen Abfall des zytosolischen Ca^{2+} die diastolische Relaxation ermöglicht werden (INESI 1985; SCHATZMANN 1989).

Die SERCA2a wird durch Phospholamban reguliert (KIRCHBERGER et al. 1974; TADA et al. 1975). Im dephosphorylierten Zustand überwiegt ein inhibierender Einfluss auf die SERCA2a, der aber durch Phosphorylierung von PLB aufgehoben werden kann (KIM et al. 1990, JAMES et al. 1989, INUI et al. 1986). Somit unterliegen die Parameter Inotropie (AMBUDKAR IS und SHAMOO AE (1984) und Lusitropie (LUO et al. 1994) indirekt der Regulation durch Phospholamban.

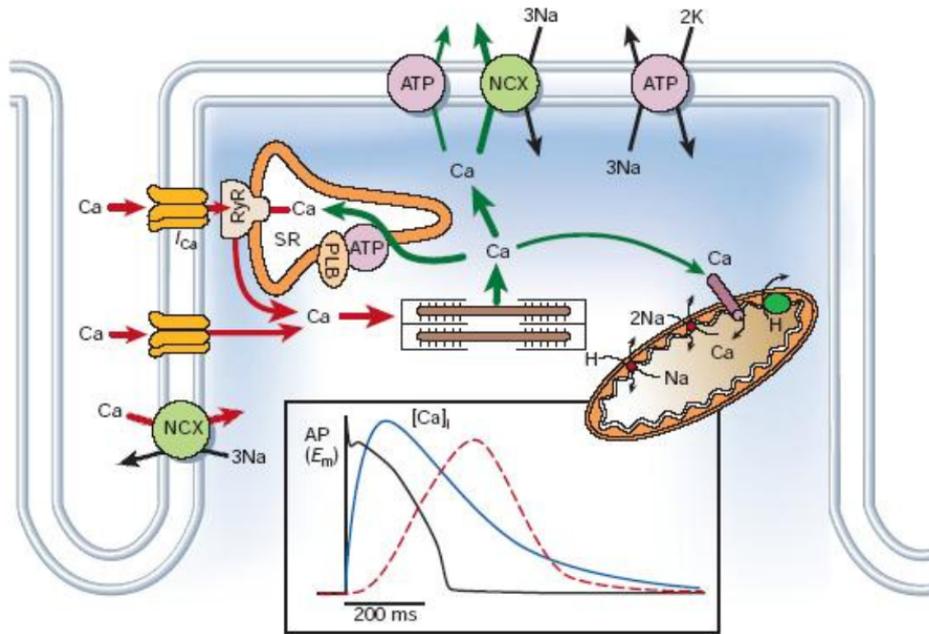


Abb. 1.2 Der Ca²⁺-Haushalt in der elektromechanischen Kopplung am Herzen.

Durch die Erregung der Kardiomyozyten öffnen sich im Sarkolemm befindliche L-Typ-Ca²⁺-Kanäle, deren transsarkolemmaler Ca²⁺-Einstrom dazu führt, dass Ca²⁺ über Ryanodin-Rezeptoren aus dem SR freigesetzt wird (Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung, Plateauphase, rote Pfeile). Es folgt die Aktivierung der Myofilamente durch das gesamte [Ca²⁺]_i. Im Anschluss wird zur Relaxation das [Ca²⁺]_i entweder über die vom PLB regulierte SERCA2a (in der Membran des SR, lila) ins SR oder über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher in den Extrazellulärraum gepumpt (grüne Pfeile). Im viereckigen Kasten (unten) ist die Beziehung von AP (schwarz), [Ca²⁺]_i (blau), und Kontraktion (rot gestrichelt) dargestellt.

Abbildung modifiziert nach BERS 2001, Seite 198.

Der Phosphorylierungsstatus von Phospholamban wird auf der Ebene der Proteinstruktur evident. So ist dephosphoryliert, d.h. inhibierend, eine monomere Proteinkonfiguration nachweisbar (AUTRY und JONES 1997). Im phosphorylierten Zustand hingegen zeigt sich eine pentamere Struktur des Phospholambans, auf die eine Abdissoziation von der SERCA2a folgt, wodurch die Inhibition der SERCA2a aufgehoben wird (KIMURA et al. 1997, WEGENER und JONES 1984).

Für die Phosphorylierung von PLB sind drei verschiedene Signalwege bekannt. PLB wird an Serin-10 durch die Ca²⁺/Phospholipid-abhängige Proteinkinase C und an Threonin-17 durch die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) phosphoryliert (BERS 2001). Die Wirkung der β-adrenergen Signalkaskade des Sympathikus wird über eine Phosphorylierung an Serin-16 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) hervorgerufen (SCHWINGER et al. 1999). Als Folge der Phosphorylierung sinkt der K_M-Wert der SERCA2a, d.h. Relaxationsgeschwindigkeit steigt an (positiv lusitroper Effekt) und weniger Ca²⁺ geht über den im Sarkolemm lokalisierten Na⁺/Ca²⁺-Antiporter der Zelle verloren (positiv inotroper Effekt, LINDEMANN et al. 1983). Eine Dephosphorylierung wird von Phosphatasen des SR

durchgeführt (KRANIAS und DI SALVO 1986). Im Lumen des SR wird Ca^{2+} durch das Protein Calsequestrin gebunden.

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR erfolgt über die Ryanodin-Rezeptoren. So ist der zentrale Stimulus für eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR ein Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (MEISSNER und HENDERSON 1987). Experimentell lässt sich der RyR auch durch die Applikation von Koffein öffnen (siehe 1.2.4).

Neben dieser koordinierten, systolischen Öffnung sind spontane, diastolische Öffnungen des RyR bekannt. Dadurch wird kurzfristig eine geringe Menge Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt, was unter dem Begriff Ca^{2+} -Spark firmiert und ein Indikator für eine Undichtigkeit des SR ist (SR Ca^{2+} -Leck).

1.3 Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

Ein zentraler Regulator der elektromechanischen Kopplung ist die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII), eine Serin/Threonin-Kinase, die als Isoform I, II und IV auch im Nervensystem vorkommt (BRAUN und SCHULMAN 1995). Die Isoform II ist die weitaus häufigste im Herzen (JETT et al. 1987). Neben einer physiologischen Funktion der CaMKII konnte auch eine zentrale Rolle in der chronischen Herzinsuffizienz nachgewiesen werden (ZHANG T und BROWN 2004).

1.3.1 Struktur der CaMKII

Für die im Herzen relevante Isoform II sind vier Gene bekannt, α , β , γ und δ . Die CaMKII δ -Isoform ist die dominierende im Herzen (BRAUN und SCHULMAN 1995; ZHANG T und BROWN 2004). Im Nukleus ist die CaMKII δ_B , im Zytosol die Splicevariante CaMKII δ_C lokalisiert (EDMAN und SCHULMAN 1994; ZHANG T und BROWN 2004). Die Bedeutung der anderen Isoformen im Herzen wird als gering eingeschätzt.

Im Gegensatz zu den monomeren Kinasen I und IV besteht die CaMKII aus 6-12 Kinase-Untereinheiten, die eine radspeichenartige Struktur bilden. Jedes dieser 6-12 Monomere besteht aus drei Domänen:

Nach außen gerichtet, am amino-terminalen Ende, befindet sich die katalytische Domäne. Eine regulatorische Domäne mit sowohl autoinhibitorischer als auch Calmodulin-bindender Funktion ist mittig lokalisiert und nach innen gerichtet. Am carboxy-terminalen Ende ist eine Assoziationsdomäne, die für eine Oligomerisation des Holoenzym verantwortlich ist,

untergebracht (siehe auch Abbildung 1.3, BRAUN und SCHULMAN 1995; HOOK und MEANS 2001, MAIER und BERS 2002).

1.3.2 Aktivierung und Inaktivierung der CaMKII

Bei einem systolischen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bindet das Protein Calmodulin (CaM) vier Ca^{2+} -Ionen (MAIER et al. 2006). Dieser Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex ist nun in der Lage mit der regulatorischen Domäne zu interagieren und die Autoinhibition der N-terminalen, katalytischen durch die regulatorische Domäne aufzuheben. Bei $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 500-1000 nM ist die CaMKII mit halbmaximaler Geschwindigkeit aktiviert (BRAUN und SCHULMAN 1995).

Nach dieser Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Aktivierung ist die CaMKII in der Lage, durch Autophosphorylierung der autoinhibitorischen Region (Threonin-287) sich selbst aktiviert zu halten (sog. autonomer Status) (BRAUN und SCHULMAN 1995; ZHANG T und BROWN 2004). In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die CaMKII im autonomen Status eine ca. 700-fach höhere Affinität zum Ca^{2+} /CaM-Komplex besitzt als unphosphoryliert (MEYER et al. 1992; BRAUN und SCHULMAN 1995). Die regulatorische Domäne hält somit bei diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von ~100 nM noch Ca^{2+} /CaM für kurze Zeit gebunden und dadurch das Enzym annähernd vollständig aktiviert.

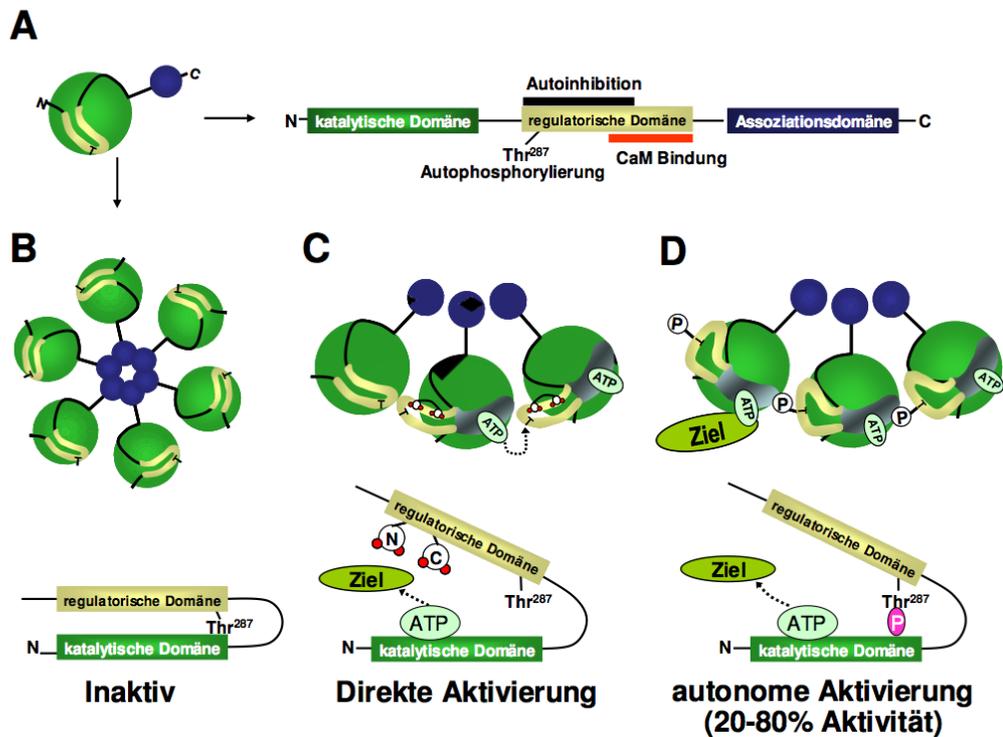


Abb. 1.3 Die Struktur und Aktivierung der CaMKII durch den Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex und anschließende Autophosphorylierung.

A: Das CaMKII-Monomer und ihre drei Domänen. B: Das radspeichenartige Holoenzym im inaktiven Zustand, mittig sind die carboxyterminalen Enden angeordnet (blau). C: An die regulatorische Domäne bindet Calmodulin und hebt dadurch die Autoinhibition auf. D: Nach Autophosphorylierung an Threonin-287 bleibt 20-80% der CaMKII-Aktivität erhalten (sog. autonomer Status). Modifiziert nach MAIER und BERS 2002 Seite 924.

Zu diesen Erkenntnissen konnten ERICKSON et al. (2008) einen alternativen Aktivierungsmechanismus durch reaktive, oxidative Spezies (ROS) beschreiben. Demnach verhindert eine Oxidation an Met-281/282 durch ROS, nach Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes, eine erneute Blockade der katalytischen Domäne und führt so zur Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängigen Aktivität (autonomer Status).

Diese Arbeit soll u.a. untersuchen, ob die strahleninduzierte ROS-Generierung (Radiolyse von Wasser) ebenfalls eine CaMKII-Aktivierung verursachen kann.

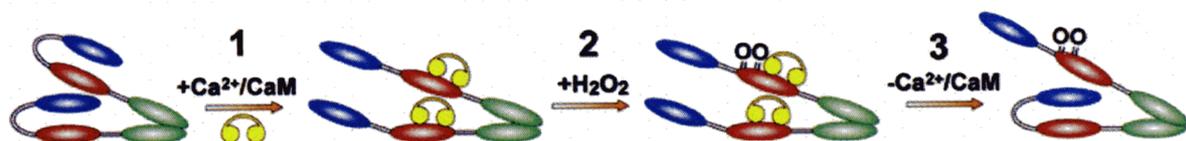


Abb. 1.4 Schema der CaMKII-Aktivierung durch ROS.

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

Eine vollständige Inaktivierung der CaMKII wird von den Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2C katalysiert (ZHANG T und BROWN 2004).

1.3.3 Die Funktion der CaMKII in der elektromechanischen Kopplung

Die CaMKII übt physiologisch eine feinregulierende Funktion sowohl auf den Ca^{2+} -Haushalt als auch auf Na^+ -Kanäle in der elektromechanischen Kopplung aus. Einerseits ist ihre Aktivität selber abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration, andererseits steuert sie den Ca^{2+} -Einstrom und die Freisetzung aus dem SR. Bereits nach initialem Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ-Kanäle wird die CaMKII aktiviert. Sie phosphoryliert nun die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle an den α_{1C} - und β_{-2a} (Threonin-498)-Untereinheiten, wodurch es zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals und anschließend vermehrtem Ca^{2+} -Einstrom kommt (HUDMON et al. 2005; GRUETER et al. 2006; DZHURA et al. 2000). Dadurch erleichtert die CaMKII die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (ANDERSON et al. 1994; XIAO et al. 1994; YUAN und BERS 1994).

Als weiteres Ziel der CaMKII-Aktivität konnten die Ryanodin-Rezeptoren des SR identifiziert werden (HAIN et al. 1995; LOKUTA et al. 1997). Es erfolgt eine Phosphorylierung entweder, wie ursprünglich vermutet, an Serin-2809 (WITCHER et al. 1991) oder, wie neuere Erkenntnisse nahe legen, an Serin-2815 (WEHRENS et al. 2004), was zur Erhöhung der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten führt (WITCHER et al. 1991; LOKUTA et al. 1997). Zudem ist nach CaMKII-Phosphorylierung des RyR die Frequenz von sog. Ca^{2+} -Sparks (spontane, diastolische Öffnungen des RyR in insuffizienten Kardiomyozyten) erhöht. Durch Inhibition der CaMKII lässt sich die Ca^{2+} -Spark-Frequenz deutlich reduzieren (MAIER et al. 2003; GUO et al. 2006; KOHLHAAS et al. 2006, SAG et al. 2009 b, SOSSALLA et al. 2010).

Ein weiterer Angriffspunkt der CaMKII ist die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR. Eine Phosphorylierung von PLB an Threonin-17 hat den gleichen Effekt wie eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A an Serin-16: Der K_m -Wert der SERCA2a wird herabgesetzt (BRITTSAN und KRANIAS 2000; SIMMERMANN et al. 1986). Dieser Mechanismus soll für die frequenz-abhängige Beschleunigung der Relaxation (FDAR) verantwortlich sein (BASSANI et al. 1995). Denn auch HAGEMANN et al. (2000) konnten nachweisen, dass die Phosphorylierung an Threonin-17 mit der Relaxationsgeschwindigkeit korreliert.

Da auch in PLB-defizienten Mäusen ein Anstieg der FDAR nachgewiesen worden ist (DESANTIAGO et al. 2002), müssen noch weitere Mechanismen zur Relaxationsbeschleunigung existieren. Von der Fachwelt wird deshalb eine direkte Phosphorylierung der SERCA2a seitens der CaMKII in Erwägung gezogen (BASSANI et al. 1995). So gibt es Hinweise für eine Phosphorylierung der SERCA2a an Serin-38 (TOYOFUKU et al. 1994; XU et al. 1993). Unterstützt wird diese Theorie durch Experimente mit PLB-defizienten Mäusen, die in Abhängigkeit von der CaMKII eine verstärkte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR zeigten (DESANTIAGO et al. 2002). Allerdings gibt es auch Arbeiten,

die eine direkte Phosphorylierung der SERCA2a durch die CaMKII scheinbar widerlegen (ODERMATT et al. 1996, REDDY et al. 1996, HUKE und BERS 2005). Für eine abschließende Klärung dieser Fragen sind weitere Forschungsarbeiten notwendig, die nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind.

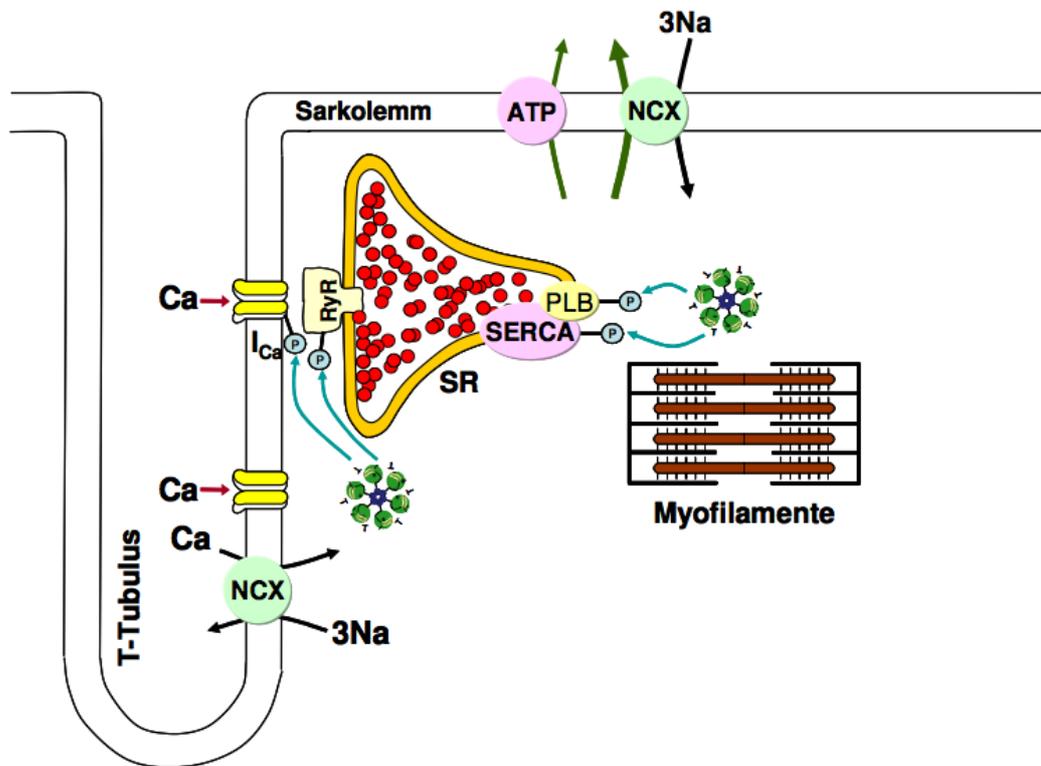


Abb. 1.5 Die CaMKII in der elektromechanischen Kopplung.

Durch einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ wird die CaMKII (radspeichenartige Struktur, grün/blau) aktiviert und phosphoryliert nun ihre Zielproteine (hellblaue Pfeile). Modifiziert nach MAIER und BERS 2007, Seite 632.

Die Untersuchungen von SAG et al. (2007) zeigten, dass der CaMKII in der Azidose eine zentrale Rolle zukommt. So ist die CaMKII von essentieller Bedeutung für die Wiederholung der Schlagkraft der Kardiomyozyten im aziden Milieu, was intensivmedizinisch von Bedeutung sein könnte.

1.3.4 Einfluss der CaMKII auf das Erregungsleitungssystem

Weiteren Einfluss besitzt die CaMKII auf das Erregungsleitungssystem und auf die Regulation der Na⁺ (I_{Na})- und K⁺ (I_K)-Kanäle.

Im Erregungsleitungssystem wird der AV-Knoten durch die CaMKII beeinflusst. So wird die Überleitungszeit in Ruhe und nach Katecholamin-Stimulation durch die CaMKII entscheidend gesteuert (KHOO et al. 2005).

Eine Regulation von I_{Na} und I_K durch die CaMKII zeigt sich deutlich im Tiermodell. So wird der pathophysiologisch relevante sog. späte Na^+ -Einstrom CaMKII-abhängig erhöht (WAGNER et al. 2006).

Auch zeigten WAGNER et al. (2009) zeigten, dass die CaMKII akut und chronisch an der Regulation der I_K beteiligt ist.

Zusammenfassend ist weder die Regulation des AV-Knotens noch der Na^+ -Kanäle und K^+ durch die CaMKII umfassend geklärt. Da die CaMKII mit der Bildung von Arrhythmien in Verbindung gebracht wird, scheinen aber auch hier wichtige Regulationsmechanismen zu bestehen.

1.3.5 Pathophysiologische Prozesse in Verbindung mit der CaMKII

Neben der physiologischen Funktion gelang es auch, der CaMKII eine relevante Rolle in pathophysiologischen Prozessen nachzuweisen.

So wurde bei der ischämischen und dilatativen Kardiomyopathie eine verstärkte Expression und erhöhte Aktivität der CaMKII nachgewiesen (AI et al. 2005; KIRCHHEFER et al. 1999; HOCH et al. 1999, SOSSALLA et al. 2010).

Erste Vermutungen, dass vermehrte Expression und erhöhte Aktivität im insuffizienten Herz einen Kompensationsmechanismus darstellen, sind in weiteren Arbeiten widerlegt worden. Denn eine Überexpression der CaMKII δ_C im Tiermodell führt zu eingeschränkter kontraktile Funktion sowie zu deutlicher kardialer Dilatation (MAIER et al. 2003). Selbst die Überexpression der im Nukleus lokalisierten CaMKII δ_B führt, wenn auch geringer, zur kardialen Hypertrophie und dilatativen Kardiomyopathie (ZHANG T et al. 2002).

Die Insuffizienz des Herzens geht mit einer deutlichen Hyperphosphorylierung der Ryanodin-Rezeptoren einher (MARX et al. 2000), was konsekutiv zu einem Ca^{2+} -Verlust aus dem SR führt (MAIER et al. 2003).

Die verminderte Ca^{2+} -Beladung des SR scheint ein Grund für die insuffiziente Herzfunktion zu sein. Denn nach CaMKII-Inhibition lässt sich die Ca^{2+} -Beladung des SR wieder deutlich steigern, was in einem positiv inotropen Effekt resultiert (AI et al. 2005). 2010 haben SOSSALLA et al. erstmals gezeigt, dass auch im humanen insuffizienten Myokard die Kontraktilität durch CaMKII-Inhibition gesteigert werden kann.

Zudem entsteht im CaMKII-autoinhibierenden Mausmodell (sog. AC3-I-Maus) trotz ständiger β -adrenerger Stimulation keine Insuffizienz des Herzens, wie sie dabei üblicherweise im Kontrolltier auftritt (ZHANG R et al. 2005).

Der Signalweg, über den die hypertrophe Genexpression durch die CaMKII reguliert wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass bei steigendem $[Ca^{2+}]_i$, wie es bei Herzinsuffizienz und Hypertrophie vorkommt, der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex in den Zellkern

gelangt und dort die CaMKII δ_B aktivieren könnte. Die CaMKII könnte nun sog. Histonacetylasen phosphorylieren, wodurch der MEF (Myozyten Enhancing Factor) nicht mehr inhibiert wird und die Hypertrophie-Signalkaskade aktiviert wird (ZHANG CL et al. 2002). Durch CaMKII δ -KO konnte Hypertrophie verhindert werden (BACKS et al. 2009). Die Inhibition der CaMKII könnte also vor allem bei der Therapie der dilatativen Kardiomyopathie sowie von Arrhythmien ein pharmazeutisches Ziel darstellen (MAIER 2006).

1.4 Wirkmechanismus ionisierender Strahlung und Einfluss des Redoxstatus auf die Herzmuskelzelle

Wie in den vorherigen Kapiteln (1.1) beschrieben wird ionisierende Strahlung für die Behandlung onkologischer Erkrankungen genutzt. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Generierung von ROS in Tumorzellen. In der Herzmuskelzelle ist der Redoxstatus von essentieller Bedeutung für eine konstante, physiologische Funktion.

1.4.1 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zelle im Allgemeinen

Der Grossteil der Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zelle wird über die Radiolyse von Wasser durch Radikale vermittelt („indirekte Ionisation“), wobei u.a. Superoxidradikale entstehen. Ein geringerer Teil wird über die sog. „direkte Ionisation“ von Molekülen durch Elektronen verursacht. Das intrazelluläre Ziel der Strahlung, bzw. der generierten Radikale ist die DNA, an der ionisierende Strahlen Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenschäden und abnorme Verbindungen von Molekülen auslösen können (HERRMAN et al. 2006). Die genetische Integrität wird von enzymatischen Reparatursystemen aufrechterhalten, die die weit überwiegende Mehrzahl aller DNA-Schäden schnell und effektiv reparieren können. Dennoch auftretende, nicht bzw. falsch reparierte DNA-Schäden werden heute als wichtigster Mechanismus für die biologische Wirkung von Strahlenexposition angesehen. Die Zahl der DNA-Schäden durch Bestrahlung ist weit höher als die Zahl der Ereignisse, die zu Mutationen oder Zelltod führen. Durch Bestrahlung entstehen pro Gy ca. 4000 - 5000 DNA-Schäden pro Zelle, hauptsächlich Basenschäden und Einzelstrangbrüche,

und ca. 40 Doppelstrangbrüche. Die Erkennung der DNA-Schäden erfolgt durch Reparaturenzyme, die direkt in die Zellzyklus-Kontrolle eingreifen können (MURRAY und HUNT 1993). Der Zellteilungszyklus beinhaltet G1- und G2-Checkpoints zur Überwachung der Integrität der DNA. Bei Schadenserkenkung kann der Zellzyklus an diesen Stellen angehalten werden, bis die Reparatur abgeschlossen ist (G1- bzw. G2-Block). Während der Mitose und in der G2-Phase sind Zellen am strahlensensibelsten, in der S-Phase am resistantesten. Wird ein irreparabler Schaden gesetzt, so besteht die Möglichkeit, dass die Zelle über den G1-Block, der durch eine Phosphorylierung des zellzyklusregulierenden Proteins p53 ausgelöst wird, in Apoptose geht. Neben diesem direkten Zelltod spielt der „reproduktive Zelltod“ (Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit) eine wesentliche Rolle. Hierbei führen Chromosomenschäden sofort oder verspätet dazu, dass die Tochterzellen Mitosen nicht zu Ende führen können (Mitose-assoziiertes Zelltod). Dieser Zelltod spielt eine zentrale Bedeutung für die Antitumorwirkung der Strahlentherapie und die Entstehung von Normalgewebsschäden. Wesentliche Einflussfaktoren auf das Zellüberleben nach Bestrahlung sind die genetisch bedingte (intrinsische) Strahlenempfindlichkeit, die Zellzyklusphase, die Fraktionierung der Strahlendosis sowie die Anwesenheit von Sauerstoff (TUBIANA et al. 1990).

Durch fehlerhafte Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden können auch Mutationen entstehen (HERRMAN et al. 2006). Da aber der überwiegende Anteil der DNA nicht funktionell ist, sind Mutationen im codierenden Bereich statistisch gesehen, seltene Ereignisse.

Da die Kardiomyozyten postmitotisch sind, spielen DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung für das Herz kaum eine Rolle. Vielmehr schädigen die generierten Radikale den Kardiomyozyten über bislang unbekannte Mechanismen, deren Untersuchung Inhalt dieser Arbeit ist.

1.4.2 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Herzmuskelzellen und deren Wirkung

Reaktive, oxidative Spezies können in der Herzmuskelzelle als Nebenprodukte im mitochondrialen Stoffwechsel gebildet werden. Ihre Produktion ist durch Entzündung und Reperfusion nach Ischämie gesteigert, auch in insuffizienten Herzmuskelzellen werden vermehrt ROS gebildet (ZIMA und BLATTER 2006) In dieser Arbeit wurden ROS durch die Radiolyse von H₂O generiert.

An isolierten Kardiomyozyten wurde nach ROS-Exposition initial eine positiv inotrope Wirkung auf Ca²⁺ und Kontraktion gezeigt. Nach längerer ROS-Exposition kommt es zu Oszillationen der Zelllänge sowie zu einer Inhibition der Kontraktion und zu einer konstanten

diastolischen Verkürzung (JOSEPHSON et al. 1991). Ein weiterer ROS-Effekt betrifft das Aktionspotential. ROS können Membrandepolarisation, verminderte Aktionspotentialamplituden und einen verlangsamten schnellen Aufstrich induzieren (PALLANDI et al. 1987). Des Weiteren wurde gezeigt, dass ROS sowohl frühe als auch späte Nachdepolarisationen (z.B. durch Oxidation des Ryanodine-Rezeptors) hervorrufen können (BARRINGTON et al. 1988; BARRINGTON 1994).

1.4.3 Mechanismen ROS-induzierter Effekte

Radikale haben keine singuläre Wirkung, sondern ziehen eine Kettenreaktion in der Zelle nach sich. So werden ROS-abhängige Effekte durch verschiedene, komplexe Mechanismen vermittelt.

Ein Angriffspunkt von ROS sind Proteine. Durch eine Oxidation von SH-Gruppen an Transportproteinen können ROS zu Bildung von Disulfidbrücken und so zu einer Konformationsänderung führen (KAKO et al. 1988; ELEY et al. 1991; BHATNAGAR 1994; FUKUI et al. 1994; OBA et al. 1996). Konformationsänderungen können eine Aktivierung oder Verminderung der Aktivität von Proteinen nach sich ziehen (HUANG et al. 1992; VEGA-SAENZ DE MIERA und RUDY 1992).

Die Aktivität der CaMKII kann durch Oxidation an Methionin-Gruppen gesteigert werden (sog. autonomer Status, ERICKSON et al. 2008).

Diese Arbeit soll u.a. die Frage klären, ob durch die Radiolyse von Wasser generierte ROS ebenfalls eine erhöhte CaMKII-Aktivität verursachen können.

1.4.4 ROS-Wirkung auf den Ca^{2+} -Haushalt von Herzmuskelzellen

Die ROS-abhängigen Effekte auf die Kontraktion lassen sich auf einen veränderten Ca^{2+} -Haushalt zurückführen. So wurde ein Anstieg der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden und des diastolischen Ca^{2+} initial nach ROS-Exposition beobachtet. Bemerkenswerterweise korrelierten diese Effekt mit der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle nahe legt (JOSEPHSON et al. 1990). Allerdings wird in anderen Untersuchungen eine Inhibition des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals durch ROS postuliert (TOKUBE et al. 1996).

Des Weiteren oxidieren ROS Thiol-Gruppen am RyR an, was die Öffnungswahrscheinlichkeit bei submillimolaren Konzentrationen erhöht und zu spontanen, diastolischen Öffnungen führen kann. Langfristig, oder auch initial durch ROS-Konzentrationen im milimolaren Bereich, kann ein Funktionsverlust des RyR durch Oxidation hervorgerufen werden (HOLMBERG et al. 1991; BORASO und WILLIAMS 1994, ZIMA und BLATTER 2006).

Des Weiteren kann in Herzmuskelzellen durch Oxidation die SERCA2a-Aktivität vermindert werden, was zu einer geringeren Ca^{2+} -Beladung des SR führen kann. Die Aktivität des NCX-Antiporters hingegen wird durch Oxidation erhöht, was in der Herzinsuffizienz eine Ca^{2+} Überladung begünstigen könnte (Wagner et al. 2003, ZIMA und BLATTER 2006).

1.5 Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die akute und direkte Wirkung ionisierender Strahlung (4 Gy, 20 Gy) auf die Herzmuskelzelle zu untersuchen.

Dabei gilt das Interesse der Untersuchung der Wirkung ionisierender Strahlung auf Ca^{2+} -Haushalt und Kontraktionsstärke (Teil I).

Des Weiteren sollte untersucht werden ob ionisierende Strahlung auch in der Herzmuskelzelle Radikale generiert und ob somit die Wirkung radikal vermittelt sein könnte (Teil II).

Aus der Beantwortung dieser Fragen ergaben sich weitere Fragestellungen. So wurde es Ziel dieser Arbeit, Proteine zu identifizieren, die die Strahlenwirkung vermitteln könnten.

Gleichzeitig sollte anhand dessen ein möglicher therapeutischer Ansatz für die Zukunft untersucht werden (Teil III).

Die exakten Fragestellungen lauten im Einzelnen wie folgt:

I.) Untersuchungen zur dosisabhängigen Wirkung ionisierender Strahlung auf Ca^{2+} -Haushalt und Kontraktion isolierter Kardiomyozyten:

Gibt es eine dosisabhängige Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca^{2+} , auf Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und Ca^{2+} -Relaxationskinetik (RT 80%) nach Bestrahlung mit 4 Gy und 20 Gy?

Gibt es eine dosisabhängige Wirkung ionisierender Strahlung auf die Ca^{2+} -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie auf die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung nach Bestrahlung mit 4 Gy und 20 Gy?

Gibt es eine dosisabhängige Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kontraktionsstärke nach Bestrahlung mit 4 Gy und 20 Gy?

II.) Untersuchungen zum Wirkmechanismus ionisierender Strahlung auf isolierte Kardiomyozyten:

Generiert ionisierende Strahlung (4 Gy, 20 Gy) in isolierten Herzmuskelzelle Radikale, gibt es hierbei eine dosisabhängige Beziehung?

Welchen Einfluss haben Radikalfänger auf die Entstehung von Radikalen durch verschiedene Dosen (4 Gy, 20 Gy) ionisierender Strahlung?

Lässt sich die Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca^{2+} , auf Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und Ca^{2+} -Relaxationskinetik (RT 80%) durch Radikalfänger inhibieren, gibt es eine Abhängigkeit der Inhibition von der Dosis (4 Gy, 20 Gy) ionisierender Strahlung?

Lässt sich die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Ca^{2+} -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie auf die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung durch Radikalfänger inhibieren, gibt es eine Abhängigkeit der Inhibition von der Dosis (4 Gy, 20 Gy) ionisierender Strahlung?

Lässt sich die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kontraktionsstärke durch Radikalfänger inhibieren, gibt es hier ebenfalls eine Abhängigkeit der Inhibition von der Dosis (4 Gy, 20 Gy) ionisierender Strahlung?

III.) Untersuchungen zur Identifizierung von Proteinen, welche die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Herzmuskelzelle vermitteln könnten:

Welche Proteine vermitteln die Wirkung ionisierender Strahlung, welche dosisabhängige Wirkung hat ionisierende Strahlung (4 Gy, 20 Gy) bei selektiver Inhibition der CaMKII auf diastolisches Ca^{2+} , auf die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und Ca^{2+} -Relaxationskinetik (RT 80%)?

Welche dosisabhängige Wirkung hat ionisierende Strahlung (4 Gy, 20 Gy) bei selektiver Inhibition der CaMKII auf die Ca^{2+} -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie auf die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung?

Welche dosisabhängige Wirkung hat ionisierende Strahlung (4 Gy, 20 Gy) bei selektiver Inhibition der CaMKII auf die Kontraktionsstärke?

2 Material und Methoden

2.1 Zu den Versuchsmäusen

Als Versuchstiere wurden Wildtyp-Mäuse vom Typ Black Swiss verwendet. Die Haltung erfolgte in Einzelkäfigen in keimfreier Umgebung bei ca. 22°C. Ab einem Alter von 12 Wochen wurden die Mäuse (n=19) für die Messungen verwendet.

Alle Tierexperimente sind von der örtlichen Ethikkommission genehmigt worden (Tierversuchsanzeige 2006 „Tötungen von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß § 4 TierSchG, Aktenzeichen T 14.06.2006, Bezirksregierung Braunschweig, Anzeigender Prof. Dr. Lars S. Maier) und wurden unter Berücksichtigung des GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS (1996) durchgeführt.

Die Haltung erfolgte unter Beachtung tierschutzrechtlicher Gesichtspunkte in Polycarbonatkäfigen unter gleichmäßigen Umweltbedingungen. Die Käfige waren in ein Regalsystem eingeschoben, welches jeden einzelnen Käfig mit Zu- und Abluft versorgte, um optimale hygienische Bedingungen zu gewährleisten.

2.1.1 Versuchsaufbau zur Isolation von Herzmuskelzellen aus Mäuseherzen

Zur Isolation der Kardiomyozyten wurde eine Perfusionsanlage nach Langendorff genutzt. (LANGENDORFF 1895). Vor der Isolation wurde die Langendorffsche Perfusionsanlage zweimal mit einer Isolationslösung (s.Tab. 2.1) durchgespült und im Anschluss auf ca. 37 °C erwärmt. So waren sowohl das Temperatur-Optimum der Kollagenasen und physiologische koronar Bedingungen gewährleistet. Nun wurde 50 ml der Isolationslösung in die Anlage und jeweils 8 ml in die Isolations- und Präparationsschalen gefüllt.

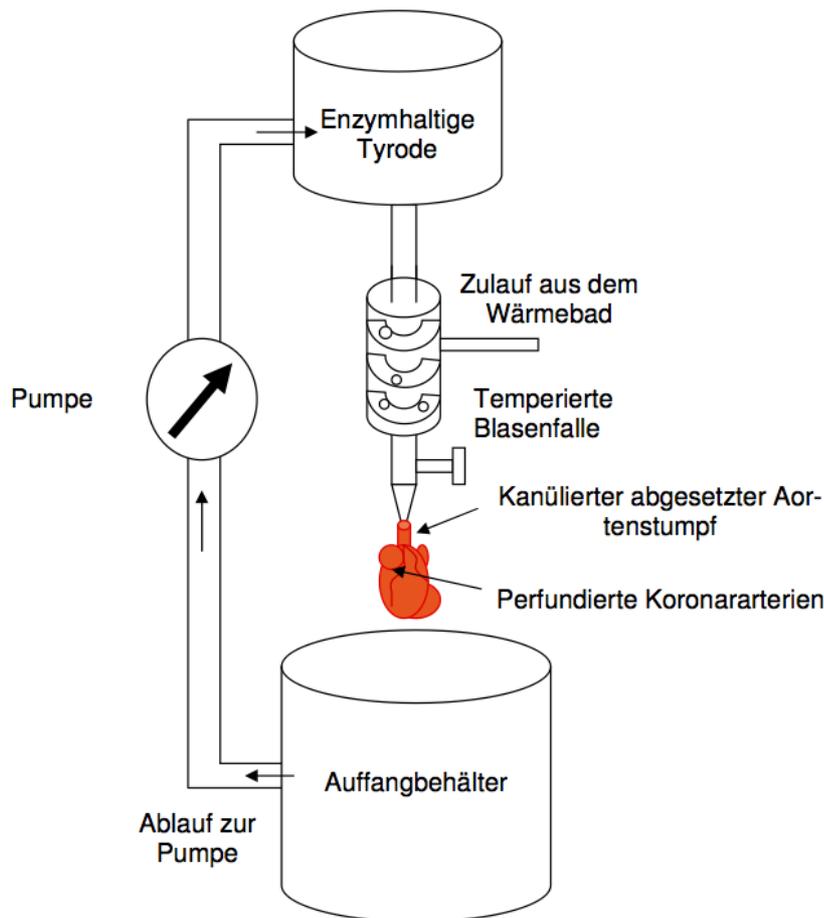


Abb. 2.1 Isolationsanlage nach Langendorff.

Die enzymhaltige Tyrode fließt, nachdem sie auf 37 °C erwärmt wurde, über die Kanüle weiter in die Aorta und anschließend in die Koronararterien. Modifiziert nach SAG 2007, Seite 26.

Zu Beginn des Versuchstages wurde die entsprechende Maus aus dem Zentralkäfig des Klinikums in das Labor geholt und in einer luftdichten Kammer anhand einer gewichtsadaptierten Menge des Narkotikums Halothan (500-900 µl; = 20 µl/kg, *Eurim Pharm Arzneimittel GmbH*, Deutschland) in Narkose versetzt. Nachdem durch die Zunahme der Atemtiefe und die Abnahme der Atemfrequenz eine Narkotisierung der Maus sichergestellt war, wurde die betäubte und dadurch reflexlose Maus durch einen schmerzlosen Genickbruch getötet.

Im direkten Anschluss konnte nun der Thorax eröffnet werden und das Herz, nach Abtrennen der Aorta, entnommen und in eine Präparationsschale gelegt werden. Unter Sicht durch ein binokulares Mikroskop wurde jetzt mittels zweier Splitterpinzetten die herznahe Aorta aufgesucht und eine retrograde Kanülierung durchgeführt, die durch eine Bulldog-Klemme

sowie einen 3,0 Polyesterfaden an der Kanüle gesichert wurde. Um einen korrekten Sitz der Kanüle sicherzustellen und um in den Koronararterien verbliebenes Blut auszuspülen, wurde das Herz jetzt retrograd perfundiert. Im Anschluss wurde die Kanüle an die Perfusionsanlage angeschlossen und die enzymhaltige Lösung (Kollagenase) retrograd in die Koronararterien perfundiert. Als Zeichen des Abbaus der extrazellulären Matrix durch das Verdauungsenzym konnte im weiteren Verlauf ein „Aufquellen“ und „Glasiig Werden“ des Herzens beobachtet werden. Nach durchschnittlich 7-10 Minuten wurde das Herz wieder von der Anlage abgenommen und in einer Glasschale zerschnitten. Anschließend wurde das Herz noch rund 5 Minuten in der Verdauungslösung belassen und danach konnte das entstandene Zellgemisch durch einen Filter (*Nylongaze*, Porendurchmesser 200 μm) in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen transferiert werden. Nach weiteren 7 Minuten war am Grund des Falcon-Röhrchens ein Pellet entstanden, von dem der Überstand (Verdauungslösung) durch eine Transfer-Pipette entfernt wurde. Im weiteren Verlauf wurde in insgesamt vier Schritten (0,1 mmol/l, 0,2 mmol/l, 0,4 mmol/l, 0,8 mmol/l) die Kalziumkonzentration erhöht. Damit war die Zellisolation beendet und es wurden jeweils 300 μl der Zelllösung auf die Messkammern pipettiert (s. Kap. 2.4).

2.2 Messung von intrazellulären Ca^{2+} -Parametern und Myozytenverkürzung sowie Radikalnachweis an der isolierten Herzmuskelzelle

Die Epifluoreszenzmessung ist eine der klassischen Methoden in der kardiologischen und physiologischen Forschung. Sie erlaubt mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen die simultane Messung von intrazellulären Ca^{2+} -Parametern und fraktioneller Verkürzung der Sarkomere. Bei den vorliegenden Messungen wurde das Fluoreszenz-Setup der Firma *ION OPTIX* an einem invertierten Mikroskop, dem Nikon Eclipse TE200-U, verwendet.

2.2.1 Zum Prinzip der Epifluoreszenzmessung

Fluoreszenzmessungen ermöglichen einen Einblick in den Ionen-Haushalt der Zelle. Die Messung von Ionen (hier Ca^{2+}) beruht auf einer selektiven Bindung durch Chelatoren. Durch die Bindung wird die definierte Wellenlänge des Anregungslichtes von den Chelatkomplexen als längerwelliges Licht emittiert, welches dann als Signal gemessen wird. Die Messung von ROS beruht auf einer Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs durch ROS. Dadurch kann der Farbstoff nach Anregung fluoreszieren, die Stärke des Fluoreszenzsignals (gemessen als relative Fluoreszenzeinheit (RFU)) lässt Rückschlüsse auf die ROS-Konzentration zu.

Ein essentielles Merkmal von Fluoreszenzfarbstoffen sind aromatische Ringstrukturen (s. Abb. 2.1) mit delokalisierten Elektronen, die mit der Umgebung Wechselwirkungen eingehen können.

Bei der Absorption von Photonen des Anregungslichts durch die Farbstoffmoleküle, werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Da das höhere Energieniveau nur sehr kurz gehalten werden kann, gelangen die Elektronen rasch auf das ursprüngliche Niveau zurück.

Die mittlere Verweilzeit in dem angeregten, höherenergetischen Zustand ist die Fluoreszenz-Lebenszeit und liegt bei den meisten Fluochromen bei einigen Nanosekunden (ca. 10 ns).

Während der Fluoreszenz-Lebenszeit wird die absorbierte Energie in Form eines Fluoreszenzphotons freigesetzt, welches nun als Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Dieses Prinzip wird durch die Stokes-Regel definiert (LAKOWICZ 1983) und ermöglicht ein Unterscheiden zwischen Anregungslicht und Fluoreszenzsignal. Die Differenz zwischen Anregungslicht und emittierten Licht ist die Stokes-Differenz (auch Stokes-Shift) und beträgt üblicherweise zwischen 20-50 nm. Bei Kenntnis dieser Stokes-Differenz kann durch entsprechenden Anregungs- und Emissionsfilter das Fluoreszenzlicht aufgefangen und gemessen werden.

mit Wellenlängen kleiner als die kritische Wellenlänge reflektiert wird und Licht mit größeren Wellenlängen als die kritische Wellenlänge passieren kann.

Für die Messung lag die kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionslicht. So wird das Anregungslicht auf das Präparat gespiegelt und das Fluoreszenzlicht kann den Spiegel passieren und gelangt zu den signalverstärkenden Photomultipliern (*electron tubes limited*, USA). Hier wird das Fluoreszenzlicht in elektrische Spannung umgewandelt, die vom Fluoreszenz System Interface (*Ion Optix*) in computerlesbare Daten konvertiert wird. Nun kann das Programm *ION WIZARD* die Daten darstellen und aufzeichnen.

2.2.3 Der Nachweis von intrazellulären Radikalen anhand des Fluoreszenzfarbstoffs CM-H₂DCFDA

Der Nachweis von intrazellulären Radikalen (ROS) nach Strahlenexposition wurde am Epifluoreszenzmikroskop mittels des Fluoreszenzfarbstoffs CM-H₂DCFDA durchgeführt. Nach Applikation des ROS-Farbstoffs in die Kammer diffundiert das lipophile CM-H₂DCFDA-Molekül entlang des Konzentrationsgefälles in die Zelle hinein. CM-H₂DCFDA ist, wie auch das verwendete Fura-2, mit Azetoxymethylgruppen (AM) verestert, die intrazellulär durch Esterasen abgespalten werden. So wird das gesamte Molekül polar und kann nach Eintritt in die Zelle die Zellmembran nicht mehr permeieren. Um diesen Vorgang zu ermöglichen, wurde die Kammer vor der Messung 20 Minuten im Inkubationsschrank bei 37°C inkubiert. Nach Oxidation des CM-H₂DCFDA-Moleküls durch ROS emittiert es, nach Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich von 492 bis 495 nm durch die Xenon-Lampe der Epifluoreszenzanlage, bei 517 bis 527 nm ein Fluoreszenzsignal (The Handbook... 2007). Dieses Fluoreszenzsignal wird durch einen dichroischen Spiegel (der nur Licht von 525±5 nm passieren lässt) zum Photomultiplier geleitet und durch diesen in elektrische Spannung umgewandelt. Das Signal des Photomultipliers kann nun auf einem Computer dargestellt werden und ist als relative Fluoreszenzeinheit (RFU) gekennzeichnet.

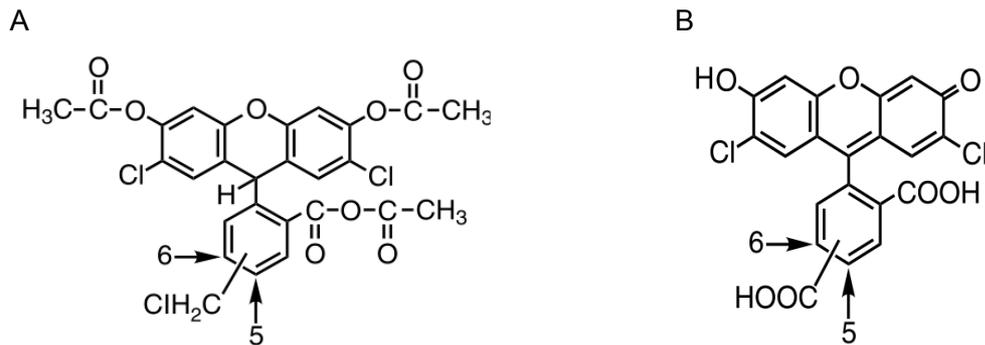


Abb. 2.3 A: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs CM-H₂DCFDA (nicht fluoreszierend).

B: Strukturformel von CM-H₂DCFDA nach Abspaltung der Azetoxymethylgruppen und Oxidation durch ROS (fluoreszierend).

Modifiziert nach der Online Version von „The Handbook...“ 2007.

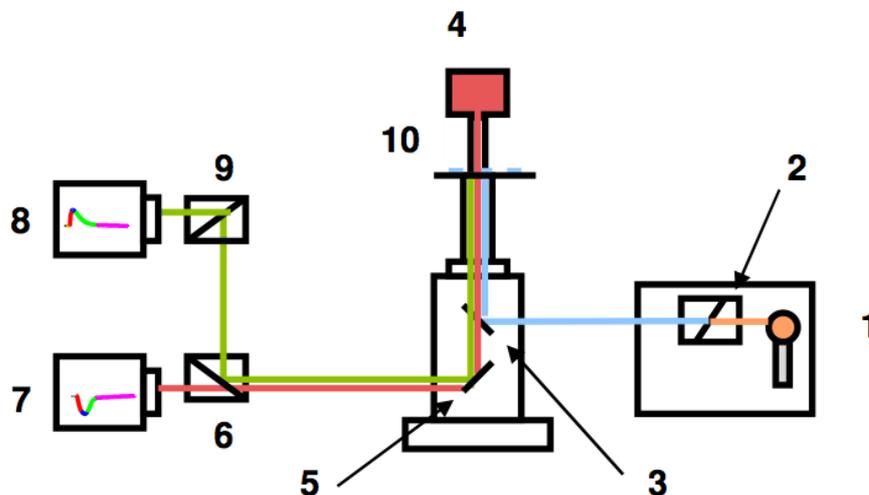


Abb. 2.4 Vereinfachtes Schema des Fluoreszenzsetups am Epifluoreszenzmikroskop (*ION OPTIX*) für a.) CM-H₂DCFDA und b.) Fura-2.

- a.) Vom Licht einer Xenon-Lampe (orange, 1) wird durch einen Filter (2) Licht der Wellenlänge 480 ± 15 nm (blau) herausgefiltert. Ein dichroischer Spiegel (3) lenkt dieses Licht nun zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs auf das Präparat (10). Das vom Präparat emittierte Licht (Wellenlänge 525 ± 5 nm, grün) sowie das Durchlicht (4, rot) kann diesen Spiegel (3) passieren. Herkömmliche Spiegel (5, 9) lenken das emittierte Licht über einen weiteren dichroischen Spiegel (6) zu dem Photomultiplier (8) bzw. zu der Myozytenkamera (7, hier ungenutzt).
- b.) Vom Licht der Xenon-Lampe (orange, 1) wird durch einen Photomultiplier (2) im Wechsel Licht der Wellenlänge 340 bzw. 380 ± 15 nm (blau) herausgefiltert. Ein dichroischer Spiegel (3) lenkt dieses Licht nun zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs auf das Präparat (10). Das vom Präparat emittierte Licht (Wellenlänge 510 nm, grün) sowie das Durchlicht (4, rot) kann diesen Spiegel (3) passieren. Herkömmliche Spiegel (5, 9) lenken das emittierte Licht über einen weiteren dichroischen Spiegel (6) zu dem Photomultiplier (8) bzw. zu der Myozytenkamera (7). Abbildung modifiziert nach SAG (2007).

2.2.4 Das Messen der fraktionellen Myozytenverkürzung

Die fraktionelle Verkürzung des Kardiomyozyten kann gleichzeitig zur Fluoreszenzmessung anhand einer Myozytenkamera (*MyoCamTM*, von *ION OPTIX*) gemessen werden. Eine Myozytenkamera misst optisch die Sarkomerlänge eines Kardiomyozyten. Hierzu wird der Kardiomyozyt mit Licht einer Wellenlänge >650 nm transilluminiert um Wechselwirkungen mit der Fluoreszenzmessung zu vermeiden.

Die gemessenen Sarkomerlängen werden von der *ION OPTIX* Software gemittelt und im Programm *ION WIZARD* graphisch dargestellt. Mit Hilfe des Programms *ION ANALYSE* kann nun die fraktionelle Verkürzung bestimmt werden. Mit dieser Methode kann die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die Kontraktion eines Kardiomyozyten gleichzeitig gemessen werden.

2.3 Pharmakologische Interventionen: Derivat des Autocamide-2-Peptids (AIP) und Melatonin

Das aus 13 Aminosäuren bestehende Derivat des inhibitorischen Peptids autocamide-2 (AIP) gilt als hochspezifischer und äußerst potenter Inhibitor der CaMKII. Die CaMKII-Inhibition ist nicht kompetitiv in Bezug auf Syntide-2, ATP und Ca^{2+} /Calmodulin, aber kompetitiv zu Autocamide-2. Es wird daher angenommen, dass AIP über die Bindung an der Substratbindungsstelle für die Autophosphorylierung (Thr-287) der CaMKII dieselbige inhibiert (ISHIDA et al. 1995). In dieser Arbeit wurde der Inhibitor AIP verwendet um eine mögliche Aktivierung der CaMKII nach Strahlenexposition zu untersuchen.

Um die Strahlenwirkung auf Radikal-Ebene zu untersuchen wurde das Hormon Melatonin (Mel.) eingesetzt. Melatonin besitzt die Eigenschaften eines Radikalfängers (CHAN und TANG 1996; POEGGELER et al. 1994; REITER et al. 2000; REITER und TAN 2003; ZANG et al. 1998), und ist so in der Lage einen radikalvermittelten Strahlungseffekt aufzuheben.

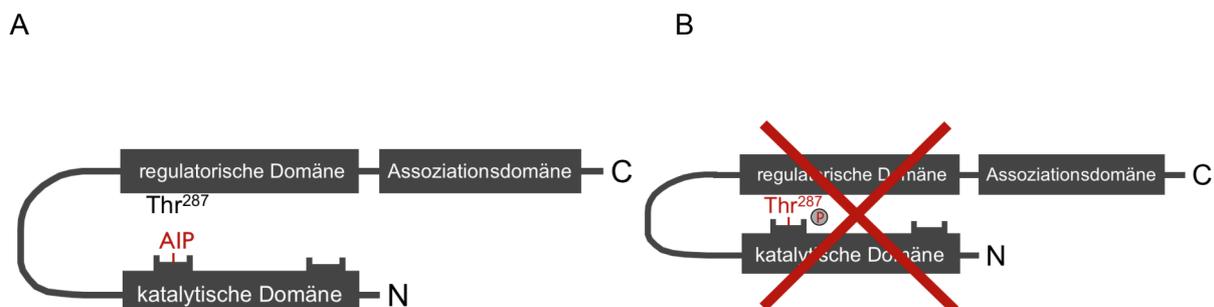


Abb. 2.5 Mechanismus der CaMKII-Inhibition durch AIP. Durch Bindung an der Substratbindungsstelle für Thr-287 (A) verhindert AIP die Autophosphorylierung der CaMKII (B).

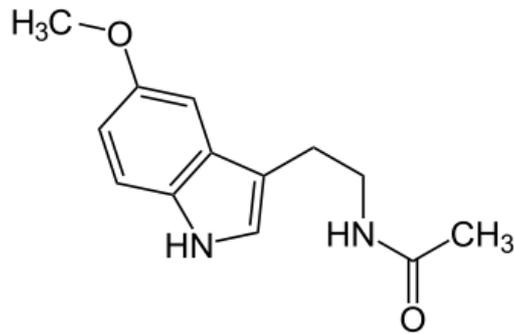


Abb. 2.6 Strukturformel von Melatonin.

Abbildung modifiziert nach dem Internetauftritt von Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com).

2.4 Versuchsprotokoll zur Messung von Ca^{2+} -Fluoreszenz, Myozytenverkürzung und Bestrahlung

Die gereinigte Superfusionskammer wurde mit 1,7 μl Laminin (*Gibco, Grand Island, NY*) bestrichen, um eine Adhäsion der Kardiomyozyten zu gewährleisten. Jetzt wurde 300 μl der Zelllösung (zur Herstellung s. Kapitel 2.1) auf die Kammer pipettiert. Bei der Messung zur Inhibition des Bestrahlungseffekts wurde nach einer Sedimentationszeit von 5 Minuten der Kammer entweder eine 5 mmol/l Melatonin-Inhibitor-Lösung oder eine 5 $\mu\text{mol/l}$ AIP-Inhibitor-Lösung hinzupipettiert (s. 2.3). Die Bestrahlung erfolgte im Anschluss nach 15-minütiger Inkubation mit dem Inhibitor mit 4 Gy und 20 Gy (β -Strahlung), als Kontrolle fungierte eine scheinbestrahlte Gruppe (0 Gy). Die Bestrahlung wurde bei Raumtemperatur mit einer Rate von 1 Gy/min mit einem 0,5-mm Cu Filter bei 200 kV bei konstantem Potential und 15 mA durchgeführt (Ulmay RS225 GS014, Gulmay Medical Ltd, Camberley, Großbritannien). Diese Tätigkeiten wurden von Frau Juliane Kasten und Frau Alex Bitter, den technischen Assistentinnen des Labors von Prof. Hess, übernommen. Alle Messungen fanden verblindet statt.

Im Anschluss an die Bestrahlung wurde der nicht fixierte Zellüberstand abgenommen und 200 μl der Farbstofflösung von Fura-2 (s. Tabelle 2.2) in die Kammer appliziert. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Kammer in eine spezielle Halterung auf dem Objektisch fixiert. Jetzt wurde ein beheizter Zulauf für die Tyrode angebracht (Temperatur der Tyrode ca. 37 °C für physiologische Bedingungen, Zulaufgeschwindigkeit ca. 80 ml/h). Als nächstes wurde ein Absauger und eine Elektrode zur Stimulation des Kardiomyozyten in die Kammer eingetaucht. Die Stimulation (*Myopacer, ION OPTIX*) erfolgte bei 1 Hz mit einer Spannung, die 25% über der Reizschwelle lag. Um sog. „steady-state“ Bedingungen zu erreichen, folgte

eine 10-minütige Einschlagzeit, in der gleichzeitig der nicht in die Zelle permeierte Farbstoff ausgewaschen wurde.

Zur Messung der Ca^{2+} -Beladung des SR wurde während der Messung der Ca^{2+} -Fluoreszenz 10 mmol/l Koffein über ein separates Zulaufsystem lokal auf den Kardiomyozyten appliziert.

2.4.1 Versuchsprotokoll zur Messung von Radikal-Fluoreszenz

Zur Messung der Radikal-Fluoreszenz wurde eine 10 $\mu\text{mol/l}$ CM- H_2DCFDA -Farbstofflösung (s. Tabelle 2.2) vor der Bestrahlung in die Kammer pipettiert, es folgte eine 20-minütige Inkubation der Kardiomyozyten.

Bei den Messungen zur Inhibition des Bestrahlungseffekts wurde einer zweiten Versuchsreihe (4 Gy, 20 Gy) zusätzlich 5 μl der Melatonin-Inhibitor-Lösung 15 Minuten vor der Bestrahlung in die Kammer pipettiert.

2.5 Datenauswertung

Das gemessene Fluoreszenzsignal wurde mittels des Computer Programms *ION WIZARD ANALYSE* Version 5.0 von *ION OPTIX* ausgewertet.

Bei der Messung der Radikalfluoreszenz (das relative Fluoreszenzsignal (RFU) bei 525 ± 5 nm) wurde eine Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz vom Messwert durchgeführt.

Bei der Messung der Ca^{2+} -Parameter wurde ebenfalls zuerst eine Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Berechnung der Ratio:

$$F_{340 \text{ nm}} / F_{380 \text{ nm}}$$

Sowie bezüglich des Abfalls des Ca^{2+} -Transienten (τ_{Ca}) als monoexponentielle Funktion anhand folgender Formel, wobei A die Amplitude und t die Zeit darstellen (s. Abb. 3.28).

Formel 2.1.
$$\tau_{\text{Ca}} = A \cdot e^{-t/\tau}$$

Die Verkürzung des Kardiomyozyten berechnet sich wie folgt:

Formel 2.2 Fraktionelle Verkürzung in % der Ruhezelllänge =

$$\frac{\text{Diastolische Sarkomerlänge} - \text{Systolische Sarkomerlänge}}{\text{Diastolische Sarkomerlänge}} \cdot 100$$

Im Anschluss an die Auswertung wurden die Daten zur Übersicht in eine Excel-Tabelle übertragen, von der sie in das Computer Programm *GRAPH PAD PRISM* oder *Sigma Stat* exportiert wurden. Mit diesen Computer Programmen wurden die Graphen erstellt und Signifikanzen berechnet.

2.5.1 Statistische Analyse

In den vorliegenden Abbildungen und im Text werden die Mittelwerte der Daten \pm Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M) dargestellt. Der S.E.M. berechnet sich anhand folgender Formel.

Formel 2.3 $S.E.M. = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{n} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$

σ = Standardabweichung

n = Anzahl an Messwerten

Ein-Weg-ANOVA kombiniert mit Newman-Keuls posthoc Tests wurden für die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 durchgeführt. Zwei-Weg-ANOVA kombiniert mit Newman-Keuls post-hoc Tests wurden für die Ergebnisse Kapitel 3.2 und 3.3 durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ gewählt.

2.6 Lösungen

Zu Kapitel 2.1 Isolation von Kardiomyozyten aus Mäuseherzen

Lösung	Ion/Substanz	Konzentration	Vorgehen
Tyrode ohne Kalzium	NaCl	137 mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,54 mit NaOH bei RT
	KCl	5,4 mmol/l	
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,2 mmol/l	
	HEPES	20 mmol/l	
	Glukose	15 mmol/l	
Tyrode mit Kalzium	CaCl ₂	25 µmol/l	gelöst in Tyrode ohne Kalzium, pH 7,54 bei RT
Enzymlösung	Kollagenase (Biochrom Typ CLS II)	357 U/mg	gelöst in Tyrode ohne Kalzium, pH 7,54 bei RT
	CaCl ₂	0,26 mmol/l	

Tab. 2.1 Die zur Isolation von ventrikulären Mäusemyozyten benötigten Lösungen (ddH₂O = zweifach destilliertes Wasser).

Zu Kapitel 2.2.2 „Die Messung von intrazellulären Ca²⁺ mit Fura“ und zu Kapitel 2.2.3 „Der Nachweis von Radikalen anhand des Fluoreszenzfarbstoffs CM-H₂DCFDA“

Lösung	Ion/Substanz	Konzentration	Vorgehen
Fura-2 AM Stock (1 mmol/l)	Fura-2 AM	1 mmol/l	1 mg Fura-2 Am in 998,1 µl DMSO lösen, bei -20 °C im Dunkeln lagern
	DMSO (Fluka 41640)		
Fura-2 Farbstofflösung 10 µmol/l	Fura-2 AM Stock	1 mmol/l	50 µl Fura-2 AM Lösung und 5 µl
	Pluronic Acid	200 mg/ml	Pluronic Acid in 5 ml Tyrode lösen, bei -4 °C je 200 µl im Dunkeln lagern
	Messtyrode RT 1 mmol/l Ca ²⁺		
CM-H ₂ DCFDA Farbstofflösung 10 µmol/l	CM-H ₂ DCFDA	10 µmol/l	50 µl CM-H ₂ DCFDA
	Pluronic Acid	200 mg/ml	Lösung und µl 86,5
	Messtyrode RT 1 mmol/l Ca ²⁺		DMSO mit 8,65 Pluronic in 8,65 ml Tyrode lösen, bei -4 °C je 200 µl im Dunkeln lagern

Tab. 2.2 Die zur Messung benötigten Lösungen wurden bei 37 °C mit NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und für die entsprechenden Experimente mit 1,94 g/l Koffein versetzt (10 mmol/l).

Zu Kapitel 2.3 „Pharmakologische Interventionen“

Lösung	Ion/Substanz	Konzentration	Vorgehen
Melatonin-Stock	Melatonin (<i>Sigma-Aldrich</i> , M5250, Molekulargewicht 232,28)	100 mmol/l	11,6 mg Melatonin im Dunkeln in 500 µl DMSO Stock geben
	DMSO		
Melatonin- Inhibitor-Lösung	Melatonin-Stock	1 mmol/l	9 µl Stock pro 900 µl Zellsuspension
AIP-Stock	AIP (Calbiochem, Cat. No.189482, Molekulargewicht 1708,1 g/mol)	500 µmol/l	585 µL H ₂ O in 500 µg AIP, vortexen, Einzelvolumina von 20 µl AIP bei -4 °C im Dunkeln lagern
	H ₂ O		
AIP-Inhibitor Lösung	AIP-Stock	5 µmol/l	20 µl AIP Stock pro 2000 ml Zellsuspension

Tab. 2.3 „Pharmakologische Interventionen“

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur dosisabhängigen Wirkung ionisierender Strahlung auf Ca^{2+} -Haushalt und Kontraktion von isolierten Kardiomyozyten

3.1.1 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca^{2+} , Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und Ca^{2+} -Relaxationskinetik

Die Abbildung 3.1. beinhaltet repräsentative Messungen von Ca^{2+} -Transienten von scheinbestrahlten Kontrollzellen (0 Gy), sowie 4 Gy und 20 Gy exponierten Kardiomyozyten. Es zeigte sich eine deutliche, dosisabhängige Beeinflussung des Ca^{2+} -Haushalts, die in einem Anstieg des diastolischen Kalziums, einer größeren Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und in einem beschleunigtem Abfall des Ca^{2+} -Transienten (RT 80%) evident wird.

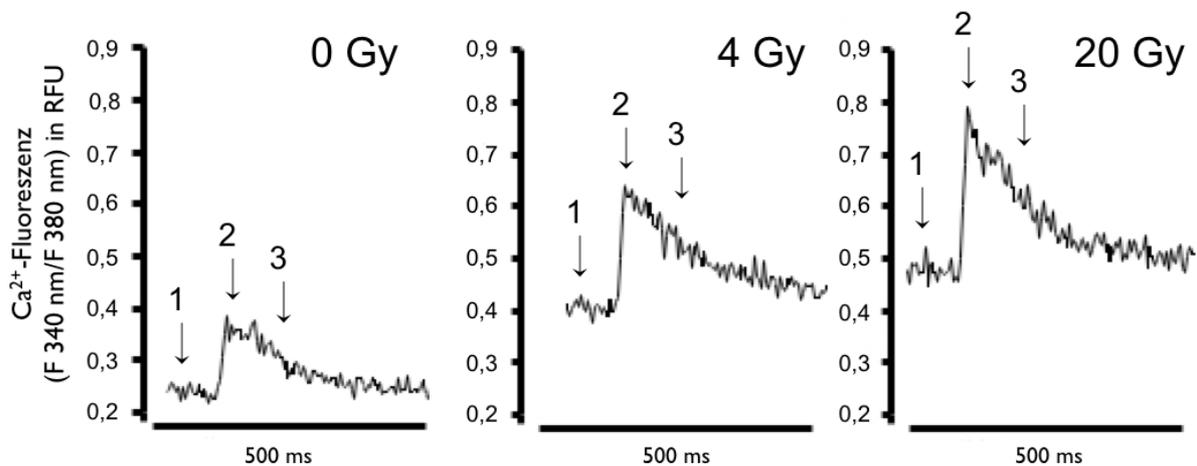


Abb. 3.1. Beispiele für die Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca^{2+} (1), Ca^{2+} -Transienten-Amplitude (2) und Relaxationszeit (3).

Das Ca^{2+} in der Diastole lag in der Kontrollgruppe noch bei einer Ratio der Fluoreszenzwerte $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$ von $0,41 \pm 0,01$ relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU). In der 4 Gy Gruppe stieg es auf einen Mittelwert $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$ von $0,47 \pm 0,01$ RFU an (Abb. 3.2 zeigt Mittelwerte der Ratio $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$). Die größte, diastolische Ca^{2+} -Konzentration war in der 20 Gy Gruppe mit einer diastolischen Fluoreszenzintensität von $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$ $5,11 \pm 0,01$ RFU vorzufinden.

Ein-Weg-ANOVA-Tests bestätigen eine statistische Signifikanz ($P < 0,05$) des diastolischen Ca^{2+} -Anstiegs. Wie in Abb.3.2 auch ersichtlich stieg die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude nach Strahlenexposition an

In der Kontrollgruppe lag sie bei einer Ratio F (340 nm/ 380 nm) von $0,15 \pm 0,01$ RFU und stieg auf $0,20 \pm 0,01$ RFU in der 4 Gy Gruppe (Abb. 3.2). In der 20 Gy Gruppe lag die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude F (340 nm/380 nm) bei $0,21 \pm 0,01$ RFU und war damit nur geringfügig größer als in der 4 Gy Gruppe ($P < 0,05$ Ein-Weg-ANOVA).

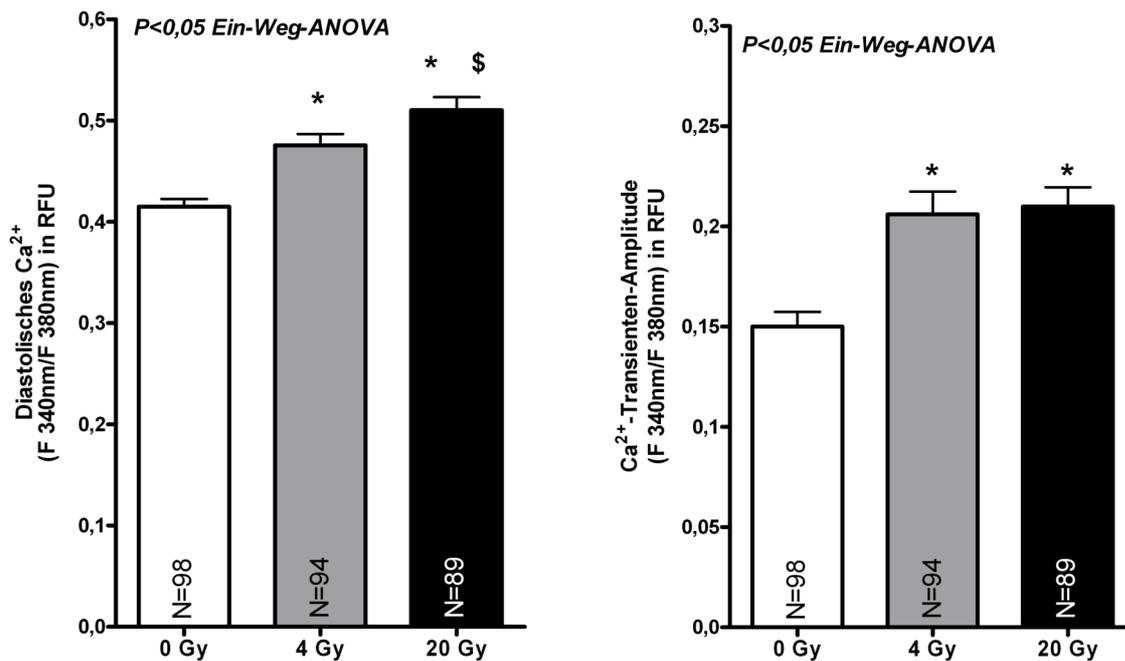


Abb. 3.2 Ionisierende Strahlung erhöht dosisabhängig diastolisches Ca^{2+} und Ca^{2+} -Transienten-Amplituden.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

\$ = signifikante Differenz zur 4 Gy Gruppe (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

Des Weiteren zeigte die Relaxationszeit 80% (RT 80%), als Maß für die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR, eine Beschleunigung der Ca^{2+} -Wiederaufnahme nach Strahlenexposition. So war in der Kontrollgruppe das Ca^{2+} im Zytosol nach 407 ± 14 ms bereits zu 80% abgesunken. In der 4 Gy war die RT 80% bereits nach 351 ± 16 ms erreicht. Eine weitere Relaxationsbeschleunigung zeigte sich in der 20 Gy Gruppe, ein Absinken auf 80% war nach 315 ± 15 ms erreicht ($P < 0,05$ Ein-Weg-ANOVA).

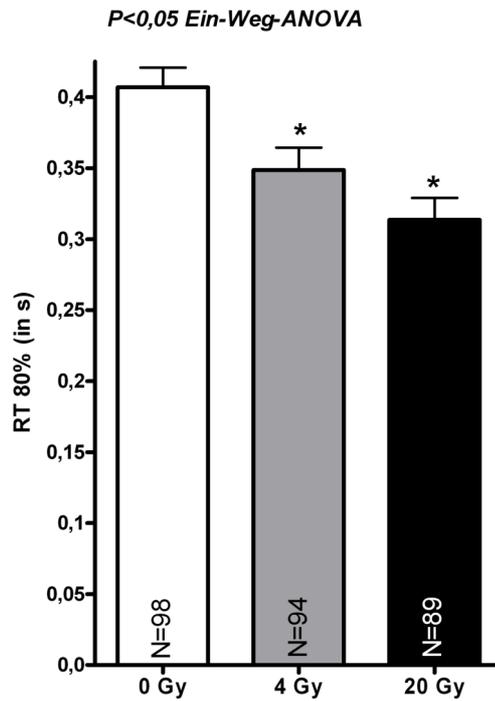


Abb. 3.3 Ionisierende Strahlung beschleunigt die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

3.1.2 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Ca^{2+} -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie auf die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung

Abbildung 3.4 zeigt beispielhafte Messungen von koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten. Ausgehend von der Kontrollgruppe kam es zu keiner Änderung der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden, was auf eine konstante Ca^{2+} -Beladung des SR nach Bestrahlung hinweist. Dagegen zeigte sich, dass die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung nach Bestrahlung erhöht ist.

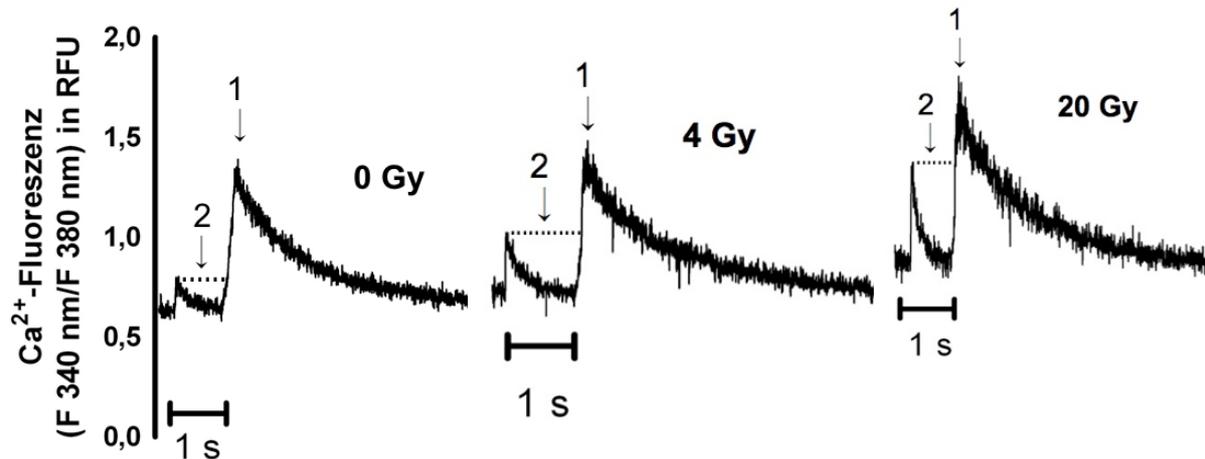


Abb. 3.4 Koffein-induzierte Ca^{2+} -Transienten zeigen eine unveränderte Ca^{2+} -Beladung des SR (1) und eine erhöhte fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung (2) nach Strahlenexposition.

In der Kontrollgruppe lag die Ca^{2+} -Beladung des SR bei einer Koffein- Ca^{2+} -Transienten-Amplituden-Fluoreszenz $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$ von $0,42 \pm 0,13$ relativen Fluoreszenzeinheiten (Abb. 3.5). Die 4 Gy Gruppe wies eine Ca^{2+} -Beladung $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$ von $0,45 \pm 0,15$ RFU auf. Auch in der 20 Gy Gruppe wurde keine statistisch signifikante Änderung der SR- Ca^{2+} -Beladung festgestellt, die Fluoreszenzwerte $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$ lagen bei $0,44 \pm 0,14$ RFU ($P > 0,05$ Ein-Weg-ANOVA).

Die Messungen der fraktionellen Ca^{2+} -Freisetzung (Ca^{2+} -Transienten-Amplitude/SR- Ca^{2+} -Beladung) in der Kontrollgruppe zeigten eine mittlere Freisetzung von $33 \pm 2 \pm 9\%$ des im SR befindlichen Ca^{2+} . Passend zu der in 3.1.1 geschilderten strahlenbedingten Zunahme der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden, stieg nach Strahlenexposition auch die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung des Kardiomyozyten an. So lag die Ca^{2+} -Freisetzung in der 4 Gy Gruppe bereits bei $41,5 \pm 8\%$ und in der 20 Gy Gruppe wurden sogar $44 \pm 4 \pm 13,2\%$ des Ca^{2+} im SR pro Transient freigesetzt ($P < 0,05$ Ein-Weg-ANOVA).

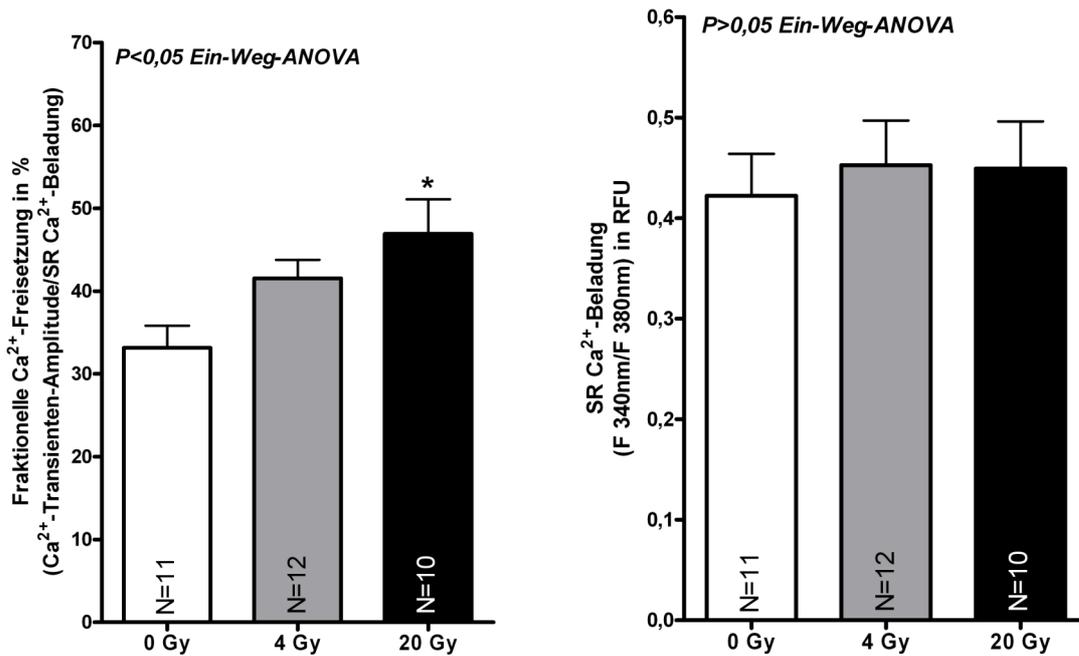


Abb. 3.5. Ionisierende Strahlung hat keinen Einfluss auf die Ca²⁺-Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Die fraktionelle Ca²⁺-Freisetzung pro Transient hingegen ist nach Bestrahlung erhöht. * = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

3.1.3 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kontraktionsstärke

Die Messung der Kontraktionsstärke zeigte, dass die positive inotrope Wirkung auf den Ca²⁺-Haushalt in einer Zunahme der Zellverkürzung resultierte. Die Abbildung 3.6 verdeutlicht die dosisabhängige Verstärkung der Kontraktion.

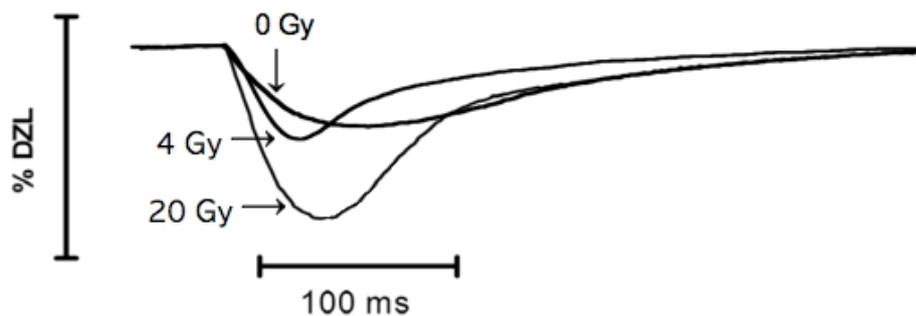


Abb. 3.6 Übereinandergelegte, repräsentative Messungen der Sarkomerverkürzung nach unterschiedlicher Strahlenexposition (gemessen in % diastolischer Zelllänge, % DZL). Es zeigt sich eine Zunahme der Zellverkürzung und eine schnellere Relaxation 4 Gy und 20 Gy exponierter Kardiomyozyten.

In der Kontrollgruppe verkürzte sich der Kardiomyozyt auf $1,4 \pm 0,1\%$ der diastolischen Zelllänge (% DZL). Eine stärkere Kontraktion war bereits in der 4 Gy Gruppe nachweisbar, denn hier verkürzte sich der Kardiomyozyt auf $1,9 \pm 0,2\%$ DZL. In der 20 Gy Gruppe war die Kontraktion am stärksten, die Verkürzung lag bei $2,3 \pm 0,2\%$ DZL ($P < 0,05$ Ein-Weg-ANOVA).

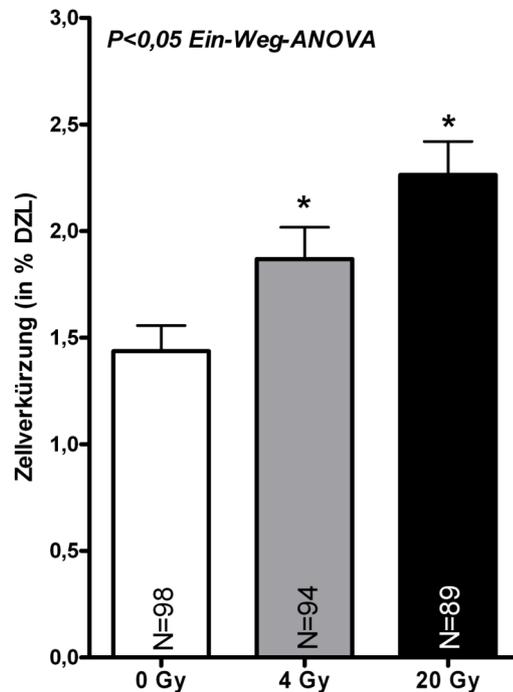


Abb. 3.7 Ionisierende Strahlung verstärkt dosisabhängig die Kontraktion.
 * = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

Zusammenfassend betrachtet zeigen diese Ergebnisse erstmals, dass ionisierende Strahlung eine direkte Wirkung auf den Ca^{2+} -Haushalt des Kardiomyozyten ausübt. Die Beeinflussung des Ca^{2+} -Haushalts ist dosisabhängig und verursacht eine diastolische Ca^{2+} -Überladung, Ca^{2+} -Transienten-Amplitude-Zunahme und Relaxationsbeschleunigung. Zudem steigt die fraktionelle Freisetzung von Ca^{2+} bei unveränderter SR- Ca^{2+} -Beladung. Als Folge der vermehrten systolischen Ca^{2+} kommt es zu einer verstärkten Kontraktion.

3.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus ionisierender Strahlung auf den Ca^{2+} -Haushalt in isolierten Herzmuskelzellen

Als nächster Schritt sollte der zugrunde liegende Mechanismus zur Wirkung ionisierender Strahlung auf isolierte Kardiomyozyten untersucht werden. Hierzu wurde untersucht ob ionisierende Strahlung in isolierten Kardiomyozyten freie Sauerstoffradikale (ROS) generiert.

3.2.1 Die Generierung von Radikalen durch ionisierende Strahlung

In den Abbildungen sind repräsentative Radikalfluoreszenzmessungen einer Kontrollzelle und von Zellen nach Exposition ionisierender Strahlung (4 Gy, 20 Gy) dargestellt. Aus der Abbildung wird ein dosisabhängiger Anstieg der intrazellulären Radikalkonzentration nach Strahlenexposition ersichtlich.

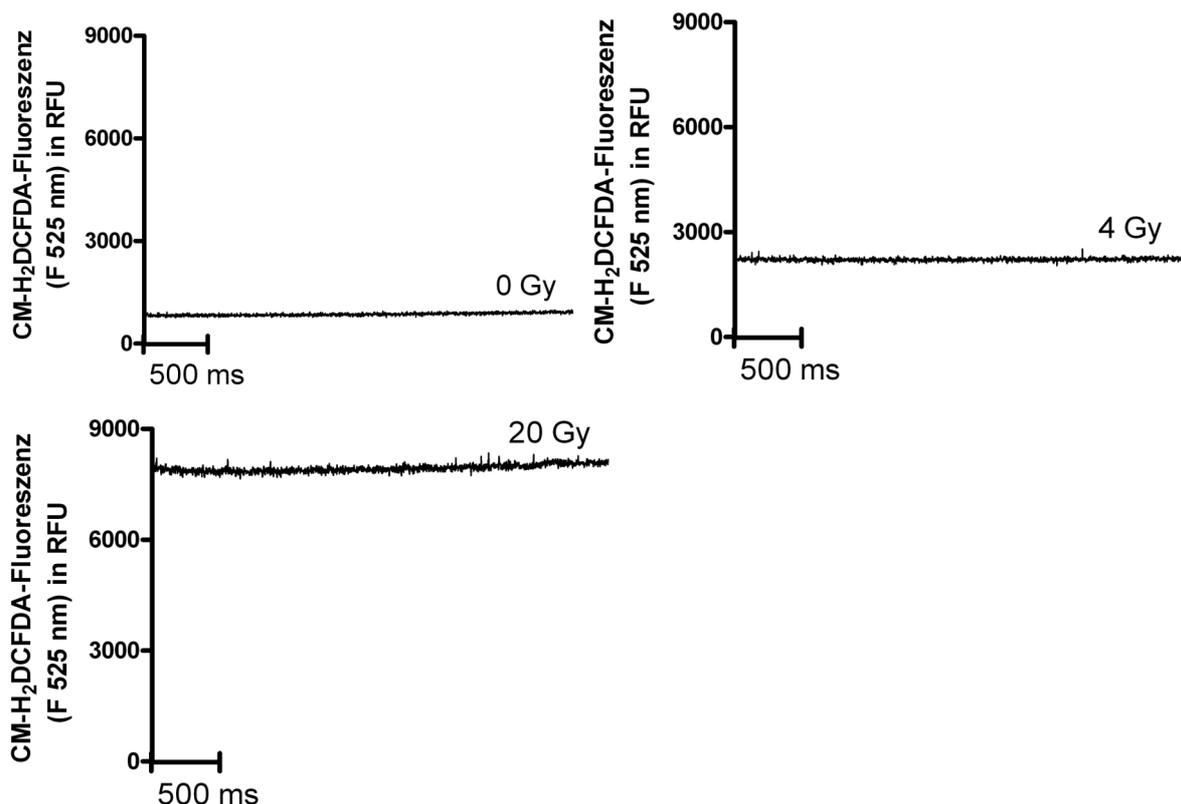


Abb. 3.8 Originalmessungen der Radikalfluoreszenz einer Kontrollgruppe (0 Gy) und 4 Gy sowie 20 Gy exponierter Kardiomyozyten.

Die Messung des Fluoreszenzsignals bei 525 ± 5 nm von Kontrollzellen ergab ein Signal von 1342 ± 137 RFU. Bereits in der 4 Gy Gruppe war eine deutlich höhere Radikalkonzentration messbar, sie lag bei einer Fluoreszenzintensität von 1982 ± 268 RFU. Die meisten Radikale

waren in den Kardiomyozyten der 20 Gy Gruppe nachweisbar, die Messung des Fluoreszenzsignals ergab Werte von 7896 ± 686 RFU. Ein Ein-Weg-ANOVA bestätigt den Anstieg der intrazellulären Radikallast ($P < 0,05$).

3.2.2 Der Einfluss des Radikalfängers Melatonin auf die strahleninduzierte Generierung von Radikalen in isolierten Herzmuskelzellen

Wie in den folgenden Abbildungen (Abb. 3.8) anhand Originalmessungen dargestellt, senkte die Applikation des Radikalfängers Melatonin vor der Strahlenexposition die intrazelluläre Radikallast des Kardiomyozyten.

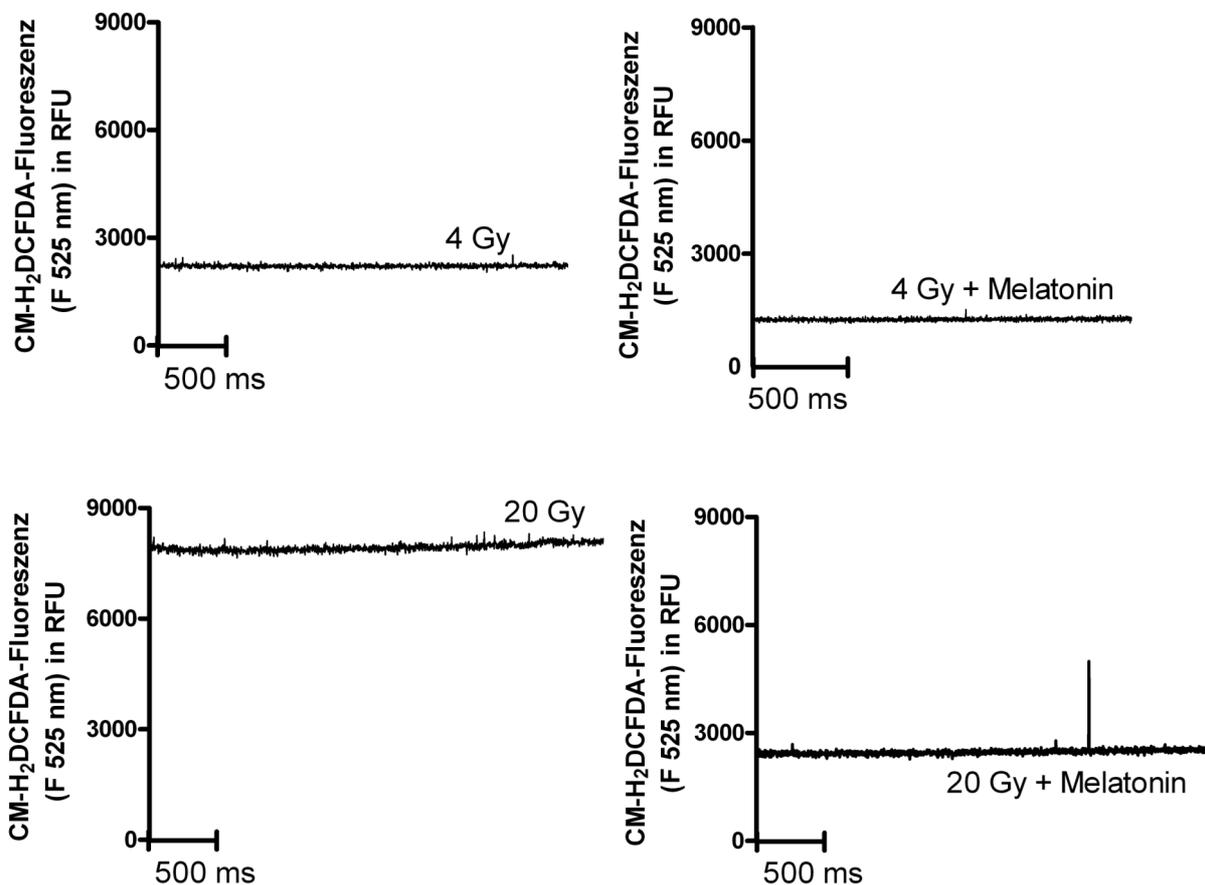


Abb. 3.9 Originalmessungen der Radikalfluoreszenz. Die Applikation des Radikalfängers Melatonin senkt die Radikallast 4 Gy und 20 Gy exponierter Kardiomyozyten.

Scheinbestrahlte Kontrollzellen (0 Gy) mit Melatonin wiesen Fluoreszenzwerte von 1683 ± 135 RFU auf. In der 4 Gy Gruppe mit Melatonin lag die Radikalkonzentration bei Fluoreszenzwerten von 1096 ± 137 RFU. Die 20 Gy Gruppe mit Melatonin wies eine Fluoreszenzintensität von 3144 ± 614 RFU ($P < 0,05$ mit vs. ohne Melatonin, Zwei-Wege-ANOVA). Abschließend betrachtet generiert ionisierende Strahlung in Kardiomyozyten Radikale, hierbei besteht eine dosisabhängige Beziehung. Durch Applikation des Radikalfängers Melatonin kann die Radikalbelastung vermindert werden.

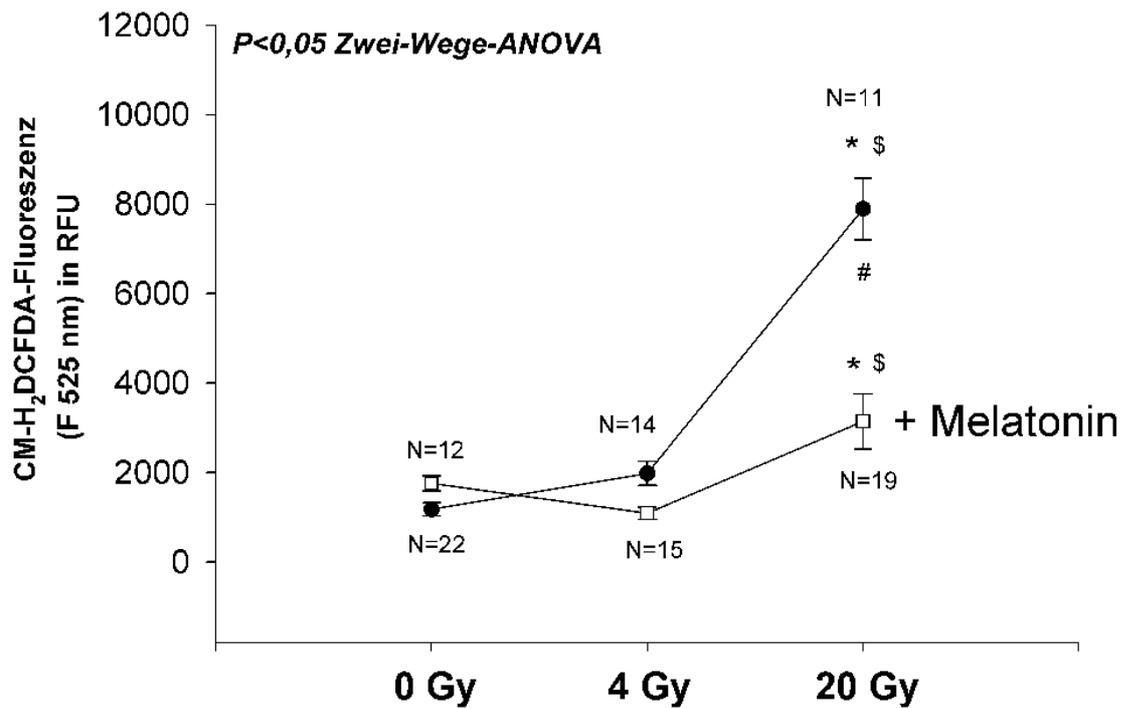


Abb. 3.10 Ionisierende Strahlung generiert in der Zelle dosisabhängig Radikale. Der Radikalfänger Melatonin senkt die Radikallast.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen mit vs. ohne Melatonin (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

\$ = signifikante Differenz zur 4 Gy bestrahlten Gruppe (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

3.2.3 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca^{2+} , auf Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und Ca^{2+} -Relaxationskinetik nach Inkubation mit Melatonin in isolierten Herzmuskelzellen

Die Ergebnisse aus 3.2 legen eine radikalvermittelte Wirkung ionisierender Strahlung auf den Ca^{2+} -Haushalt nahe. In der Folge sollte untersucht werden, ob der Radikalfänger Melatonin konsekutiv auch die Wirkung ionisierender Strahlung auf den Ca^{2+} -Haushalt beeinflussen kann.

Abb. 3.10 verdeutlicht, dass Messungen des Ca^{2+} -Haushalts nach 4 und 20 Gy mit Melatonin deutliche Unterschiede zu den Messungen ohne den Radikalfänger aufwiesen.

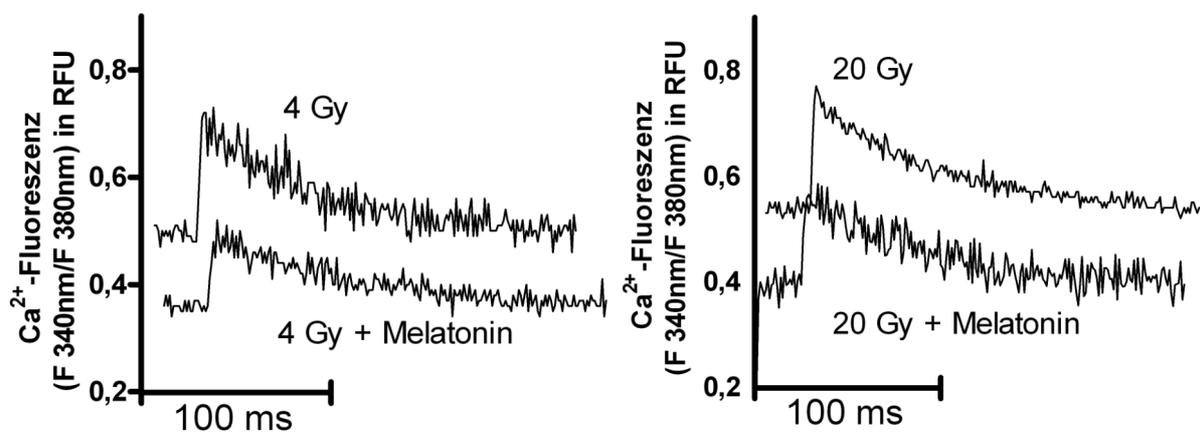


Abb. 3.11 Originalmessungen von Ca^{2+} -Transienten mit und ohne den Radikalfänger Melatonin zeigen einen verminderten Strahleneffekt durch Melatonin.

In einer scheinbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy) mit Melatonin lagen diastolische Ca^{2+} -Fluoreszenzwerte $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$ bei $0,41 \pm 0,01$ relativen Fluoreszenzeinheiten. Nach 4 Gy mit Radikalfänger lag der Fluoreszenzwert $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$ in der Diastole bei $0,41 \pm 0,02$ RFU. Die Ca^{2+} -Fluoreszenz änderte sich mit Radikalfänger auch nach 20 Gy kaum, Messungen von $F(340\text{ nm}/380\text{ nm})$ ergaben $0,42 \pm 0,01$ RFU ($P < 0,05$ Zwei-Wege-ANOVA).

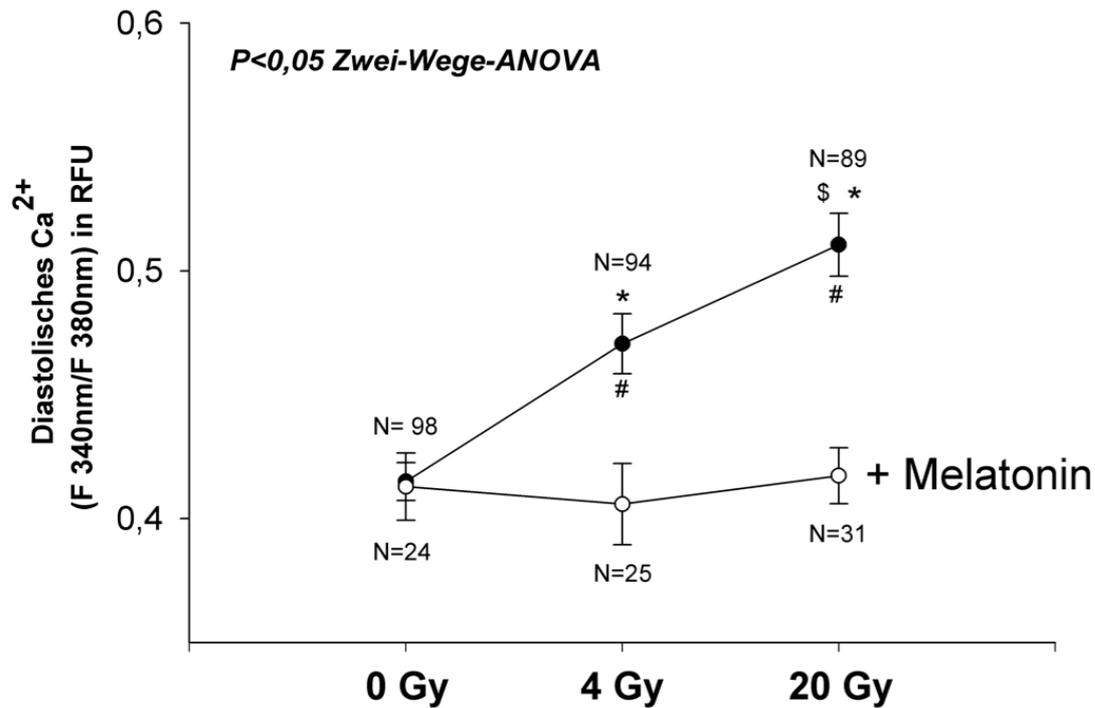


Abb. 3.12 Der Radikalfänger Melatonin vermindert den strahlungsinduzierten Anstieg des diastolischen Ca^{2+} .

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen mit vs. ohne Melatonin (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

\$ = signifikante Differenz zur 4 Gy Gruppe (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

Damit einhergehend zeigte sich durch Melatonin auch eine partielle Inhibition des strahlungsbedingten Ca^{2+} -Transienten-Amplituden-Anstiegs. So waren die Ca^{2+} -Transienten-Amplituden F (340 nm/380 nm) mit Radikalfänger nach 4 Gy mit $0,12 \pm 0,01$ RFU und 20 Gy mit $0,16 \pm 0,01$ RFU jeweils deutlich geringer als ohne Melatonin ($P < 0,05$ Zwei-Wege-ANOVA).

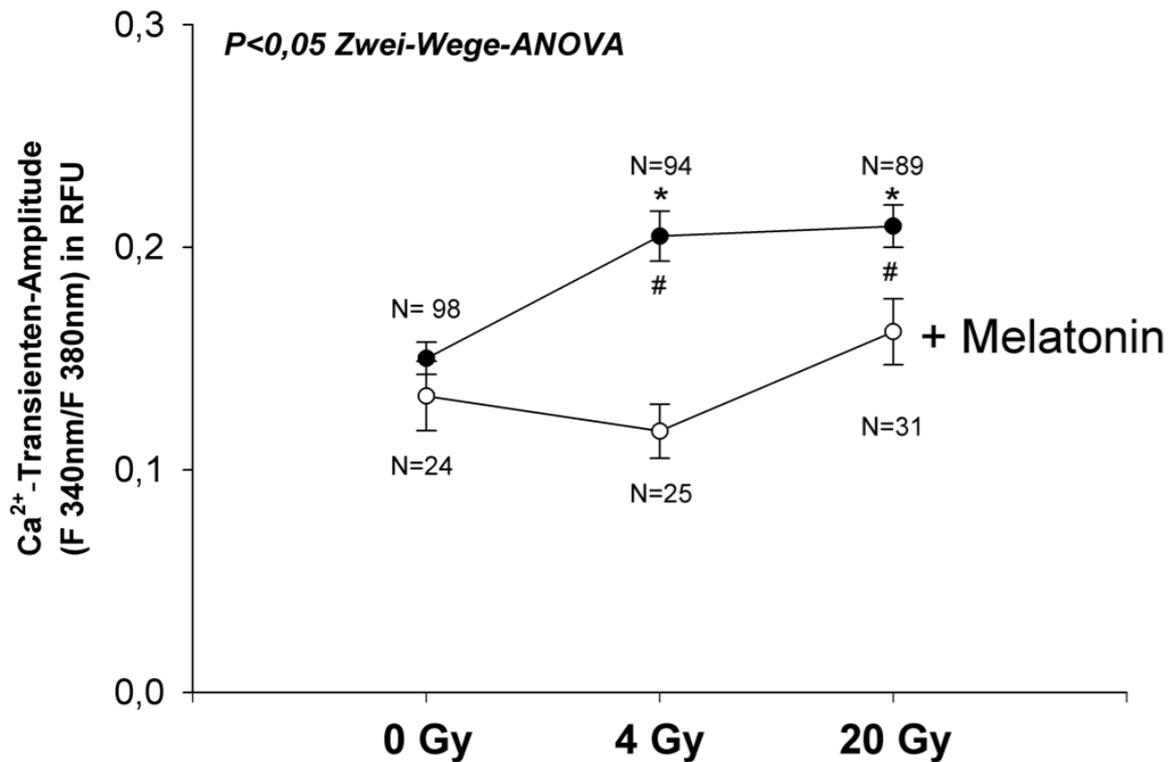


Abb. 3.13 Der Radikalfänger Melatonin inhibiert (teilweise) den strahlungsinduzierten Anstieg der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen mit vs. ohne Melatonin (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

Konsistent zu den vorherigen Ergebnissen inhibierte Melatonin auch eine Relaxationsbeschleunigung nach Strahlenexposition. Durch Einsatz von Melatonin war das Absinken des Ca^{2+} auf 80% in der 4 Gy Gruppe nach 432 ± 19 ms und in der 20 Gy Gruppe nach 432 ± 15 ms erreicht, was verglichen zu Messungen ohne Radikalfänger eine deutliche Verzögerung des Ca^{2+} -Abfalls darstellt.

Bei beiden Dosen mit Melatonin bestätigen ($P < 0,05$) Zwei-Wege-ANOVA Tests eine verlangsamte Ca^{2+} -Aufnahme ins SR gegen über Kardiomyozyten ohne Radikalfänger.

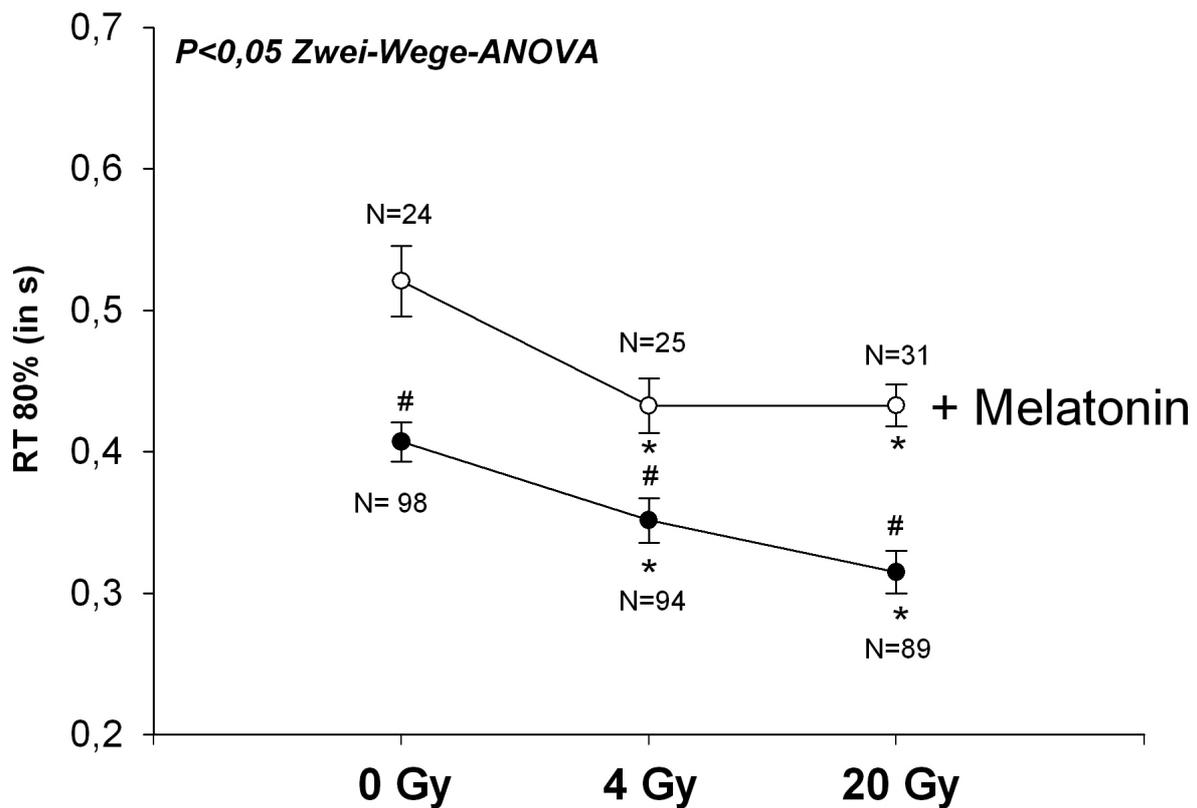


Abb. 3.14 Melatonin vermindert die Relaxationsbeschleunigung durch ionisierende Strahlung.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen mit vs. ohne Melatonin (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

3.2.4 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Ca^{2+} -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie auf die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung nach Inkubation mit Melatonin in isolierten Herzmuskelzellen

Bei den Messungen der Ca^{2+} -Beladung des SR sowie bei der fraktionellen Ca^{2+} -Freisetzung gab es durch Melatonin, ähnlich zu den Messungen ohne Radikalfänger (s. Kapitel 3.1.2), keine signifikanten Änderungen nach Bestrahlung.

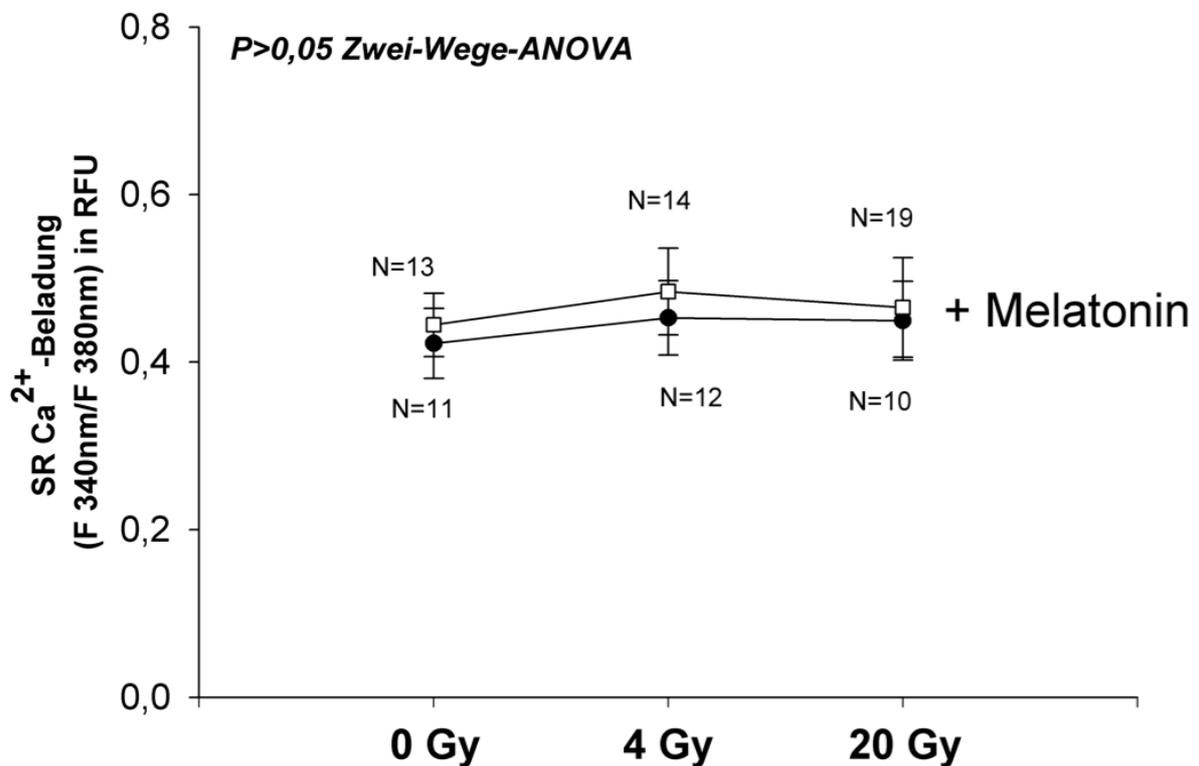


Abb. 3.15 Nach Strahlenexposition und Applikation des Radikalfängers Melatonin ändert sich die Ca^{2+} -Beladung des SR nicht.

Die Mittelwerte der Ratio F (340 nm/380 nm) ergaben Werte in der scheinbestrahlten (0 Gy) Kontrollgruppe mit Melatonin von $0,4 \pm 0,1$ RFU. Nach Bestrahlung mit 4 Gy und Applikation des Radikalfängers Melatonin lagen die Mittelwerte F (340 nm/380 nm) bei $0,5 \pm 0,1$ RFU. Nach Bestrahlung mit 20 Gy und Melatonin-Inkubation lag F (340 nm/380 nm) bei $0,5 \pm 0,1$ RFU, was keine statistisch signifikante Änderung darstellt ($P > 0,05$ Zwei-Wege-ANOVA).

Passend zu der Messung einer melatonin-abhängigen Inhibition des Ca^{2+} -Transienten-Amplituden-Anstiegs war auch die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung (Ca^{2+} -Transienten-Amplitude/SR- Ca^{2+} -Beladung durch Melatonin erniedrigt. So lag die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung in 4 Gy bestrahlten Kardiomyozyten mit Melatonin bei $36\pm 2\%$ und in 20 Gy bestrahlten Kardiomyozyten mit Melatonin bei $38\pm 3\%$. Eine statistisch signifikante Differenz besteht zwischen der 20 Gy mit Melatonin vs. 20 Gy ohne Radikalfänger ($P < 0,05$ Newman-Keuls Post-Hoc-Test).

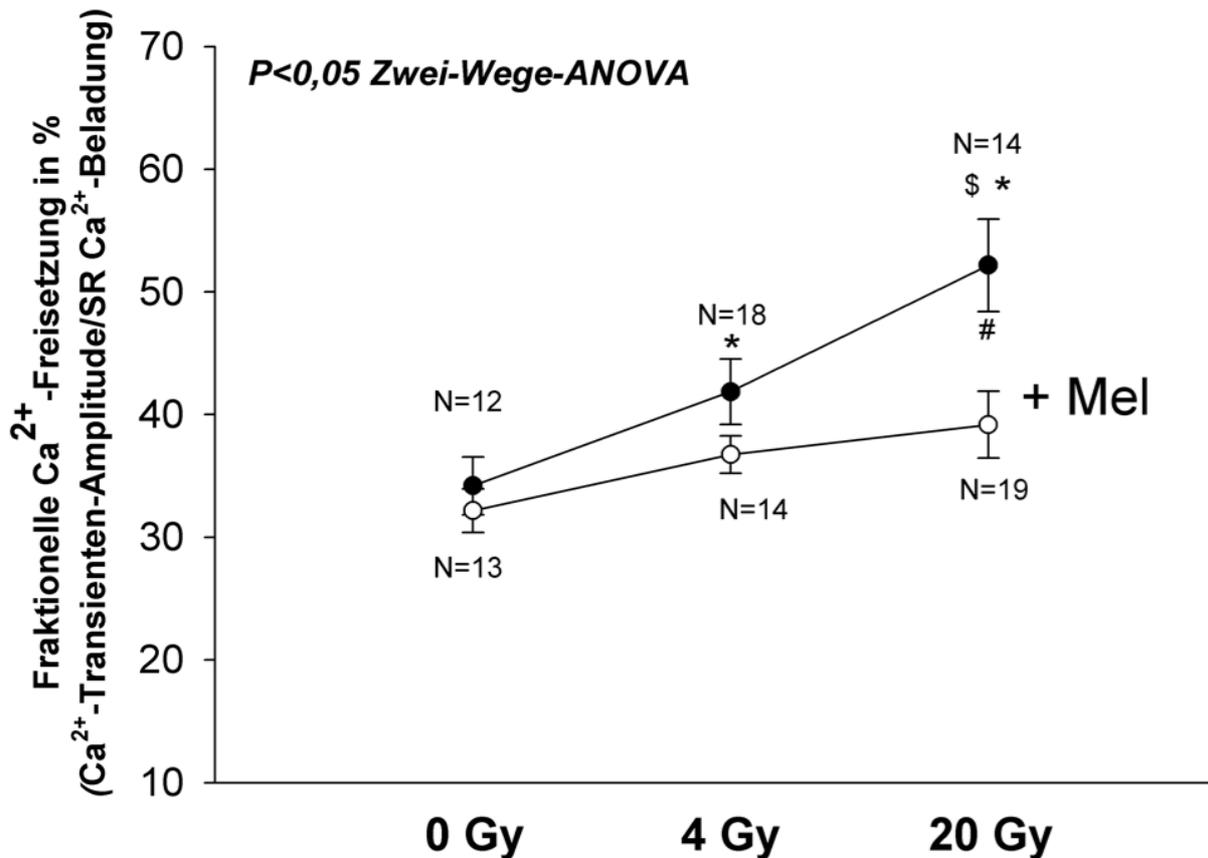


Abb. 3.16 Der Radikalfänger Melatonin inhibiert den strahleninduzierten Anstieg der fraktionellen Ca^{2+} -Freisetzung.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen mit vs. ohne Melatonin (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

\$ = signifikante Differenz zur 4 Gy bestrahlten Gruppe (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

3.2.5 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kontraktionsstärke nach Inkubation mit Melatonin in isolierten Herzmuskelzellen

In Übereinstimmung zu der inhibitorischen Wirkung von Melatonin auf den Ca^{2+} -Haushalt verminderte Melatonin auch den strahlenbedingten Anstieg der Kontraktionsstärke. So verdeutlicht die Abb. 3.17 die melatonin-abhängige Inhibition der Zunahme der Kontraktionsstärke.

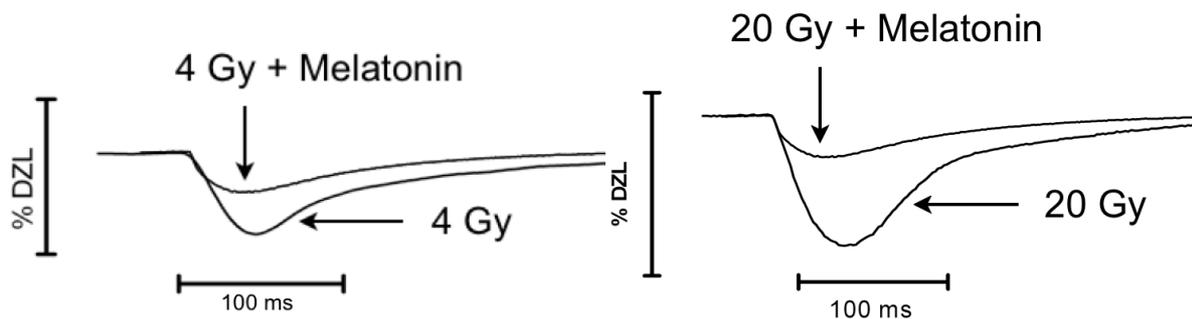


Abb. 3.17 Der Radikalfänger Melatonin schwächt die Zunahme der Kontraktionsstärke nach Bestrahlung mit 4 Gy und 20 Gy ab.

In der scheinbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy) mit Melatonin lag die Zellverkürzung bei $1,1 \pm 0,2\%$ der diastolischen Zelllänge. Die 4 Gy Gruppe mit Melatonin verkürzte sich auf $1,2 \pm 0,1\%$ der diastolischen Zelllänge, während die 20 Gy Gruppe mit Melatonin sich auf $1,6 \pm 0,2\%$ DZL kontrahierte, was eine statistisch geringeren Anstieg der Kontraktion in der Melatonin Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ohne Melatonin darstellt ($P < 0,05$ Zwei-Wege-ANOVA).

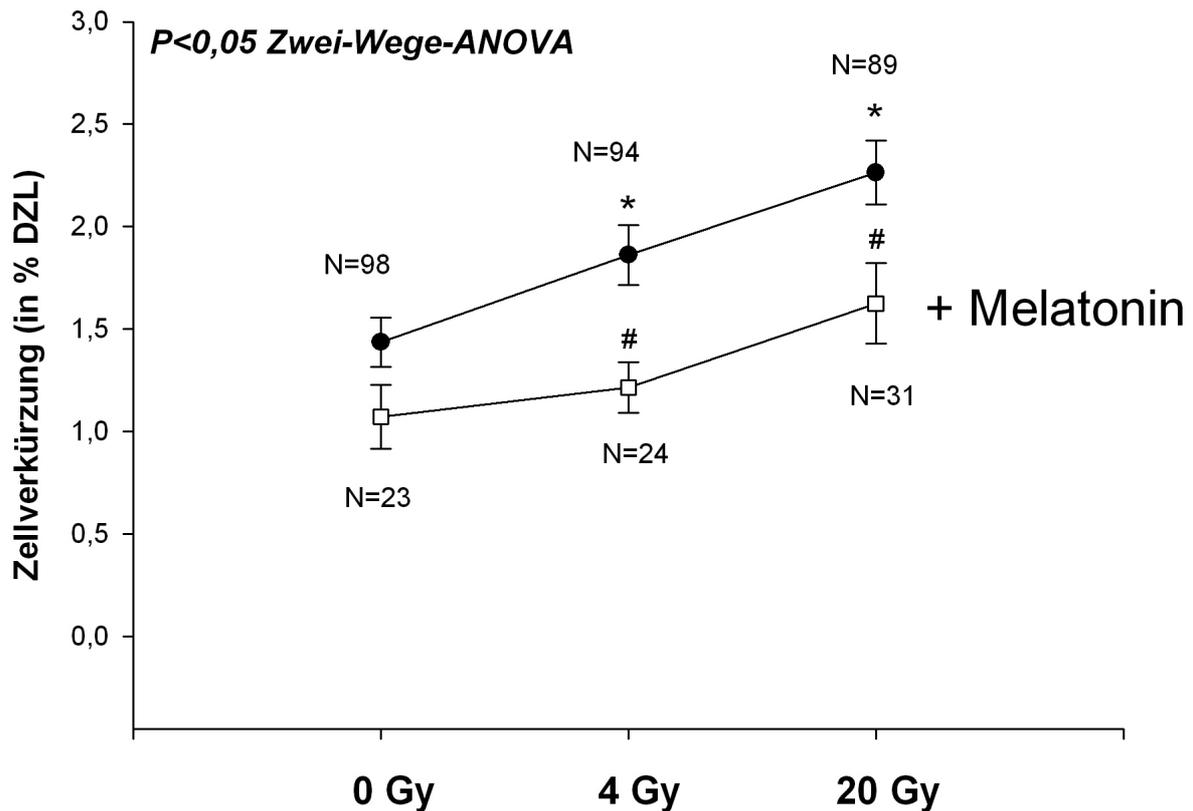


Abb. 3.18 Der Radikalfänger Melatonin vermindert eine strahlenbedingte Zunahme der Kontraktionsstärke.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen der korrespondierenden Gruppe mit vs. ohne Melatonin (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

Bei zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich, dass die Wirkung ionisierender Strahlung auf den Kardiomyozyten radikalvermittelt zu sein scheint. Ionisierende Strahlung generiert in Kardiomyozyten Radikale, deren Konzentration durch den Radikalfänger Melatonin vermindert werden kann. Folgerichtig lässt sich durch einen Radikalfänger auch die positiv inotrope und lusitrope Wirkung auf Ca^{2+} -Haushalt und Kontraktion vermindern.

3.3 Untersuchungen zur Wirkung der strahleninduzierten ROS-Generierung auf Proteine

Um den Mechanismus der Strahlenwirkung auf isolierte Kardiomyozyten noch genauer aufzuklären wurden die Folgen der strahleninduzierten ROS-Generierung näher untersucht. Ein Protein dessen Aktivität über den Redoxstatus reguliert werden kann ist die Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Proteinkinase II (siehe Kapitel 1.3). Deshalb wurde die Wirkung ionisierende Strahlung auf isolierte Kardiomyozyten nach selektiver, pharmakologischer Inhibition der CaMKII (mittels eines Derivats des autocamide-2 inhibitorischen Peptids, AIP, siehe 2.3) untersucht.

3.3.1 Die Wirkung ionisierender Strahlung bei selektiver Inhibition der CaMKII auf diastolisches Ca^{2+} , auf Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und Ca^{2+} -Relaxationskinetik in isolierten Herzmuskelzellen

Wie die Originalregistrierungen in Abb. 3.19 zeigen, verminderte eine selektive Inhibition der CaMKII die Wirkung ionisierender Strahlung auf den Ca^{2+} -Haushalt des Kardiomyozyten.

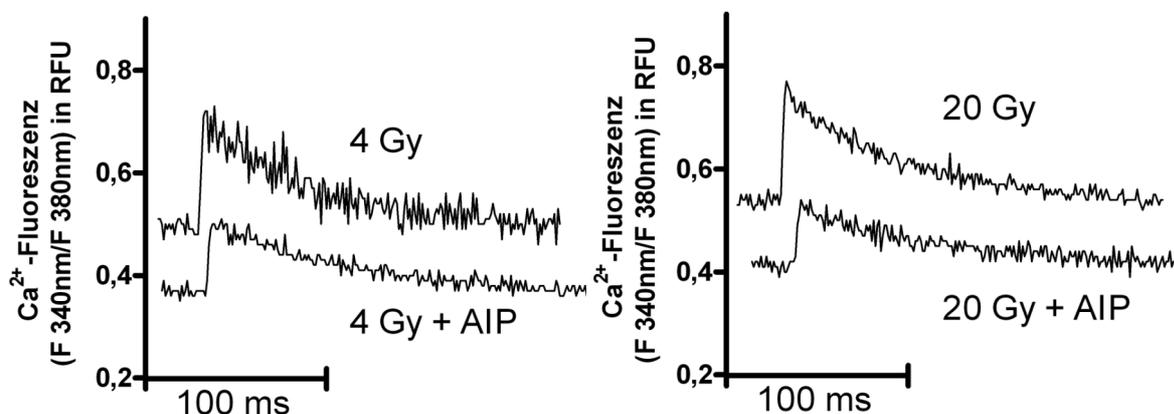


Abb. 3.19 Hemmung der CaMKII mittels AIP verminderte die Wirkung ionisierender Strahlung auf den Ca^{2+} -Haushalt.

CaMKII-Inhibition verminderte die diastolische Ca^{2+} -Überladung nach Strahlenexposition (4, Gy, 20 Gy, $P < 0,05$ Zwei-Wege-ANOVA). Die Ratio der diastolischen Fluoreszenz F (340 nm/380 nm) lag in einer scheinbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy) mit AIP bei $0,41 \pm 0,01$ RFU. In der CaMKII-inhibierten 4 Gy Gruppe lag die diastolische Ca^{2+} Fluoreszenz F (340 nm/380 nm) bei $0,42 \pm 0,01$ RFU und in der 20 Gy Gruppe bei $0,42 \pm 0,02$ relativen Fluoreszenzeinheiten. Damit ist das diastolische Ca^{2+} in beiden Gruppen signifikant niedriger als in den Gruppen mit regulärer CaMKII-Aktivität (Newman-Keuls Post-Hoc-Test).

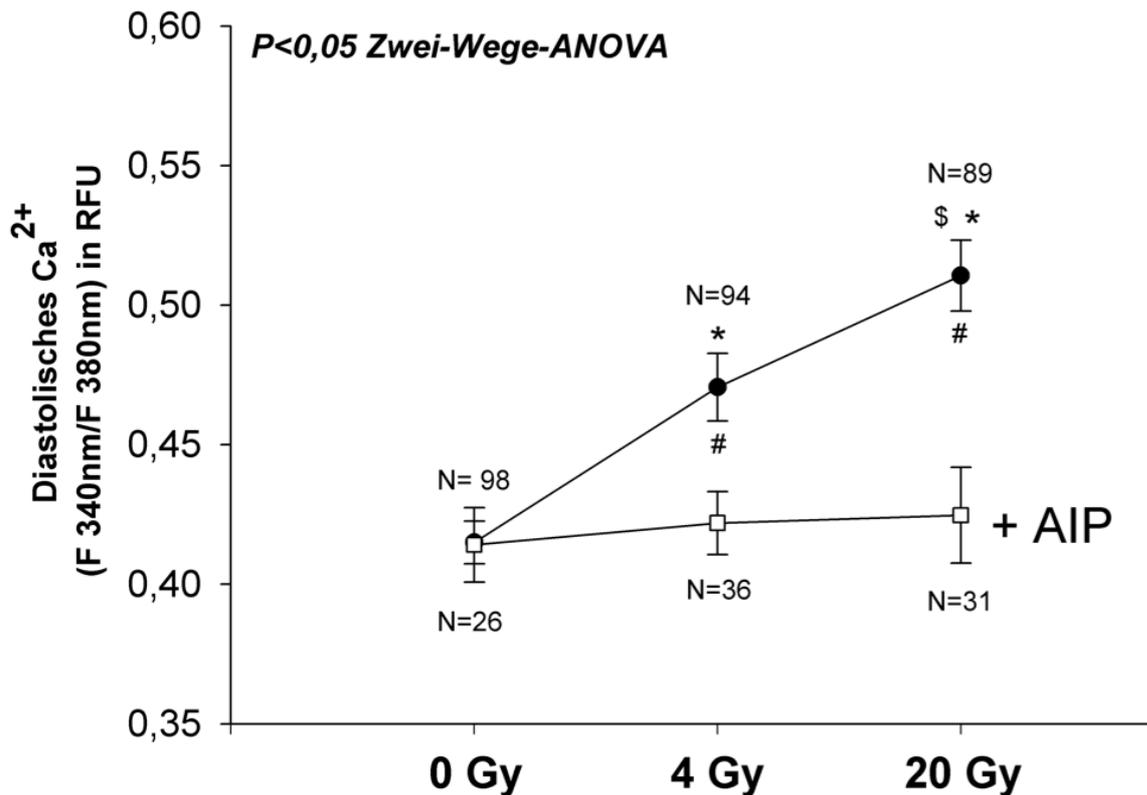


Abb. 3.20 Inhibition der CaMKII (mittels AIP) reduzierte den strahlungsinduzierten Anstieg des diastolischen Ca^{2+} .

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen mit vs. ohne AIP (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

\$ = signifikante Differenz zur 4 Gy bestrahlten Gruppe (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

Auch der strahlenabhängige Ca^{2+} -Transienten-Amplituden-Anstieg konnte durch CaMKII-Inhibition deutlich vermindert werden ($P < 0,05$ Zwei-Wege-ANOVA). Direkte Vergleiche der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden F (340 nm/380 nm) der CaMKII-inhibierten 4 Gy ($0,14 \pm 0,01$ RFU) und 20 Gy ($0,14 \pm 0,01$ RFU) Gruppen mit den 4 und 20 Gy Gruppen mit regulärer CaMKII-Aktivität zeigen bei beiden Dosen eine signifikant kleinere Ca^{2+} -Transienten-Amplitude durch CaMKII-Inhibition ($P < 0,05$ 4 Gy + AIP vs. 4 Gy, $P < 0,05$ 20 Gy + AIP vs. 20 Gy, Newman-Keuls Post-Hoc-Test).

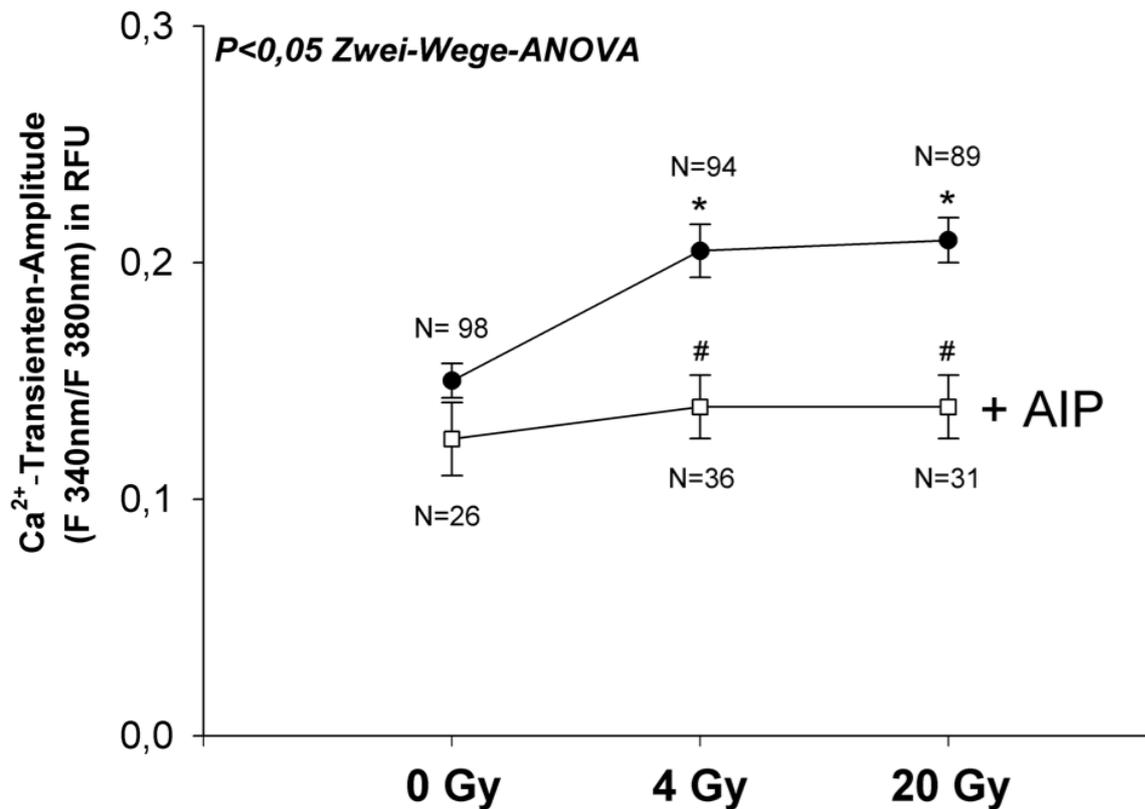


Abb. 3.21 Hemmung der CaMKII (mit AIP) vermindert den strahlungsinduzierten Anstieg der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen mit vs. ohne AIP (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen erwies sich auch die strahleninduzierte Relaxationsbeschleunigung als CaMKII-abhängig ($P < 0,05$ Zwei-Wege-ANOVA). Nach der Systole war 80% der diastolischen Ausgangskonzentration des Ca^{2+} in der CaMKII-inhibierten 4 Gy Gruppe nach 482 ± 18 ms erreicht, was verglichen zur 4 Gy Gruppe ohne CaMKII-Inhibitor eine verzögerte Ca^{2+} -Aufnahme ins SR darstellt ($P < 0,05$ vs. 4 Gy ohne AIP, Newman-Keuls Post-Hoc-Test). Auch in der 20-Gy-Gruppe mit AIP wurde das Ca^{2+} langsamer zytosolisch abgesenkt, denn die RT80% wurde erst nach 454 ± 17 ms erreicht ($P < 0,05$ vs. 20 Gy ohne AIP, Newman-Keuls-Post-Hoc-Test).

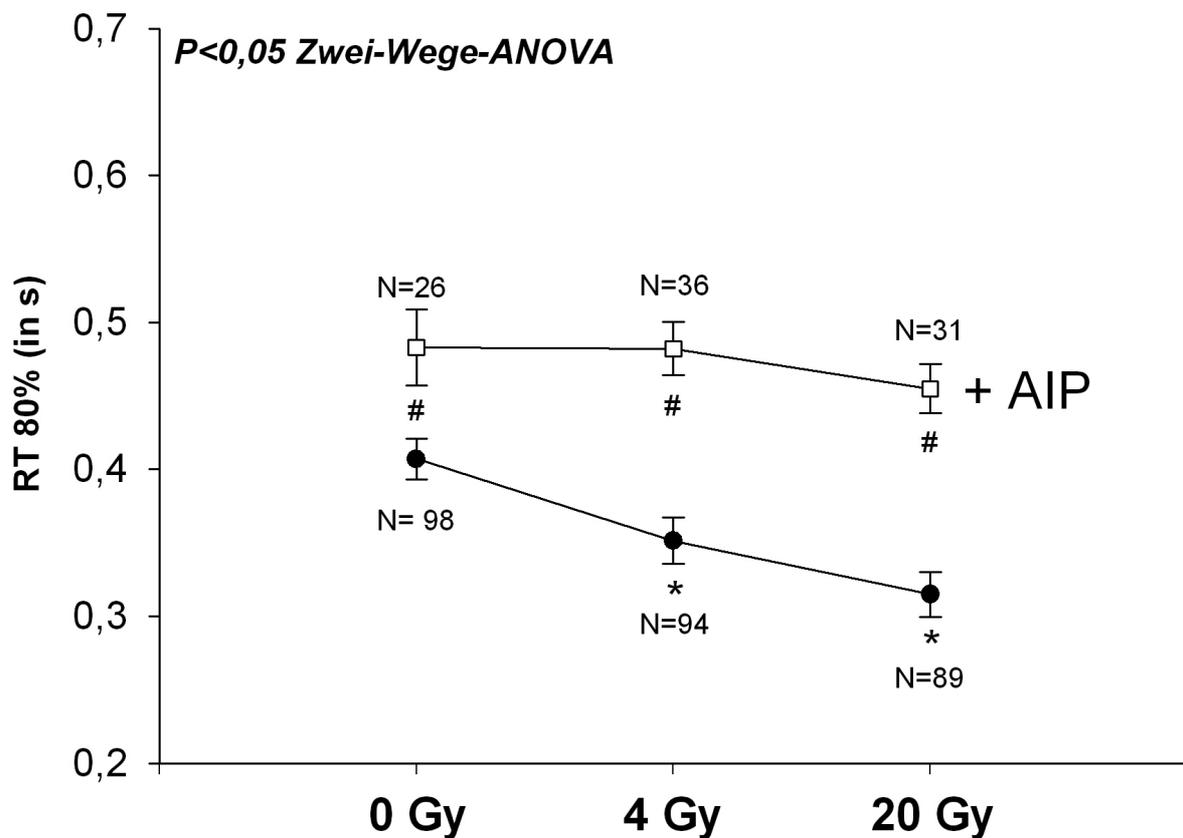


Abb. 3.22 Die strahlungsinduzierte Relaxationsbeschleunigung lässt sich durch CaMKII-Inhibition (mit AIP) vermindern.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen mit vs. ohne AIP (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

3.3.2 Die Wirkung ionisierender Strahlung bei selektiver Inhibition der CaMKII auf die Ca²⁺-Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie auf die fraktionelle Ca²⁺-Freisetzung in isolierten Herzmuskelzellen

Die Ca²⁺-Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) blieb auch nach CaMKII-Inhibition und Bestrahlung unverändert. Die fraktionelle Ca²⁺-Freisetzung pro Transient (Ca²⁺-Transienten-Amplitude/SR-Ca²⁺-Beladung) war, passend zur Reduktion der Ca²⁺-Transienten-Amplituden-Zunahme durch AIP, nach CaMKII-Inhibition geringer.

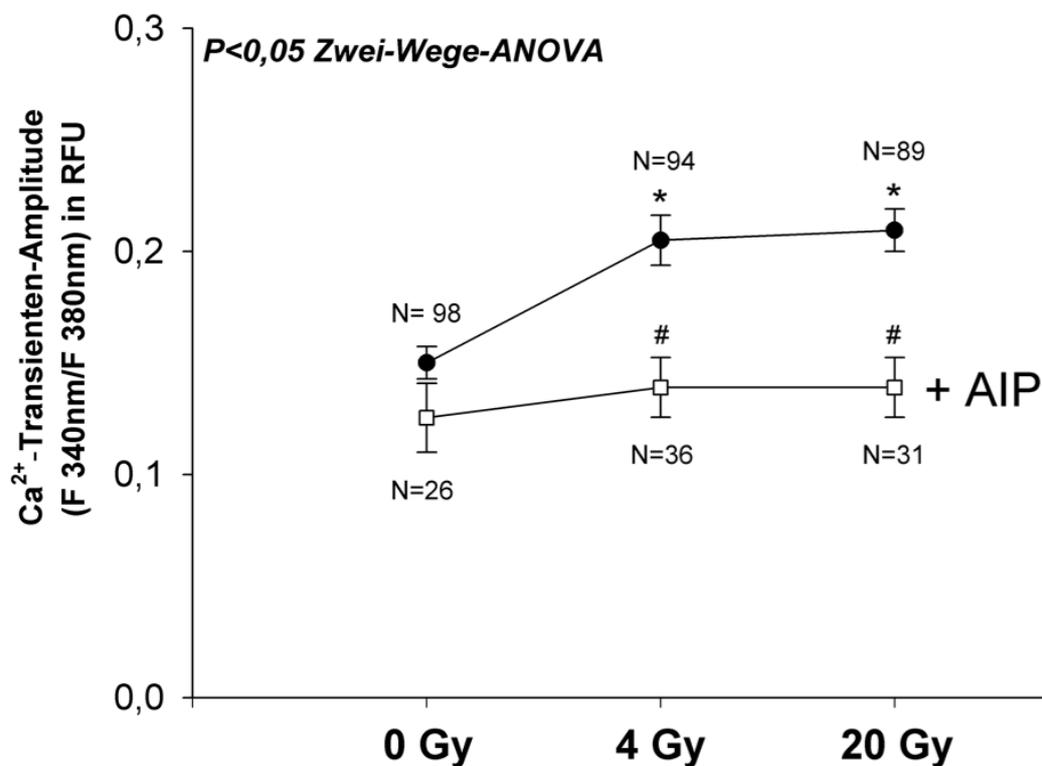


Abb. 3.23 Auch nach CaMKII-Inhibition blieb die Ca²⁺-Beladung des SR nach Bestrahlung unverändert.

In den CaMKII-inhibierten Kardiomyozyten war Ca²⁺-Beladung des SR nach 4 Gy (0,48±0,21 RFU) und nach 20 Gy (0,59±0,12 RFU) gegenüber den nicht CaMKII-inhibierten Kardiomyozyten kaum verändert (P>0,05 Zwei-Wege-ANOVA).

In Übereinstimmung mit der verminderten Ca^{2+} -Transienten-Amplituden-Zunahme reduzierte AIP den strahlungsinduzierten Anstieg der fraktionellen Ca^{2+} -Freisetzung. So wurde in CaMKII-inhibierten Kardiomyozyten mit $35,8 \pm 3,3\%$ (scheinbestrahlte Kontrollgruppe) ungefähr gleich viel Ca^{2+} zu der 4 Gy Gruppe mit $33,0 \pm 2,8\%$ und zur 20 Gy Gruppe mit $33,6 \pm 2,7\%$ für einen Ca^{2+} -Transienten freigesetzt, was signifikant geringer ist als in Kardiomyozyten mit regulärer CaMKII-Aktivität ($P < 0,05$ Zwei-Wege-ANOVA).

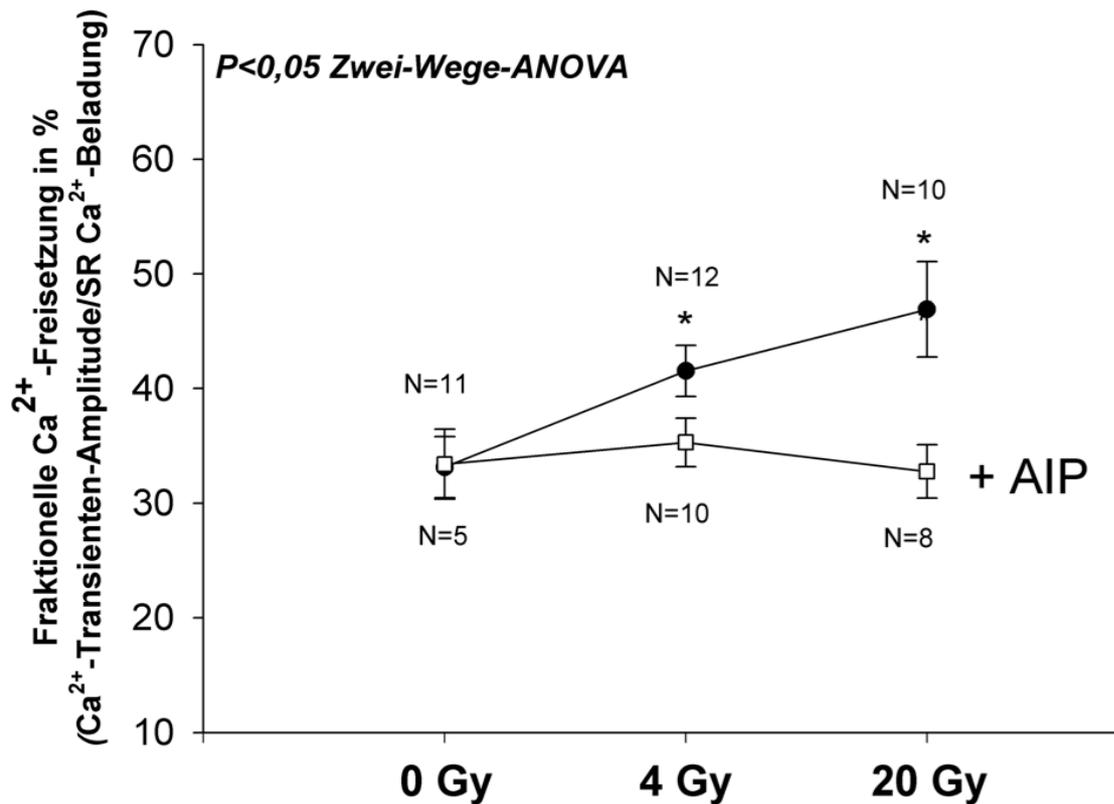


Abb. 3.24 Der CaMKII-Inhibitor AIP vermindert die strahlenbedingte Zunahme der fraktionellen Ca^{2+} -Freisetzung.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

3.3.3 Die Wirkung ionisierender Strahlung bei selektiver Inhibition der CaMKII auf die Kontraktionsstärke in isolierten Herzmuskelzellen

Die Ergebnisse zur Messung der Kontraktionsstärke korrelierten zum Ca^{2+} -Haushalt nach CaMKII-Inhibition und Strahlenexposition. So zeigt Abb. 3.25 dass auch die Zunahme der Kontraktionsstärke durch den CaMKII-Inhibitor AIP vermindert werden konnte ($P < 0,05$ Zwei-Wege-ANOVA).

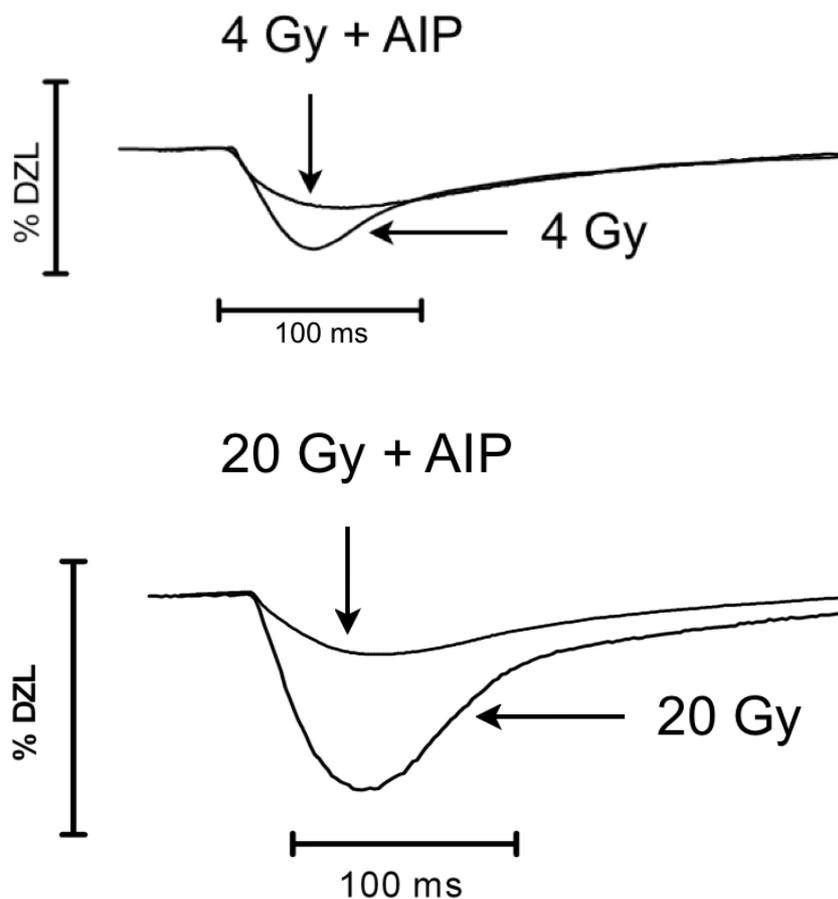


Abb. 3.25 Hemmung der CaMKII vermindert die strahlenbedingte Zunahme der Kontraktionsstärke.

Die Kardiomyozyten der CaMKII-inhibierten 4 Gy Gruppe kontrahierten sich auf $1,46 \pm 0,19\%$ der diastolischen Zelllänge (DZL) und damit schwächer als ohne AIP ($P < 0,05$ Newman-Keuls Post-Hoc-Test). Die 20 Gy Gruppe mit CaMKII-Inhibitor verkürzte sich sogar nur auf $1,21 \pm 0,10\%$ DZL, was verglichen zur 20 Gy Gruppe mit regulärer CaMKII-Aktivität eine deutlich schwächere Kontraktion darstellt ($P < 0,05$ Newman-Keuls Post-Hoc-Test).

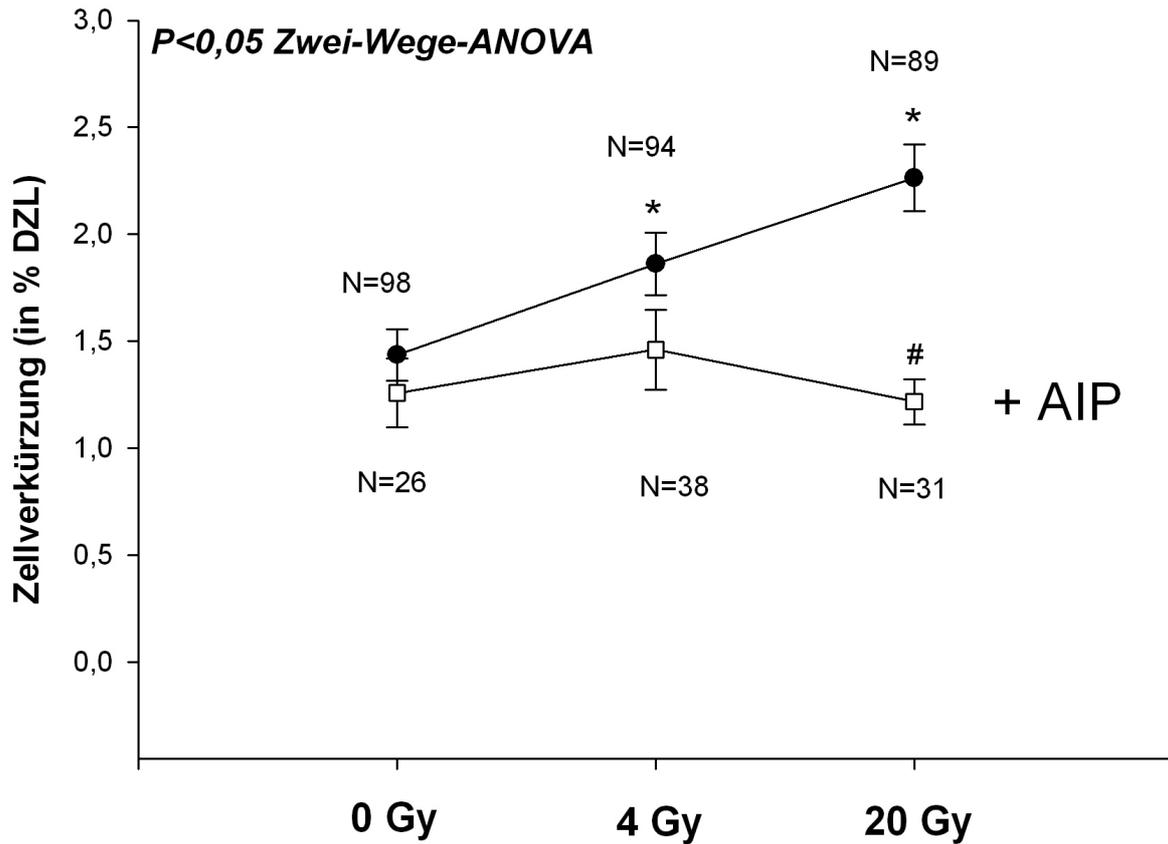


Abb. 3.26 Hemmung der CaMKII (durch AIP) inhibiert eine strahlungsinduzierte Zunahme der Kontraktionsstärke.

* = signifikante Differenz zu 0 Gy Kontrollzellen (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

= signifikante Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen mit vs. ohne AIP (Newman-Keuls Post-Hoc-Test)

Zusammenfassend betrachtet verminderte eine selektive Hemmung der CaMKII die Wirkung ionisierender Strahlung auf den Ca^{2+} -Haushalt des Kardiomyozyten. So erwiesen sich vor allem die positiv inotrope und lusitrope Strahlenwirkung auf Ca^{2+} -Haushalt und Kontraktion des Kardiomyozyten als CaMKII-abhängig.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass ionisierende Strahlung eine direkte Wirkung auf die Funktion des Myokards hat.

Der Wirkmechanismus scheint auf einer dosisabhängigen Generierung von ROS durch die Radiolyse von Wasser zu beruhen, was üblicherweise in der Strahlentherapie genutzt wird, um die DNA von Tumorzellen zu schädigen (HERRMAN et al. 2006). Da der Kardiomyozyte postmitotisch ist, spielt dieser Effekt im Herzen kaum eine Rolle. Vielmehr zeigt diese Arbeit erstmals, dass ionisierende Strahlung die Integrität des Ca^{2+} -Haushalts von isolierten Kardiomyozyten beeinträchtigen kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass dies über eine strahleninduzierte Generierung von ROS geschieht, die zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) führen. Da eine Beeinträchtigung des Ca^{2+} -Haushalts und eine CaMKII-Aktivierung langfristig zu kardialer Dysfunktion führen können, könnte möglicherweise die in dieser Arbeit gezeigte strahleninduzierte CaMKII-Aktivierung für die bekannten klinischen Komplikationen nach mediastinaler Strahlenexposition (dilatative Kardiomyopathie, Arrhythmien, siehe Kapitel 1.1.1) von Bedeutung sein.

4.1 Zur Generierung von Radikalen durch ionisierende Strahlung und Einfluss des Radikalfängers Melatonin in isolierten Herzmuskelzellen

Die Ergebnisse zur ROS-Generierung sind konsistent zur vielfach publizierten Wirkung ionisierender Strahlung auf die Zelle im Allgemeinen. Demnach generiert ionisierende Strahlung über die Radiolyse von Wasser dosisabhängig ROS (HERRMAN et al. 2006).

In dieser Arbeit sind klare Anstiege der intrazellulären ROS-Konzentration nach Bestrahlung (4 Gy, 20 Gy) gemessen worden (Kapitel 3.2.1). Dies zeigt, dass ionisierende Strahlung auch in Kardiomyozyten dosisabhängig ROS generiert.

Die Inkubation mit Melatonin verringerte die ROS-Konzentration nach 4 Gy und 20 Gy Bestrahlung deutlich, was die bekannte Wirkung von Melatonin als Radikalfänger bestätigt (REITER und TAN 2003). Durch einen Anstieg der ROS-Konzentration in den Melatonin-Gruppen von 1096 ± 136 relativen Fluoreszenzeinheiten (4 Gy) zu 3144 ± 613 RFU (20 Gy),

zeigte sich zudem ein Sättigungseffekt des Melatonins. So generierte 20 Gy in den Kardiomyozyten offenbar so viele ROS, dass trotz 1 mm/l Melatonin die Radikalkonzentration anstieg und nicht mehr, wie in 4 Gy exponierten Kardiomyozyten, auf das scheinbestrahlte Kontrollniveau (0 Gy) vermindert war.

Ein Rückschluss von der in dieser Arbeit gemessenen ROS-Konzentration auf tatsächliche, klinische ROS-Konzentrationen im Herzen ist nur sehr bedingt möglich. Denn einerseits wird in der Strahlentherapie fraktioniert bestrahlt, mit Einzeldosen von max. 2 Gy, andererseits ist am Patienten die Ausgangsvoraussetzung des Kardiomyozyten eine völlig andere („in vivo“, zusätzliche Beeinflussung durch Medikamente, etc.). Nichtsdestotrotz ist aufgrund des Mechanismus generell auch klinisch bei Bestrahlung des Herzens von einem intrazellulären ROS-Anstieg in den Kardiomyozyten auszugehen.

Die Generierung von ROS und die dadurch verursachten DNA-Schädigungen stellen die Grundlage der Strahlentherapie dar (Kapitel 1.4.1). Da der Kardiomyozyt postmitotisch ist spielen ROS-Wirkungen auf die DNA im Herzen eine geringe Rolle. Allerdings könnten in Kardiomyozyten ROS-bedingte DNA-Schäden im codierenden-Bereich oder eine Beeinträchtigung von Transkriptionsmechanismen eine veränderte Protein-Expression verursachen. So wiesen TIMOLATI et al. (2006) nach, dass Doxorubicin-Inkubation möglicherweise über eine ROS-Generierung langfristig eine verringerte SERCA2A-Expression verursacht. Des Weiteren zeigten LIM et al. (1994), dass Doxorubicin (möglicherweise auch über ROS, TIMOLATI et al. 2006) Titin zersetzt, wodurch Myofilament-Instabilität und diastolische Dysfunktionen verursacht werden könnten. Da die genannten Zellschädigungen auf ähnlichen Mechanismen (Generierung von ROS) wie ionisierende Strahlung beruhen, könnte Strahlenexposition eventuell ebenfalls langfristig sowohl eine Verminderung der SERCA2a-Expression als auch eine Zersetzung von Titin zur Folge haben, die wie auch der gestörte Ca^{2+} -Stoffwechsel zur klinisch bekannten (langfristigen) kontraktilen Dysfunktion nach Strahlenexposition beitragen könnten.

Eine mögliche Fehlerquelle der ROS-Messungen war die Tatsache, dass es am Epifluoreszenzsetup nicht möglich war, wie vom Hersteller des ROS-Farbstoffs empfohlen, die Messungen in einer O_2 -armen Atmosphäre durchzuführen. Allerdings war jede Gruppe davon gleich betroffen, was mögliche systematische Messfehler ausgleichen sollte.

4.1.1 Zum ROS-abhängigen Aktivierungsmechanismus der CaMKII

Die Ergebnisse zur CaMKII-Inhibition (siehe Kapitel 3.3) weisen daraufhin, dass die Wirkung ionisierender Strahlung auf den Ca^{2+} -Haushalt von einer ROS-vermittelten CaMKII-Aktivierung abhängig ist. Zudem haben wir in begleitenden Untersuchungen (NEUMANN et al. 2010) eine dosisabhängig ansteigende CaMKII-Phosphorylierung an Thr-287 nach Strahlenexposition (4, Gy, 20 Gy) vorgefunden. Durch Einsatz von Melatonin war diese Thr-287-Phosphorylierung der CaMKII signifikant vermindert, was die funktionellen Ergebnisse dieser Arbeit (ROS-abhängige-CaMKII-Aktivierung) auf Western-Blot Ebene bestätigt.

Details der CaMKII-Aktivierung durch ROS beschreiben ERICKSON et al. (2008). Demnach bindet die regulatorische Domäne den Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex. Eine anschließende Oxidation an Met 281/282 durch ROS führt zu Ca^{2+} /Calmodulin unabhängiger Aktivität (autonomer Status). In dieser Arbeit könnte die ROS-abhängige CaMKII-Aktivierung zu einem Anstieg des diastolischen Ca^{2+} geführt haben, was wiederum eine vermehrte Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes an die regulatorische Domäne der CaMKII bedingt haben könnte. In der Folge könnte es nun auch zu Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängiger Aktivität durch vermehrte Autophosphorylierung an Thr-287 kommen (hemmt Blockade der katalytischen Domäne), wie wir sie in den begleitenden Untersuchungen (NEUMANN et al. 2010) nach Strahlenexposition durch Western-Blot Experimente bestätigen konnten. Die genauen Mechanismen der CaMKII-Aktivierung nach Strahlenexposition erfordern allerdings noch weitere, genauere Untersuchungen. WAGNER et al. (2011) konnte allerdings zeigen, dass eine SR Ca^{2+} abhängige Aktivierung der CaMKII während ROS Stress von entscheidender Bedeutung ist.

4.1.2 Zur Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca^{2+} , Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung in isolierten Herzmuskelzellen

Sowohl durch den Radikalfänger Melatonin als auch durch CaMKII-Inhibition konnte der Anstieg des diastolischen Ca^{2+} , der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden und damit einhergehend auch die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung vermindert werden. Dies legt den Rückschluss nahe, dass der strahlungsinduzierte Anstieg von einer ROS-abhängigen CaMKII-Aktivierung abhängig ist. Verschiedene Mechanismen könnten hierfür verantwortlich sein:

Eine dosisabhängige Phosphorylierung der L-Typ-Kanäle (an Threonin-498) durch die CaMKII erhöht bekanntlich den Ca^{2+} -Einstrom (DZHURA et al. 2000; HUDMON et al. 2005; GRUETER et al. 2006). Durch einen vermehrten Einstrom von Ca^{2+} über die L-Typ-Kanäle

könnte die diastolische Ca^{2+} -Überladung bei unveränderter Ca^{2+} -Beladung des SR erklärt werden.

Des Weiteren haben wir in den begleitenden Untersuchungen (SAG et al. 2009a) gesehen, dass die CaMKII nach Strahlenexposition dosisabhängig die Ca^{2+} -Spark-Frequenz (spontane, diastolische Ca^{2+} -Freisetzungen) erhöht. Eine Zunahme des SR- Ca^{2+} -Lecks in der Diastole könnte zu der in dieser Arbeit gemessenen, diastolischen Ca^{2+} -Überladung beigetragen haben. Wobei ungeklärt bleibt, ob das SR Ca^{2+} -Leck Resultat oder Ursache der Ca^{2+} -Überladung in der Diastole ist. Für die CaMKII Aktivierung (oder weitere CaMKII Aktivierung) scheint dieser RyR-abhängige Mechanismus allerdings von Bedeutung zu sein (Wagner et al. 2011).

Des Weiteren könnte die bereits bekannte CaMKII-abhängige RyR-Phosphorylierung an Serin-2815 für den Ca^{2+} -Transienten-Amplituden-Anstieg nach Strahlenexposition verantwortlich sein. Denn eine CaMKII-abhängige RyR-Phosphorylierung führt über einen vermehrten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR zu einem Anstieg der Ca^{2+} -induzierten- Ca^{2+} -Freisetzung (MAIER et al. 2003; KOHLHAAS et al. 2006), was auch in diesem Zusammenhang Ca^{2+} -Transienten-Amplitude und fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung erhöht haben könnte.

In Übereinstimmung mit dieser Vermutung vermindert eine CaMKII-Inhibition die Ca^{2+} -Transienten-Amplituden und fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung in den 4 Gy und 20 Gy Gruppen. Ein weiterer Mechanismus, der in den CaMKII-abhängigen Anstieg des diastolischen Ca^{2+} involviert sein könnte, ist die Na^+ -Kanal-Regulation durch die CaMKII. So zeigten WAGNER et al. (2006), dass die CaMKII den sog. späten Na^+ -Einstrom erhöht. Die begleitenden Experimente von NEUMANN et al. 2010 zeigen, dass die strahleninduzierte CaMKII-Aktivierung zu einer intrazellulären $[\text{Na}^+]_i$ -Akkumulation führen. Als Folge könnte der „reverse Mode“ des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters aktiviert werden, der kompensatorisch Na^+ nach extrazellulär und Ca^{2+} in die Zelle hineintransportieren würde, was zur diastolischen Ca^{2+} -Überladung des Kardiomyozyten beigetragen haben könnte. Die radikalvermittelte Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters könnte diesen Mechanismus begünstigt haben.

Die Arbeiten von JOSEPHSON et al. (1990), GOLDHABER und LIU (1994) und TIMOLATI et al. (2006) zur ROS-Wirkung auf den Ca^{2+} -Haushalt postulieren ähnliche Ergebnisse. So wurde, wie in dieser Arbeit, ebenfalls ein initialer Anstieg des diastolischen Ca^{2+} und der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden nach ROS-Exposition des Kardiomyozyten gemessen. Allerdings war dieser Anstieg jeweils nur initial vorhanden, langfristig zeigte sich eine negativ inotrope Wirkung auf den Ca^{2+} -Haushalt. Es ist daher, und aufgrund der bekannten langfristigen klinischen Komplikationen nach Strahlenexposition des Herzens (Herzinsuffizienz), davon auszugehen, dass ionisierende Strahlung ebenfalls nur kurzfristig

positiv inotrop wirkt. Denn ein CaMKII-abhängiges SR-Ca²⁺-Leck und eine Ca²⁺-Überladung sind charakteristisch für ein gestörtes „Ca²⁺-Cycling“ wie es auch in der Herzinsuffizienz vorkommt. So ist das veränderte „Ca²⁺-Cycling“ nach Bestrahlung als Hinweis für eine tief greifende Schädigung des Kardiomyozyten nach Bestrahlung anzusehen sind.

Interessanterweise generierten TIMOLATI et al. (2006) die ROS durch Inkubation mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin. Da die Ergebnisse (initial positive Inotropie) ähnlich denen dieser Arbeit waren, könnte klinisch eine kombinierte Radiochemotherapie mit Doxorubicin die kardiotoxische Wirkung ionisierender Strahlung auf das Herz potenzieren, wofür es in der Tat Hinweise in der Literatur gibt (bei Kombination mit Anthrazyklinen während oder direkt nach radioonkologischer Behandlung akutes Auftreten von Kardiomyopathien (SINGAL und ILISKOVIC 1998, SCHULTZ-HECTOR und TROTT 2006).

Die Integrität des Ca²⁺-Haushalts des einzelnen Kardiomyozyten stellt die Grundlage der Funktion des Herzens dar (BERS 2001). Ionisierende Strahlung beeinträchtigt über die CaMKII-Aktivierung den Ca²⁺-Haushalt derart, dass es zu einer vermehrten Ca²⁺-Freisetzung und zu einer Ca²⁺-Überladung in der Diastole kommt. Allgemein ist eine Ca²⁺-Überladung des Kardiomyozyten mit einem verminderten Zellüberleben verbunden (JOSEPHSON et al. 1991). Die begleitenden Untersuchungen (NEUMANN et al. 2010) zeigen in der Tat auch ein vermindertes Zellüberleben nach Strahlenexposition, das sich, wie die Ca²⁺-Überladung in der Diastole und die vermehrte Ca²⁺-Freisetzung, sowohl durch Inkubation mit Melatonin als auch durch CaMKII-Inhibition deutlich verbessern lässt.

Dies bestätigt, dass der positiv inotrope Effekt nach Strahlenexposition (vermehrte Ca²⁺-Freisetzung, diastolische Ca²⁺-Überladung) als frühe Anzeichen für eine tief greifende Schädigung des Kardiomyozyten interpretiert werden müssen.

4.1.3 Zur Wirkung ionisierender Strahlung auf Ca²⁺- Relaxationskinetik und Ca²⁺-Beladung des SR in isolierten Herzmuskelzellen

Ein weiteres Zielprotein der CaMKII ist Phospholamban (PLB) (BRITTSAN und KRANIAS 2000; SIMMERMAN et al. 1986). Da eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung von PLB an Threonin-17 die Inhibition der SERCA2a aufhebt, kommt es einerseits zu einer Relaxationsbeschleunigung und andererseits zu einem Anstieg der Ca²⁺-Beladung des SR (MAIER und BERS 2007, SAG et al. 2007). Dieser Mechanismus könnte auch für die strahleninduzierte Aktivierung der SERCA2a mitverantwortlich sein, da sowohl Melatonin (Verminderung der ROS-abhängigen CaMKII-Aktivierung) als auch die direkte CaMKII-Inhibition mit AIP die Relaxationsbeschleunigung verringerte.

Trotz der gemessenen vermehrten Ca^{2+} -Freisetzung, zeigten überraschenderweise die Messungen der Ca^{2+} -Beladung des SR nach Strahlenexposition keinen Abfall der Ca^{2+} -Beladung. Da bei der Maus 90% des systolischen Ca^{2+} während der Diastole durch die SERCA2a ins SR aufgenommen wird (MAIER und PIESKE 2000), ist vermutlich die strahleninduzierte Relaxationsbeschleunigung für den konstanten SR-Gehalt nach Bestrahlung verantwortlich. So könnte eine Aktivierung der SERCA2a die diastolische Ca^{2+} Elimination im Zytosol zugunsten des SR verschoben haben, was konsekutiv die vermehrte Ca^{2+} -Freisetzung kompensiert haben könnte.

Sowohl durch Einsatz des Radikalfängers Melatonin als auch durch CaMKII-Inhibition veränderte sich die SR Ca^{2+} -Beladung nach Bestrahlung nicht. Vermutlich war hierfür einerseits die Verminderung des Ca^{2+} -Lecks aus dem SR bei gleichzeitiger Verlangsamung der Relaxation nach Einsatz von Melatonin/AIP verantwortlich, wodurch dann in der Summe die Ca^{2+} -Beladung des SR unverändert blieb.

Ein Vergleich der Ergebnisse mit den Untersuchungen von TIMOLATI et al. (2006) zur Doxorubicin induzierten ROS-Wirkung zeigt ähnliche Ergebnisse in Bezug auf vergrößerte Ca^{2+} -Transienten-Amplituden, aber Unterschiede bezüglich Relaxationsbeschleunigung und SR- Ca^{2+} -Beladung. So wurde in der Arbeit von TIMOLATI et al. (2006) eine leicht verlangsamte Relaxation und verringerte SR- Ca^{2+} -Beladung nach Doxorubicin induzierter ROS-Exposition gezeigt. Da die Kardiomyozyten von TIMOLATI et al. (2006) etwas länger (18-24 Stunden) ROS exponiert wurden schlagen möglicherweise diese Parameter als erste von einer initial positiven zu einer negativen Wirkung auf den Kardiomyozyten um. Da die vorliegende Arbeit sich aber ausschließlich mit der initialen Wirkung ionisierender Strahlung befasst, war wohl nur eine Beschleunigung der Relaxation messbar.

Die begleitenden Experimente von SAG et al. 2011 zeigte sich in der Tat auch, dass 24 h nach Bestrahlung die SR- Ca^{2+} -Beladung nicht mehr konstant sondern erniedrigt ist.

4.1.4 Zur Wirkung ionisierender Strahlung auf die Kontraktionsstärke in isolierten Herzmuskelzellen

Die Messungen der Kontraktionsstärke korrelierten mit der Wirkung ionisierender Strahlung auf den Ca^{2+} -Haushalt. Da die Kontraktionsstärke nach BLINKS (1986) und HUXLEY (1969) proportional der systolischen Ca^{2+} -Konzentration ist, nahm die Zellverkürzung nach Strahlenexposition zu. ROS direkt oder über können über eine PKA-abhängige Signalkaskade die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente modifizieren (BRENNAN et al. 2006). Da nach CaMKII-Inhibition trotz ROS-Generierung keine Zunahme der Kontraktionsstärke messbar war, scheint dieser Mechanismus in dieser Arbeit kaum eine Bedeutung für die

Kontraktilität zu haben. Da ROS-abhängige PKA-Effekte in dieser Arbeit aber nicht untersucht worden sind, kann über einen Einfluss der PKA-Signalkaskade nach Bestrahlung nur spekuliert werden.

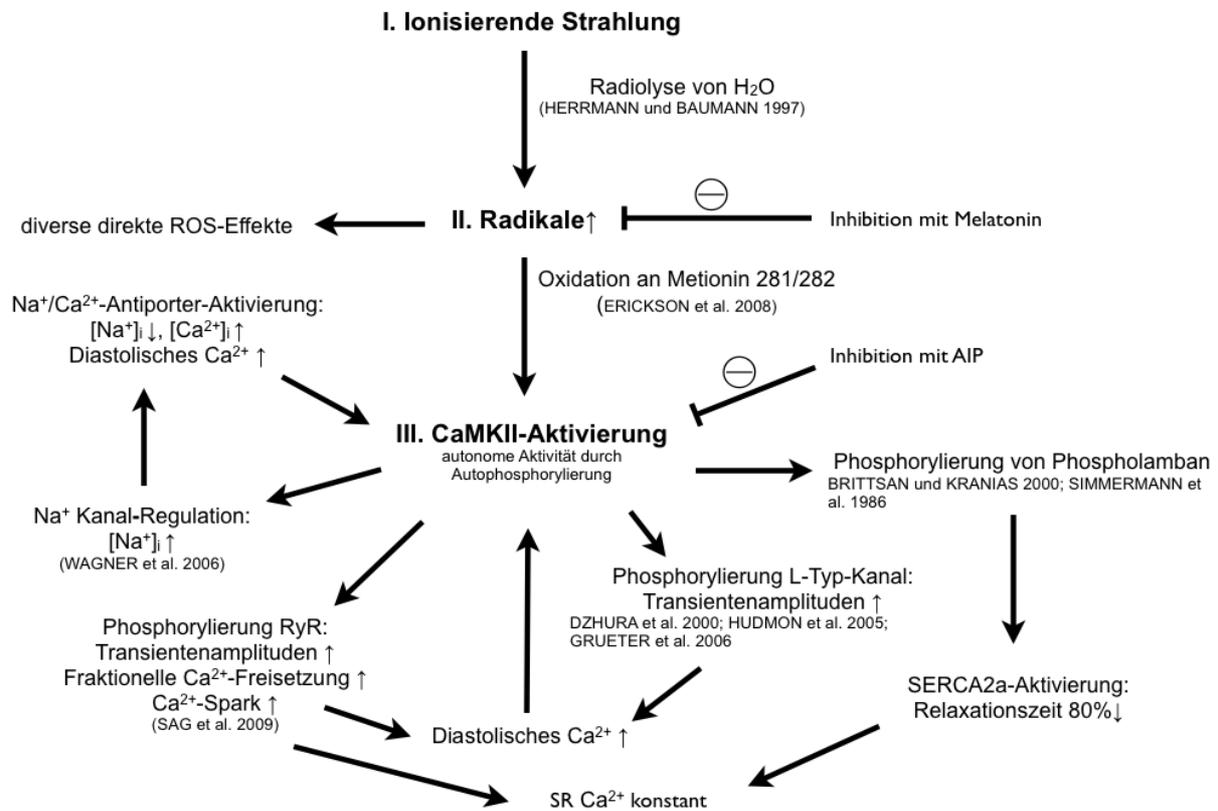


Abb. 4.1 Schema möglicher akuter Wirkmechanismen ionisierender Strahlung auf den Kardiomyozyten.

4.2 Mögliche klinische Folgen einer strahleninduzierten CaMKII-Aktivierung

Da in der kardiologischen Forschung CaMKII-Aktivierung langfristig mit Herzinsuffizienz Entwicklung und Arrhythmien in Verbindung gebracht werden, könnte die hier gezeigte strahleninduzierte CaMKII-Aktivierung an den klinisch bekannten Komplikationen nach Strahlenexposition des Herzens (u.a. Herzinsuffizienz, Arrhythmien) beteiligt sein.

Denn bereits akut nach mediastinaler Strahlenexposition können EKG-Veränderungen auftreten. So könnten möglicherweise die im Rahmen der Bestrahlung nach linksseitigem Mamma-Karzinom beschriebenen Repolarisationsstörungen, QRS-Abnormalitäten, Verlängerungen der QT-Zeit und eine AP-Verlängerung (BILLER et al. 1979, WEHR et al.

1982, LINDAHL et al. 1983, ANIGBOGU et al. 2008) durch eine akute, möglicherweise CaMKII-involvierte, Beeinflussung des Ca^{2+} -Haushalts verursacht worden sein.

In die klinisch beschriebene pro-arrhythmogene Wirkung ionisierender Strahlung (GAYA und ASHFORD 2005; VAN RISJWIK et al. 2008) könnte ebenfalls eine CaMKII-Aktivierung involviert sein. So könnten über die CaMKII-abhängige Phosphorylierung der L-Typ-Kanäle oder RyR-Rezeptoren (erhöhte Inzidenz von pro-arrhythmogenen, diastolischen Ca^{2+} -Freisetzungen) frühe bzw. späte Nachdepolarisationen hervorgerufen werden (SAG et al. 2009b). Auch durch die CaMKII-abhängige Regulation der Na^+ -Kanäle (WAGNER et al. 2006) könnten möglicherweise die klinisch beobachteten Arrhythmien verursacht werden.

Eine wesentliche Komplikation mediastinaler Strahlenexposition ist die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (SCHULTZ-HECTOR und TROTT 2006). Da diverse Untersuchungen gezeigt haben, dass eine CaMKII-Aktivierung (oder Überexpression im transgenen Mausmodell) langfristig zur dilatativen Kardiomyopathie führen kann (MAIER et al. 2003; ZHANG T et al. 2004; AI et al. 2005; ZHANG R et al. 2005), könnte eine strahleninduzierte CaMKII-Aktivierung möglicherweise zur Kardiomyopathie nach Strahlenexposition des Herzens beitragen.

A Wildtyp 6 Wochen alt B TG 6 Wochen alt C TG 13 Wochen alt



Abb. 4.2 Beispiel für die CaMKII-induzierte dilatative Kardiomyopathie. Durch Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_c$ im transgenen (TG) Mausmodell kommt es zur Hypertrophie und Insuffizienz des Herzens. Abbildung modifiziert nach MAIER et al. 2003, S. 915.

Zudem ist langfristig nach Strahlenexposition eine AV-Blockade beobachtet worden (BORREL et al. 1990; KNIGHT und SUTTON 1996). Da die CaMKII ebenfalls in die Regulation des AV-Knotens involviert ist (KHOO et al. 2005, WU et al. 2009), könnte die strahleninduzierte CaMKII-Aktivierung möglicherweise auch in die AV-Blockade nach Strahlenexposition des Herzens involviert sein, was klinisch allerdings eine sehr seltene, klinische Komplikation darstellt.

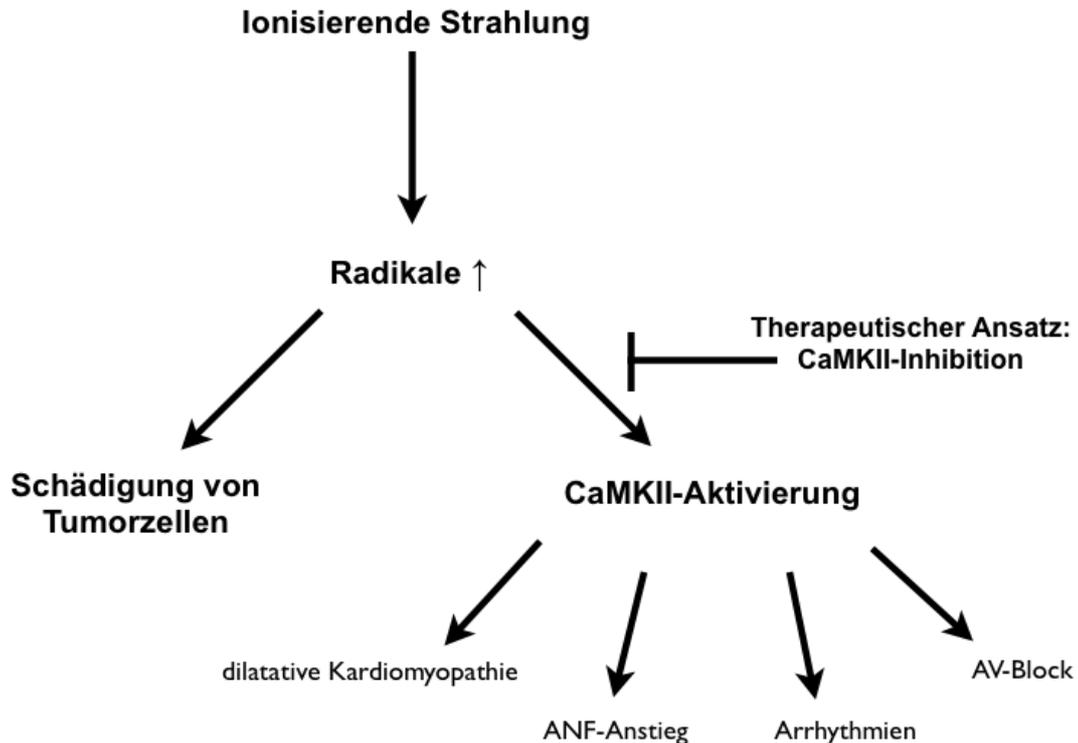


Abb. 4.3 Schema möglicher klinischer Folgen der langfristigen CaMKII-Aktivierung und ein Modell zu einem eventuellen, zukünftigen Therapieansatz.

4.2.1 ANF-Anstieg nach Strahlenexposition des Mediastinums: Hinweis für CaMKII-Aktivierung?

Der atriale, natriuretische Faktor (ANF) wird von den Kardiomyozyten des Vorhofs und bei starker Dehnung auch vom Ventrikel freigesetzt. Klinisch kann ANF u.a. als Parameter für Diagnostik und Prognose akut und chronisch pathologischer Prozesse des Herzens eingesetzt werden (SCHMIDT et al. 2004).

Die im Nukleus lokalisierte Isoform CaMKII δ_B ist ein Teil der Signalkaskade zur Expression vom ANF-Gen. Sie stellt einen Aktivator der Expression und Sekretion von ANF dar. So korreliert eine hohe CaMKII-Aktivität mit erhöhten ANF-Plasmawerten (RAMIREZ et al. 1997, COLOMER und MEANS 2000, RONKAINEN 2007).

Nach Strahlenexposition des Herzens sind erhöhte ANF-Plasmawerte messbar, die gleichzeitig mit kardialer Dysfunktion einhergehen. Nach PERSONS et al. 1996, WONDERGEM et al. 1999, WONDERGEM, et al. 2001, KRUSE et al. 2002 sollte ANF daher als früher Marker für akute und chronische pathologische Prozesse des Herzens nach Strahlenexposition fungieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen nun die Frage auf, ob dieser ANF-Anstieg möglicherweise als klinischer Hinweis für eine strahleninduzierte CaMKII-Aktivierung gedeutet werden kann.

4.2.2 Zu einem möglichen, therapeutischen Ansatz bei mediastinaler Strahlenexposition

Die Wirkung ionisierender Strahlung auf den isolierten Kardiomyozyten lässt sich in dieser Arbeit auf zwei Ebenen inhibieren: Auf Radikalebene durch einen Radikalfänger (Melatonin) und auf Proteinebene durch CaMKII-Inhibition (AIP).

Die Inhibition auf Radikalebene wurde im Tiermodell von KRUSE et al. (2003) und BOERMA et al. (2008) untersucht. So konnte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit zur Verminderung des Bestrahlungseffekts mittels des Radikalfängers Melatonin, auch in-vivo die Wirkung ionisierender Strahlung auf das Herz durch einen Radikalfänger (hier: Amifostin, bzw. α -Tocopherol) deutlich vermindert werden. Der Einsatz eines Radikalfängers verringerte die Abnahme der Herzleistung und die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie, wie sie ohne Radikalfänger auftrat (SCHULTZ-HECTOR et al. 1992; KRUSE et al. 2003; BOERMA et al. 2008).

Da die Generierung von Radikalen die radioonkologische Grundlage der Tumorzellschädigung darstellt, könnte klinisch der Einsatz eines Radikalfängers problematisch sein.

Eine Alternative könnte die Inhibition der Strahlenwirkung auf Proteinebene durch selektive CaMKII-Inhibition darstellen. Eine CaMKII-Inhibition hätte keine Auswirkung auf die notwendige Generierung von Radikalen, könnte aber möglicherweise die Entwicklung der strahleninduzierten Kardiomyopathie vermindern.

In der kardiologischen Forschung wird eine CaMKII-Inhibition bereits seit einiger Zeit als neuartiger, therapeutischer Ansatz zur Behandlung dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie und Arrhythmien diskutiert (ANDERSON et al. 2006; MAIER 2006).

Diese Arbeit zeigt, dass eine CaMKII-Inhibition möglicherweise auch bei der Behandlung von kardialen Nebenwirkungen der Strahlentherapie eine zukünftige Option darstellen könnte.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass ionisierende Strahlung eine Wirkung auf den Ca^{2+} -Haushalt den Kardiomyozyten ausübt. Die Beeinflussung des Ca^{2+} -Haushalts ist dosisabhängig und wirkt positiv inotrop und lusitrop. Dies wurde in einem dosisabhängigen Anstieg des diastolischen Ca^{2+} , der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden, der fraktionellen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und einer Relaxationsbeschleunigung evident. Aus der positiv inotropen Wirkung auf den Ca^{2+} -Haushalt resultierte konsekutiv eine Kontraktionsverstärkung nach Strahlenexposition.

Die positiv inotrope und lusitrope Wirkung ionisierender Strahlung basierte auf einer Generierung von Radikalen, deren Konzentration durch den Radikalfänger Melatonin vermindert werden konnte. Folgerichtig ließ sich durch Melatonin auch die positiv inotrope/lusitrope Wirkung auf den Anstieg des diastolischen Ca^{2+} , der Ca^{2+} -Transienten-Amplituden, der fraktionellen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und die Relaxationsbeschleunigung vermindern.

Eine Hemmung der CaMKII zeigte, dass die positiv inotrope/lusitrope Wirkung auf Ca^{2+} -Haushalt und Kontraktion der Kardiomyozyten (teilweise) auf einer CaMKII-Aktivierung durch Bestrahlung beruhen. So war durch CaMKII-Inhibition die Wirkung ionisierender Strahlung auf diastolisches Ca^{2+} , Ca^{2+} -Transienten-Amplituden, fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, Relaxationsbeschleunigung und Kontraktionsverstärkung deutlich vermindert.

Die Ca^{2+} -Beladung des SR zeigte sich erstaunlicherweise nach Bestrahlung nicht verändert. So scheint das strahleninduzierte SR- Ca^{2+} -Leck durch eine gleichzeitige Relaxationsbeschleunigung (initial) kompensiert zu werden. Weder durch Inkubation mit dem Radikalfänger Melatonin noch durch Inkubation mit dem CaMKII-Inhibitor AIP änderte sich die SR- Ca^{2+} -Beladung, was sich vermutlich auf eine gleichzeitige Verminderung des SR- Ca^{2+} -Lecks und der Relaxationsbeschleunigung durch Radikalfänger und CaMKII-Inhibitor zurückführen lässt.

Die kardiologische Forschung der vergangenen Jahre hat gezeigt, dass eine CaMKII-Aktivierung chronisch zu dilatativer Kardiomyopathie und zu Arrhythmien führen kann.

Diese Arbeit zeigt nun erstmals, dass in die klinisch bekannten Komplikationen nach Strahlenexposition des Herzens (u.a. dilatative Kardiomyopathie, Arrhythmien) möglicherweise eine strahlungsinduzierte CaMKII-Aktivierung involviert sein könnte. Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine selektive CaMKII-Inhibition ein eventueller therapeutischer Ansatz für kardiale Komplikationen in der Strahlentherapie darstellen könnte.

6 Literaturverzeichnis

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ Res* 97, 1314-1322

Aleman BM, van den Belt-Dusebout AW, Klokman WJ, Van't Veer MB, Bartelink H, van Leeuwen FE (2003): Long-term cause-specific mortality of patients treated for Hodgkin's disease. *Clin Oncol* 15, 3431-9

Ambudkar IS, Shamoo AE (1984): Role of phospholamban in regulating cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Membr Biochem* 5(2), 119-30

Anderson ME, Higgins LS, Schulman H (2006): Disease mechanisms and emerging therapies: protein kinases and their inhibitors in myocardial disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3(8), 437-45

Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack B (1994): Multifunctional Ca/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca-induced enhancement of the L-type Ca current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 75, 854-61

Anigbogu CN, Ajekigbe A, Odiaka I, Ajuluchukwu J, Sowunmi AB. (2008): Cardiovascular function in breast cancer patients receiving radiotherapy. *Nig Q J Hosp Med* 18(1), 21-4

Autry JM, Jones LR (1997): Functional Co-expression of the canine cardiac Ca^{2+} pump and phospholamban in *Spodoptera frugiperda* (SF21) cells reveals new insights on ATPase regulation. *J Biol Chem* 272, 15872-15880

Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, Grueter CE, Qi X, Richardson JA, Hill JA, Katus HA, Bassel-Duby R, Maier LS, Olson EN (2009): The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci* 106(7), 2342-7.

Baeuml H, Behrends U, Peter RU, Mueller S, Kammerbauer C, Caughman SW, Degitz K. (1997): Ionizing radiation induces, via generation of reactive oxygen intermediates, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene transcription and NF kappa B-like binding activity in the ICAM-1 transcriptional regulatory region. *Free Radic Res* 27(2), 127-42

Barrington PL (1994): Interactions of H₂O₂, EGTA and patch pipette recording methods in feline ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 26, 557-568

Barrington PL, Meier CF, Jr., Weglicki WB (1988): Abnormal electrical activity induced by free radical generating systems in isolated cardiocytes. *J Mol Cell Cardiol* 20, 1163-1178

Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM (1995): CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268, H703-12

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

Bhatnagar A (1994): Biochemical mechanism of irreversible cell injury caused by free radical-initiated reactions. *Mol Cell Biochem* 137, 9-16

Bhatti P, Sigurdson AJ, Mabuchi K (2008): Can low-dose radiation increase risk of cardiovascular disease? *Lancet* 372, 697-699.

Biller H, Koop EA, Prignitz R (1979): ECG-changes following postoperative irradiation of patients with mammary carcinoma. *Strahlentherapie* 155(8), 541-8.

Blinks JR: Intrazellular Ca²⁺ measurements; the heart and cardiovascular system edited by Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM and Morgan HE. Raven Press, New York 1986, 671-701

Boerma M, Kruse JJ, van Loenen M (2004): Increased deposition of von Willebrand factor in the rat heart after local ionizing radiation. *Strahlenther Onkol* 180(2), 109-16.

Boerma M, Wang J, Wondergem J, Joseph J, Qiu X, Kennedy RH, Hauer-Jensen M (2005): Influence of mast cells on structural and functional manifestations of radiation-induced heart disease: *Cancer Res* 15, 65(8), 3100-7

Boerma M, Roberto KA, Hauer-Jensen M (2008): Prevention and treatment of functional and structural radiation injury in the rat heart by pentoxifylline and alpha-tocopherol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72(1), 170-7

Boraso A, Williams AJ (1994): Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel by HO and dithiothreitol. *Am J Physiol* 267, H1010-1016

Borrel E, Wolf JE, Page E, Chaltiel G, Bertrand B, Machecourt J, Reboud JP, Denis B (1990): A rare complication of thoracic radiotherapy: auriculoventricular block. Apropos of a case and review of the literature. *Ann Cardiol Angeiol* 39(6), 351-5

Braun AP, Schulman H. (1995) The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 57, 417-445

Brennan JP, Bardswell SC, Burgoyne JR, Fuller W, Schröder E, Wait R, Begum S, Kentish JC, Eaton P (2006): Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. *J Biol Chem* 281(31), 21827-3

Brittsan AG, Kranias EG (2000): Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2131-9

Burton KP, McCord JM, Ghai G (1984): Myocardial alterations due to free-radical generation. *Am J Physiol* 246, H776-783

Carlson RG, Mayfield WR, Normann S, Alexander JA (1991): Radiation-associated valvular disease. *Chest* 99(3), 538-45

Chan TY, Tang PL (1996): Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro. *J Pineal Res* 20, 187-191

Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C (2005): Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 366(9503), 2087-106

Coetzee WA, Opie LH (1992): Effects of oxygen free radicals on isolated cardiac myocytes from guinea-pig ventricle: electrophysiological studies. *J Mol Cell Cardiol* 24, 651-663

Coetzee WA, Ichikawa H, Hearse DJ (1994): Oxidant stress inhibits Na-Ca-exchange current in cardiac myocytes: mediation by sulfhydryl groups? *Am J Physiol* 266, H909-919

Colomer JM, Means AR (2000): Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Endocrinol* 14(8), 1125-36

Crestanello JA, McGregor CG, Danielson GK, Daly RC, Dearani JA, Orszulak TA, Mullany CJ, Puga FJ, Zehr KJ, Schleck C, Schaff HV (2004): Mitral and tricuspid valve repair in patients with previous mediastinal radiation therapy. *Ann Thorac Surg* 78(3), 826-31

Darby SC, McGale P, Taylor CW, Peto R. (2005): Long-term mortality from heart disease and lung cancer after radiotherapy for early breast cancer: prospective cohort study of about 300.000 women in US SEER cancer registries. *Lancet Oncol* 6(8), 557-65

DeSantiago J, Maier LS, Bers DM (2002): Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 34, 975-84

Dixon IM, Kaneko M, Hata T, Panagia V, Dhalla NS (1990): Alterations in cardiac membrane Ca²⁺ transport during oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 99, 125-133

Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balser JR, Anderson ME (2000): Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol* 2(3), 173-7

Edman C.F., Schulman H (1994): Identification and characterization of δ B-CaM kinase and δ C- CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1221, 89-101

Eley DW, Eley JM, Korecky B, Fliss H (1991): Impairment of cardiac contractility and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase activity by hypochlorous acid: reversal by dithiothreitol. *Can J Physiol Pharmacol* 69, 1677-1685

Erickson JR, Joiner MLA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, Donnel SE, Anderson ME (2008): A dynamic Pathway for Calcium-independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell* 133, 462-474

Fabiato A, Fabiato F (1975): Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 245, 469-495

Farjado LF, Stewart JR (1970): Experimental radiation-induced heart disease. I. Light microscopic studies. *Am J Pathol* 59(2), 299-316

Farjado LF, Stewart JR (1971): Capillary injury preceding radiation-induced myocardial fibrosis. *Radiology* 101(2), 429-33

Fukui K, Kaneda M, Takahashi E, Washio M, Doi K (1994): Protective effects of sulfhydryl compounds on HOCl-induced intracellular Ca²⁺ increase in single rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 26, 455-461

Gaya AM, Ashford RF (2005): Cardiac complications of radiation therapy. *Clin Oncol* 17(3), 153-9

Giraud P, Cosset JM (2004): Radiation toxicity to the heart: physiopathology and clinical data. *Bull Cancer* 3, 147-53

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

Grueter CE, Abiria SA, Dzhura I, Wu Y, Ham AJL, Mohler PJ, Anderson ME, Colbran RJ (2006): L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by phosphorylation of the β subunit by CaMKII. *Mol Cell* 23, 641-50

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

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (NIH Publikationsnummer 85-23), überarbeitet 1996

Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM (2006): Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 99, 398-406

Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP (2000): Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 275, 22532-6

Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995): Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem* 270, 2074-81

Hancock SL, Tucker MA, Hoppe RT (1993): Factors affecting late mortality from heart disease after treatment of Hodgkin's disease. *JAMA* 270(16), 1949-55

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. (1999): Relationship between Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99(5), 641-8

Herrman T, Baumann M, Dörr W: *Klinische Strahlenbiologie*. 3. Auflage, Urban & Fischer Verlag, 1997

Herrman T, Baumann M, Dörr W: *Klinische Strahlenbiologie*. 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, 2006

Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (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, 713-21

Holmberg SR, Cumming DV, Kusama Y, Hearse DJ, Poole-Wilson PA, Shattock MJ, Williams AJ (1991): Reactive oxygen species modify the structure and function of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel. *Cardioscience* 2(1), 19-25

Hook SS, Means AR (2001): Ca^{2+} /CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 471-505,

Huang WH, Wang Y, Askari A (1992): (Na⁺ + K⁺)-ATPase: inactivation and degradation induced by oxygen radicals. *Int J Biochem* 24, 621-626

Hudmon A, Schulman H, Kim J., Maltez J.M., Tsien R.W., Pitt G.S. (2005): CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *J Cell Biol* 171, 537-47

Huke S, Bers DM (2005): Frequency-dependent acceleration of relaxation (FDAR) does not require phospholamban phosphorylation by CaM-kinase II in rat cardiomyocytes. *Biophys J* 88, 311a

Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1366

Inesi G (1985): Mechanism of calcium transport. *Annu Rev Physiol* 47, 573-601

Inui M Chamberlain BK, Saito A, Fleischer S (1986): The nature of the modulation of Ca²⁺ transport as studied by reconstitution of cardiac sarcoplasmic retikulum. *J Bio Chem* 261, 1794-1800

Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H (1995): A novel specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 806-12

James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E (1989): Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic retikulum. *Nature* 342, 90-92

Jett MF, Schwoerer CM, Soderling TR (1987): Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Arch Biochem Biophys.* 255, 354-360

Josephson RA, Silvermann HS, Lakatta EG, Stern MD, Zweier JL (1990): Study of mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 266, 2354-2361

Josephson RA, Silverman HS, Lakatta EG, Stern MD, Zweier JL (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, 2354-2361

Kako K, Kato M, Matsuoka T, Mustapha A (1988): Depression of membrane-bound $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am J Physiol* 254, C330-337

Khoo MS, Kannankeril PJ, Li J, Kupersmidt S, Zhang W, Atkinson JB, Colbran RJ, Roden DM, Anderson ME (2005): Calmodulin kinase II is required for normal atrioventricular nodal conduction. *Heart Rhythm* 2 (6), 641-2

Kim HW, Steenaart NA, Ferguson DG, Kranias EG (1990): Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles. *J Bio Chem* 268, 1702-1709

Kimura Y, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH (1997): Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J Biol Chem* 272, 15061-15064

Kirchberger MA, Tada M, Katz AM (1974): Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Bio Chem* 265, 6166-6173

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42, 254-61

Knight CJ, Sutton GC. (1996): Complete heart block and severe tricuspid regurgitation after radiotherapy. Case report and review of the literature. *Chest* 110(2), 580-1

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

Kourie JI (1998): Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 275, C1-24

Kranias EG, Di Salvo J (1986): A protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Bio Chem* 261, 10029-10032

Kruse JJ, Strootman EG, Bart CI, Visser A, Leer JW, Wondergem J (2002): Radiation-induced changes in gene expression and distribution of atrial natriuretic peptide (ANP) in different anatomical regions of the rat heart. *Int J Radiat Biol* 78(4), 297-304

Kruse JJ, Strootman EG, Wondergem J (2003): Effects of amifostine on radiation-induced cardiac damage. *Acta Oncol* 42(1), 4-9

Lakowicz JR: *Principles of Fluoreszenz Spectroscopy* Plenum Press, New York 1983

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

Lauk (1987): Endothelial alkaline phosphatase activity loss as an early stage in the development of radiation-induced heart disease in rats. *Radiat Res* 110(1), 118-28

Li ZP, Matsuoka S, Hryshko LV, Nicoll DA, Bersohn MM, Burke EP, Lifton RP, Philipson KD (1994): Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 269, 17434-17439

Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM, et al. (1994): Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 279, 8290–9.

Lindahl J, Strender LE, Larsson LE, Unsgaard A. (1983): Electrocardiographic changes after radiation therapy for carcinoma of the breast. Incidence and functional significance. *Acta Radiol Oncol* 22(6), 433-40

Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henny BG, Watanabe AM (1983): Beta-adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca²⁺-ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 258, 464-471

Lokuta AJ, Rogers TB, Lederer WJ, Valdivia HH (1997): Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Physiol* 487, 609-22

Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschmann, Kranias EG (1994): Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 75, 401-409

Maier LS (2006): Molekulare Pathogenese der Herzinsuffizienz: Inhibition der CaMKII als neuartiger therapeutischer Ansatz. Dtsch Med Wochenschr 131, 503-505

Maier LS Bers DM, Pieske B (2000): Differences in Ca²⁺-Handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-content in isolated rat and rabbit myocardium. J Mol Cell Cardiol 32, 2249-2258

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

Maier LS, Bers DM (2007): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. Cardiovasc Res 73, 631-640

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. Circ Res 92, 904-11

Maier LS, Ziolo MT, Bossuyt J, Persechini A, Mestril R, Bers DM (2006): Dynamic changes in free Ca²⁺-calmodulin levels in adult cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol 41, 451-8

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, Marks AR (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell 101, 365-376

McChesney SL, Gillette EL, Orton EC (1988): Canine cardiomyopathy after whole heart and partial lung irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 14(6), 1169-74

Meissner G, Henderson JS (1987): Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca²⁺ and is modulated by Mg²⁺, adenine nucleotide and calmodulin. J Bio Chem 262, 3065-3073

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

Mulrooney DA, Yeazel MW, Kawashima T, Mertens AC, Mitby P, Stovall M, Donaldson SS, Green DM, Sklar CA, Robison LL, Leisenring WM (2009): Cardiac outcomes in a cohort of

adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *BMJ* 339, 1-11

Murray A, Hunt T: *The Cell Cycle: An Introduction*. W. H. Freeman and Co., New York, 1993

Neumann K, Sag CM, Wolff HA, Opiela M.K., Rave-Fränk M., Hess CF, Christiansen H, Maier LS (2010): Ionizing radiation alters Ca^{2+} -cycling through ROS dependent activation of Ca/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in isolated cardiac myocytes. *Clin Res Cardiol* 99, (Suppl 1): April 2010

Nicoll DA, Quednau BD, Qui ZY, Xia YR, Lysis AJ, Philipson KD (1996): Cloning of third mammalian Na^{+} - Ca^{2+} exchanger, NCX3. *J Biol Chem* 271, 24914-24921

Nicoll DA, Ottolia M, Lu LY, Lu YJ, Philipson KD (1999): A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *J Biol Chem* 274, 910-917

Oba T, Koshita M, Yamaguchi M (1996): H_2O_2 modulates twitch tension and increases P_o of Ca^{2+} release channel in frog skeletal muscle. *Am J Physiol* 271, C810-818

Odermatt A, Kurzydowski K, MacLennan DH (1996): The V_{max} of the Ca^{2+} -ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by Ca^{2+} /Calmodulin-dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban. *J Biol Chem* 271, 14206-13

Pallandi RT, Perry MA, Campbell TJ (1987): Proarrhythmic effects of an oxygen-derived free radical generating system on action potentials recorded from guinea pig ventricular myocardium: a possible cause of reperfusion-induced arrhythmias. *Circ Res* 61, 50-54

Paszat LF, Mackillop WJ, Groome PA, Boyd C, Schulze K, Holowaty E (1998): Mortality from myocardial infarction after adjuvant radiotherapy for breast cancer in the surveillance, epidemiology, and end-results cancer registries. *J Clin Oncol* 16(8), 2625-31

Persons CC, Franken NA, Wondergem J (1996): Changes in myocardial and circulating atrial natriuretic peptide following thorax irradiation in rat. *Int J Radiat Biol* 70(1), 61-8

- Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1994): Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 738, 419-420
- Preston DL, Shimizu Y, Pierce DA, Suyama A, Mabuchi K. (2003): Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. *Radiat Res* 160(4), 381-407
- Ramirez MT, Zhao XL, Schulman H, Brown JH (1997): The nuclear deltaB isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J Biol Chem* 272(49), 31203-8
- Reddy LG, Jones LR, Pace RC, Stokes DL (1996): Purified reconstituted cardiac Ca²⁺-ATPase is regulated by phospholamban but not by direct phosphorylation with Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 271, 14964-70
- Reeves JP, Bailey CA, Hale CC (1986): Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 261, 4948-4955
- Reinders JG, Heijmen BJ, Olofsen-van Acht MJ, van Putten WL, Levendag PC (1999): Ischemic heart disease after mantlefield irradiation for Hodgkin's disease in long-term follow-up. *Radiother Oncol* 51(1), 35-42
- Reiter RJ, Tan DX (2003): Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 58, 10-19
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000): Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 7, 444-458
- Ronkainen JJ, Vuolteenaho O, Tavi P (2007): Calcium-calmodulin kinase II is the common factor in calcium-dependent cardiac expression and secretion of A- and B-type natriuretic peptides. *Endocrinology* 148(6), 2815-20
- Rousseau R, Meissner G (1987): Single cardiac Ca²⁺ release channel: Activation by caffeine. *Am J Physiol* 256, 328-333

Sag CM (2007): Die Bedeutung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) für die Erholung von Kontraktionskraft und Ca²⁺-Transienten während der Azidose am Herzen. Diss, Göttingen 2007

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

Sag CM, Wolff HA, Opiela MK, Neumann K, Rave-Fränk M, Hess CF, Christiansen H, Maier LS (2009a): Ionizing radiation acutely increases SR Ca release in isolated cardiac myocytes. *Clin Res Cardiol* 98 (Suppl 1), V1562.2009

Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, Neef S, Maier SK, Maier LS (2009b): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail* 2 (6), 664-7

Sag CM, Wolff HA, Neumann K, Opiela MK, Schirmer M, Rave-Fränk, Hess CF, Christiansen H, Maier LS (2011): Irradiation Impairs Excitation-Contraction Coupling in Isolated Cardiac Myocytes, *Circ Rev In Rev*

Schatzmann HJ (1989): The calcium pump of the surface membran and of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Physiol* 51, 473-485

Schmidt RF., Lang F, Thews G: Physiologie des Menschen. 29. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2004

Schultz-Hector S, Trott KR (2006): Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67 (1):10-8

Schultz-Hector S, Scherer E, Streffer C, Trott KR: Radiopathology of organs and tissues Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 1991

Schultz-Hector S, Böhm M, Blöchel A, Dominiak P, Erdmann E, Müller-Schauenburg W, Weber A (1992): Radiation-induced heart disease: morphology, changes in catecholamine synthesis and content, beta-adrenoceptor density, and hemodynamic function in an experimental model. *Radiat Res* 129(3), 281-9

Schwinger RH, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999): Reduced Ca^{2+} sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 31(3), 479-91

Simmerman HKB, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR (1986): Sequence analysis of PLB: Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem* 261, 13333-41

Singal PK, Iliskovic N (1998): Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 339(13), 900-5

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, El-Armouche A, Hasenfuss G, Maier LS. (2010): Inhibition of elevated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107(9), 1044-6

Tada M, Inui M (1983): Regulation of calcium transport by the ATPase-phospholamban system. *J Mol Cardiol* 15, 565-575

Tada M, Kirchberger MA, Katz AM (1975): Phosphorylation of a 22.000-dalton component of the sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 250, 2640-2647

Tada M, Yamada M, Kadoma M, Inui M, Ohori F (1982): Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Mol Cell Biochem* 46, 3-95

Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M (1999): Regulation of the transient outward K^+ current by Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein-kinases II in human atrial myocytes. *Circ Res* 85, 810-9

The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies” 10. Auflage, Molekular Probes, www.invitrogen.com, 2007

Timolati F, Ott D, Pentassuglia L, Giraud MN, Perriard JC, Suter TM, Zuppinger C (2006): Neuregulin-1 beta attenuates doxorubicin-induced alterations of excitation-contraction

coupling and reduces oxidative stress in adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 41, 845-854

Tokube K, Kiyosue T, Arita M (1996): Openings of cardiac K_{ATP} channel by oxygen free radicals produced by xanthine oxidase reaction. *Am J Physiol* 271, H478-489

Toyofuku T, Kurzydowski K, Mac Lennan DH (1994): Identifikation of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic retikulum Ca/Calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 269, 26492-6

Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A: Introduction to Radiobiology. 1. Auflage, CRC Press, Boca Raton, 1990

van Rijswijk S, Huijbregts MA, Lust E, Strack van Schijndel RJ (2008): Mini-review on cardiac complications after mediastinal irradiation for Hodgkin lymphoma. *Neth J Med* 66(6), 234-7

Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1992): Modulation of K^+ channels by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 1681-1687

Verheij M, Dewit LG, Boomgaard MN, Brinkman HJ, van Mourik JA (1994): Ionizing radiation enhances platelet adhesion to the extracellular matrix of human endothelial cells by an increase in the release of von Willebrand factor. *Radiat Res* 137(2), 202-7

Wagner S, Seidler T, Picht E, Maier LS, Kazanski V, Teucher N, Schillinger W, Pieske W, Isenberg G, Hasenfuss G (2003): Na^+ /Ca^{2+} exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury. *Circ Res* 60, 404-412

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

Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, Sowa T, Fabritz L, Kirchhof P, Bers DM, Maier LS (2009): Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2(3), 285-94

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

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

Wegener AD, Jones LR (1984): Phosphorylation induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Evidence for a protein structure consisting of multiple identical phosphorylatable subunits. *J Biol Chem* 259, 1834-1841

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, 61-70

Wehr M, Roskopf BG, Schwenk D, Prignitz R. (1982): An electrocardiographic study of cardiac damage following post-operative radiation in patients with mammary carcinoma on the left. *Z Kardiol* 71(2), 112-8.

Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR (1991): Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 266, 11144-52

Wundergem J, Persons K, Zurcher C, Frölich M, Leer JW, Broerse J (1999): Changes in circulating atrial natriuretic peptide in relation to the cardiac status of Rhesus monkeys after total-body irradiation. *Radiother Oncol* 53(1), 67-75

Wundergem J, Strootman EG, Frölich M, Leer JW, Noordijk EM (2001): Circulating atrial natriuretic peptide plasma levels as a marker for cardiac damage after radiotherapy. *Radiother Oncol* 58(3), 295-301

Wu Y, Roden DM, Anderson ME (1999): Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res* 84(8), 906-12

Xiao RP, Cheng H, Lederer WJ, Suzuki T, Lakatta EG (1994): Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci* 91, 9659-63

Xu A, Hawkins C, Narayanan N (1993): Phosphorylation and activation of the Ca/pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca²⁺/Calmodulin dependent protein kinase. *J Biol Chem* 268, 8394-7

Yamada M, Wong FL, Fujiwara S (2004): Non-cancer disease incidence in atomic bomb survivors, 1958-1998. *Radiation Res* 161

Yuan W, Bers DM (1994): Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase. *Am J Physiol.* 267, H982-93

Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V (1998): Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1425, 469-477

Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN (2002): Class II histone deacetylase act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110, 473-488

Zhang R, Khoo MSC, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE, Thiel W, Guatimosin S, Song LS, Madu EC, Anderson ME (2005): Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 11, 409-17

Zhang T, Brown JH (2004) Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63, 476-486

Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, Ross J Jr, Brown JH (2002): The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277(2), 1261-7

Zima Aleksey V, Blatter Lothar A. (2006): Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res* 71, 310 – 321

Preise und Auszeichnungen, die sich auf diese Arbeit beziehen

1. Platz beim Posterpreis Kongress für Strahlentherapie, Tübingen, November 2008

1. Platz und Auszeichnung mit Nachwuchsstipendium (Dr. Hendrik Wolff, Abteilung für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Göttingen), Kongress für experimentelle Strahlenbiologie, Dresden, Februar 2009

Publikationen und Abstracts, die sich auf diese Arbeit beziehen

Originalarbeiten:

Sag CM, Wolff HA, Neumann K, Opiela MK, Schirmer M, Rave-Fränk, Hess CF, Christiansen H, Maier LS (2011): Irradiation Impairs Excitation-Contraction Coupling in Isolated Cardiac Myocytes, *Circ Res*. In Revision

Abstracts:

C. Sag, H. A. Wolff, M.-K. Opiela, K. Neumann, M. Rave-Fränk, C. F. Hess, H. Christiansen, L. S. Maier (2009): Ionizing radiation acutely increases SR Ca release in isolated cardiac myocytes. *Clin Res Cardiol* 98 (Suppl 1): V1562.2009

K. Neumann, C. Sag, H. A. Wolff, M.-K. Opiela, M. Rave-Fränk, C. F. Hess, H. Christiansen, L. S. Maier (2010): Ionizing radiation alters Ca²⁺-cycling through ROS dependent activation of Ca/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in isolated cardiac myocytes. *Clin Res Cardiol* 99, (Suppl 1): April 2010

K. Neumann, C. Sag, H. A. Wolff, M.-K. Opiela, M. Rave-Fränk, C. F. Hess, H. Christiansen, L. S. Maier (2010): Ionizing radiation alters Ca²⁺-cycling through ROS dependent activation of Ca/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in isolated cardiac myocytes. *Biophys Soc*, März 2011

Danksagung

Ein großer Dank gilt meinen Betreuern Dr. med. Can-Martin Sag und Dr. med. Hendrik Wolff. Von der Versuchsvorbereitung bis zum Redigieren des Manuskripts war ihre tatkräftige Unterstützung eine unschätzbare Hilfe. Ohne ihren engagierten und motivierenden Einsatz wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen verdanke ich nicht nur meine Dissertation, sondern auch meinen Wunsch, weiterhin wissenschaftlich tätig zu sein.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Lars S. Maier möchte ich ganz herzlich für das Dissertationsthema und für die vielen, zielführenden Interpretationen der Ergebnisse und Anregungen danken. Ganz besonders hat mich seine Art der Laborleitung, die eine motivierende und kollegiale Atmosphäre schuf, begeistert.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Timo Schulte und Herrn Thomas Sowa bedanken, die durch ihre technisch hervorragend durchgeführten Zellisolationen erst die Grundlage für alle weiteren Messungen schufen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Frau Juliane Kastens und Frau Alex Bitter bedanken, die durch ihren tatkräftigen Einsatz in der Strahlentherapie meine Messungen ermöglichten.

Auch den Post-Docs Dr. med. Samuel Sossalla, Dr. med. Adam Rokita, Dr. med. Stefan Neef, Dr. med. Stefan Wagner und Dr. rer. nat. Nataliya Dybkova fühle ich mich zum Dank verpflichtet. Sie haben durch ihre Unterstützung in allen Fragen des „Doktoranden-Daseins“ ebenfalls ihren Anteil an dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. rer.nat. Margret Rave-Fränk, die durch die Vermittlung dieses Dissertations-Themas grundlegend zu meiner Promotion beigetragen hat. Des Weiteren möchte ich meinen „mit-Doktorandinen“ Marie Opiela, Katharina Ort und Birte Kallmeyer danken, mit denen es immer eine Freude war, zusammen Experimente durchzuführen.