

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

**Die Bedeutung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen
Kinase II δ für sauerstoffradikalvermittelte
zytosolische Natrium- und Kalziumüberladung sowie
Arrhythmogenese in Herzmuskelzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Sarah Bellmann

aus

Göppingen

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

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

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. T. Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Februar 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz.....	2
1.2 Elektromechanische Kopplung.....	5
1.3 Die Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase II.....	9
1.3.1 Struktur und Funktion der CaMKII δ	9
1.3.2 Die Bedeutung der CaMKII δ für die Herzinsuffizienz und Arrhythmogenese	12
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies.....	15
1.4.1 Sauerstoffradikalvermittelte Toxizität in Herzmuskelzellen	16
1.5 Die zytosolische Kalziumüberladung vermittelt durch den Natrium-Kalzium- Austauscher	17
1.6 Arrhythmien.....	18
1.7 Zusammenfassung und Hypothese	21
2 Material und Methoden	24
2.1 Generierung von CaMKII δ -Knock-out-Mäusen	24
2.2 Primärkultur adulter ventrikulärer Mäusemyozyten	27
2.2.1 Versuchstiere	27
2.2.2 Isolation ventrikulärer Mäusemyozyten	27
2.3 Epifluoreszenzmikroskopie	31
2.3.1 Die Fluoreszenzfarbstoffe SBF1 und Indo-1	32
2.3.2 Messung der intrazellulären Natriumkonzentration mit SBF1	34
2.3.3 Kalibrierung.....	37
2.3.4 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Indo-1	40
2.4 Generierung von Sauerstoffradikalen.....	43
2.4.1 Praktische Durchführung.....	44
2.5 Pharmakologische Intervention durch Inhibition des NCX	44
2.6 Messprotokoll.....	44

2.7 Statistik	47
3 Ergebnisse.....	48
3.1 Die Bedeutung der CaMKII δ für den Anstieg der zytosolischen Natriumkonzentration unter ROS-Exposition	48
3.2 Die Veränderung der zytosolischen Natriumkonzentrationen unter Radikalexposition in Wildtyp- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten	53
3.3 Die Rolle der CaMKII δ für die Veränderung der Kalziumkonzentration unter ROS-Exposition	54
3.4 Der Einfluss der CaMKII δ auf die Entstehung von Arrhythmien unter oxidativem Stress.....	61
3.4.1 Originalregistrierungen von Arrhythmien und Festlegung eines Arrhythmie-Scores	61
3.4.2 Arrhythmie-Score in WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten.....	66
3.4.3 Normalisierter Arrhythmie-Score.....	67
3.5 Zytoprotektive Effekte des CaMKII δ -knock-outs	68
4 Diskussion.....	70
4.1 Reaktive Sauerstoffspezies.....	70
4.2 ROS-Effekte auf den Natriumkanal.....	70
4.3 Die Bedeutung von Sauerstoffradikalen für die zytosolische Natriumkonzentration in Kardiomyozyten.....	73
4.4 Auswirkungen einer Radikal-Exposition auf die zytosolische Kalziumkonzentration.....	76
4.5 ROS-Effekte auf die Arrhythmogenese	79
5 Zusammenfassung	83
6 Literaturverzeichnis	84
7 Anhang: Publikationen zum Thema der Dissertation	98

Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxymethylester
AP	Aktionspotensial
ATP	Adenosintriphosphat
[Ca] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
Ca/CaM	Ca ²⁺ /Calmodulin-Komplex
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKII δ	im Herzen vorherrschende Isoform der CaMKII
CaMKII $\delta^{-/-}$	homozygoter Knock-out der CaMKII δ
CaMKII δ_c	zytosolische δ_c -Isoform der CaMKII
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNSE	engl.: „delayed non-stimulated event“
EGTA	engl.: „ethylene glycol tetraacetic acid“ (Ca ²⁺ -spezifischer Chelator)
ENSE	engl.: „early non-stimulated event“
HFpEF	engl.: „Heart Failure with preserved Ejection Fraction“
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I _{Ca}	einwärts gerichteter Kalziumstrom
I _{Na}	einwärts gerichteter Natriumstrom
KB-R7943	spezifischer Inhibitor des NCX-Umkehrtransportmodus
[Na]	Natriumkonzentration
[Na] _i	intrazelluläre Natriumkonzentration
[Na] _o	extrazelluläre Natriumkonzentration
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NYHA	New York Heart Association
PLB	Phospholamban
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	engl.: „Reactive Oxygen Species“
RyR2	kardialer Ryanodin-Rezeptor (Ryanodin-Rezeptor 2)
SBFI	engl.: „Sodium-binding Benzofuran Isophthalate“
SERCA	engl.: „Sarcoplasmatic/Endoplasmatic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase“
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

1.1 Elektromechanische Kopplung am Herzen.....	6
1.2 Querbrückenzyklus.....	8
1.3 Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II.....	10
1.4 Aktivierung der Ca ⁺ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II	12
2.1 Generierung von CaMKII δ -Knock-out-Mäusen.....	26
2.2 Vereinfachte schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage.....	28
2.3 Beladung eines Kardiomyozyten mit SBFI-AM.....	33
2.4 Abhängigkeit der SBFI-Fluoreszenz von der Natriumkonzentration und von der Wellenlänge.....	35
2.5 SBFI-Setup.....	37
2.6 Setup für die Indo-1-Messungen	41
2.7 Fluoreszenzemission von Indo-1	42
3.1 Originalregistrierung der SBFI-Fluoreszenzratio eines Wildtyp-Kardiomyozyten unter ROS-Exposition.....	49
3.2 Originalregistrierung der SBFI-Fluoreszenzratio eines CaMKII δ ^{-/-} -Kardiomyozyten unter ROS-Exposition.....	50
3.3 Beispielhafte Darstellung eines SBFI-Kalibrierungsexperimentes.....	51
3.4 Eichkurve.....	52
3.5 Zytosolische Natriumkonzentrationen unter Radikalexposition in CaMKII δ ^{-/-} - und Wildtyp-Kardiomyozyten.....	53
3.6 Originalabbildung der Fluoreszenzratio F ₄₀₅ /F ₄₈₅ eines Wildtyp-Kardiomyozyten als Maß für die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen unter ROS-Exposition.....	55
3.7 Originalregistrierung einer Hyperkontraktur.....	56
3.8 Originalabbildung der Fluoreszenzratio F ₄₀₅ /F ₄₈₅ eines CaMKII δ ^{-/-} -Kardiomyozyten als Maß für die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration unter ROS-Exposition	57
3.9 Originalregistrierung der Ino-1-Fluoreszenzratio eines mit KB-R7943 behandelten Wildtyp-Kardiomyozyten nach ROS-Exposition	58
3.10 Veränderungen der Indo-1-Ratio nach ROS-Exposition.....	59
3.11 Originaldarstellung einer rhythmisch kontrahierenden Herzmuskelzelle	61
3.12 Originalregistrierung eines frühen nicht-stimulierten Ereignisses (ENSE)	62

3.13 Originalregistrierung später nicht-stimulierter Ereignisse (DNSEs)	62
3.14 Originalregistrierung von doppelten DNSEs	63
3.15 Originalabbildung von dreifachen DNSEs.....	63
3.16 Bigeminusartige Rhythmusstörung dargestellt in einer Originalregistrierung.....	64
3.17 Originalabbildung einer trigeminusartigen Rhythmusstörung	64
3.18 Originalregistrierung einer salvenartigen Rhythmusstörung nach Radikalexposition	65
3.19 Originalabbildung einer nicht-anhaltenden zellulären Rhythmusstörung	65
3.20 Originalregistrierung einer anhaltenden zellulären Rhythmusstörung	66
3.21 Arrhythmie-Score.....	67
3.22 Auf die Beobachtungszeit normalisierter Arrhythmie-Score.....	68
3.23 Kaplan-Meier-Survival-Kurve	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Isolationstyrode.....	30
Tabelle 2-2 Enzymlösung.....	30
Tabelle 2-3 Myozytenstopplösung 1 (10% Rinderkälberserum).....	30
Tabelle 2-4 Kalziumaufbau.....	31
Tabelle 2-5 Natriumlösung (140mmol/l).....	39
Tabelle 2-6 Kaliumlösung (140 mmol/l).....	39
Tabelle 2-7 Kalibrierungslösungen.....	39
Tabelle 2-8 Messtyrode.....	45

1 Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist eines der häufigsten Krankheitsbilder der Inneren Medizin. Allein in Deutschland leben derzeit weit über eine Million Menschen mit dieser Erkrankung. Betroffen sind überwiegend ältere Menschen über 60 Jahre, so dass angesichts der aktuellen demografischen Entwicklung, die durch eine zunehmende Alterung der Gesellschaft gekennzeichnet ist, insbesondere in den Industrieländern mit einer erheblichen Zunahme der Prävalenz und der Inzidenz der Herzinsuffizienz zu rechnen ist (Stewart et al. 2003). Die herzkranken Patienten leiden meist unter einer beträchtlichen Einschränkung ihrer Lebensqualität. Ihre Prognose ist trotz aller bisher erreichten therapeutischen Fortschritte schlecht. Neueste Studien konnten zeigen, dass die Prognose der Herzinsuffizienz nicht unbedingt besser ist als die bösartiger Tumorerkrankungen (Askoxylakis et al. 2010). In der Framingham-Studie betrug die mittlere Überlebenszeit für Männer mit Herzinsuffizienz 1,7 Jahre und für Frauen 3,2 Jahre, die 5-Jahresüberlebensrate lag bei 25% für Männer und bei 38% für Frauen. Damit ist ihre Mortalitätsrate um das vier- bis achtfache höher als das der altersentsprechenden Allgemeinbevölkerung (Kannel 2000).

Derzeit sind die Mechanismen der Herzinsuffizienzentwicklung auf Ebene der Kardiomyozyten nur unzureichend verstanden. Reaktive Sauerstoffspezies, welche in der Herzinsuffizienz vermehrt gebildet werden, können hierbei von Bedeutung sein (Mallat et al. 1998). Da diese hochreaktiven Moleküle aufgrund der sehr kurzen Lebenshalbwertszeit nur eine sehr begrenzte Reichweite innerhalb der Zelle besitzen, wird ihre Wirkung möglicherweise über sekundäre Botenstoffe vermittelt.

Eine zentrale Rolle bei der Regulation des zellulären Natrium- und Kalziumstoffwechsels spielt die zytosolische Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ . Diese insbesondere in Kardiomyozyten vorkommende Serin-Threonin-Proteinkinase ist in der Lage, durch Phosphorylierung zahlreiche Ionenkanäle und Membrantransporter in ihrer Funktion zu beeinflussen. Ihre Aktivität wird dabei nicht nur kalziumabhängig, sondern - wie neuere Daten zeigen - auch redox-abhängig reguliert (Erickson et al. 2008).

Das insuffiziente Herz zeichnet sich durch eine beeinträchtigte elektromechanische Kopplung mit konsekutiver kontraktile Dysfunktion aus, die unter anderem auf eine erhöhte Aktivität dieser Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II δ zurückzuführen ist (Maier und Bers 2007). Dabei weisen die Effekte von Reaktiven

Sauerstoffspezies und aktivierter CaMKII erstaunliche Parallelen auf (Wagner et al. 2012). In dieser Arbeit soll die zentrale Hypothese untersucht werden, ob die sauerstoffradikalinduzierte Zytotoxizität im Herzen über eine Aktivierung der CaMKII δ vermittelt ist.

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist keine eigenständige Diagnose, sondern wird als Syndrom unterschiedlichster Ätiologie, das sich durch das Vorliegen typischer Symptome bei pathophysiologisch veränderter Herzfunktion auszeichnet, definiert (Hunt et al. 2009). Ein zentrales Problem stellt dabei die eingeschränkte Pumpfunktion des Herzens und die daraus resultierende Minderversorgung wichtiger innerer Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen dar (Swedberg et al. 2005).

In Abhängigkeit von den im Vordergrund stehenden Symptomen spricht man klinisch von einer Links- oder von einer Rechtsherzinsuffizienz (Swedberg et al. 2005). Während das linksventrikuläre Versagen durch die Rückstauung des Blutes in die Lungenstrombahn häufig mit Dyspnoe einhergeht, führt die rechtsventrikuläre Dysfunktion zur venösen Rückstauung des Blutes in den großen Blutkreislauf mit Knöchelödemen, Halsvenenstauung und Hepatomegalie. Die bestehende Funktionseinschränkung des Herzens kann weiter in eine diastolische Insuffizienz, die insbesondere mit einem Versagen des Blutansaugens (Rückwärtsversagen) und eine systolische Insuffizienz, die vor allem mit einem Versagen des Blutauswerfens (Vorwärtsversagen) einhergeht, unterschieden werden. Pathophysiologisch handelt es sich um Störungen der Lusitropie (Relaxationsfähigkeit) und Inotropie (Kontraktilität) des Myokards, wobei diese in den meisten Fällen nicht getrennt voneinander betrachtet werden dürfen, sondern vielmehr miteinander zusammenhängen (Swedberg et al. 2005). In letzter Zeit wurde vermehrt eine Krankheitsentität untersucht, bei der es zunächst isoliert zu einer diastolischen Relaxationsstörung ohne systolische Kontraktilitätsstörung kommt. Diese ist Folge einer ausgeprägten Myokardhypertrophie, z.B. auf dem Boden eines langjährigen arteriellen Hypertonus, und wird als diastolische Herzinsuffizienz oder Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion („HFpEF“) bezeichnet (Mandinov et al. 2000). In späteren Stadien der Erkrankung kann sich, insbesondere wenn Kompensationsmechanismen (siehe unten) versagen, auch eine Kontraktilitätsstörung entwickeln.

Als wichtigste und häufigste Ursache für die Entstehung einer Herzinsuffizienz ist die ischämische Herzerkrankung zu nennen. Neben der ischämischen Herzkrankheit zählen aber auch die hypertensiven Herzerkrankungen, die valvuläre Herzkrankheit, die angeborenen sowie die erworbenen Kardiomyopathien und die Myokarditiden zu den wesentlichen Ursachen einer Herzinsuffizienz (McMurray und Stewart 2000). Die Einteilung der Herzinsuffizienz in verschiedene Schweregrade erfolgt unabhängig von ihrer Ätiologie ausschließlich anhand von klinischen Gesichtspunkten, die von der New York Heart Association (NYHA) zusammengefasst wurden. Die Klassifikation orientiert sich an der Leistungsfähigkeit des einzelnen Patienten. Ein Patient mit klinisch nachgewiesener Herzinsuffizienz, aber keiner wesentlichen Einschränkung der alltäglichen körperlichen Belastbarkeit wird als NYHA I, ein schwerkranker bettlägeriger Patient mit Ruhedyspnoe als NYHA IV eingestuft. Das Stadium NYHA II zeichnet sich durch eine leichte, NYHA III durch eine starke Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit im Alltag aus (Hunt et al. 2009).

Pathogenetisch beginnt die Herzinsuffizienz häufig durch eine Schädigung des Herzmuskels beispielsweise im Rahmen einer Ischämie oder einer Druck- oder Volumenbelastung und führt zu einem Verlust von Kardiomyozyten oder zu einer eingeschränkten Kraftentwicklung des Myokards (Mann und Bristow 2005). Anfangs kann die kardiale Funktion, insbesondere wenn die Schädigung allmählich eintritt, durch Kompensationsmechanismen aufrecht erhalten werden, so dass Patienten zunächst unter Umständen gar keine Symptome einer Herzinsuffizienz zeigen (Mann und Bristow 2005). Zu den neurohumoralen Kompensationsmechanismen zählen insbesondere die Aktivierung des adrenergen Nervensystems (Sympathikus), die unter anderem mit einer Erhöhung der Herzfrequenz (positive Chronotropie) und der Kontraktilität (positive Inotropie) einhergeht, und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), das zu einer gesteigerten Natrium- und Wasserretention, zur Vasokonstriktion und zur Myokardhypertrophie führt. Auf eine Verminderung des Schlagvolumens (Blutvolumen, das mit einem Herzschlag ausgeworfen wird) würde der Organismus zunächst mit einer Erhöhung der Herzfrequenz (Aktivierung des adrenergen Nervensystems) reagieren. Unter physiologischen Bedingungen würde eine erhöhte Herzfrequenz zu einer Zunahme der Kontraktilität führen (Bowditch-Effekt, Bowditch 1871). Diese positive Kraft-Frequenz-Korrelation ist jedoch bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz nicht mehr nachweisbar (Negative Kraft-Frequenz-Beziehung), so dass trotz gesteigerter Herzfrequenz immer weniger Herzzeitvolumen

(Produkt aus Herzfrequenz und Schlagvolumen) generiert werden kann (Mulieri et al. 1992). Im Endstadium der Erkrankung kann es dabei zu einer kritischen Minderversorgung lebenswichtiger Organe, zum kardiogenen Schock kommen.

Die Progression der Erkrankung ergibt sich insbesondere durch eine stetige Aktivierung der neurohumoralen Kompensationsmechanismen. Durch Überexpression bestimmter biologisch aktiver Moleküle wie beispielsweise Noradrenalin, Angiotensin II und Aldosteron kommt es zum sogenannten pathologischen kardialen Remodeling (Mann und Bristow 2005). Dieser strukturelle Umbau des Myokards entsteht durch eine Vielzahl von molekularen und zellulären Veränderungen in Kardiomyozyten und führt letztendlich zu einem progressiven Verlust kardialer Pumpfunktion (Mann und Bristow 2005). Unter anderem kommt es auf zellulärer Ebene zu einem hypertrophen Myozytenwachstum (Mann und Bristow 2005), zum Myozytenverlust durch Apoptose (Olivetti et al. 1997) und zu einer extrazellulären Fibrosierung (Weber 1997). Auf molekularer Ebene resultieren veränderte kontraktile Eigenschaften von Kardiomyozyten (Nakao et al. 1997, Schaper et al. 1991) aus einer gestörten elektromechanischen Kopplung (Beuckelmann et al. 1992, Maier et al. 2003) und einer Herunterregulierung von β -adrenergen Rezeptoren (Bristow et al. 1982). Die RAAS-vermittelte periphere Vasokonstriktion (erhöhte Nachlast) geht mit einer weiteren Verschlechterung der hämodynamischen Situation einher, was zu einer zusätzlichen Aktivierung des neurohumoralen Systems und damit zu einer Progression des kardialen Remodelings führt (Circulus vitiosus).

Beispielhaft konnten Bacs et al. 2009 zeigen, dass auch die zytosolische CaMKII (siehe unten) beim kardialen Remodeling eine wichtige Rolle spielt. Sie ist beteiligt an der Entstehung von pathologischer Myokardhypertrophie nach kontinuierlicher Nachlasterrhöhung. Dies erfolgt über die Aktivierung eines fetalen kardialen Genprogramms (Bacs et al. 2009), das mit einem hypertrophen Wachstum von Kardiomyozyten in erwachsenen Herzen einhergeht. Einen Zusammenhang zwischen der CaMKII und der Entwicklung einer massiven dilatativen Hypertrophie konnte auch durch Maier et al. 2003 und Zhang T et al. 2003 festgestellt werden. Neben der CaMKII können vermehrt gebildete Reaktive Sauerstoffspezies (siehe unten) durch eine gestörte Natrium- und Kalziumhomöostase zum Zelltod und damit zum strukturellem myokardialen Umbau beitragen (Josephson et al. 1991, Wagner et al. 2011).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass oben genannte Kompensationsmechanismen anfangs zwar zu einer deutlichen Verbesserung bzw. Stabilisierung der hämodynamischen Situation und der Herzleistung führen, sich im Verlauf bei chronischer Aktivierung aber deutlich nachteilig auf die Herzfunktion auswirken. Der daraus resultierende Circulus vitiosus muss medikamentös (unter anderem durch Blockierung des neurohumoralen Systems) durchbrochen werden, um eine Dekompensation der Herzinsuffizienz zu verhindern bzw. zu verzögern. Neben der Beeinträchtigung der Herzfunktion ist die Herzinsuffizienz durch ein deutlich gesteigertes Auftreten von lebensbedrohlichen ventrikulären und supraventrikulären Rhythmusstörungen (siehe unten) gekennzeichnet.

1.2 Elektromechanische Kopplung

Auf zellulärer Ebene liegen der Kontraktion und Relaxation Mechanismen zugrunde, die zusammengefasst als elektromechanische Kopplung (Bers 2002) beschrieben werden. Die wichtigste Schlüsselrolle zwischen Erregung und Kontraktion spielen dabei Kalziumionen, die während des Aktionspotentials ins Zytosol gelangen und als direkte Aktivatoren der Myofilamente die Kontraktion bedingen (Bers 2001). Die Erregung beginnt im Sinusknoten, dessen spezialisierte Herzmuskelzellen ein weniger negatives Ruhemembranpotential als ventrikuläre Myozyten aufweisen und in der Diastole spontan depolarisieren können (spontane Schrittmacheraktivität) (Bers 2001). Das dort entstandene Aktionspotential erreicht über das Erregungsleitungssystem die Ventrikel. Verbindungen („gap junctions“) zwischen den einzelnen Herzmuskelzellen gewährleisten eine gleichmäßige Ausbreitung der Erregung über das gesamte Herzmuskelgewebe. Der Herzmuskel entspricht daher einem funktionellen Synzytium, einer einzigen elektromechanischen Einheit (Bers 2001). Die mechanische Kontraktion dauert im Herzen nur wenig länger als das Aktionspotential einer ventrikulären Myozyte. Dies hat zwei Konsequenzen: Zum einen verhindert es in der Zeit, in der die Membran depolarisiert und Natrium- und Kalziumkanäle inaktiviert sind (Refraktärzeit), eine erneute Erregung der Kardiomyozyten und damit die Entstehung von kreisenden Erregungen (Reentry-Kreise). Zum anderen gewährleistet die lange Aktionspotentialdauer und die Refraktärzeit, dass nach jeder systolischen Kontraktion eine ausreichend lange Relaxation und Füllung der Herzkammern mit Blut (Diastole) folgt und zugleich eine Tetanisierung des Herzens quasi unmöglich ist (Bers 2001).

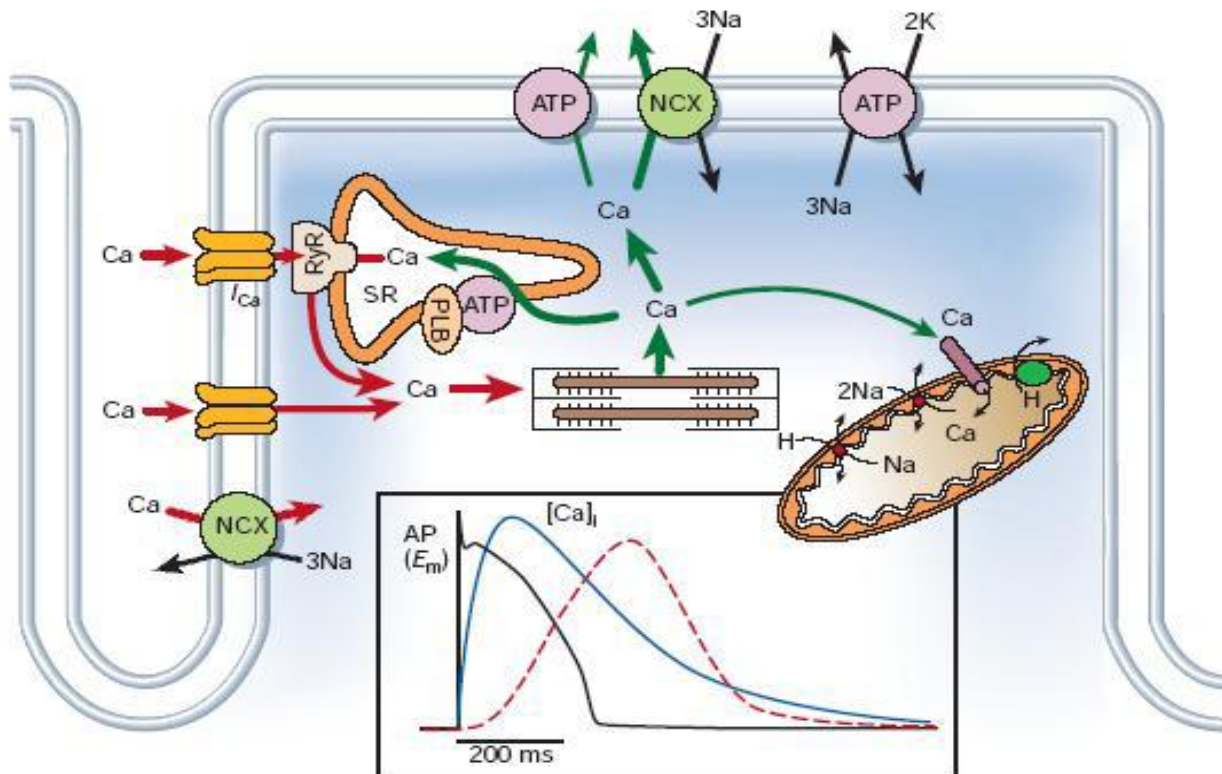


Abb. 1.1 Elektromechanische Kopplung am Herzen

Zur Veranschaulichung der langen Aktionspotentialdauer einer Herzmuskelzelle wird diese im Einschub in zeitlicher Korrelation zur systolischen Kalziumkonzentration $[Ca]_i$ (blau) und zur mechanischen Kontraktion (rot gestrichelt) gezeigt. Während der Plateauphase (Einschub, schwarz) öffnen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Der resultierende Kalziumeinstrom (I_{Ca}) führt zur kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über die kardialen Ryanodin-Rezeptoren (RyR2). Die Kalziumionen binden an die Myofilamente und sorgen für eine mechanische Kontraktion. In der Diastole werden die Kalziumionen über ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpen zurück ins SR gepumpt oder über Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX) sowie sarkolemmale Ca^{2+} -ATPasen nach extrazellulär transportiert. Je nach intrazellulären Konzentrationsverhältnissen kann der NCX Kalzium in die Zelle oder aus der Zelle heraustransportieren. Zu einem geringen Anteil werden die Kalziumionen auch über Uniporter in die Mitochondrien aufgenommen. Modifiziert nach Bers 2002, S. 198.

Das Aktionspotential des Ventrikelmyokards beginnt mit einem schnellen Aufstrich durch die Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle (Abbildung 1.1, Einschub). Die lange Dauer des Aktionspotentials ist hauptsächlich bedingt durch die für das Herz charakteristische Plateauphase (Abb. 1.1, Einschub), in der Kalziumionen entlang eines elektromechanischen Gradienten über spannungsabhängige Kalziumkanäle in die Zelle strömen (Bers 2001). Diese Kanäle heißen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (DHPR-Rezeptoren bzw. Dihydropyridinrezeptoren), befinden sich bevorzugt

in sarkolemmalen Einstülpungen (Transversale Tubuli bzw. T-Tubuli, Abb. 1.1) und zeichnen sich durch eine lange Öffnungsdauer aus (Bers 2001). Das lokal ansteigende zytosolische Kalzium triggert die Aktivierung von Kalziumkanälen des Sarkoplasmatischen Retikulums (Ryanodin-Rezeptoren 2, RyR2, Abb. 1.1) und sorgt für eine Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dieser Vorgang wird auch als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung bezeichnet (Bers 2001).

Diese während der Systole ins Zytosol einströmenden Kalziumionen binden an Troponin C und sorgen durch eine Konformationsänderung für eine Umlagerung von Tropomyosin und Troponin T und damit für die Freilegung der Myosinbindungsstellen am Aktin. Die Myosinköpfchen binden nun an das Aktinfilament und bewirken durch Kippung des Hebelarms unter ATP-Hydrolyse eine isometrische Kraftentwicklung oder eine Filamentverschiebung (Gleitfilamenttheorie) (Huxley 1969) und damit eine Muskelverkürzung (Bers 2001). Diese zyklische Wechselwirkung zwischen Myosinköpfchen und Aktinfilament wird als Querbrückenzyklus bezeichnet (Abb. 1.2). Für die Relaxation des Herzmuskels während der Diastole muss die zytosolische Kalziumkonzentration wieder absinken. Dazu werden die Kalziumionen über SR- Ca^{2+} -ATPasen (SERCA = „Sarcoplasmatic/Endoplasmatic Reticulum Ca^{2+} -ATPase“) aktiv ins Sarkoplasmatische Retikulum zurückgepumpt (Bers 2001). Durch Phosphorylierung von Phospholamban beispielsweise im Rahmen der β -adrenergen Stimulation durch Sympathikomimetika kann die Kalziumaufnahme ins SR beschleunigt und die Relaxationsgeschwindigkeit gesteigert werden (positiv lusitrope Wirkung) (Bers 2001). $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) transportieren Kalziumionen über die Zellmembran nach extrazellulär. Zu einem geringen Anteil wird Kalzium über sarkolemmale Ca^{2+} -ATPasen aus der Zelle eliminiert sowie über Uniporter in die Mitochondrien aufgenommen (siehe Abb.1.1) (Bers 2001). Durch die sinkende zytosolische Kalziumkonzentration dissoziieren die Ca^{2+} -Ionen vom Troponin C ab. Die Bindung von ATP führt zu einer Lösung des Myosinköpfchens vom Aktin, so dass sich die Tropomyosinmoleküle wieder über die hochaffinen Myosinbindungsstellen auf den Aktinfilamenten lagern können und der Querbrückenzyklus nicht weiter durchlaufen werden kann. Gleichzeitig strömt Kalium aus der Zelle und sorgt dafür, dass die Herzmuskelzelle repolarisiert und ihr Ruhemembranpotential von etwa -80 mV wieder erreicht wird, so dass sie erneut depolarisiert werden kann (Bers 2001).

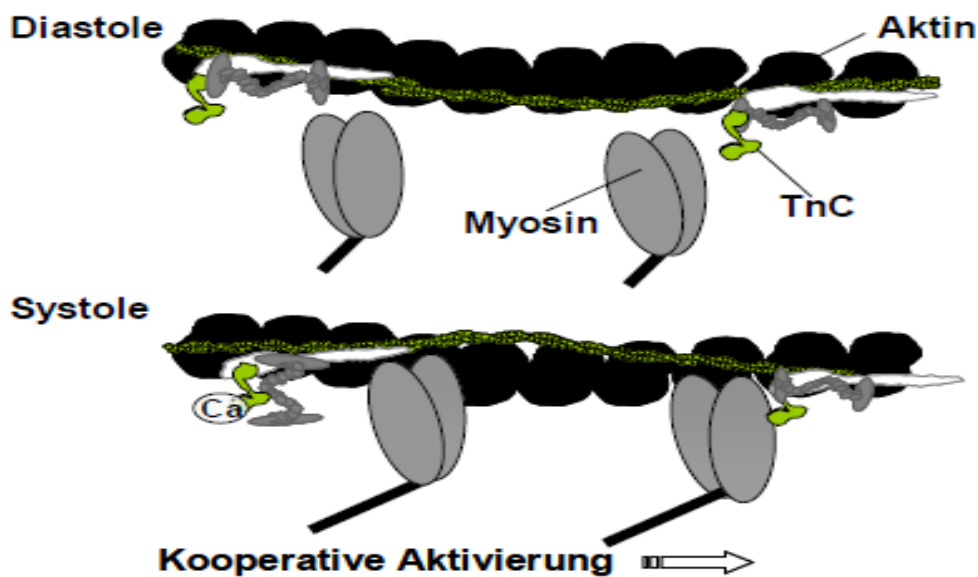


Abb. 1.2 Querbrückenzyklus

Unter dem Querbrückenzyklus versteht man eine zyklische Wechselwirkung zwischen Aktin- und Myosinfilamenten, die unter Energieverbrauch abläuft. Die in der Zelle während der Systole vorhandenen Kalziumionen binden an Troponin C (TnC), das den Aktinfilamenten angelagert ist. Daraus resultiert eine Konformationsänderung des Troponin C, welche zu einer Freilegung der Myosinbindestellen auf den Aktinfilamenten führt. Die Myosinköpfe binden nun an das Aktinfilament und führen durch Kippung ihrer Hebelarme unter Verbrauch von ATP zu einer Filamentverschiebung. Dieser Vorgang wiederholt sich viele Male und führt durch Überlappung der Aktin- und Myosinfilamente zur Muskelverkürzung. In der Diastole bewirkt die sinkende zytosolische Kalziumkonzentration das Abdissoziieren des Kalziums von Troponin C, das daraufhin seine Konformation wiederherstellt und damit die Myosinbindestellen auf dem Aktinfilament wieder verdeckt. Modifiziert nach Bers 2001, S. 25.

Neben ihrer positiven ino- und lusitropen Wirkung führen Sympathikomimetika zu einer Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit (positiv dromotrope Wirkung) und damit zu einer Beschleunigung der Herzfrequenz (positiv chronotrope Wirkung). Im Rahmen der Herzinsuffizienz kann es durch chronische sympathikomimetische Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren zu einer elektromechanischen Entkopplung kommen, die mit einer gestörten Kalziumhomöostase einhergeht (Bers 2001). Eine wichtige Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II δ (CaMKII δ) zu.

1.3 Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II

Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase (Braun und Schulman 1995). Als multifunktionelles Enzym kann die CaMKII durch Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten auf erhöhte zytosolische Kalziumkonzentrationen reagieren (Hook und Means 2001). Sie ist im Rahmen der elektromechanischen Kopplung ein wichtiges Enzym zur Regulierung der physiologischen zellulären Kalziumhomöostase. So kann sie z.B. den kardialen Ryanodin-Rezeptor (Witcher et al. 1991, Zhang T und Brown 2004) und Phospholamban (Koss und Kranias 1996) phosphorylieren, was Auswirkungen auf die Kanalöffnungswahrscheinlichkeit und die Kalziumaufnahme in das SR hat (Maier und Bers 2007). Während die genauen akuten Effekte, die sich aus der Phosphorylierung des RyR2-Rezeptors ergeben, noch nicht vollständig geklärt sind, konnten Bassani et al. 1995 zeigen, dass die Phosphorylierung von Phospholamban durch die CaMKII zu einer Abdissoziation von der SR-Ca²⁺-ATPase und damit zu einer erhöhten Kalziumaufnahme ins SR und zu einer frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation führt (Maier und Bers 2007). Somit wird eine diastolische Füllung auch bei hohen Herzfrequenzen ermöglicht. CaMKII-abhängige Effekte konnten auch für den L-Typ-Ca²⁺-Kanal nachgewiesen werden. Eine Phosphorylierung dieses Kanals durch die CaMKII geht nach wiederholten Depolarisationen mit einer Zunahme des Ca²⁺-Einstroms im Sinne eines positiven Feedbacks, auch als „Facilitation“ bezeichnet, einher (Dzhura et al. 2000, Yuan und Bers 1994). Auf der Ebene eines einzelnen L-Typ-Ca²⁺-Kanals zeigt sich dies als eine verlängerte Öffnungsdauer des Kanals (Dzhura et al. 2000). Eine direkte Modulation des kardialen Natrium-Kalzium-Austauschers durch die CaMKII konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Neben den akuten Effekten, die die CaMKII auf die Ionenkanäle und die elektromechanische Kopplung hat, ist sie auch an der Regulation und Vermittlung langfristiger Effekte beteiligt (siehe unten).

1.3.1 Struktur und Funktion der CaMKII δ

Die im Herzen vorherrschende Isoform ist die CaMKII δ (Maier und Bers 2007), deren Splicevariante δ_c vor allem im Zytosol und deren Splicevariante δ_B hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist (Edman und Schulman 1994). Neben der CaMKII δ sind noch drei weitere Isoformen (α , β , γ) der CaMKII bekannt, wobei die α - und β -Isoformen insbesondere im zentralen Nervensystem vorkommen. Die CaMKII besteht als

multimeres Holoenzym aus sechs bis zwölf Untereinheiten (Hudmon und Schulman 2002).

Neben einer regulatorischen und eine katalytischen Domäne besitzt jedes Monomer eine Assoziationsdomäne (siehe Abb. 1.3 A), über die sich die einzelnen Monomere miteinander verbinden und sich ringförmig anordnen können (Maier und Bers 2007) (siehe Abb. 1.3 B).

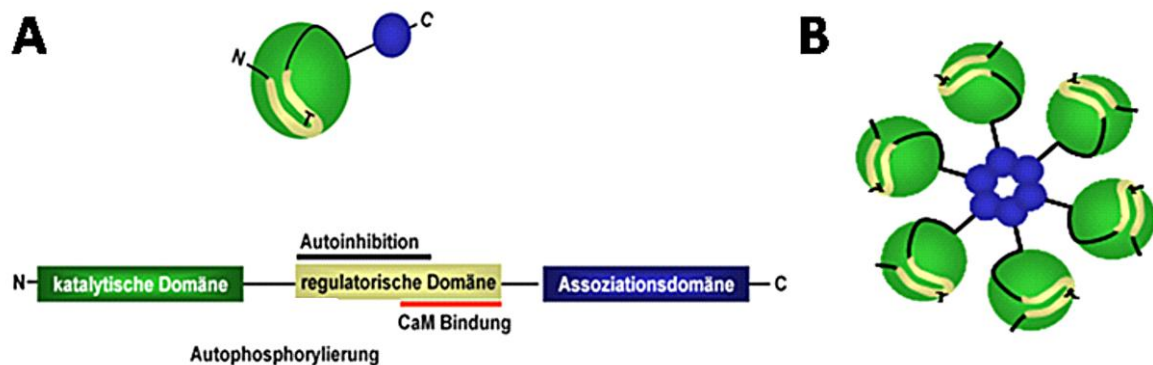


Abb. 1.3 Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

A: Die drei Domänen eines CaMKII-Monomers **B:** Durch Verbindung der Assoziationsdomänen entsteht die ringförmige Struktur eines multimeren Holoenzym.

Modifiziert nach Maier und Bers 2002, S. 924.

Im inaktiven Zustand der CaMKII verdeckt die regulatorische Domäne das aktive Zentrum der katalytischen Domäne (Autoinhibition) (siehe Abb. 1.4). Sobald das zytosolische Kalzium allerdings ansteigt, bindet dieses an Calmodulin und lagert sich als Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex (Ca/CaM) an die regulatorische Domäne der CaMKII. Dies führt zu einer Konformationsänderung der CaMKII, die zur Folge hat, dass die katalytische Domäne Zugang zu ihrem Substrat findet und ATP binden kann. Wird das aktive Enzym an Threonin 287 der regulatorischen Domäne autophosphoryliert, ist eine Re-Assoziation von katalytischer und regulatorischer Domäne aufgrund der negativen Ladung der phosphorylierten Aminosäure nicht mehr möglich, auch wenn die Ca/CaM-Konzentration in der Zelle abgefallen und Ca/CaM von der regulatorischen Domäne abdissoziiert ist. Dies führt zu einer Ca/CaM-unabhängigen (autonomen) Aktivität der katalytischen Untereinheit (Hudmon und Schulman 2002). Die Autophosphorylierung ist für die Aktivierung der CaMKII nicht notwendig, sie hat aber eine andere wesentliche Bedeutung. Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer 1000-fachen Steigerung der Affinität für Ca/CaM, so dass dieser Komplex trotz

abgefallener Kalziumkonzentration noch für einige Sekunden an der CaMKII δ gebunden sein kann. Dies ist wichtig, da trotz autonomer Aktivität die Bindung von Ca/CaM für eine maximale Aktivierung der CaMKII essentiell ist (Meyer et al. 1992). Neben der Autophosphorylierung konnten Erickson et al. 2008 einen neuartigen Aktivierungsweg der CaMKII mittels direkter Oxidation durch Reaktive Sauerstoffspezies nachweisen (siehe Abb. 1.4). Nach Bindung von Kalzium und Calmodulin an die regulatorische Domäne der CaMKII klappt diese auf und legt die beiden Methioninreste 281 und 282 frei. Diese werden nun in Anwesenheit von freien Radikalen oxidiert. Dies führt zu einer ähnlichen autonomen Aktivität (Ca/CaM-unabhängigen Aktivität) wie die Autophosphorylierung. Dabei sind die Autophosphorylierung und Oxidation nicht zwei sich gegenseitig ausschließende Prozesse. Im Gegenteil, Erickson et al. konnten zeigen, dass die Oxidation an Methionin 281/282 die Autophosphorylierung fördert (Erickson et al. 2008). Wagner et al. konnten jedoch zeigen, dass für die initiale Oxidation und damit vermehrte Aktivierung der CaMKII unbedingt eine vorausgehende Ca/CaM-Bindung und damit eine Exposition der Methioninreste notwendig ist (Wagner et al. 2011). Das erforderliche Kalzium stammt vermutlich aus dem SR, das über eine direkte Aktivierung von kardialen Ryanodin-Rezeptoren durch Reaktive Sauerstoffspezies (siehe unten) freigesetzt wird (Wagner et al. 2011 und 2012).

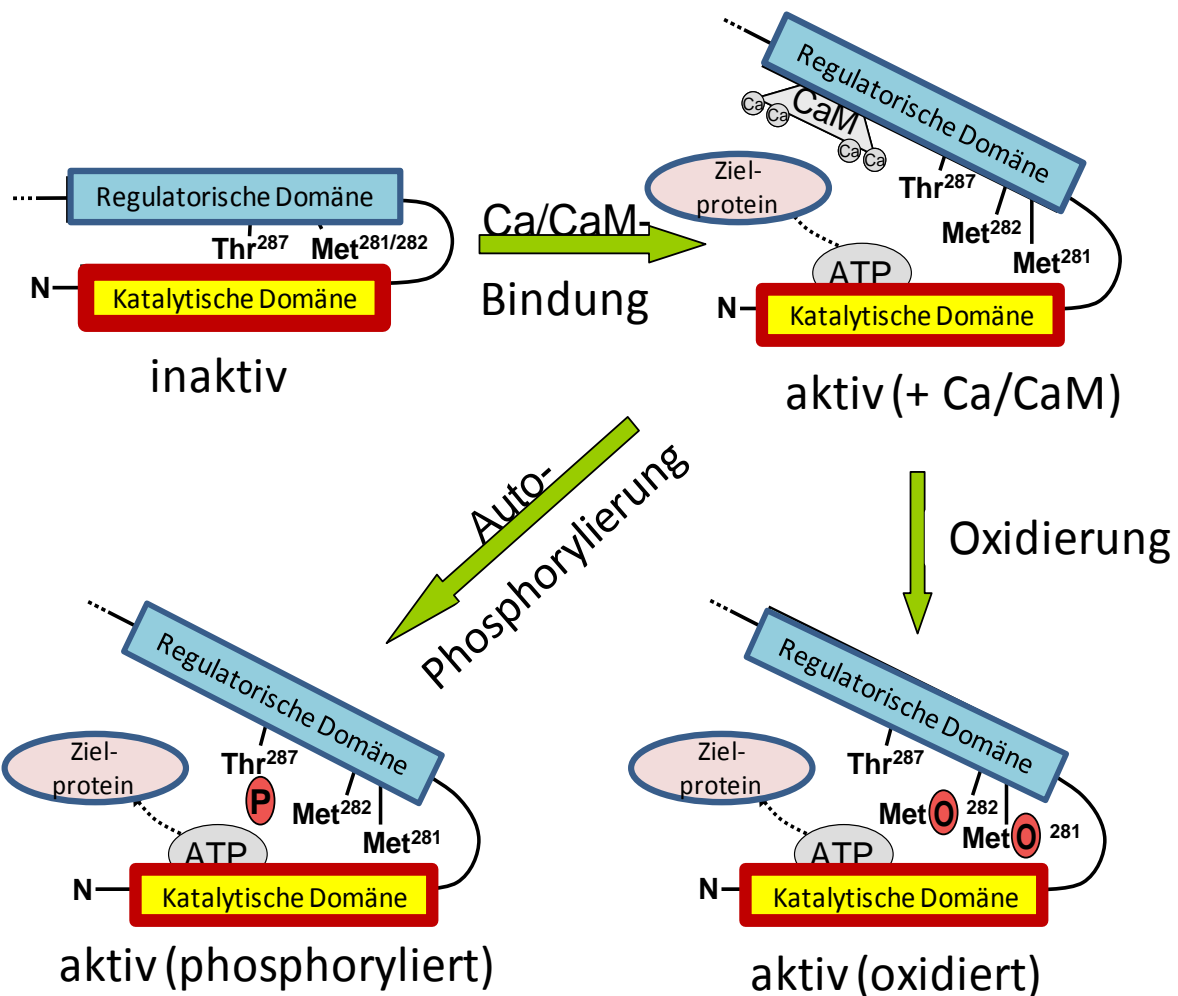


Abb.1.4 Aktivierung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II

Im inaktiven Zustand wird das aktive Zentrum der katalytischen Domäne von der regulatorischen Domäne verdeckt (Autoinhibition). Erst nach Bindung von Ca/CaM an die regulatorische Domäne, wird dieses durch Konformationsänderung freigelegt und kann jetzt Zielproteine phosphorylieren. Durch Autophosphorylierung von Threonin 287 (Thr 287) wird ein autonomer Zustand durch Verhinderung einer erneuten Autoinhibition erreicht. Eine anhaltende Ca/CaM-unabhängige Aktivität kann außerdem durch Oxidation von Methionin 281 und 282 (Met 281/282) erreicht werden.

1.3.2 Die Bedeutung der CaMKII δ für die Herzinsuffizienz und Arrhythmogenese

Es ist bekannt, dass die Herzinsuffizienz mit erhöhter Expression (Hoch et al. 1999) und Aktivität (Kirchhefer et al. 1999) der CaMKII δ einhergeht. Wagner et al. konnten 2006 zeigen, dass die multifunktionelle Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ das Leitungsverhalten („Gating“) kardialer spannungsabhängiger Natriumkanäle (Na_v1.5) beeinflussen kann. Dabei kommt es unter anderem zu einer Steigerung des späten Natriumstroms (Wagner et al. 2006 und 2011). Dies ist ein Na_v1.5-vermittelter

Natriumstrom, der durch fortgesetzte Reaktivierung einzelner Na⁺-Kanäle (Bursting-Mode) über hunderte von Millisekunden persistieren kann. Demgegenüber inaktivieren die meisten Natriumkanäle innerhalb weniger Millisekunden beim Spitzennatriumstrom und bleiben inaktiv, bis die zur Reaktivierung notwendige Erholungszeit während des Ruhemembranpotentials verstrichen ist (Wagner et al. 2006).

Ursache der CaMKII-abhängigen Veränderungen des Öffnungsverhaltens scheint eine direkte CaMKII-abhängige Phosphorylierung des Na_v1.5 zu sein. Eine Assoziation zwischen der CaMKII und dem kardialen Na⁺-Kanal und eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung konnten Wagner et al. 2006 indirekt nachweisen. Die exakte Phosphorylierungsstelle blieb jedoch unklar. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde eine CaMKII-abhängige Na_v1.5-Phosphorylierung an Serin 571 im Linker zwischen Domäne I und II beschrieben (Hund et al. 2010). In dieser Arbeit wurden jedoch nicht alle Veränderungen des Leitungsverhaltens (insbesondere nicht die Verstärkung des späten Natriumstroms) untersucht, so dass unklar bleibt, ob Serin 571 die entscheidende Phosphorylierungsstelle ist, welche die Veränderungen im späten Natriumstrom vermittelt.

CaMKII δ -überexprimierte Kaninchenkardiomyozyten weisen unter Ruhebedingungen einen signifikant höheren Natriumeinwärtsstrom auf. Auch die zytosolische Natriumkonzentration ist im Vergleich zu Wildtyp-Kardiomyozyten höher, was auf einen möglichen ursächlichen Zusammenhang hinweisen könnte (Wagner et al. 2006 und 2011). Interessanterweise sind die CaMKII-abhängigen Veränderungen des späten Natriumstroms denen nach direkter ROS-Exposition sehr ähnlich (Wagner et al. 2011 und 2012). ROS-Exposition geht in Kaninchenwildtyp-Kardiomyozyten mit einem signifikant gesteigerten Natriumeinwärtsstrom einher (Wagner et al. 2011). Mittels PatchClamp-Technik konnte gezeigt werden, dass H₂O₂, welches ROS freisetzt (siehe unten), zu einer bedeutsamen Zunahme des späten Natriumstroms führt (Ward und Giles 1997, Ma et al. 2005, Song et al. 2006, Wagner et al. 2011).

Wagner et al. konnten 2011 erstmals zeigen, dass diese ROS-induzierte Steigerung des späten Natriumstroms in Kardiomyozyten, denen das Gen für die CaMKII δ fehlt, ausbleibt. Diese grundlegenden Arbeiten liefern wichtige Anhaltspunkte für die zu untersuchende Hypothese der vorliegenden Arbeit und deuten bereits darauf hin, dass die CaMKII entscheidend an der ROS-induzierten Regulation der Natriumhomöostase beteiligt zu sein scheint.

Neben den spannungsabhängigen Natriumkanälen ist die CaMKII in der Lage eine Vielzahl von kalziumregulatorischen Proteinen im insuffizienten Herzen zu beeinflussen. Mäuse mit transgener Überexpression der CaMKII δ_c weisen nicht nur eine ausgeprägte Störung der Natrium-, sondern auch der Kalziumhomöostase und der elektromechanischen Kopplung auf (Maier et al. 2003). So führt eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR2 zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Ca²⁺-Kanals (Witcher et al. 1991, Maier et al. 2003). Die daraus resultierenden spontanen diastolischen Kalziumfreisetzungen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum („Ca²⁺-Sparks“) führen zu einem gesteigerten sarkoplasmatischen Ca²⁺-Leck und damit zu einer reduzierten Kalziumkonzentration im SR. Zusätzlich führt die transgene CaMKII δ_c -Überexpression zu einer reduzierten Expression der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase und einer erhöhten Aktivität des NCX, die beide um die Elimination des zytosolischen Kalziums konkurrieren (Maier et al. 2003). Dies hat eine Verschiebung der Kalziumelimination in Richtung Kalziumauswärtstransport aus der Zelle (via NCX) zur Folge. Da dadurch für die nachfolgenden Kontraktionen nicht mehr genügend Kalzium aus dem SR freigesetzt werden kann, kommt es zu einer Verminderung der Amplitude der Kalziumtransienten und damit zu einer reduzierten Kontraktionskraft des Herzens (Maier et al. 2003). Diese weitreichenden Veränderungen im Kalziumhaushalt in CaMKII δ_c -transgenen Mäusen gehen neben einer klinisch evidenten Herzinsuffizienz außerdem mit einer massiven kardialen dilatativen Hypertrophie einher (Zhang T et al. 2003, Maier et al. 2003). Interessanterweise konnten Zhang R et al. 2005 erstmals zeigen, dass eine Inhibition der CaMKII mittels transgener Überexpression inhibitorischer Peptide in Mäusen vor der Entwicklung einer strukturellen Herzerkrankung in Folge eines Herzinfarktes schützen kann. Da die CaMKII als Signalprotein in der β -adrenergen Signalkaskade fungiert, kann durch die Hemmung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II das myokardiale Remodeling durch exzessive β -adrenerge Stimulation verhindert werden (Zhang R et al. 2005). Die Generierung und Charakterisierung von CaMKII δ -knock-out-Mäusen erfolgte erstmals 2009 durch Backs et al. (siehe unten). Diese CaMKII δ -knock-out-Mäuse wiesen unter Ruhebedingungen keine offenkundigen Abnormitäten in ihrer kardialen Struktur oder Funktion auf (Backs et al. 2009). Dies ist vereinbar mit der generellen Hypothese, dass die CaMKII δ als Stresskinase, ähnlich der Proteinkinase A, erst nach Stimulation des β -adrenergen Pathways, des RAAS-Systems aber auch direkt

durch erhöhte intramurale Wandspannung bei Nachlasterhöhung (Toischer et al. 2010) aktiviert werden kann. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass die in Wildtyp-Kardiomyozyten nach Nachlasterhöhung mittels transversaler Aortenkonstriktion beobachtete kardiale Hypertrophie in CaMKII δ -knock-out-Mäusen signifikant vermindert ausgeprägt war (Backs et al. 2009).

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden in Mitochondrien als natürliche Nebenprodukte der Zellatmung im Rahmen der Atmungskette gebildet und spielen eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung in Zellen (Thannickal und Fanburg 2000). Durch ihre ungepaarten und damit freien Elektronen sind Radikale allerdings sehr instabile, kurzlebige und äußerst reaktionsfreudige Verbindungen, die fähig sind oxidative Schäden im Organismus hervorzurufen. Unter physiologischen Bedingungen wird die schädliche Wirkung der Reaktiven Sauerstoffspezies durch antioxidative Enzyme abgefangen (Thannickal und Fanburg 2000). Unter pathologischen Bedingungen wie beispielsweise bei der Herzinsuffizienz, bei der Reperfusion oder der Ischämie werden jedoch vermehrt Reaktive Sauerstoffspezies gebildet (Mallat et al. 1998). Durch das Ungleichgewicht zwischen der ROS-Generierung und der antioxidativen Kapazität sind die Myokardzellen einem sogenannten oxidativen Stress ausgesetzt, der zu myokardialen Schäden, linksventrikulärem Remodeling und letztendlich zu einer Progression der Herzinsuffizienz führt (Josephson et al. 1991). Die vorherrschenden Reaktiven Sauerstoffradikale, die den starken Schaden am Myokard anrichten, sind die Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) (Josephson et al. 1991). Diese entstehen durch eine Reaktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit Superoxid (O_2^-) ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$) oder über eine Reaktion mit Eisen ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}\cdot + \text{Fe}^{3+}$, Fenton-Reaktion siehe 2.4, S. 43). Sauerstoffradikale werden nicht nur im Rahmen des Elektronentransportes bei der Zellatmung gebildet. Auch bei der Biotransformation, bei der Abwehr von Krankheitserregern in Immunzellen und bei der Oxidation von Fettsäuren in Peroxisomen entstehen Reaktive Sauerstoffspezies (Thannickal und Fanburg 2000). Des Weiteren tragen Enzyme wie die NADPH-Oxidase und die Xanthinoxidase insbesondere unter ischämischen Bedingungen zur gesteigerten Generierung von freien Radikalen bei (McCord 1985, Thannickal und Fanburg 2000), die sehr schnell mit verschiedenen Molekülen reagieren können. Unter anderem

konnte vor kurzem eine ROS-abhängige Oxidation und damit Aktivierung der kardialen CaMKII nachgewiesen werden (siehe oben) (Erickson et al. 2008). Aber es werden auch Lipide oxidiert, was zur Zerstörung von Zellmembranen führt, DNA-Moleküle erleiden Strangbrüche und Proteine sowie Enzyme verlieren durch Denaturierung ihre Funktion (Zweier und Talukder 2006). Die Vielzahl an Schäden innerhalb der Zelle hat zur Folge, dass Mutationen auftreten oder die Zelle in den natürlichen Zelltod (Apoptose) geht. Letztendlich spielen Radikale bei der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle. Dazu zählen unter anderem ischämische Erkrankungen, Atherosklerose, neurodegenerative Erkrankungen, Tumoren, Altersschäden, Entzündungen und chronisch metabolische Erkrankungen.

1.4.1 Sauerstoffradikalvermittelte Toxizität in Herzmuskelzellen

Erhöhte Konzentrationen von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen zu myokardialen Schäden. Interessanterweise sind die ROS-Konzentrationen im insuffizienten Herzen jedoch nicht nur erhöht, die Myokardzellen sind zusätzlich auch empfindlicher gegenüber oxidativem Stress im Vergleich zu gesunden Myokardzellen und das trotz vergleichbaren antioxidativen Kapazitäten (Tsutsui et al. 2001). Den ROS-induzierten funktionellen Schäden liegt eine gestörte Natrium- und Kalziumhomöostase zugrunde (Wagner et al. 2003, Song et al. 2006), die mit kontraktile Dysfunktion und elektrischer Instabilität einhergeht und schlussendlich zum Zelltod (Apoptose) führen kann.

Die gestörte Ionenhomöostase beruht auf veränderten Ionentransportfunktionen (Kourie 1998). So verstärkt H_2O_2 den späten Natriumstrom in Herzmuskelzellen (siehe oben), was zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer und zu frühen Nachdepolarisationen führen und damit Arrhythmien hervorrufen kann (Song et al. 2006) (siehe auch 1.6, S. 20). Die nun erhöhte zytosolische Natriumkonzentration aktiviert den sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauscher im Umkehrmodus, so dass es, anders als unter physiologischen Bedingungen, unter denen der NCX Kalzium aus der Zelle befördert und im Gegenzug Natrium einwärts strömen lässt (Vorwärtsmodus, siehe 1.5), zu einem Natriumauswärtstransport und einem zusätzlichen Kalziumeinstrom (Umkehrmodus) kommt (Zeitze et al. 2002, Wagner et al. 2003). Die Folge sind mit Kalzium überladene Herzmuskelzellen. Das Kalzium wird zunächst kompensatorisch in das Sarkoplasmatische Retikulum gepumpt, welches daraufhin – auch in der Folge einer direkten ROS-abhängigen Modifikation

des RyR2 – das Kalzium nicht adäquat speichern kann. Ein gesteigertes diastolisches Kalziumleck mit vermehrten kurzdauernden dramatischen Erhöhungen der Kalziumkonzentration im diastolischen Spalt führt zur Aktivierung des NCX im Vorwärtsmodus. Der in der Folge entstehende einwärtsgerichtete Natriumstrom kann zur Depolarisation des Membranpotentials und damit zu späten Nachdepolarisationen führen. Diese können wiederum weitere Arrhythmien triggern. Darüber hinaus führt die diastolische Kalziumüberladung zu Kontraktions- und Relaxationsstörungen (Zeitlitz et al. 2002).

Letztendlich verkürzen sich die Zellen aufgrund der Kalziumüberladung sehr stark (Hyperkontraktur) und gehen in Apoptose (Ince et al. 2002). Durch die verkürzten abgestorbenen Zellen müssen die übrigen Kardiomyozyten erhöhte Spannungskräfte bei der Systole und Diastole aushalten. Dadurch gehen weitere Zellen in Apoptose (Cheng et al. 1995) und der oxidative Stress auf die Zellen verstärkt sich aufgrund der Mehrarbeit der übrigen Herzmuskelzellen. Dieser Circulus vitiosus führt zu einer Progression der Herzinsuffizienz.

1.5 Die zytosolische Kalziumüberladung vermittelt durch den Natrium-Kalzium-Austauscher

Der Natrium-Kalzium-Austauscher ist ein sekundär aktiver Transporter, das heißt er benötigt einen Natriumkonzentrationsgradienten über der Zellmembran, welcher über die primär aktive Natrium-Kalium-ATPase aufrecht erhalten wird und welcher es Natrium ermöglicht, in Richtung seines Konzentrationsgefälles in die Zelle zu strömen. Mit Hilfe dieses Natriumkonzentrationsgradienten können Kalziumionen nun gegen ihren Konzentrationsgradienten aus der Zelle transportiert werden, weshalb dieser Austauscher eine wichtige Rolle für die Kalziumhomöostase in der Zelle spielt (Bers 2008). So trägt er beispielsweise in der Relaxationsphase zur Eliminierung von Kalzium aus den Kardiomyozyten bei (Vorwärtsmodus) (Bers 2002). Der Natrium-Kalzium-Austauscher transportiert drei Natriumionen nach intrazellulär gegen ein Kalziumion nach extrazellulär und hat damit als elektrogener Transporter einen depolarisierenden Einfluss auf das Membranpotential. Abhängig von Natriumkonzentration, Kalziumkonzentration und Membranpotential kann er als reversibler Transporter allerdings die Ionen auch in entgegengesetzter Richtung transportieren („reverse-mode“, Umkehrmodus) (Mullins 1979). Die Transportrichtung wird dabei vom Umkehrpotential bestimmt, dem Potential, bei dem der Transporter

seine Transportrichtung für Natrium bzw. Kalzium umkehrt (Bers 2002). Unter normalen diastolischen Bedingungen liegt das etwa zwischen -30 und -40 mV (Bers 2001, Bers 2002). Dieser Umkehrmodus ist insbesondere bei Natriumüberladung von Bedeutung. Dabei führt die Natriumelimination zu einem Kalziumeinwärtstransport und damit zu einer Kalziumüberladung der Zelle, wie dies im Rahmen der Herzinsuffizienz im Endstadium zu beobachten ist (siehe 1.4.1).

Eine mögliche Ursache für die Veränderung des Umkehrpotentials könnte der veränderte transmembrane Natriumgradient sein (Wagner et al. 2003). So führt eine ROS-induzierte Steigerung des späten Natriumstroms und die daraus resultierende erhöhte Natriumkonzentration in der Zelle (siehe 1.4.1) zu einer Abschwächung dieses Gradienten. Dies kann wichtige therapeutische Konsequenzen haben, denn eine Hemmung des späten Natriumstroms beispielweise durch Ranolazin könnte damit möglicherweise nicht nur den Anstieg des zytosolischen Natriums, sondern konsekutiv durch fehlende Umkehr der NCX-Transportrichtung auch die Erhöhung der Kalziumkonzentration nach ROS-Exposition unterbinden (Song et al. 2006).

Interessanterweise sind in Myozyten insuffizienter Herzen erhöhte Expressionslevel des Natrium-Kalzium-Austauschers nachweisbar (Hasenfuss et al. 1999, Studer et al. 1994). NCX-überexprimierende ventrikuläre Kaninchenmyozyten entwickeln nach vorübergehender ROS-Exposition deutlich schneller als Wildtyp-Kardiomyozyten eine zelluläre Kalziumüberladung, die durch selektive Hemmung des NCX-Umkehrtransportmodus verhindert werden kann (Wagner et al. 2003). Auch Zeitz et al. konnten 2002 durch selektive Inhibition des NCX-Umkehrtransportmodus eine kalziumüberladungsbedingte diastolische Dysfunktion nach ROS-Exposition verhindern.

Die erhöhten Expressionslevel des NCX in Myokardzellen insuffizienter Herzen könnten somit eine mögliche Ursache für die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Reaktiven Sauerstoffspezies (Wagner et al. 2003), die ohnehin im insuffizienten Herzen vermehrt vorhanden sind (Mallat et al. 1998, siehe oben), darstellen und für die ROS-induzierten myokardialen Schäden verantwortlich sein.

1.6 Arrhythmien

Herzrhythmusstörungen stellen eine der führenden Todesursachen bei Patienten, die an Herzinsuffizienz leiden, dar. Pathophysiologisch unterscheidet man zwischen einer Störung der Erregungsbildung (gestörte Autonomie oder getriggerte Aktivität)

und einer Störung der Erregungsausbreitung oder einer Kombination von beidem (Hoffman 1999). Die Erregungsausbreitungsstörungen können weiter unterteilt werden in Kreiserregungen (Reentrymechanismen) oder Leitungsblockierungen (Hoffman 1999). Die genauen molekularen Signalwege, die letztendlich zur gestörten zellulären elektrischen Stabilität und damit zu schweren Arrhythmien führen, sind noch nicht komplett verstanden. Die Herzinsuffizienz stellt unter anderem aufgrund von morphologischen Veränderungen im Sinne eines kardialen strukturellen Remodelings und aufgrund von veränderter elektrischer Aktivität (elektrisches Remodeling) ein komplexes arrhythmogenes Substrat dar (Nattel et al. 2007). Myokardiale Narben stören die physiologische Erregungsausbreitung (Zipes 2003). Sie können zu einer verlangsamten Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit und zu einer veränderten Richtung der Erregungsausbreitung führen. Dadurch kann die Erregungswelle auf bereits erregtes refraktäres Myokard stoßen und ins Leere laufen oder aber an anderer Stelle auf ein bereits wieder erregbares Areal treffen (Zipes 2003). So können kreisende Erregungen (Reentry-Kreise) sich über das Myokard ausbilden, die je nach Größe und Lokalisation zu unterschiedlich schnellen ventrikulären oder supraventrikulären Tachykardien führen. Typischerweise besteht ein unidirektionaler Block aufgrund von zwei Bahnen mit jeweils unterschiedlichen Leitungsgeschwindigkeiten und Refraktärzeiten, die beispielsweise in unterschiedlichen Richtungen halbkreisförmig um ein anatomisches Hindernis führen. Dabei kann eine vorzeitig ankommende Erregungswelle beispielsweise antegrad über die Bahn mit kürzerer Refraktärzeit geleitet werden und dann retrograd über die Bahn mit längerer Refraktärzeit, die nun nach der zeitlichen Verzögerung erregbar ist, zurück zum Ursprungsort gelangen. Dort angekommen kann die Erregungswelle wieder antegrad über die Bahn mit kürzerer Refraktärzeit geleitet werden. Dieser Erregungskreis kann nun wiederholt durchlaufen werden (Zipes 2003). Von diesem sogenannten Makro-Reentry wird der funktionelle Reentry unterschieden. Hier kreist die Erregung um einen Bereich von refraktären Kardiomyozyten, wobei die Erregungsausbreitung ungeordnet über mehrere Erregungsfronten erfolgt, die regelmäßig auf nicht refraktäre Myozyten stoßen (Zipes 2003). Ursache dieses sogenannten Mikro-Reentrys sind Veränderungen der elektrischen Eigenschaften einzelner Kardiomyozyten. So läuft die Repolarisation in Myozyten insuffizienter Herzen verzögert bzw. uneinheitlich ab und die Aktionspotentialdauer ist insgesamt verlängert (Näbauer und Kääh 1997). Dies ist

bedingt durch vermehrte depolarisierende und verminderte repolarisierende Ströme. Im Einzelnen konnte ein vermehrter später Natriumstrom (Valdivia et al. 2005, Wagner et al. 2006) und eine verminderte Aktivität von Kaliumkanälen in insuffizienten Herzmuskelzellen beobachtet werden (Näbauer und Käab 1997). Insgesamt führt die Verlängerung der Aktionspotentialdauer durch die Ausbildung von frühen und späten Nachdepolarisationen (EADs, engl.: „early afterdepolarizations“ bzw. ENSEs, engl.: „early non-stimulated events“ und DADs, engl.: „delayed afterdepolarizations“ bzw. DNSEs, engl.: „delayed not-stimulated events“) zu einem gehäuften Auftreten von arrhythmogenen Potentialen. Song et al. konnten 2006 zeigen, dass H_2O_2 in gesunden Kardiomyozyten zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer und zu einer vermehrten Ausbildung früher Nachdepolarisationen führt. Dagegen konnten sie durch gezielte Hemmung des ROS-induzierten späten Natriumeinwärtsstroms durch das sehr selektive Tetrodotoxin oder den klinisch einsetzbaren Inhibitor des späten Natriumstroms Ranolazin die Verlängerung der Aktionspotentialdauer verringern und das Auftreten früher Nachdepolarisationen verhindern. Damit ist vermutlich der ROS-induzierte verstärkte späte Natriumeinwärtsstrom für die Verlängerung der Aktionspotentialdauer und für die vermehrte Entstehung von frühen Nachdepolarisationen verantwortlich. Diese treten insbesondere im Rahmen von bradykarden Phasen während der Repolarisationsphase durch Reaktivierung von L-Typ-Kalziumkanälen auf (Anderson et al. 1998). Im Gegensatz dazu werden die späten Nachdepolarisationen nach vollständiger Repolarisation des vorangegangenen Aktionspotentials vor allem während schneller Herzfrequenzen beobachtet. Sie werden vermutlich durch einen transienten Natriumeinwärtsstrom über den NCX, der auf eine ROS-induzierte Kalziumüberladung und eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodin-Rezeptors zurückzuführen ist, ausgelöst (Wagner et al. 2011). Dabei sind insbesondere insuffiziente Herzmuskelzellen mit gesteigerter CaMKII δ -Expression und -Aktivität anfällig für späte Nachdepolarisationen, da sie durch eine CaMKII δ -abhängige Phosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors eine erhöhte Aktivität des RyR2 aufweisen (Maier et al. 2003). Aber auch H_2O_2 kann durch direkte Oxidation des RyR2 die Frequenz spontaner diastolischer Kalziumfreisetzungen erhöhen (Anzai et al. 1998). Erreichen die frühen und späten Nachdepolarisationen jeweils das Schwellenpotential, induzieren sie ein neues Aktionspotential. Dies kann zu einer

Erregung führen, die auf wieder erregbares benachbartes Myokard trifft, was schließlich zu Mikro- bzw. Makro-Reentry führen kann. Manifestationsformen der Extrasystolie können von der einfachen Extrasystole über Couplets und Triplets, die sich dadurch auszeichnen, dass jeweils zwei bzw. drei ventrikuläre Extrasystolen nacheinander auftreten, bis zum Bigeminus bzw. Trigemini, der durch den anhaltenden Wechsel von Normalschlag und Extraschlag bzw. Normalschlag und zwei Extraschlägen auffällt, reichen. Eine Salve besteht aus mehr als drei aufeinanderfolgenden ventrikulären Extrasystolen, während man bei mehr als zehn Extraschlägen von einer nicht-anhaltenden ventrikulären Tachykardie spricht. Hält diese länger als 30 Sekunden an, liegt eine anhaltende ventrikuläre Tachykardie vor. Da die Definitionen der verschiedenen ventrikulären Rhythmusstörungen in der Literatur nicht einheitlich sind und sich die Definitionen im deutschsprachigen Raum zum Teil von denen im englischsprachigen Raum unterscheiden, verwende ich diese nun in Orientierung an die in Deutschland am häufigsten gebrauchten Definitionen. Die anhaltenden ventrikulären Tachykardien resultieren häufig aus kreisenden Erregungen (Zipes 2003) und sind prinzipiell lebensbedrohlich. Sie treten nicht selten unter ischämischen Bedingungen z.B. im Rahmen eines Myokardinfarktes auf. Auch hier begünstigen die vermehrt gebildeten ROS (Mallat et al. 1998) die Entstehung von Arrhythmien. Wu et al. konnten 2002 zeigen, dass auch die CaMKII an der Entstehung von frühen Nachdepolarisationen beteiligt zu sein scheint. So konnten sie eine erhöhte L-Typ-Kalziumkanalöffnungswahrscheinlichkeit in CaMKIV-transgenen Mäusen nachweisen, die nach spezifischer Hemmung der CaMKII, die in diesen Mäusen vermehrt exprimiert wurde, reversibel war. Ebenso stellten sie ein gehäuftes Auftreten von frühen Nachdepolarisationen und Arrhythmien in diesen Mäusekardiomyozyten fest, die ebenfalls durch Hemmung der CaMKII verhindert werden konnten (Wu et al. 2002). Damit könnte auch die CaMKII neben den Reaktiven Sauerstoffspezies als proarrhythmogenes Signalmolekül fungieren. In dieser Arbeit soll nun geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den ROS-induzierten Arrhythmien und der CaMKII besteht.

1.7 Zusammenfassung und Hypothese

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die kardiale Insuffizienz mit erhöhten Konzentrationen von Reaktiven Sauerstoffspezies (Mallat et al. 1998) und mit einer

gesteigerten Expression und Aktivität der CaMKII δ (Hoch et al. 1999, Kirchhefer et al. 1999) einhergeht. Sowohl die experimentelle H₂O₂-Exposition (Wagner et al. 2003, Zeitz et al. 2002, Song et al. 2006) als auch die transgene CaMKII δ -Überexpression (Wagner et al. 2006) führen zu einer Erhöhung des späten Natriumstroms und zu einer zytosolischen Kalziumüberladung. In der Folge kommt es über eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer (Song et al. 2006) und auch aufgrund der intrazellulären Kalziumakkumulation zu Arrhythmien; die Kalziumüberladung führt schließlich zu einer Hyperkontraktur und zum Zelltod (Inserte et al. 2002, Wagner et al. 2003). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der CaMKII δ durch Peptide vor Herzerkrankungen schützt (Zhang R et al. 2005) und die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie infolge Nachlasterhöhung nach Ausschaltung der CaMKII δ geringer ausgeprägt ist (Backs et al. 2009). Grundlegende Arbeiten zum Mechanismus der ROS-abhängigen CaMKII-Aktivierung zeigten, dass die Oxidation an Methionin 281/282 zu autonomer Aktivität der CaMKII δ führt (Erickson et al. 2008).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb zu klären, ob die ROS-induzierten kardialen Schäden hauptsächlich über die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ vermittelt werden.

Dabei werden folgende Fragestellungen untersucht:

- Welchen Einfluss hat die CaMKII δ auf die Natrium- und Kalziumkonzentration in Kardiomyozyten nach Radikalexposition? Kommt es unter Radikaleinwirkung zu einem reduzierten Anstieg der Natrium- und Kalziumkonzentration in Mäusekardiomyozyten, die keine CaMKII δ exprimieren (CaMKII δ -knock-out-Mäuse)?
- Ist der Natrium-Kalzium-Austauscher tatsächlich für die radikalvermittelte zytosolische Kalziumüberladung mitverantwortlich? Kann die Kalziumüberladung durch spezifische Inhibition des „reverse-mode“-NCX verhindert werden?
- Welche Rolle spielt die CaMKII δ bei der Entstehung von durch ROS-induzierten Arrhythmien?

- Hat die CaMKII eine Bedeutung für die Ausbildung einer Hyperkontraktur und für die Induktion des Zelltods unter erhöhtem oxidativen Stress?

2 Material und Methoden

2.1 Generierung von CaMKII δ -Knock-out-Mäusen

Die Generierung von Knock-out-Mäusen ist noch nicht lange etabliert. Erstmals gelang dies den drei Forschern Drs. Mario R. Capecchi, Martin J. Evans und Oliver Smithies. Für die Erfindung des sogenannten „Gene Targeting“, mit dem spezifische Gene im Genom gezielt modifiziert werden können, wurde ihnen im Jahr 2007 der Nobelpreis für Medizin verliehen (Graw 2007). Dabei konnten Smithies und Capecchi unabhängig voneinander nachweisen, dass sie das Erbgut von Säugetieren verändern können, indem sie ein verändertes DNA-Stück in eine Zelle einschleusten, welches dann mittels homologer Rekombination das ursprüngliche DNA-Stück auf einem Chromosom im Zellkern ersetzt (Smithies et al. 1985, Thomas et al. 1986). Mit dieser Methode konnten sie allerdings nur einzelne Zellen verändern und keine genmodifizierten Tiere generieren. Dazu war es nötig, die veränderten Gene in die Keimbahn der Tiere zu bringen (Graw 2007) und Nachkommen zu züchten, die diese veränderten Gene ebenfalls trugen und exprimierten. Die passende Idee hierfür hatte Evans, der an der Isolierung von embryonalen Stammzellen forschte (Evans und Kaufman 1981). Durch Kombination dieser beiden Ideen gelang es Capecchi (Thomas und Capecchi 1987) und Smithies (Doetschman et al. 1987), die erste Knock-out-Maus zu generieren. Damit ist es nun erstmals möglich, die Funktion und Bedeutung einzelner Gene genau zu untersuchen bzw. darauf aufbauend zukünftige Therapieansätze durch Korrektur von genetischen Defekten (sogenannter „Knock-in“) zu entwickeln. Zwischenzeitlich existieren mehr als tausend von Knock-out-Mäusestämmen.

Um eine homozygote Ausschaltung eines spezifischen Gens (homozygoter Knock-out) beispielsweise in Mäusen zu erzielen, geht man im Einzelnen folgendermaßen vor. Zunächst injiziert man DNA-Stücke mit dem mutierten bzw. defekten Zielgen in aus Mäuseblastozysten isolierte embryonale Stammzellen. Die Zellen mit jeweils einem durch homologe Rekombination veränderten Gen werden in Blastozysten eingesetzt und in die Gebärmutter von Leihmüttern implantiert. Daraus entwickeln sich chimäre Nachkommen (Graw 2007). Durch Kreuzung chimärer Mäuse, welche die Genveränderung in ihren Keimzellen tragen, mit Wildtyp-Mäusen können erstmals heterozygote Knock-out-Mäuse entstehen, deren Paarung dann wiederum zu heterozygoten, sowie homozygoten Knock-out-Mäusen, die das Zielgen nicht

mehr exprimieren, als auch zu unveränderten Mäusen (Wildtyp-Mäusen) führt (Graw 2007).

Die in dieser Arbeit verwendete homozygote CaMKII δ -Knock-out-Maus (CaMKII $\delta^{-/-}$) wurde von Backs et al. 2009 erstmals beschrieben. Dazu wurde ein CaMKII δ -null-Allel generiert, das sich vom CaMKII δ -Allel dadurch unterscheidet, dass Exon 1 und Exon 2 einschließlich der für die Kinasefunktion wichtigen ATP-Bindungsstelle entfernt wurde. Durch diese Deletion konnten weder eine als Kinase funktionsfähige CaMKII δ noch alternative Genprodukte in den Herzmuskelzellen nachgewiesen werden (Backs et al. 2009). Das für die Generierung des Null-Allels verwendete Cre-LoxP-Rekombinations-System zeichnet sich durch spezifische Erkennungssequenzen (LoxP) aus, die gezielt vor und hinter dem DNA-Abschnitt des zu entfernenden Gens bzw. Exons eingefügt werden und dem sogenannten Cre-Rekombinase-Enzym anzeigen, dass es hier spalten, das dazwischenliegende Segment gegebenenfalls entfernen und die DNA neu verknüpfen soll (Gu et al. 1993, Lakso et al. 1992, Orban et al. 1992). Um diese Erkennungssequenzen ins Genom zu integrieren, wurde von Backs et al. ein Vektor generiert, der die mit LoxP flankierten Exone 1 und 2 sowie eine mit frt-Erkennungssequenzen flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette und ein Diphtherietoxin A-Gen enthielt (siehe Abb. 2.1). Dieser Vektor wurde in den Zellkern geschleust und mittels homologer Rekombination ins Genom embryonaler Stammzellen integriert (siehe oben).

Um Zellen mit erfolgreicher homologer Rekombination identifizieren zu können, verwendet man generell sogenannte Selektionsmarker. Die Resistenz gegenüber einem bestimmten Antibiotikum lässt Zellen, die die Neomycin-Resistenz-Kassette (neo, siehe Abb. 2.1) in das Genom integriert haben, überleben (positive Selektion), während die Integration von Diphtherietoxin A (DTA, siehe Abb. 2.1) ins Genom zum Absterben der Zelle führt, wobei DTA bei homologer Rekombination verloren geht und nur bei zufälliger Integration ins Genom erhalten bleibt (negative Selektion) (Mansour et al. 1988). Die Neomycin-Resistenz-Kassette kann im Anschluss durch Kreuzung mit Flp-Rekombinase exprimierenden Mäusen über die frt-Erkennungssequenzen wieder entfernt werden.

Nach Kreuzung dieser flp-modifizierten Mäuse mit transgenen Mäusen, die das Cre-Rekombinase-Enzym in den Keimzellen exprimierten, erzeugten Backs et al. Nachkommen mit dem sogenannten CaMKII δ -Null-Allel mit deletiertem Exon 1 und Exon 2 (siehe 2.1). Es konnte im Nachhinein ausgeschlossen werden, dass durch

das Ausschalten der CaMKII δ in den Kardiomyozyten eine der anderen drei Isoformen wie die CaMKII α , die CaMKII β oder die CaMKII γ kompensatorisch vermehrt exprimiert wurden (Bucks et al. 2009).

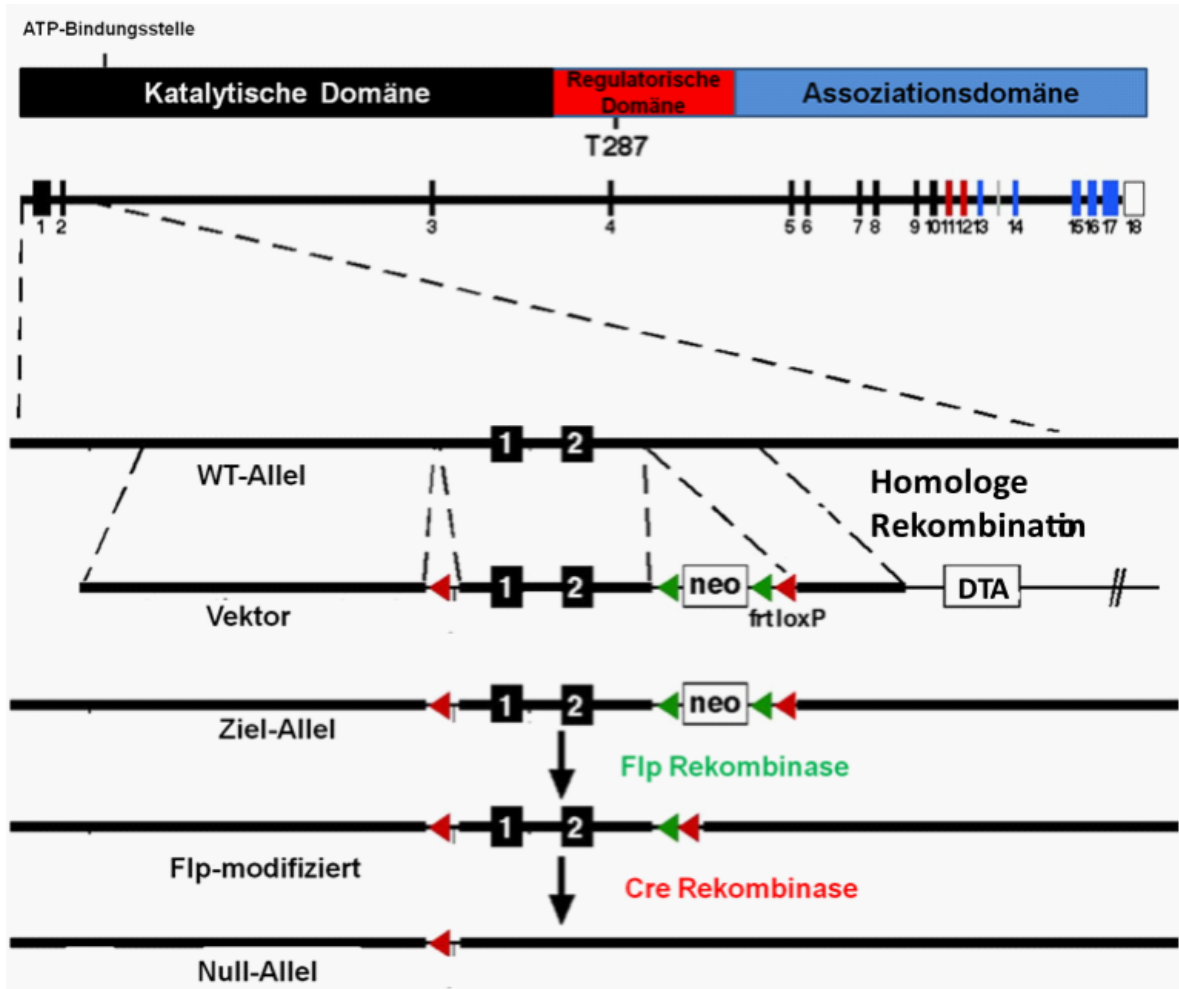


Abb.2.1 Generierung von CaMKII δ -knock-out-Mäusen

Aufbau der CaMKII δ nach Funktion und Intron-Exon-Struktur. Für die Generierung von CaMKII δ -knock-out-Mäusen reicht es aus, lediglich Exon 1 und 2 der katalytischen Domäne zu entfernen, da die für die Kinasefunktion wichtige ATP-Bindungsstelle in Exon 2 liegt. Mit Hilfe eines Vektors werden die mit LoxP-Sequenzen flankierten Exone 1 und 2 (\blacktriangleleft) und die mit frt-Sequenzen flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette (\blacktriangleleft neo \blacktriangleleft) durch homologe Rekombination in das Genom eingebracht. Die Neomycin-Resistenz-Kassette dient als positiver, Diphtherietoxin A (DTA) als negativer Selektionsmarker für eine erfolgreiche nicht-zufällige Integration ins Genom. Die Neomycin-Resistenz-Kassette kann im Anschluss durch Kreuzung mit Mäusen, die eine Flp-Rekombinase exprimieren, wieder entfernt werden. Kreuzt man nun mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen, führt dies zu einem Herausschneiden der innerhalb der beiden LoxP-Sequenzen liegenden Exone 1 und 2. Modifiziert nach Bucks et al. 2009, S. 2344

2.2 Primärkultur adulter ventrikulärer Mäusemyozyten

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten wie oben beschrieben Mäuse, bei denen das Gen der CaMKII™ ausgeschaltet ist, sowie ihre Wildtyp-Geschwister (Backs et al. 2009). Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Mäuse im Mittel $14,1 \pm 0,89$ Wochen alt. Alle Tierexperimente wurden der örtlichen Tierschutzbehörde angezeigt (Tierversuchsanzeige für die „Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß § 4 TierSchG, Aktenzeichen T2.08, Bezirksregierung Braunschweig) und sind in Übereinstimmung mit dem „Guide of the Care and Use of Laboratory Animals“ (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council, 1996) durchgeführt worden.

2.2.2 Isolation ventrikulärer Mäusemyozyten

Die Isolation ventrikulärer Mäusemyozyten erfolgte mit Hilfe einer Langendorff-Perfusionsanlage (Langendorff 1895). Sie gewährleistete eine in etwa konstante Temperatur von $36,5^{\circ}\text{C}$ und einen konstanten Perfusionsdruck mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit der Perfusionslösung von 3ml/min von der Isolationsanlage über die Aorta in die Koronargefäße.

Zunächst wurden die Mäuse in einem Inkubator mit einem Narkosegas-Aerosol (800 µl Isofluran) bis zur Schnappatmung betäubt. Nach Genickbruch wurde der Thorax geöffnet und das Herz an den Gefäßstielen abgetrennt. Das explantierte Herz wurde sofort in gekühlte Perfusionslösung (Isolationstyrode, siehe Tabelle 2-1) überführt. Durch vorsichtige Kompression des Herzens mit dem Finger wurde das verbliebene Blut ausgedrückt und anschließend das Herz- und Körpergewicht der Maus bestimmt und notiert.

Unter Zuhilfenahme eines Binokulars wurde das Herz durch Pinzetten fixiert und der Aortenstumpf vorsichtig über eine Kanüle gezogen. Die Kanülenspitze sollte sich dabei oberhalb der Aortenklappe befinden, damit - nach Anschluss der Kanüle an die Perfusionsanlage - die Perfusionslösung retrograd über den Aortenstumpf in die Koronargefäße, die oberhalb der Aortenklappe abgehen, gelangen konnte. Im Anschluss erfolgte die Befestigung des Aortenstumpfes an der Kanüle durch einen Bindfaden sowie eine Bulldog-Klemme. Um die korrekte Lage der Kanülenspitze zu überprüfen, wurde eine mit gekühlter Isolationstyrode gefüllte Spritze auf das Kanülenende gesetzt und die Flüssigkeit luftblasenfrei infundiert, bis die Koronarien

sichtbar perfundiert waren. Damit konnten außerdem die restlichen Blutreste in den Koronargefäßen ausgespült und thrombotische Verschlüsse derselben verhindert werden. Anschließend wurde die Kanüle mit dem daran fixierten Herzen in die zuvor mit Perfusionslösung gespülte Perfusionsanlage eingesetzt.

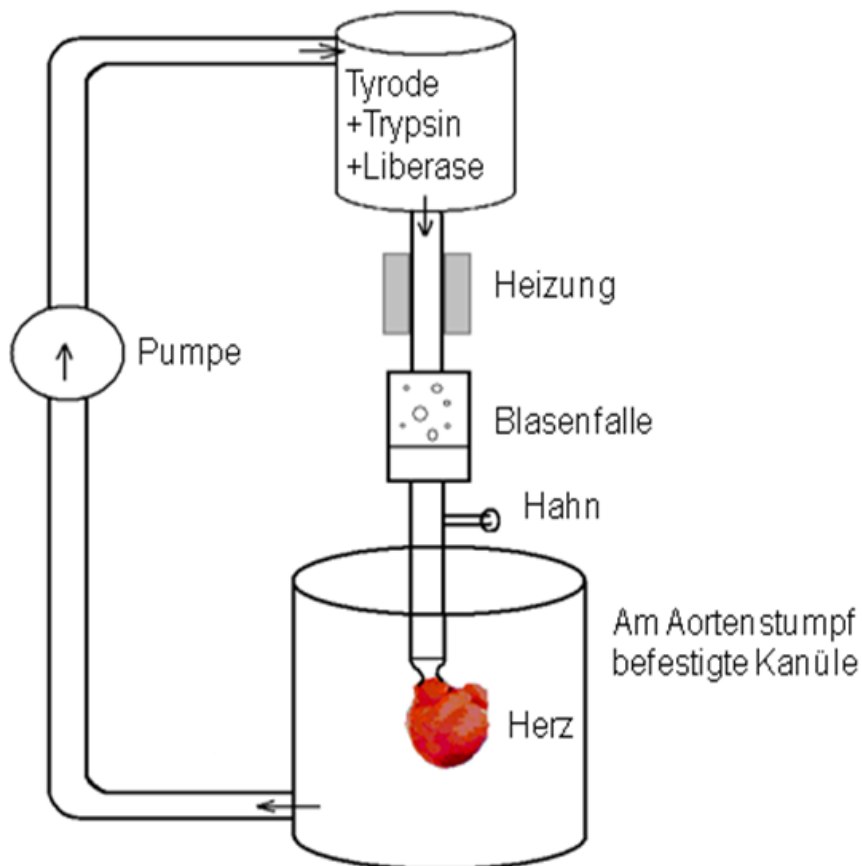


Abb.2.2 Vereinfachte schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage

Die Langendorff-Perfusionsanlage dient der Isolation ventrikulärer Mäusemyozyten. Wichtig für den Verdau des Herzens ist die korrekte Lage der Kanüle oberhalb der Aortenklappe um eine retrograde Perfusion der Koronararterien mit Enzymlösung zu gewährleisten. Modifiziert nach Rasenack 2006, S. 35.

Nun erfolgte der Verdau des Herzens durch Perfusion der Koronargefäße mit Trypsin und Liberase (Enzymlösung, siehe Tabelle 2-2). Nach 8 1/2 Minuten wurde das Herz von der Kanüle abgeschnitten. Dabei wurden nur die Ventrikel mit einer Schere abgetrennt und die Vorhöfe zunächst an der Kanüle belassen. Die abgeschnittenen Ventrikel wurden in eine mit 2,5 ml Enzymlösung (Trypsin und Liberase, siehe Tabelle 2-2) gefüllte Petrischale überführt. Die noch aktiven Enzyme wurden durch Zugabe einer Rinderkälberserum-Lösung (2,5 ml, 10%, siehe Tabelle 2-3) gestoppt. In der Petrischale wurden die Ventrikel vorsichtig zerschnitten und mit einer Pipette

durch auf- und abpipettieren (tritrieren) mechanisch zerkleinert. Um größere, unverdaute Gewebestücke und Herzmuskelzellen zu trennen, wurde die Lösung durch Nylongaze gefiltert. (Filtergröße 200 μm).

Die gefilterte Myozytenlösung wurde in ein 15-ml-Falconröhrchen überführt. Nach siebenminütiger Sedimentation konnte der Überstand, bestehend aus Kalziumlösung (mit 10% Rinderkälberserum, siehe Tabelle 2-3) und toten Zellen, behutsam entfernt werden.

In mehreren Schritten wurde nun die Kalziumkonzentration der Lösung bis zu der für die Mäusemyozyten physiologischen extrazellulären Kalziumkonzentration erhöht („Kalziumaufbau“, siehe Tabelle 2-4). Dazu wurde zunächst sehr vorsichtig 5 ml der Myozytenstopplösung 2 (5% Rinderkälberserum, siehe Tabelle 2-4) mit einer Kalziumkonzentration von 0,1 mmol/l auf die sedimentierten Myozyten gegeben und behutsam dissoziiert. Nach siebenminütiger Sedimentation wurde der Überstand entfernt. Dies wurde mit Myozytenstopplösungen aufsteigender Kalziumkonzentrationen (0,2 mmol/l, 0,4 mmol/l und 0,8 mmol/l) wiederholt. Die Myozyten in 0,8 mmol/l Kalziumlösung konnten für die Messungen verwendet werden. Die Anzahl an vitalen Herzmuskelzellen betrug pro Mäuseherz etwa 200.000. Jeweils 300 bis 500 μl der Zellsuspension (abhängig von der Zellzahl/Isolierung) wurden vorsichtig in eine Zellkammer pipettiert, auf deren Glasboden zuvor 1 bis 2 μl Laminin für die Haftung der lebenden Zellen ausgestrichen wurde.

Tabelle 2-1 Isolationstyrode*pH 7,42 bei 36,5 °C*

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,4	113
KCl	74,6	4,7
KH ₂ PO ₄	136,1	0,6
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	178,0	0,6
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	246,5	1,2
Phenol-red	376,4	0,032
NaHCO ₃	84	12
KHCO ₃	101	10
HEPES	238,3	10
Taurin	125,1	30
2,3 -Butanedion-Monoxim, SIGMA	101	10
Glucose	180,2	5,5

Tabelle 2-2 Enzymlösung*Isolationstyrode plus folgende Zusätze bei 36,5°C*

Substanz	Konzentration
Liberase TM (ROCHE)	75 mg/l
Trypsin (GIBCO/INVITROGEN)	5,84 µmol/l
CaCl ₂	0,0125 mmol/l

Tabelle 2-3 Myozytenstopplösung 1 (10% Rinderkälberserum)*Isolationstyrode plus folgende Zusätze*

Substanz	Konzentration
Rinderkälberserum (HYCLONE)	10 % (Vol.)
CaCl ₂	0,0125 mmol/l

Tabelle 2-4 Kalziumaufbau

Vier Kalziumlösungen mit jeweils verschiedenen Kalziumkonzentrationen zum Kalziumaufbau aus jeweils Myozytenstopplösung 2 (5% Rinderkälberserum) plus 0,1 mmol/l, 0,2 mmol/l, 0,4 mmol/l oder 0,8 mmol/l CaCl₂

Substanz	Konzentration
Rinderkälberserum (HYCLONE)	5 % (Vol.)
	0,1 mmol/l
	0,2 mmol/l
CaCl ₂	0,4 mmol/l
	0,8 mmol/l

2.3 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf einer Beobachtung August Köhlers im Jahr 1904. Bestimmte Strukturen unter seinem Mikroskop führten nach Bestrahlung mit kurzwelligem Licht zu einer Leuchterscheinung (Köhler und von Rohr 1904). Kurz darauf entwickelte er und Henry Siedentopf bei der Firma Carl Zeiss das erste Mikroskop zur Anregung von fluoreszierenden Stoffen.

Die Leuchterscheinung von bestimmten Stoffen beruht auf dem Phänomen der Fluoreszenz und lässt sich folgendermaßen erklären. Durch Anregung von Photonen mit Licht einer bestimmten Wellenlänge werden diese in einen Zustand höherer Energie überführt. Diese Energie wird nach kurzer Zeit in Form von Fluoreszenz wieder frei. Da ein Teil der Energie über die Schwingungsrelaxation verloren geht, ist nach dem Prinzip der Energieerhaltung die Wellenlänge des emittierten Photons länger und damit energieärmer als die des absorbierten Photons. Die Verschiebung der Wellenlänge des emittierten Lichts gegenüber der des absorbierten Lichts wird auch als Stokesverschiebung bezeichnet und geht auf den Mathematiker und Physiker Sir George Gabriel Stokes zurück (Stokes 1852).

Um die Leuchtkraft der Fluorochrome optimal auszunutzen, bestimmt man die Wellenlänge des Lichts, bei der die Absorptionsrate maximal ist (Spitzenanregungswellenlänge), und die Wellenlänge, bei der die meisten Photonen emittiert werden (Spitzenemissionswellenlänge).

In der vorliegenden Arbeit wird die Fluoreszenz als Hilfsmittel verwendet, um die Veränderung der Konzentration primär nicht fluoreszierender intrazellulärer Ionen

unter Radikalexposition mit den synthetisch hergestellten Fluoreszenzfarbstoffen Indo-1 und SBFI quantitativ zu messen. Für alle Epifluoreszenzexperimente wurde das Setup der Firma IonOptix (IonOptix Corporation, Boston, MA) verwendet.

2.3.1 Die Fluoreszenzfarbstoffe SBFI und Indo-1

Die Fluoreszenzfarbstoffe SBFI und Indo-1 sind jeweils ionenspezifisch. SBFI bindet selektiv an Natriumionen, Indo-1 selektiv an Kalziumionen. Sowohl SBFI als auch Indo-1 sind naturgemäß sehr lichtempfindlich, so dass sowohl das Ansetzen der Farbstoffe als auch die Beladung der frisch isolierten Myozyten mit Farbstoff in einer Dunkelkammer erfolgen musste.

Um Aussagen über die intrazelluläre Ionenkonzentration zu erhalten, ist es essentiell, dass die Farbstoffmoleküle während der Inkubationszeit über die Zellmembran in die Zelle diffundieren. Beide Farbstoffe sind jedoch aufgrund ihrer Affinität zu geladenen Ionen und ihrer Polarität (Carboxylgruppen) nur schwer membrangängig. Daher wurden sowohl die Indo-1- als auch die SBFI-Moleküle an den Carboxylgruppen mit Acetoxymethanol (SBFI-AM bzw. Indo-1-AM) verestert. Sie liegen so als ungeladene, lipophile und damit membranpermeable Verbindungen vor. In der Zelle sorgen intrazelluläre Esterasen für eine Hydrolyse des veresterten Farbstoffs. Dies führt zur Bildung von Acetoxymethanol; die freien Carboxylgruppen des Farbstoffs sind im intrazellulären pH-Milieu von 7,2 geladen (das Proton wird von Wassermolekülen unter Bildung von Oxoniumionen aufgenommen). Die Polarität führt zur Unfähigkeit des Farbstoffs, über die Membran zu diffundieren (siehe Abb. 2.3).

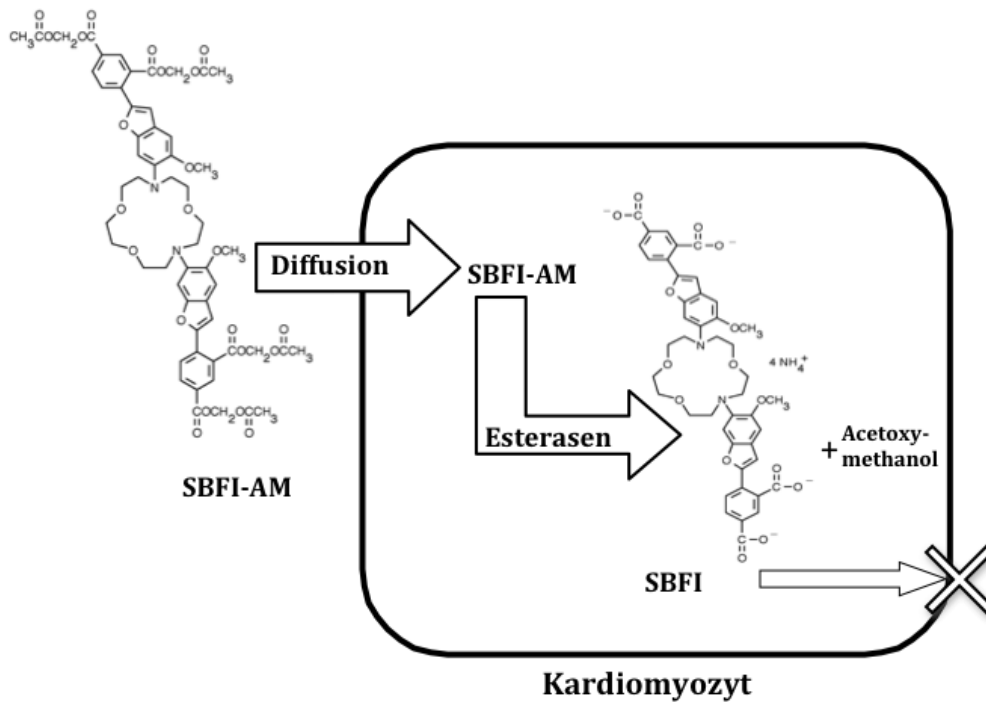


Abb.2.3 Beladung eines Kardiomyozyten mit SBFi-AM

Um die Diffusion des Farbstoffes über die Kardiomyozytenmembran zu gewährleisten, wird für die Beladung der Zellen mit Alkohol verestertes SBFi (SBFi-AM) verwendet. Durch intrazelluläre Esterasen wird die Bindung gespalten, so dass in dem Kardiomyozyten bei einem pH von 7,2 negativ geladenes, polares SBFi vorliegt, das die Zelle nicht mehr verlassen kann und sich dadurch in der Zelle anreichert. Modifiziert nach Rasenack 2006, S.51.

Man nimmt an, dass sich der Farbstoff gleichmäßig in der Zelle verteilt. Die Akkumulation von Farbstoffmolekülen in membranumgrenzten Kompartimenten innerhalb der Zelle wird als Kompartimentalisierung bezeichnet (Wahl et al. 1990). Die Kompartimentalisierung des Farbstoffes wurde in meinen Versuchen durch Minimierung von Beladungszeit und Temperatur weitgehend verhindert.

Die sich nun in der Zelle befindenden negativ geladenen Farbstoffmoleküle binden an die positiv geladenen freien Ionen im Zytosol und bilden Chelatkomplexe aus. Das hat zur Folge, dass sich die Spitzenanregungs- oder Spitzenemissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe verschieben und sich die über das Epifluoreszenzmikroskop gemessenen Emissionsintensitäten verändern. Da die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten auch stark von der Farbstoffkonzentration abhängen und damit das Ergebnis verfälschen können, werden nicht absolute Fluoreszenzintensitätswerte, sondern Verhältnisse (Ratio) von mehreren Fluoreszenzintensitäten (bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen bzw. unterschiedlichen Emissionswellenlängen) gemessen. Dabei wird für SBFi eine Ratio

der Emissionsintensität bei zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen gebildet, für Indo-1 eine Ratio der Emissionsintensität bei zwei unterschiedlichen Emissionswellenlängen unter einer einzigen Anregungswellenlänge.

Diese Ratios sind unabhängig von Farbstoffkonzentrationen, Ionenstärke und pH-Wert der Lösungen und erlauben es Aussagen über die Konzentration des untersuchten Ions zu machen. Indo-1 und SBFI werden deshalb auch als ratiometrische Farbstoffe bezeichnet. Beide Farbstoffe bieten die Möglichkeit einer Umrechnung der gemessenen Emissionsintensitäten in eine exakte Ionenkonzentration. Dies setzt jedoch eine zuvor erfolgte Kalibrierung voraus.

2.3.2 Messung der intrazellulären Natriumkonzentration mit SBFI

SBFI bindet selektiv an Natriumionen. Die in einer Zellkammer befindlichen Myozyten wurden mit dem Farbstoff SBFI-AM (Molecular Probes, S-1264) für maximal 90 Minuten bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ (in Tyrode, 0,0045% Pluronic, Molecular Probes, P-3000, F-127, 1 mmol/l CaCl_2) bei Raumtemperatur und in Dunkelheit beladen.

Nach Einspannen der Zellkammer in die Halterung des Epifluoreszenzmikroskops wurde vor Beginn der Messungen der überschüssige Farbstoff, der nicht von den Zellen aufgenommen bzw. noch nicht von diesen hydrolysiert wurde, für zehn Minuten mit Messtyrode ausgewaschen.

Dann wurden die Zellen mittels bipolarer elektrischer Feldstimulation (ca. 10-20 V) mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Nach Beurteilung der Myozyten durch das Mikroskop bezüglich Anzahl und Qualität wurde eine Myozyte ausgewählt, die sich regelmäßig synchron mit der Stimulationsfrequenz verkürzte. Diese wurde dann unter Verwendung eines 40-fachen Objektivs (Immersionöl) vergrößert. Mit einer Kamera (IonOptix MyoCamTM) wurde das lichtmikroskopische Bild der ausgewählten Zelle aufgenommen und in ein Computerprogramm (IonWizard Acquire Version 4.4) übermittelt. Hier konnte durch Kontrasterkennungsverfahren die Sarkomerlänge ermittelt und als Funktion der Zeit gespeichert werden.

Die Anregung der mit SBFI-beladenen Einzelzellen erfolgte mit zwei verschiedenen Wellenlängen (340 und 380 nm). Die Fluoreszenzemissionsintensität wurde bei 505 nm gemessen.

Nach Bindung von Natriumionen verändert SBFI seine Fluoreszenzeigenschaften. Bei der Anregungswellenlänge von 340 nm kommt es nach Natriumionenbindung zu

einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzemission (gemessen bei 505 nm). Bei der Anregungswellenlänge 380 nm ändert sich demgegenüber nur sehr wenig an der Emissionsintensität (bei 505 nm) (siehe Abb.2.4).

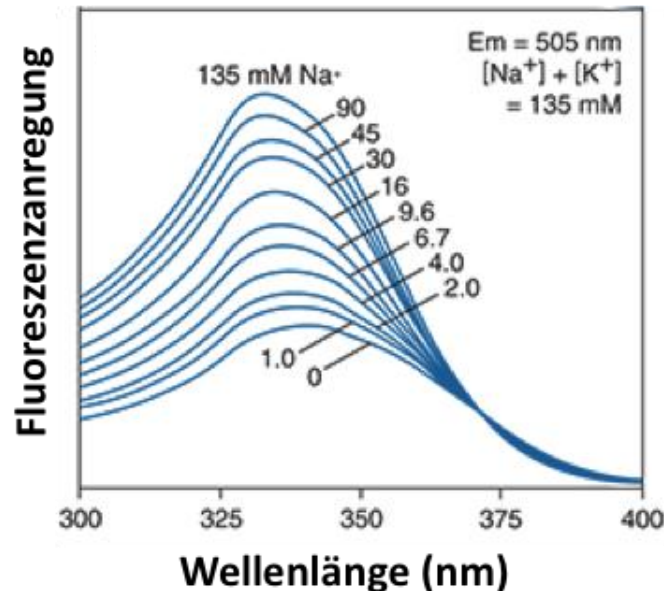


Abb.2.4 Abhängigkeit der SBFI-Fluoreszenz von der Natriumkonzentration und von der Wellenlänge

Die Emission wird bei 505 nm gemessen. Dabei führt eine Änderung der Natriumkonzentration bei der Anregungswellenlänge von 340 nm zu einer erheblichen Änderung der Fluoreszenzemissionsintensität, während eine Erhöhung der Natriumkonzentration bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm keinen Einfluss auf die Fluoreszenzemissionsintensität hat. (Gesamtionenstärke zusammengesetzt aus Kalium- und Natriumionen jeweils 135 mM)

Modifiziert nach der Online-Version des Handbuchs „The Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies“, 11. Auflage von Molecular Probes

(<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Na-K-Cl-and-Miscellaneous-Ions/Fluorescent-Na-and-K-Indicators.html>, Abb. 21.4, Stand 01.07.2012)

Setzt man die unter Anregung mit 340 nm und 380 nm gemessenen Emissionsintensitäten (bei 505 nm) ins Verhältnis, so vergrößert sich die Ratio (F_{340}/F_{380}) nach Bindung von Natriumionen. Vor Berechnung der Ratio erfolgte eine Korrektur der individuellen Fluoreszenzemissionswerte durch Abzug der jeweiligen Hintergrundfluoreszenz des gesamten Messsystems, einschließlich Streustrahlung durch benachbarte Zellen. Hierfür wurde ein zellfreier Bildausschnitt von identischer Fläche unmittelbar neben der gemessenen Zelle ausgewählt und die Hintergrundfluoreszenz nach entsprechender Anregung vor und nach dem

eigentlichen Experiment gemessen. Der eigentliche Hintergrundfluoreszenzwert wurde dann als Mittelwert aus den beiden Werten berechnet.

$$\frac{F_{340}}{F_{380}} = \frac{(F_{340}^{\text{Messwert}} - F_{340}^{\text{Hintergrund}})}{(F_{380}^{\text{Messwert}} - F_{380}^{\text{Hintergrund}})}$$

Die Epifluoreszenzmessungen erfolgten an dem Setup der Firma Ion Optix (Abb.2.4). Das UV-Licht der Xenonbogenlampe wurde mit Hilfe eines rotierenden Spiegels („Hyperswitch“), der sich mit einer Frequenz von 250 Hz drehte, über zwei verschiedene Filter gelenkt. Der eine Filter ließ Licht mit einer Wellenlänge 340 ± 5 nm passieren, der andere Filter Licht mit der Wellenlänge 380 ± 5 nm. Das Licht mit der Wellenlänge 340 nm wurde über einen dichroitischen Spiegel (370DCLP) abgelenkt und gelangte dann in denselben Lichtleiter wie das 380 nm Licht. In der Folge wurde SBF1 mit einer Frequenz von 250 Hz alternierend mit 340 bzw. 380 nm angeregt. Dabei erfolgte die Ablenkung des Anregungslichtes auf die Zelle durch Reflexion an einem weiteren dichroitischen Spiegel (400DCLP, siehe Abb. 2.5). Dieser 400DCLP Spiegel wurde nur während der Messungen alle zwei Minuten eingedreht, um ein vorzeitiges Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern.

Die Farbstoffemission und das sichtbare Licht konnten den 400DCLP Spiegel passieren und wurden so vom kurzwelligeren Anregungslicht getrennt. Das sichtbare Licht im roten Bereich des Spektrums wurde über einen 635-nm-DCLP Spiegel vom gelben Fluoreszenz-Licht getrennt und zur Kamera geleitet. Vor dem zur Detektion des Fluoreszenzlichtes genutzten Photomultiplier war ein Bandfilter ($D535 \pm 20$ nm) angebracht, der das Emissionsspektrum auf die Spitzenemissionswellenlänge eingrenzte. Die auch als Photoelektronenvervielfachungsröhren bekannten Photomultiplier detektierten Lichtsignale und wandelten diese unter großer Verstärkung in elektrische Spannung um. Von hier wurde die Spannung weiter an einen AD-Wandler geleitet, bevor sie ebenfalls über die Software registriert wurde.

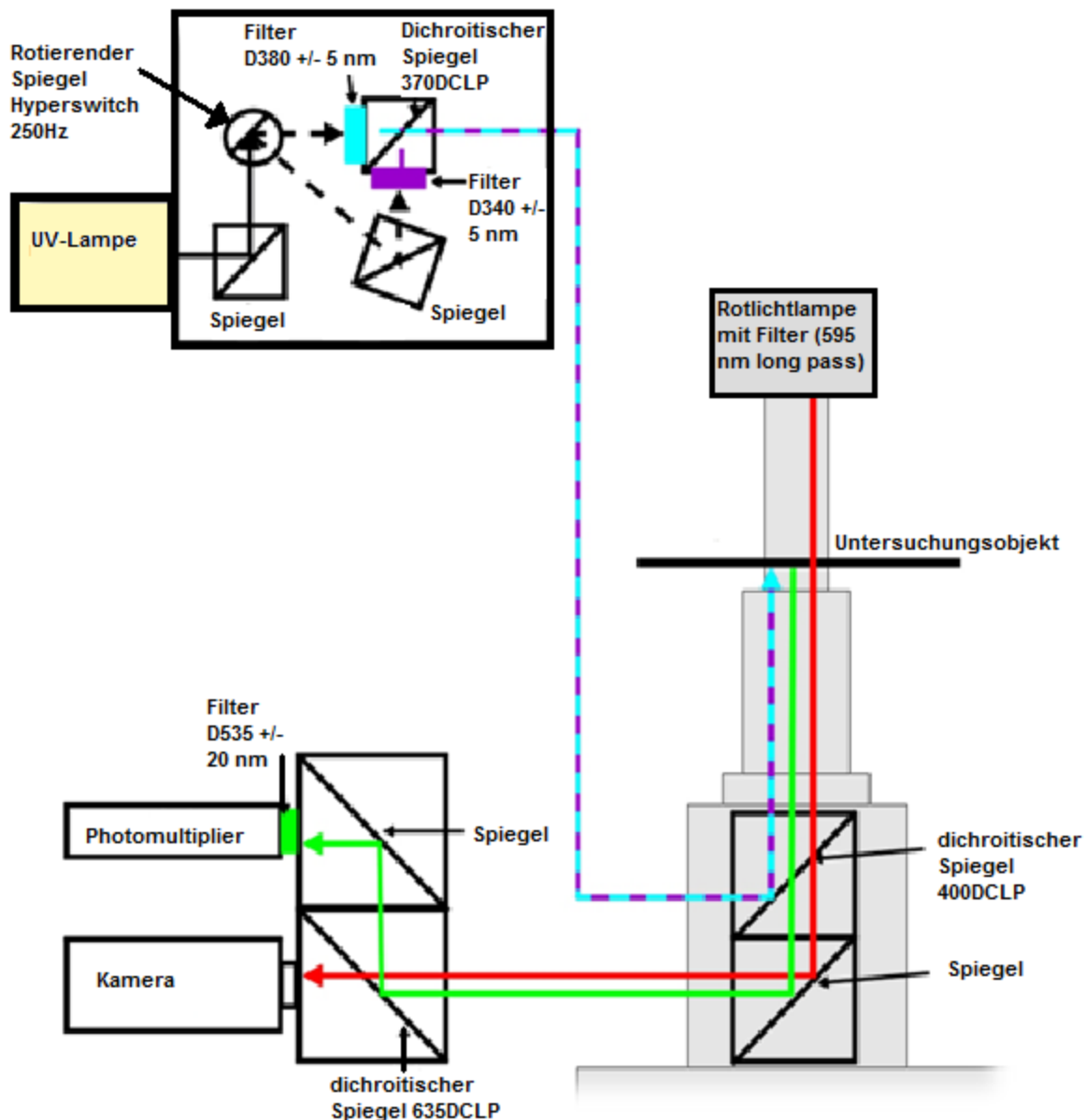


Abb.2.5 SBF1-Setup

Dargestellt ist der Strahlengang am Epifluoreszenzmikroskop bei der Messung mit SBF1.

Modifiziert nach Rasenack 2006, S. 54.

2.3.3 Kalibrierung

Mit Hilfe der Kalibrierungsexperimente konnten die in den Epifluoreszenzmessungen ermittelten Ratiowerte (F_{340}/F_{380}) in die tatsächlichen Natriumkonzentrationen umgerechnet werden. Da sich das Fluoreszenzverhalten von SBF1 *in situ* aufgrund von Proteinbindung in der Zelle und Kompartimentalisierung des Farbstoffes in interne Organellen von dem *in vitro* unterscheidet, wurden die Experimente *in situ* durchgeführt.

Für die Kalibrierung wurden vier Natriumlösungen mit unterschiedlicher Natriumkonzentrationen hergestellt (0 mmol/l, 5 mmol/l, 10 mmol/l, 20 mmol/l) (Tabelle 2-5, 2-6, 2-7) und deren pH mit TRIS-Base (Trishydroxymethylaminomethan, Puffersubstanz) bei Raumtemperatur auf 7,3 eingestellt, was einem physiologischen intrazellulären pH-Wert von 7,2 bei 37°C entspricht. Diese wurden in aufsteigender Reihenfolge auf die mit SBFI beladenen Kardiomyozyten gegeben. Das zur Superfusionlösung beigefügte Natrium-Ionophor Gramicidin D (10 µmol/l) (siehe Tabelle 2-7) sorgte durch Porenbildung in der Zellmembran dafür, dass Natriumionen ein- und ausströmen konnten und sich somit die intrazelluläre Natriumkonzentration allmählich der extrazellulären angleich. Damit die gerade eingeströmten Natriumionen nicht sofort wieder über die Natrium-Kalium-ATPase aus der Zelle gepumpt wurden, wurde diese durch Zugabe von Strophanthidin (100 µmol/l) (siehe Tabelle 2-7) in die Superfusionslösung inhibiert. Die Epifluoreszenzmessungen erfolgten in der Reihenfolge 0 mmol/l, 5 mmol/l, 10 mmol/l, 20 mmol/l, 0 mmol/l; dabei wurde jeweils vor Messbeginn für zehn Minuten mit Superfusionslösung gespült und nach Zugabe der entsprechenden Natriumlösungen alle zwei Minuten eine Messung der Fluoreszenz vorgenommen. Es wurde für jede Natriumkonzentration die Einstellung eines stationären Zustands (Equilibriums) abgewartet. Von den gemessenen Ratiowerten wurden, wie oben dargestellt (siehe 2.3.2), die jeweils kurz zuvor bestimmten Hintergrundfluoreszenzratios abgezogen und die berechneten Ratios als Funktion der Natriumkonzentrationen dargestellt. Mittels linearer Regression konnte eine Eichkurve erstellt werden, anhand der für jede beliebig gemessene Ratio die entsprechende Natriumkonzentration entweder abgelesen oder aber über die dazugehörige Funktion der Regressionsgeraden berechnet werden konnte (siehe Ergebnisse).

Tabelle 2-5 Natriumlösung (140 mmol/l)

Substanz	Konzentration	
NaCl	140 mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,3 mit TRIS- Base bei RT
HEPES	10 mmol/l	
EGTA	2 mmol/l	

Die Substanzen wurden jeweils in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst und mit Hilfe der Puffersubstanz Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS-Base) auf einen pH von 7,3 eingestellt.

Tabelle 2-6 Kaliumlösung (140 mmol/l)

Substanz	Konzentration	
KCl	140 mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,3 mit TRIS- Base bei RT
HEPES	10 mmol/l	
EGTA	2 mmol/l	

Die Substanzen wurden jeweils in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst und mit Hilfe der Puffersubstanz Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS-Base) auf einen pH von 7,3 eingestellt.

Tabelle 2-7 Für die Kalibrierungsexperimente verwendete Lösungen

Zur Herstellung der für die Kalibrierung benötigten Lösungen mit unterschiedlicher Natriumkonzentration wurden die oben aufgeführten Natrium- und Kaliumlösungen in folgendem Verhältnis verwendet.

Natriumkonzentration	Natriumlösung	Kaliumlösung
[mmol/l]	[ml]	[ml]
0	0	100
5	3,6	96,4
10	7,1	92,9
20	14,3	85,7

plus jeweils folgende Zusätze

	Substanz	Konzentration
Natriumionophor	Gramicidin D	10 µmol/l
Natrium-Kalium-ATPase Inhibitor	Strophanthidin	100 µmol/l

2.3.4 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Indo-1

Indo-1 bindet selektiv an Kalziumionen. Um Aussagen über die Kalziumkonzentration in den Kardiomyozyten machen zu können, wurden sie mit dem Farbstoff Indo-1 (Molecular Probes, I-1202) wie oben beschrieben beladen. Dabei erfolgte die Beladung bei Raumtemperatur und in Dunkelheit für maximal 15 Minuten bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ (in Tyrode, 0,02% Pluronic, Molecular Probes, P-3000, F-127, 1 mmol/l CaCl_2). Im Gegensatz zu SBF1 wurden die mit Indo-1-beladenen Einzelzellen nicht mit zwei verschiedenen Wellenlängen angeregt, sondern nur mit einer Wellenlänge bei 360 nm.

Dafür wurden die Emissionsmaxima bei zwei Emissionswellenlängen 405 nm und 485 nm ermittelt. Das Verhältnis dieser beiden Emissionsintensitäten (Ratio) F_{405}/F_{485} ermöglicht Aussagen über das Bindungsausmaß zwischen Kalziumionen und Farbstoffmolekülen und damit über die Ionenkonzentration.

Über eine 75-W-Xenonbogenlampe (Ushio, Japan) wurde der Farbstoff Indo-1 mit Hilfe eines Anregungsfilters ($360 \pm 5\text{nm}$) mit einer konstanten Wellenlänge von 360 nm angeregt. Die Weiterleitung des Lichts von der UV-Lampe auf das Objekt erfolgte über einen Filterspiegel (380DCLP), der in einem 45° -Winkel zum Strahlengang ausgerichtet war und das Licht um 90° ablenkte und somit auf das Objekt fokussierte (siehe Abb. 2.6).

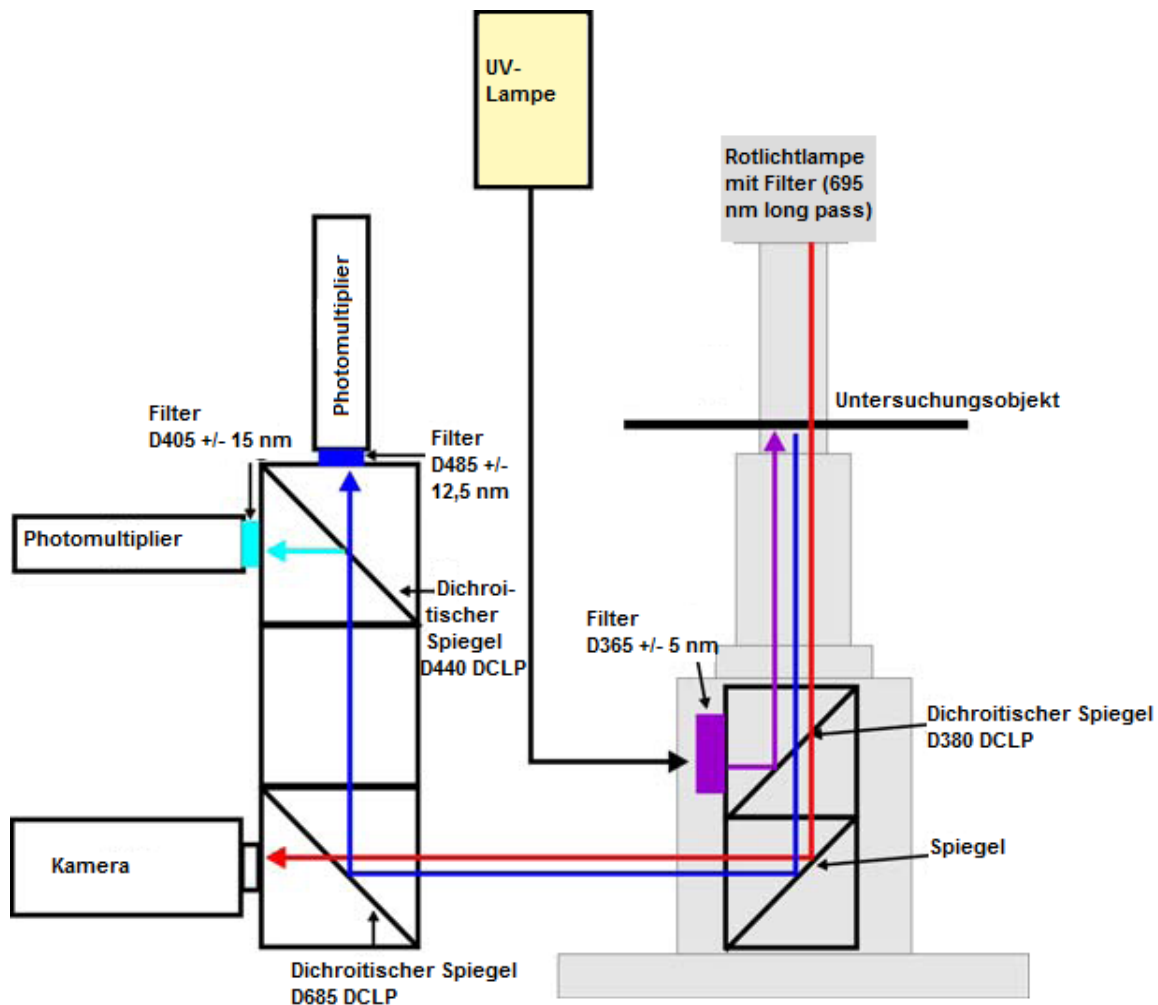


Abb.2.6 Setup für die Indo-1-Messungen

Dargestellt ist der Strahlengang am Epifluoreszenzmikroskop bei den Indo-1-Messungen.

Modifiziert nach Kohlhaas 2006, S. 66.

Die Farbstoffemission und das Durchlicht des Mikroskops wurde über einen 685 DCLP dichroitischen Spiegel so getrennt, dass das sichtbare Licht im roten Bereich des Spektrums zur Kamera und das vom Farbstoff emittierte kurzwelligere Licht (405 nm und 485 nm) zu den Photomultipliern gelenkt wurde. Bevor dieses jedoch die Photomultiplier erreichte, wurde es über einen weiteren dichroitischen Spiegel (440DCLP) in die beiden Emissionswellenlängen aufgeteilt und separat zu jeweils einem Photomultiplier geleitet. Vor den Photomultipliern befand sich jeweils noch ein Bandpassfilter ($D405 \pm 15$ nm bzw. $D485 \pm 12,5$ nm) um Streustrahlung zu eliminieren. In den Photomultipliern wurde das Emissionssignal verstärkt, in Spannung umgewandelt und die analogen Signale mit einem AD Wandler in computerlesbare Signale konvertiert.

Mit steigender Kalziumbindung des Farbstoffs vergrößert sich die Lichtemissionsintensität des Farbstoffes bei 405 nm; demgegenüber kommt es zu einer leichten Verringerung der Lichtemissionsintensität bei 485 nm. Die über das Epifluoreszenzmikroskop gemessene Ratio (F_{405}/F_{485}) vergrößert sich also nach Bindung von Kalziumionen an den Farbstoff.

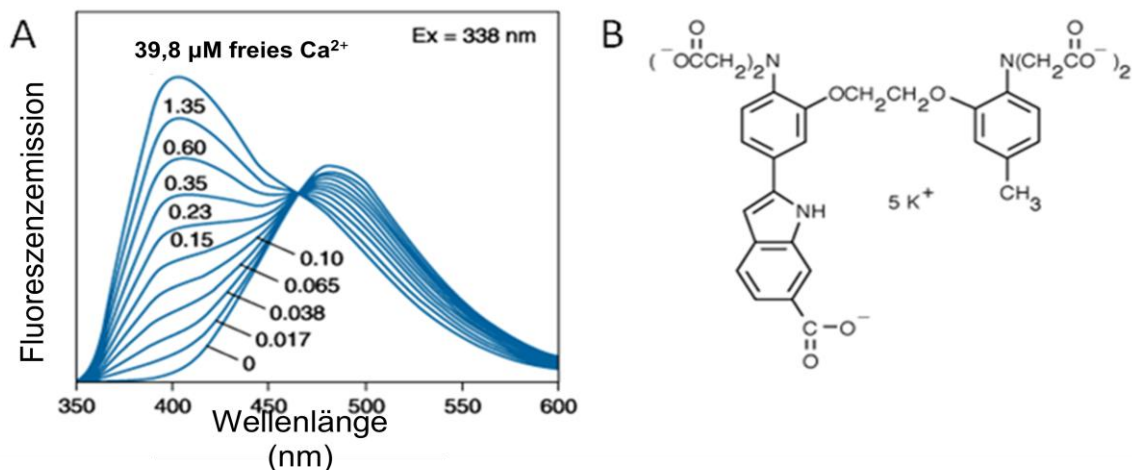


Abb.2.7 Fluoreszenzemission von Indo-1

A: Veränderung der Indo-1-Fluoreszenzemissionsintensität durch Bindung an Kalziumionen. Die Fluoreszenzintensität nimmt bei einer Emissionswellenlänge von circa 405 nm unter einer Anregung von 338 nm (Ex) mit steigender Kalziumkonzentration zu, wohingegen diese bei einer Emissionswellenlänge von ~ 465 nm konstant bleibt. Die Spitzenemissionswellenlänge verschiebt sich dabei von 485 nm in Ca^{2+} -freiem Medium zu 405 nm in einem mit Kalzium gesättigtem Medium (39,8 μM freies Ca^{2+}). Modifiziert nach der Online-Version des Handbuchs „The Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies“, 11. Auflage von Molecular Probes (<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html>, Abb.19.4, Stand 01.07.2012)

B: Molekülformel des geladenen membranimpermeablen Indo-1. Modifiziert nach der Online-Version des Handbuchs „The Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies“, 11. Auflage von Molecular Probes (<http://probes.invitrogen.com/media/structure/865.jpg>, Stand 01.07.2012)

Durch Abzug der Hintergrundfluoreszenz (siehe auch 2.3.2, S. 35/36) von der über der Zelle gemessenen Fluoreszenz konnte die tatsächliche Fluoreszenz der Zelle über folgende Formel berechnet werden.

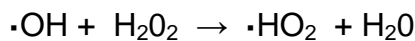
$$\frac{F_{405}}{F_{485}} = \frac{(F_{405}_{\text{Messwert}} - F_{405}_{\text{Hintergrund}})}{(F_{485}_{\text{Messwert}} - F_{485}_{\text{Hintergrund}})}$$

2.4 Generierung von Sauerstoffradikalen

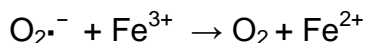
In der vorliegenden Arbeit sollte die intrazelluläre Natrium- und Kalziumkonzentration unter Einfluss von Sauerstoffradikalen untersucht werden. Dazu mussten Radikale in Konzentrationen vorliegen, wie sie für Myozyten eines insuffizienten Herzens typisch sind. Diese Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können über die Fenton-Reaktion (Fenton 1876) generiert werden. Die Reaktion diente Fenton einst als Nachweis von Weinsäure. Denn er machte die Beobachtung, dass das, wie er später herausfand, Oxidationsprodukt der Weinsäure, das in Anwesenheit von Eisen(II)-sulfat und Wasserstoffperoxyd entstand, zu einer Violettfärbung der Reaktionslösung führte (Fenton 1894). Dass bei dieser Reaktion Reaktive Sauerstoffspezies als Zwischenprodukte entstehen, wurde erst später nachgewiesen (Haber und Willstätter 1931). Dabei dient Eisen als Katalysator für die Reduktion von Wasserstoffperoxyd zu Hydroxidationen und Hydroxylradikalen (Haber und Weiss 1932).



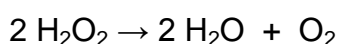
Reagiert dieses Hydroxylradikal nun mit Wasserstoffperoxyd entsteht ein weiteres Radikal, das Sauerstoffsuperoxid ($\text{O}_2\cdot^-$).



Über eine weitere Reaktion wird Eisen wieder zu zweiwertigem Eisen reduziert und steht für obige Reaktion wieder zu Verfügung. (Weiss 1935).



Beim Zerfall eines Moleküls H_2O_2 entstehen als Zwischenprodukte also die beiden kurzlebigen Sauerstoffspezies Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) und Sauerstoffsuperoxid ($\text{O}_2\cdot^-$), die sich jeweils durch ein freies Elektron auszeichnen und deshalb besonders reaktionsfreudig sind. Die Endprodukte des Wasserstoffperoxidzerfalls sind Wasser und Sauerstoff.



2.4.1 Praktische Durchführung

Die Reaktiven Sauerstoffspezies wurden über die oben aufgeführte Fenton-Reaktion gebildet. Da Radikale sehr lichtempfindlich sind, erfolgten das Ansetzen der Wasserstoffperoxidlösung und die gesamte Durchführung der Experimente in einem abgedunkelten Raum. Über eine lichtgeschützte Perfusorspritze (Braun Perfusor F) wurden die Kardiomyozyten jeweils über einen Zeitraum von zehn Minuten mit einer durch Tyrode auf 200 $\mu\text{mol/l}$ verdünnten Wasserstoffperoxidlösung superfundiert. Der gleich bleibende Flow der Perfusorspritze und der Superfusionslösung und eine andauernde Absaugung gewährleisteten einen kontinuierlichen Zu- und Abfluss und damit eine konstante Konzentration des Wasserstoffperoxids in der Zellkammer. H_2O_2 kann über die Zellmembran der Myozyten diffundieren und wird in der Zelle wie oben beschrieben (siehe 2.4) durch intrazellulär vorhandenes Eisen weiter umgesetzt. Da die dabei gebildeten Radikale eine sehr kurze Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden haben, wurde H_2O_2 über zehn Minuten kontinuierlich zugeführt.

2.5 Pharmakologische Intervention durch Inhibition des NCX

KB-R7943 (Sigma-Aldrich) ist ein spezifischer Inhibitor des NCX und zwar insbesondere der „Reverse-Mode“-Aktivität dieses Ionentransporters (Iwamoto et al. 1996, Watano et al. 1996). Mittels DMSO wurde das als Pulver vorliegende KB-R7943 gelöst, mit Tyrode auf eine Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ verdünnt und als Superfusionsmedium verwendet. Da DMSO selbst geringe Radikalfängereigenschaften besitzt (Koulkes-Pujo et al. 1981), wurde der Superfusionslösung der Kontrollexperimente ebenfalls DMSO zugefügt. Vor H_2O_2 -Exposition erfolgte jeweils für mindestens zehn Minuten eine Superfusion mit der jeweiligen Tyrode.

2.6 Messprotokoll

Die in 0,8 mmol/l Kalziumlösung befindlichen, frisch isolierten Kardiomyozyten von $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ -Mäusen bzw. von ihren Wildtyp-Geschwistern wurden vorsichtig in Zellkammern pipettiert, deren Glasböden zuvor mit Laminin ausgestrichen worden sind. Laminine sind Glykoproteine, die physiologischerweise als Bestandteil der Basalmembran eine wichtige Funktion bei der Zelladhäsion spielen. Als wirksames Klebereiweiß unterstützt das aus Mäusen gewonnene Laminin daher experimentell die Haftung der Kardiomyozyten an dem Boden der Zellkammern. Nach

siebenminütiger Sedimentation konnte der Überstand entfernt werden und die an dem Laminin haftenden Myozyten mit Farbstoff beladen werden. Die Inkubationszeit betrug abhängig von dem verwendeten Farbstoff entweder mindestens neunzig Minuten für SBFI oder fünfzehn Minuten für Indo-1. Um den extrazellulär verbliebenen Farbstoff sowie tote Zellen zu eliminieren, wurde die in das Epifluoreszenzmikroskop eingespannte Zellkammer mit den Kardiomyozyten vor Versuchsbeginn mindestens zehn Minuten mit Messtyrode (37°C) (Tabelle 2-8) gespült. Bei den Versuchen mit KB-R7943 bzw. den dazugehörigen Kontrollexperimenten wurde mit den entsprechenden Superfusionslösungen gespült.

Tabelle 2-8 Messtyrode

pH 7,4 mit NaOH (Natriumhydroxid) bei 37°C; optional wurde KB-R7943 bzw. DMSO zugefügt.

Substanz	Konzentration (mmol/l)
NaCl	140
KCl	4
Glucose	10
HEPES	5
MgCl ₂	1
CaCl ₂	1

Mittels elektrischer Feldstimulation wurden die Kardiomyozyten mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Nach ausreichend langer Spülung wurde die erste Hintergrundfluoreszenz, die unmittelbar neben dem ausgewählten Kardiomyozyten zu messen war, ermittelt. Die erste Fluoreszenzmessung über dem Kardiomyozyten erfolgte mit Beginn der ROS-Superfusion. Zwei Minuten nach Start der zehnminütigen ROS-Exposition wurde die zweite Messung durchgeführt, die dann im weiteren Verlauf alle zwei Minuten wiederholt wurde. Mit einer Kamera (IonOptix MyoCam™) wurde die Zelle in der Versuchskammer aufgenommen und in ein Computerprogramm (IonWizard Acquire Version 4.4) übermittelt, in dem die Sarkomerlänge bzw. die Zellverkürzung erfasst werden konnte. Diese wurde wie die Fluoreszenzwerte alle zwei Minuten ausgewertet.

Die Messungen wurden nach maximal dreißig Minuten beendet oder schon früher, falls die Zelle in den Zustand der Hyperkontraktur überging. Die Hintergrundfluoreszenz wurde immer am Ende der Messungen noch einmal bestimmt. Der eigentliche Hintergrundfluoreszenzwert wurde dann als Mittelwert aus den beiden Werten berechnet und jeweils von den über dem Kardiomyozyt gemessenen Fluoreszenzwerten abgezogen (siehe auch 2.3.2, S. 35/36 bzw. 2.3.4, S. 42).

Außerdem wurden unbeladene CaMKII $\delta^{-/-}$ und WT-Kardiomyozyten auf das Auftreten von Arrhythmien unter ROS-Einfluss über einen Messzeitraum von maximal dreißig Minuten beobachtet und je nach dessen Muster in Anlehnung an einen von Wu und Kollegen (Wu et al. 2002) vorgeschlagenen Arrhythmie-Score bewertet. Dieser ermöglicht die Bewertung von unterschiedlichen Schweregraden von Arrhythmien durch die Vergabe von Punkten. Das Vorkommen leichter Arrhythmien wie frühen nicht-stimulierten Nachkontraktionen (ENSEs) und späten nicht-stimulierten Nachkontraktionen (DNSEs) innerhalb des Beobachtungszeitraums wurde mit einem Punkt bewertet. Dabei beschreiben die ENSEs bzw. DNSEs jeweils einzelne Kontraktionen, die nicht durch einen elektrischen Stimulus sondern über frühe bzw. späte Nachdepolarisationen, die das Schwellenpotential erreicht haben, ausgelöst wurden (siehe 1.6). Doppelte DNSEs und dreifache DNSEs erhielten zwei Punkte. Das Auftreten von bigeminusartigen, trigeminusartigen, salvenartigen oder nicht-anhaltenden zellulären Rhythmusstörungen wurde mit drei Punkten, die anhaltende zellulären Rhythmusstörungen als schwerste Arrhythmieform mit vier Punkten bewertet. Insgesamt konnte pro Kardiomyozyt über den gesamten Beobachtungszeitraum ein Maximalscore von 10 Punkten erreicht werden.

Das Überleben der einzelnen Kardiomyozyten wurde als messbarer Zeitraum von Beginn der ROS-Exposition bis zur Hyperkontraktur festgehalten. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Kurve für beide Gruppen (CaMKII $\delta^{-/-}$ vs. WT-Kardiomyozyten) graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet, wobei auch hier der maximale Beobachtungszeitraum pro Kardiomyozyt auf dreißig Minuten festgelegt wurde.

2.7 Statistik

Alle Messergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM) angegeben. Für die Datenauswertung wurde Ionwizard 5, Microsoft Office Excel 2007, Prism 4.0 und Sigma Stat. verwendet.

Der Vergleich zweier Gruppen konnte über einen t-Test ausgewertet werden. Longitudinale Messungen mehrerer Gruppen wurden mit dem 2-Wege-ANOVA-Test bzw. dem 2-Wege-ANOVA-Test für wiederholte Messungen („Two-way ANOVA Repeated Measures“) analysiert. Als Post-Hoc-Test kam ein Student-Newman-Keuls-Test zum Einsatz. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

Die Auswertung der prozentualen Überlebensraten erfolgte nach Kaplan-Meier und dem log-rank-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Die Bedeutung der CaMKII δ für den Anstieg der zytosolischen Natriumkonzentration unter ROS-Exposition

Im insuffizienten Herzen findet man erhöhte Konzentrationen von ROS, die mit einer Natrium- und Kalziumüberladung der Kardiomyozyten einhergehen und zu kontraktile Dysfunktion führen. Welche Funktion die CaMKII δ , die unter anderem direkt durch Oxidation über freie Radikale aktiviert werden kann, für diese ROS-Effekte in Kardiomyozyten hat, soll anhand dieser Arbeit näher untersucht werden. Dazu wurden Kardiomyozyten verwendet, in denen das Gen für die CaMKII δ ausgeschaltet wurde, als Kontrollgruppe dienten Wildtyp-Kardiomyozyten.

Um die zytosolische Natriumkonzentration nach Radikalsuperfusion zu messen, wurden die aus CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäusen oder ihren Wildtyp-Geschwistern isolierten Herzmuskelzellen jeweils mit dem Na⁺-sensitiven Farbstoff SBFI beladen und anschließend zehn Minuten lang H₂O₂ ausgesetzt. Da sich die Ratio F₃₄₀/F₃₈₀ nach Bindung von Natriumionen an den Farbstoff ändert, können mit Hilfe dieses Farbstoffes quantitative Aussagen über die Natriumkonzentration getroffen werden. Die Ratio einer mit SBFI beladenen Myozyte wurde alle zwei Minuten über einen Gesamtzeitraum von dreißig Minuten ab Beginn der ROS-Exposition mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops gemessen. Abbildung 3.1 zeigt eine Originalregistrierung der SBFI-Ratio eines Wildtyp-Kardiomyozyten zu den Zeitpunkten 0 Minuten, 6 Minuten und 12 Minuten ab Beginn der zehnminütigen H₂O₂-Exposition.

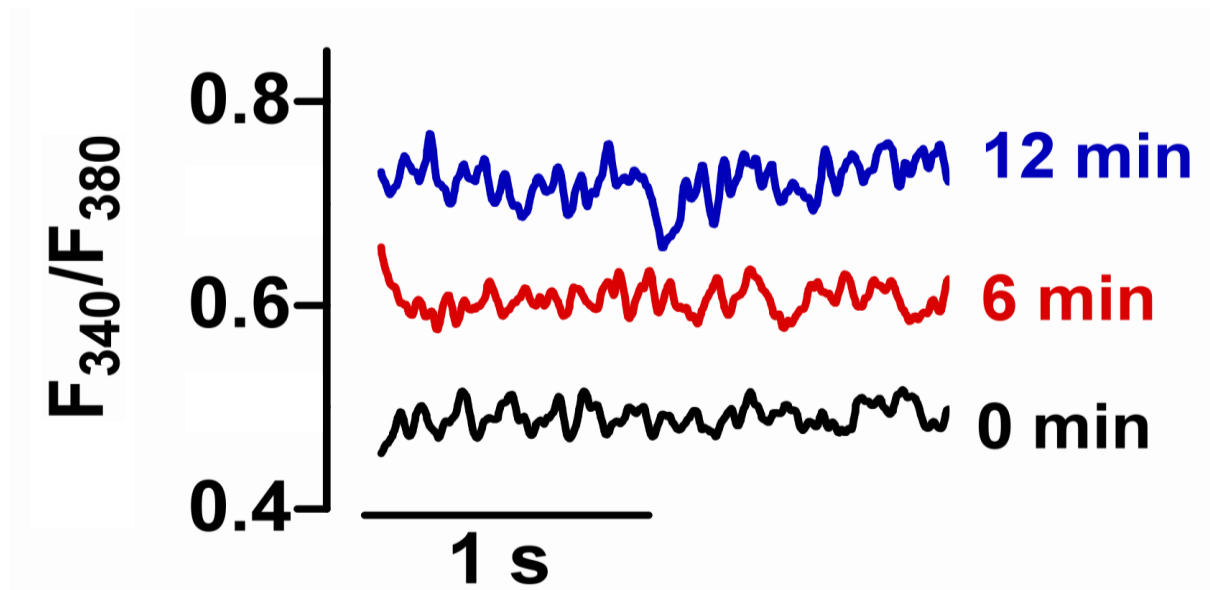


Abb.3.1 Originalregistrierung der SBF1-Fluoreszenzratio eines Wildtyp-Kardiomyozyten unter ROS-Exposition

Originalabbildung der SBF1-Ratio F_{340}/F_{380} eines Wildtyp-Kardiomyozyten als Maß für die Veränderung der Natriumkonzentration zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 min ab Beginn der zehnmütigen ROS-Exposition (übereinandergelagert).

Der Zeitpunkt 0 Minuten bezeichnet die Ratio zu Beginn der Radikalsuperfusion. Nach sechsminütiger ROS-Exposition der Wildtyp-Kardiomyozyten ist die Ratio schon deutlich angestiegen und hat sich nach zwölf Minuten noch weiter gesteigert. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass mit dieser Technik keine zyklischen Schwankungen der Natriumkonzentration nachgewiesen werden können. Diese sind örtlich und zeitlich sehr begrenzt (in unmittelbarer Nähe der Natriumkanäle subsarkolemmal), spielen jedoch eine große Rolle für die Funktion anderer sarkolemmaler Proteine (Natrium-Kalzium-Austauscher, siehe Diskussion).

Abbildung 3.2 zeigt im Vergleich dazu die Originalregistrierung eines Kardiomyozyten, in der das Gen für die CaMKII δ ausgeschaltet wurde.

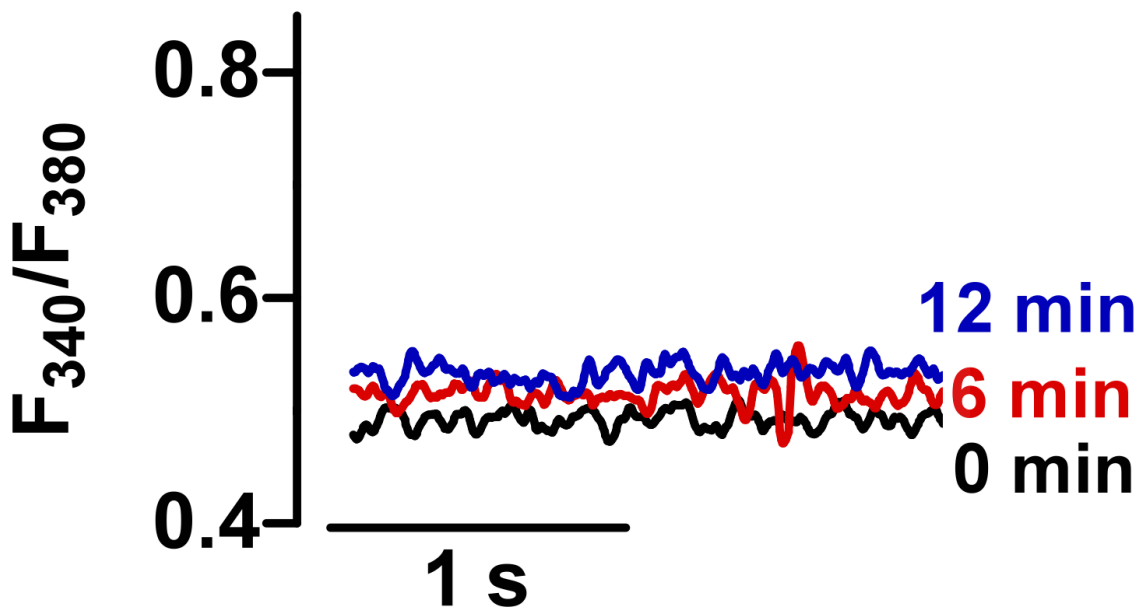


Abb. 3.2 Originalregistrierung der SBFI-Fluoreszenzratio eines $CaMKII\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten unter ROS-Exposition

Originalabbildungen der SBFI-Ratio F_{340}/F_{380} eines $CaMKII\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten 0, 6 und 12 Minuten nach ROS-Exposition (übereinandergelagert).

Vor Beginn der Radikaleinwirkung zeigen WT- und $CaMKII\delta^{-/-}$ -Herzmuskelzellen vergleichbare Ratios und damit vergleichbare Natriumkonzentrationen. Der deutliche Anstieg der Ratio, der in den Wildtyp-Kardiomyozyten nach sechs und zwölf Minuten zu erkennen ist (siehe Abb.3.1), bleibt in den Kardiomyozyten mit ausgeschalteter $CaMKII\delta$ aus. In diesen bleibt die Ratio trotz identischer Radikalkonzentrationen über den gesamten beobachteten Zeitraum nahezu unverändert, was ein erster Hinweis dafür sein könnte, dass der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase $II\delta$ bei der Vermittlung der zellulären ROS-induzierten Natriumüberladung eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Um genauere Aussagen über die tatsächlichen intrazellulären Natriumkonzentrationen machen zu können, wurde eine *in situ* Kalibrierung durchgeführt. Dazu wurden die mit SBFI beladenen Kardiomyozyten mit dem Ionophor Gramicidin D und Strophanthidin superfundiert und anschließend nacheinander Natriumlösungen vorgegebener Konzentrationen ausgesetzt. Einen Ausgleich der intra- und extrazellulären Natriumkonzentration konnte man annehmen, wenn die Fluoreszenzratio F_{340}/F_{380} , die über einem Kardiomyozyten gemessen wurde, einen stationären Zustand („steady state“) erreichte. Bei jedem Kalibrierungsexperiment wurden deshalb die Ratiowerte für vier verschiedene

Natriumkonzentrationen in aufsteigender Reihenfolge (0 mmol/l, 5 mmol/l, 10 mmol/l, 20 mmol/l) jeweils solange gemessen, bis sich ein stationärer Zustand eingestellt hat. Die ermittelten Werte korrelieren somit nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz direkt mit der zugeführten Natriumkonzentration. Abbildung 3.3 stellt beispielhaft ein Kalibrierungsexperiment dar.

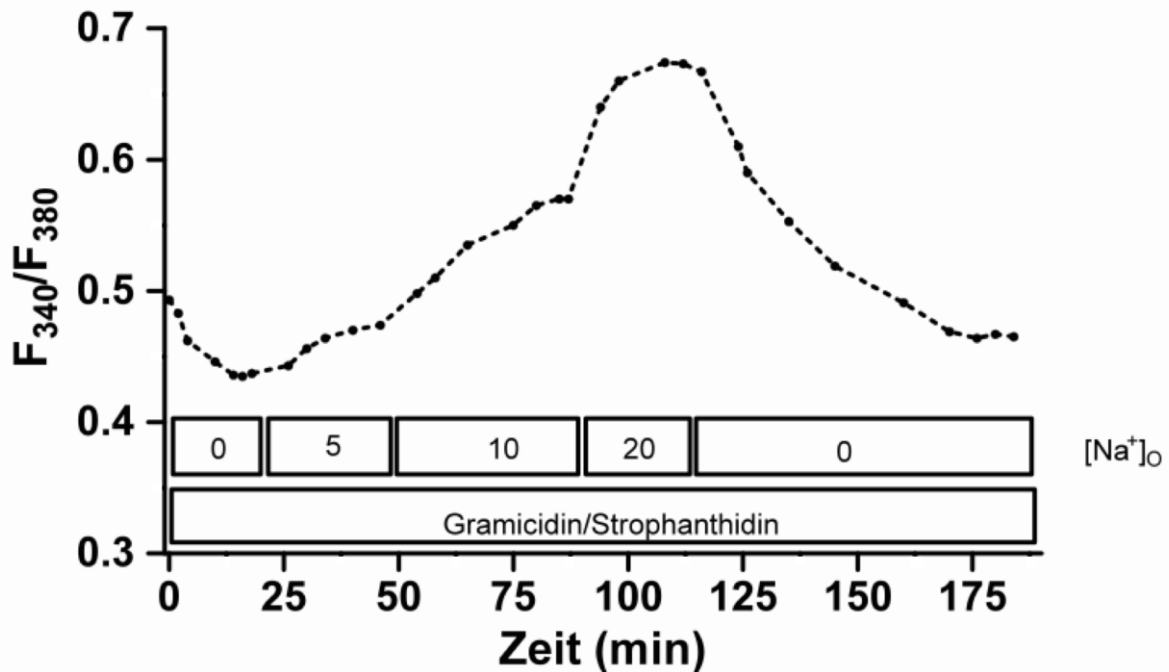


Abb.3.3 Beispielhafte Darstellung eines SBFI-Kalibrierungsexperiments

Dargestellt ist die Fluoreszenzratio einer mit Gramicidin und Strophanthidin behandelten Herzmuskelzelle, die, in aufsteigender Reihenfolge, vier unterschiedlich konzentrierten Natriumlösungen $[Na^+]_o$ (0 mmol/l, 5 mmol/l, 10 mmol/l und 20 mmol/l) ausgesetzt wurde. Nach Einstellen eines stationären Zustands korreliert die gemessene Fluoreszenzratio über dem Kardiomyozyten nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz mit der extrazellulär zugeführten Natriumkonzentration.

Am Ende des Experiments wurde die Reversibilität des Versuchs mit einer natriumfreien Lösung überprüft. Wie auch in der Abbildung 3.3 zu erkennen ist, sinkt die Ratio deutlich, aber nicht wieder ganz auf den Ausgangs-Ratiowert, der zu Beginn der Messung bei 0 mmol/l Natrium erreicht wurde, ab. Dies konnte auch schon von Maier et al. 1997 beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Natrium bei einer intrazellulären Konzentration von 20 mmol/l gar nicht mehr vollständig eliminiert werden kann oder aber dass es bedingt durch eine sehr lange Messzeit zu einem Ausbleichen des Farbstoffs kommt und damit

insbesondere nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz fehlerhafte Werte ermittelt werden (Maier et al. 1997).

Anhand von vier Kalibrierungsexperimenten wurde eine Eichkurve in Form einer linearen Regressionsgeraden erstellt. Sie ermöglicht die Zuordnung eines gemessenen Ratiowerts (nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz) zu der tatsächlichen intrazellulären Natriumkonzentration.

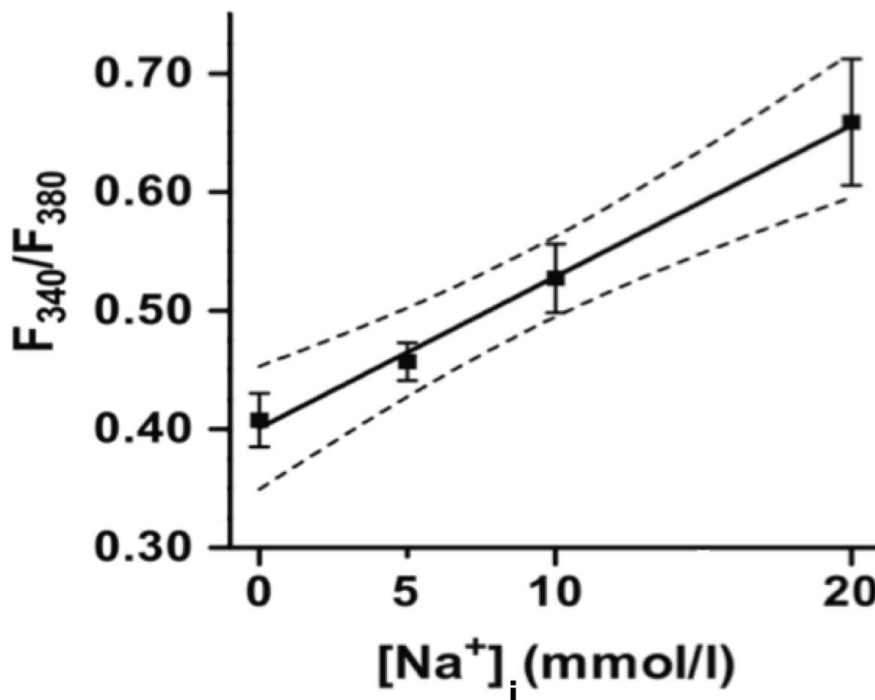


Abb. 3.4 Eichkurve

Dargestellt ist die gemittelte SBFI-Ratio (nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz) aus insgesamt vier Kalibrierungsexperimenten als Funktion der intrazellulären Natriumkonzentration. Die durchgezogene Linie steht für die Regressionsgerade $f(x)=0,013x+0,401$. Sie ist eine Annäherung an die gewonnenen Daten. Das 95%-ige Konfidenzintervall der Regression ist gestrichelt gezeichnet.

Die Regressionsgerade als Annäherung für die aus den vier Experimenten gewonnenen Daten liefert nach Umformungen folgende Funktion für die intrazelluläre Natriumkonzentration:

$$[\text{Na}^+]_i = \frac{(F_{340}_{\text{Messwert}} - F_{340}_{\text{Hintergrund}})}{(F_{380}_{\text{Messwert}} - F_{380}_{\text{Hintergrund}})} - 0,401}{0,013} \quad (\text{mmol/l})$$

Mit Hilfe dieser Formel können für alle gemessenen SBFI-Ratiowerte der vorliegenden Arbeit die entsprechenden intrazellulären Natriumkonzentrationen bestimmt werden.

3.2 Die Veränderung der zytosolischen Natriumkonzentrationen unter Radikalexposition in Wildtyp- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten

Die gemittelten SBFI-Fluoreszenzratiowerte der WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten, die unter Radikaleinwirkung gemessen wurden, sind über obige Formel in tatsächliche Natriumkonzentrationen umgerechnet worden und in folgender Abbildung dargestellt.

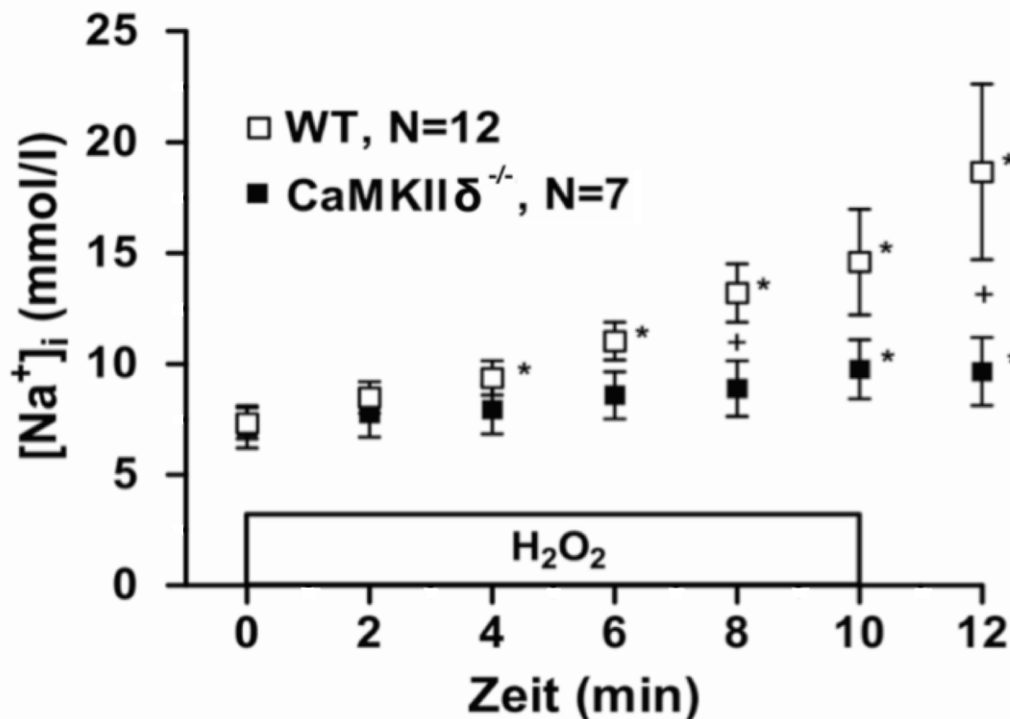


Abb.3.5 Zytosolische Natriumkonzentrationen unter Radikalexposition in CaMKII $\delta^{-/-}$ (N=7) und Wildtyp-Kardiomyozyten (N=12)

Der Anstieg der zytosolischen Natriumkonzentration nach ROS-Exposition ist in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten signifikant verzögert (vs. WT, $P < 0,05$, Zwei-Wege ANOVA wiederholt gemessener Daten). Betrachtet man dabei die einzelnen Zeitpunkte mittels Post-Hoc-Analyse genauer, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zum Zeitpunkt 8 und 12 min ($+P < 0,05$). Vergleicht man innerhalb der jeweiligen Gruppe den einzelnen Messzeitpunkt zum Ausgangszeitpunkt zeigt sich, dass in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten im Gegensatz zu Wildtypkardiomyozyten erst nach 10 Minuten ein signifikanter Anstieg der zytosolischen Natriumkonzentration, während ein signifikanter Anstieg in WT-Kardiomyozyten bereits nach vier Minuten erreicht ist. ($*P < 0,05$ im Vergleich zum Zeitpunkt 0 min) (jeweils Student-Newman-Keuls-Test)

Abbildung 3.5 zeigt die Wirkung einer zehnminütigen H₂O₂-Superfusion auf die Natriumkonzentrationen in Wildtyp- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten über einen Beobachtungszeitraum von zwölf Minuten. Die gemittelten intrazellulären Natriumkonzentrationen liegen vor Radikaleinfluss (0 Minuten) im physiologischen

Bereich und sind in beiden Gruppen vergleichbar hoch: $7,16 \pm 0,57$ mmol/l in den CaMKII $\delta^{-/-}$ - und $7,32 \pm 0,44$ mmol/l in den WT-Myozyten.

Nach ROS-Exposition zeigt sich jedoch ein signifikant verzögerter Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration in CaMKII $\delta^{-/-}$ im Vergleich zu WT-Kardiomyozyten ($P < 0,05$).

Während die gemittelte zytosolische Natriumkonzentration in den Wildtyp-Kardiomyozyten bereits nach 4 Minuten signifikant höher als zu Beginn der ROS-Exposition (0 Minuten) ist, tritt dieser Anstieg der Natriumkonzentration in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Zellen verzögert auf. Ein signifikant erhöhtes Natrium im Zytosol konnte hier erst nach zehn Minuten gemessen werden. Nach zwölf Minuten beträgt die gemittelte Natriumkonzentration in den WT-Kardiomyozyten $18,59 \pm 0,81$ mmol/l gegenüber $7,32 \pm 0,44$ mmol/l zum Zeitpunkt 0 min (P -Wert $< 0,05$). Im Gegensatz dazu ist die intrazelluläre Natriumkonzentration in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten mit $10,39 \pm 0,70$ mmol/l nach zwölf Minuten vs. $7,16 \pm 0,57$ mmol/l zum Zeitpunkt 0 Minuten zwar ebenfalls signifikant zum Ausgangswert gesteigert, aber die Natriumkonzentration nach zwölf Minuten ist hier deutlich geringer als in WT-Kardiomyozyten ($P < 0,05$).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass für den Anstieg der Natriumkonzentration unter ROS-Exposition insbesondere die CaMKII δ verantwortlich ist. Im Weiteren soll nun geprüft werden, ob die CaMKII auch einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase unter ROS-Exposition hat.

3.3 Die Rolle der CaMKII δ für die Veränderung der Kalziumkonzentration unter ROS-Exposition

In den folgenden Experimenten soll nun ermittelt werden, welche Bedeutung die CaMKII δ für die Kalziumakkumulation unter ROS-Exposition hat bzw. ob der drastische Anstieg der Kalziumkonzentration durch das Ausschalten der CaMKII δ gemindert oder sogar verhindert werden kann.

Die Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration während und nach zehnminütiger ROS-Exposition wurde an frisch isolierten Mäusekardiomyozyten nach Beladung mit dem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Indo-1 verfolgt. Dabei erfolgte die Fluoreszenzerfassung im Gegensatz zu SBF1 nicht über den Quotienten aus den Emissionsintensitäten bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen, sondern bei zwei unterschiedlichen Emissionswellenlängen, nämlich bei 405 nm und 485 nm.

Die Ratio der Emissionswellenlängen F_{405}/F_{485} , die alle zwei Minuten jeweils in den Wildtyp- und in den $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops bestimmt wurde, stellt dabei ein Maß für die Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration dar. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von maximal dreißig Minuten.

Abbildung 3.6 zeigt eine Originalabbildung der Fluoreszenzratio F_{405}/F_{485} eines Wildtyp-Kardiomyozyten zu den Zeitpunkten 0 Minuten, 6 Minuten und 12 Minuten nach Beginn der zehninütigen ROS-Exposition.

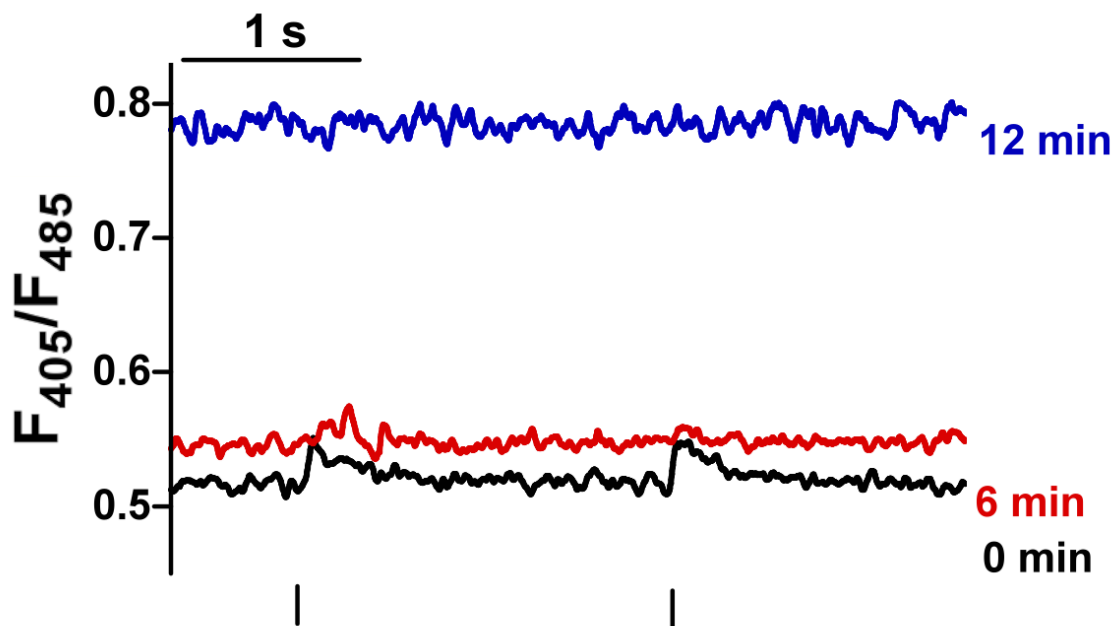


Abb.3.6 Originalabbildung der Fluoreszenzratio F_{405}/F_{485} eines Wildtyp-Kardiomyozyten als Maß für die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen unter ROS-Exposition

Repräsentative Originalregistrierung der Veränderung der Ratio (F_{405}/F_{485}) einer Wildtyp-Herzmuskelzelle zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Minuten nach Beginn der zehninütigen ROS-Exposition. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 405 nm und bei 485 nm dient als Maß für die zytosolische Kalziumkonzentration. Die elektrische Feldstimulation ist mit senkrechten Strichen markiert (übereinandergelagert).

Vor Beginn der Radikalsuperfusion (0 min) zeigen sich in den WT-Kardiomyozyten sogenannte Kalziumtransienten. Diese Schwankungen entstehen durch die infolge des Erregungs-Kontraktions-Zyklus (siehe 1.2, S. 5-8) sich regelmäßig verändernden zytosolischen Kalziumkonzentrationen. Mit längerer Dauer der ROS-Exposition kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der diastolischen Kalziumkonzentration. Die systolische Kalziumkonzentration verändert sich demgegenüber weniger stark, so dass die Differenz zwischen systolischer und diastolischer Kalziumkonzentration

immer kleiner wird. Schließlich kommt es nach ca. zwölf Minuten ROS-Exposition zum Sistieren des Kalziumtransienten. Gleichzeitig scheint die Zelle visuell nicht mehr erregbar zu sein, da sie keine rhythmischen Kontraktionen mehr zeigt. Dies ist möglicherweise auf die an den Myofilamenten dauerhaft vorherrschende hohe Kalziumkonzentration zurückzuführen, die eine geordnete Relaxation unmöglich macht. Die progrediente Kontraktion mündet schließlich in die sogenannte Hyperkontraktur, die als dauerhafte Verkürzung der longitudinalen Zelllänge auf weniger als fünfzig Prozent definiert ist (siehe Abb. 3.7).

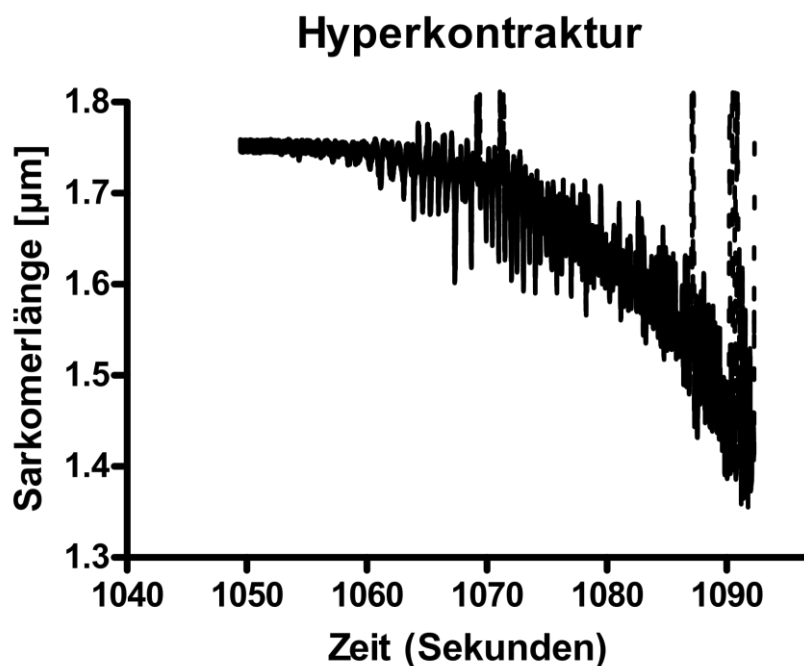


Abb.3.7 Originalregistrierung einer Hyperkontraktur

Originalabbildung einer Veränderung der Sarkomerlänge als Funktion der Zeit in einem Wildtyp-Kardiomyozyten. Die Hyperkontraktur ist dabei durch eine dauerhafte Verkürzung der Zelllänge (hier Sarkomerlänge als Surrogat) auf weniger als 50% ihrer Ausgangslänge definiert.

Abbildung 3.8 zeigt beispielhaft die Entwicklung der Indo-1-Ratio einer Herzmuskelzelle, in der das Gen für die CaMKII δ fehlt. Hier kommt es unter gleichen ROS-Konzentrationen nur zu einem sehr geringen Anstieg der diastolischen Ratio F_{405}/F_{485} . Interessanterweise zeigten sich jedoch deutlich gesteigerte systolische Kalziumtransienten, was auf einen gesteigerten Kalziumgehalt des SR bei noch kompensierter diastolischer Kalziumkonzentration hindeuten könnte (siehe Diskussion).

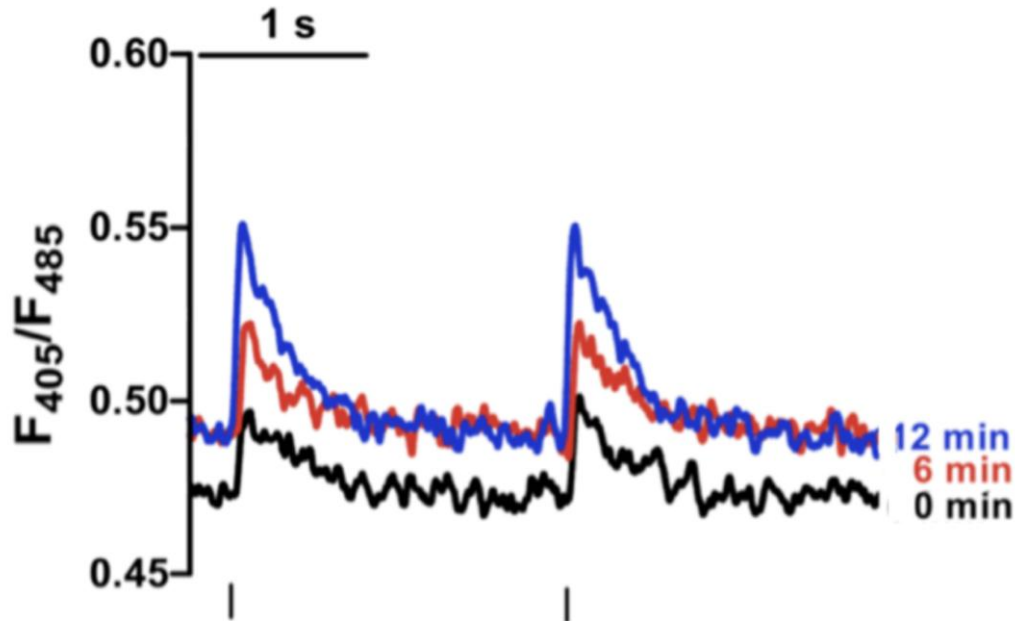


Abb.3.8 Originalabbildung der Fluoreszenzratio F_{405}/F_{485} eines $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten als Maß für die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration unter ROS-Exposition

Dargestellt ist eine repräsentative Originalregistrierung der Ratio F_{405}/F_{485} eines $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Minuten nach Beginn der zehninütigen ROS-Exposition. Die elektrische Feldstimulation ist mit senkrechten Strichen markiert (übereinandergelagert).

Des Weiteren ist zu klären, ob die in den Wildtyp-Kardiomyozyten beobachtete und auch zuvor schon beschriebene Kalziumüberladung direkt über die Aktivierung eines Kalziumkanals (RyR2 oder L-Typ- Ca^{2+} -Kanal) durch die $\text{CaMKII}\delta$ vermittelt wird oder ob sie tatsächlich hauptsächlich sekundär in Folge der zytosolischen Natriumüberladung mit konsekutiv aktiviertem NCX-Umkehrtransportmodus (Kalziumeinwärtstransport) entsteht. Dazu wurde der Umkehrmodus des NCX gezielt mittels KB-R7943 (5 $\mu\text{mol/l}$) in WT-Kardiomyozyten gehemmt und die Veränderung der Indo-1-Fluoreszenzratio gemessen.

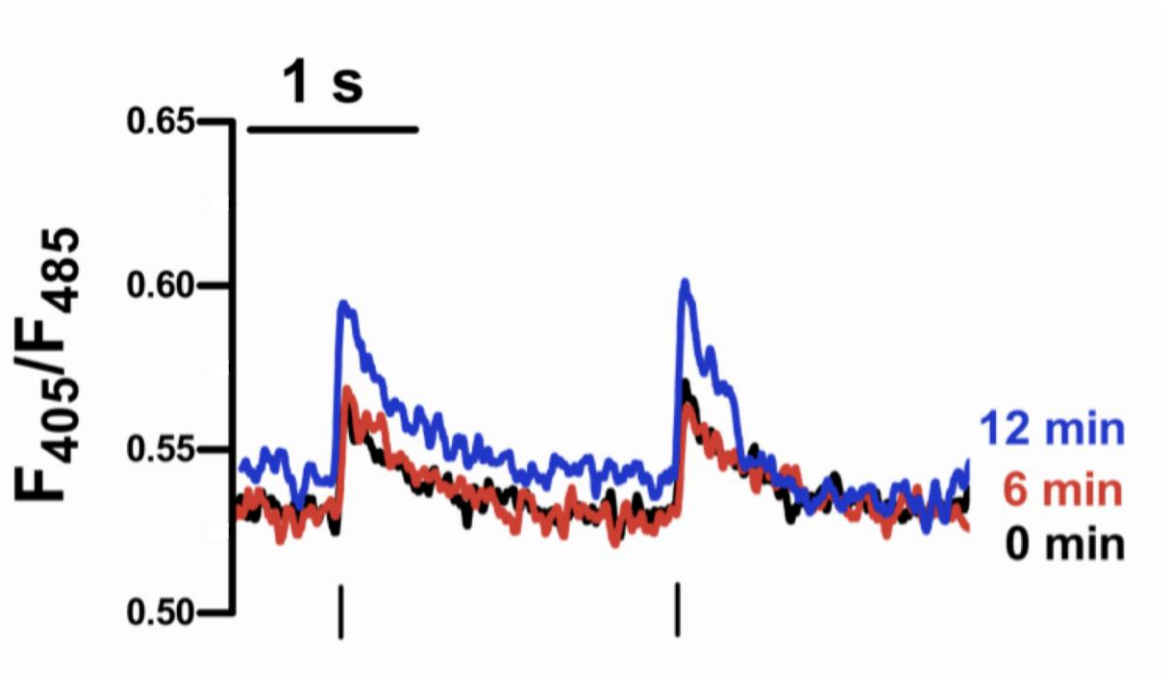


Abb.3.9 Originalregistrierung der Indo-1-Fluoreszenzratio eines mit KB-R7943 behandelten Wildtyp-Kardiomyozyten nach ROS-Exposition

Dargestellt ist die Originalabbildung der Indo-1-Fluoreszenzratio von einer mit KB-R7943 behandelten Wildtyp-Herzmuskelzelle zu den Zeitpunkten 0, 6, und 12 Minuten ab Beginn der zehnmütigen ROS-Exposition. Die elektrische Feldstimulation ist mit senkrechten Strichen markiert. (übereinandergelagert)

Abbildung 3.9 zeigt die Originalregistrierung eines mit KB-R7943 behandelten Wildtyp-Kardiomyozyten nach Radikaleinwirkung. Vergleichbar mit der Originalabbildung des oben dargestellten Kardiomyozyten, in dem das Gen für die CaMKII δ ausgeschaltet wurde (siehe 3.8), kommt es auch in den mit KB-R7943 behandelten Herzmuskelzellen zu keinem wesentlichen Anstieg der diastolischen Fluoreszenzratio, was für die wesentliche Bedeutung des NCX bei der Kalziumakkumulation durch erhöhten oxidativen Stress spricht. In den Registrierungen bei 0 Minuten als auch bei 6 und 12 Minuten sind Kalziumtransienten erkennbar. Die zunehmenden Kalziumtransienten nach ROS-Exposition sind auch hier nach zwölf Minuten erkennbar, was spekulieren lässt, dass geringe Mengen an Kalzium weder über den NCX noch über die CaMKII δ -vermittelt nach ROS-Exposition in die Zelle gelangen und zumindest zeitweise für eine bessere Kontraktionskraft sorgen.

Abbildung 3.10 zeigt die zusammengefassten Mittelwerte der F_{405}/F_{485} -Ratio für die oben dargestellten experimentellen Gruppen. Dabei können folgende Beobachtungen gemacht werden.

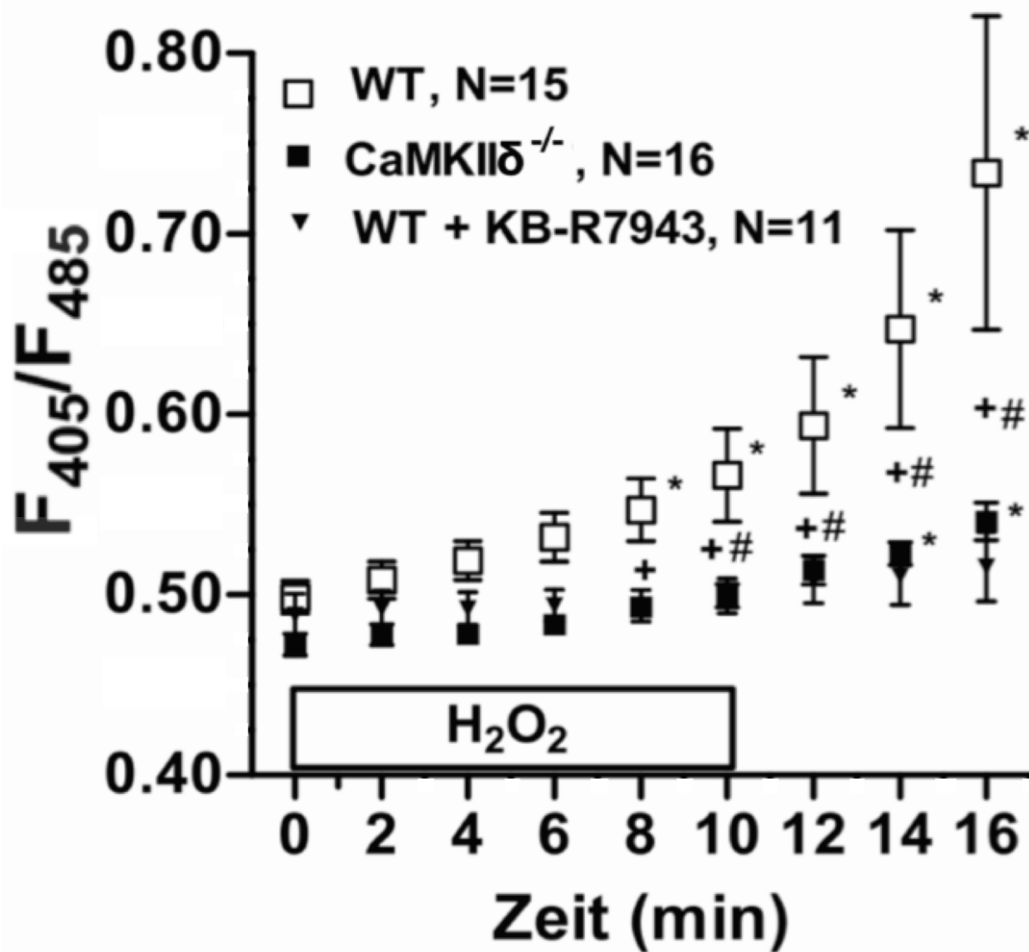


Abb. 3.10 Veränderungen der Indo-1-Ratio nach ROS-Exposition

Dargestellt ist die Veränderung der Indo-1-Fluoreszenzratio in Abhängigkeit von der Zeit während und nach zehnteiliger ROS-Exposition. $P < 0,05$ (Two-way ANOVA wiederholt gemessener Daten).

* $P < 0,05$ im Vergleich zum Ausgangs-Ratio (0 Minuten) innerhalb einer Gruppe; + $P < 0,05$ CaMKII $\delta^{-/-}$ im Vergleich mit WT-Kardiomyozyten innerhalb eines Zeitpunktes; # $P < 0,05$ mit KB-R7984 behandelte WT- im Vergleich mit unbehandelten WT-Kardiomyozyten innerhalb eines Zeitpunktes (jeweils Student-Newman-Keuls-Methode).

Während in den WT-Kardiomyozyten (N=15) ein starker Anstieg der Indo-1-Ratio (im Vergleich zur Ausgangs-Ratio bei 0 Minuten) zu verzeichnen ist, ist dieser in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten (N=16) und in den mit KB-R7943 behandelten Wildtyp-Kardiomyozyten (WT+KB-R7943, N=11) signifikant geringer ($P < 0,05$).

Bereits nach acht Minuten ist die gemittelte Ratio in den Wildtyp-Kardiomyozyten signifikant höher als vor ROS-Exposition ($0,55 \pm 0,02$ vs. $0,50 \pm 0,01$ bei 0 Minuten) ($P < 0,05$). Dieser Anstieg ist in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten, deren Ausgangs-Ratio ($0,47 \pm 0,01$) mit denen von Wildtyp-Herzmuskelzellen ($0,5 \pm 0,01$) vergleichbar ist,

fast vollständig ausgeblieben. Die gemittelte Ratio ist in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Zellen erst ab vierzehn Minuten signifikant zum Ausgangswert angestiegen ($0,52 \pm 0,01$ vs. $0,47 \pm 0,01$ bei 0 Minuten).

Sechzehn Minuten nach Beginn der zehnmütigen ROS-Exposition ist die gemittelte Ratio (F_{405}/F_{485}) $0,73 \pm 0,09$ gegenüber $0,50 \pm 0,01$ bei 0 Minuten in den Wildtyp-Herzmuskelzellen versus $0,54 \pm 0,01$ gegenüber $0,47 \pm 0,01$ bei 0 Minuten in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten. Die Indo-1-Ratio als Maß für die Veränderung der diastolischen zytosolischen Kalziumkonzentration ist in den WT-Kardiomyozyten nach sechzehn Minuten damit signifikant höher als in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten ($P < 0,05$), was darauf hinweisen könnte, dass die CaMKII wesentlich an der ROS-vermittelten Kalziumüberladung beteiligt ist.

Die mit KB-R7943 superfundierten Wildtyp-Kardiomyozyten haben eine gemittelte Ratio von $0,52 \pm 0,02$ nach sechzehn Minuten gegenüber $0,49 \pm 0,01$ bei 0 Minuten. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Vergleicht man die nach sechzehn Minuten gemittelte Ratio der WT-Kardiomyozyten ($0,73 \pm 0,09$) mit den mit KB-R7943 behandelten Myozyten ($0,52 \pm 0,02$), erschließt sich hieraus eine signifikant geringere Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration bei letzteren ($P < 0,05$, WT vs. WT+KB-R7943). Somit konnte durch die Hemmung des NCX-Umkehrtransportmodus mittels KB-R7943 die intrazelluläre Kalziumakkumulation unter Radikaleinfluss nahezu vollständig verhindert werden. Damit scheint der NCX als wesentlicher Transporter für die zytosolische Kalziumüberladung verantwortlich zu sein.

Diese Ergebnisse legen außerdem nahe, dass eine zytosolische Natriumüberladung der Kalziumüberladung vorausgehen muss, denn der Umkehrtransportmodus des NCX kann nur dann aktiviert werden, wenn sich der elektrochemische Gradient für Natrium und/oder das Membranpotential deutlich verändern. Möglicherweise ist der reduzierte Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten auf den reduzierten Anstieg der Natriumkonzentration (siehe oben) zurückzuführen, obwohl direkte CaMKII-abhängige Effekte auf den NCX, den L-Typ-Kalziumkanal und den Ryanodin-Rezeptor nicht vollständig ausgeschlossen werden können.

Die zytosolische Kalziumüberladung hat vielfältige Auswirkungen für die Zelle. Unter anderem kann sie zu Arrhythmien führen. Ob die H₂O₂-induzierte arrhythmogene Aktivität ebenfalls über die CaMKII δ vermittelt wird, ist nun zu prüfen.

3.4 Der Einfluss der CaMKII δ auf die Entstehung von Arrhythmien unter oxidativem Stress

Um die Bedeutung der CaMKII δ für die Entstehung von Arrhythmien unter Radikaleinwirkung zu quantifizieren, wurden frisch isolierte unbeladene WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten 10 Minuten lang gegenüber 200 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ exponiert und über einen Zeitraum von maximal dreißig Minuten auf das Auftreten von Arrhythmien (siehe 1.6, S. 18-21) hin beobachtet. Dabei wurde die Sarkomerlänge kontinuierlich als Funktion der Zeit registriert.

3.4.1 Originalregistrierungen von Arrhythmien und Festlegung eines Arrhythmie-Scores

Insgesamt wurden 18 WT- und 21 CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten untersucht.

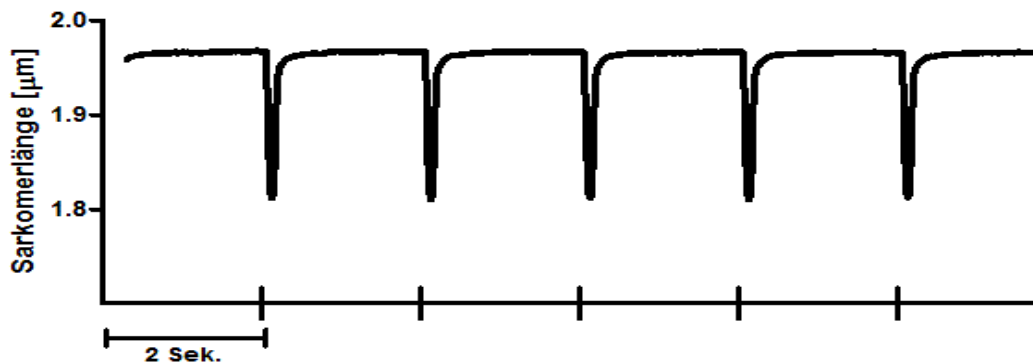


Abb.3.11 Originaldarstellung einer rhythmisch kontrahierenden Herzmuskelzelle

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz.

Abbildung 3.11 zeigt eine regelmäßig kontrahierende Herzmuskelzelle ohne Arrhythmien bei einer Grundstimulationsfrequenz von 0,5 Hz.

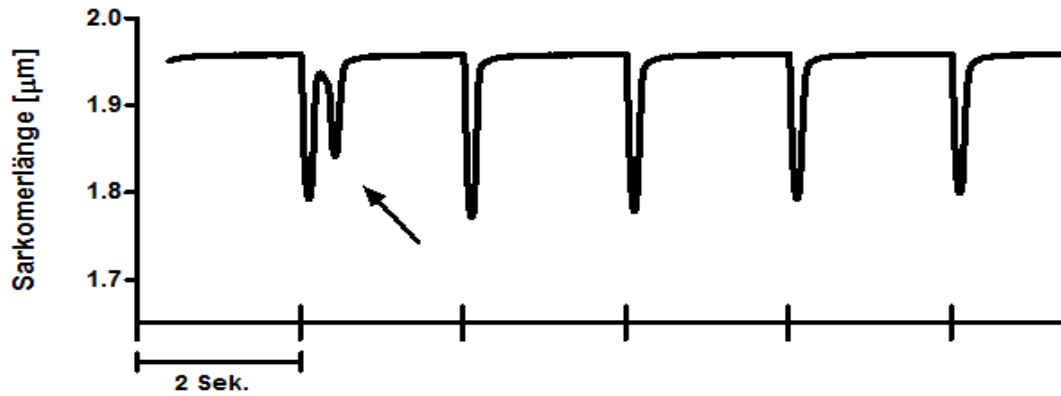


Abb.3.12 Originalregistrierung eines frühen nicht-stimulierten Ereignisses (ENSE)

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz. Pfeil deutet auf ein ENSE.

Frühe nicht-stimulierte Nachkontraktionen (ENSEs, „early non-stimulated events“) traten bei 7 von 18 Wildtyp- und bei 11 von 21 CaMKII δ ^{-/-}-Kardiomyozyten auf.



Abb.3.13 Originalregistrierung später nicht-stimulierter Ereignisse (DNSEs)

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche auf der unteren Achse zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz. Pfeile deuten auf DNSEs.

Späte nicht stimulierte Ereignisse (DNSEs, „delayed non-stimulated events“) zeigten sich bei insgesamt 15 von 18 Wildtyp-Herzmuskelzellen und bei 12 von 21 Herzmuskelzellen, bei denen die CaMKII δ ausgeschaltet wurde.

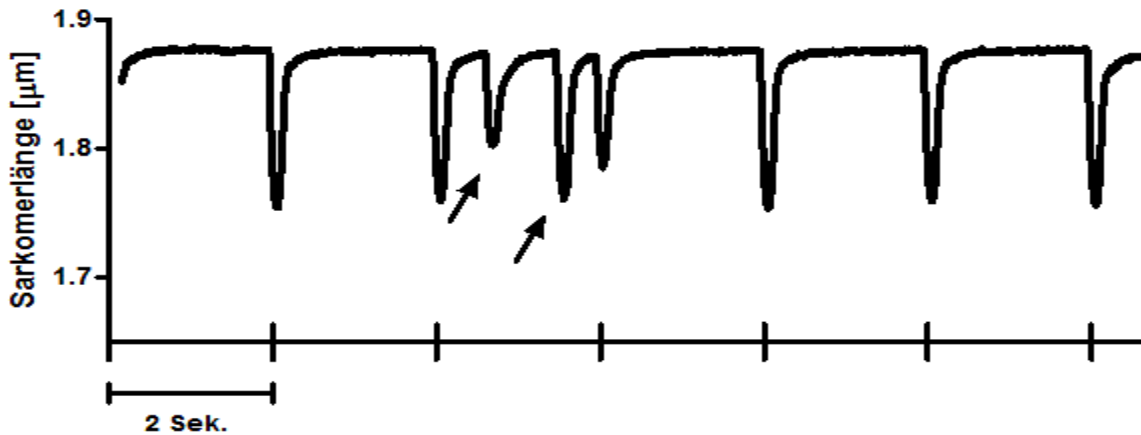


Abb.3.14 Originalregistrierung von doppelten DNSEs

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz. Pfeile deuten auf doppelte DNSEs.

Diese paarweise auftretenden späten Nachkontraktionen kamen bei 83,3% aller WT-Kardiomyozyten und nur bei 38,1% aller CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten vor.

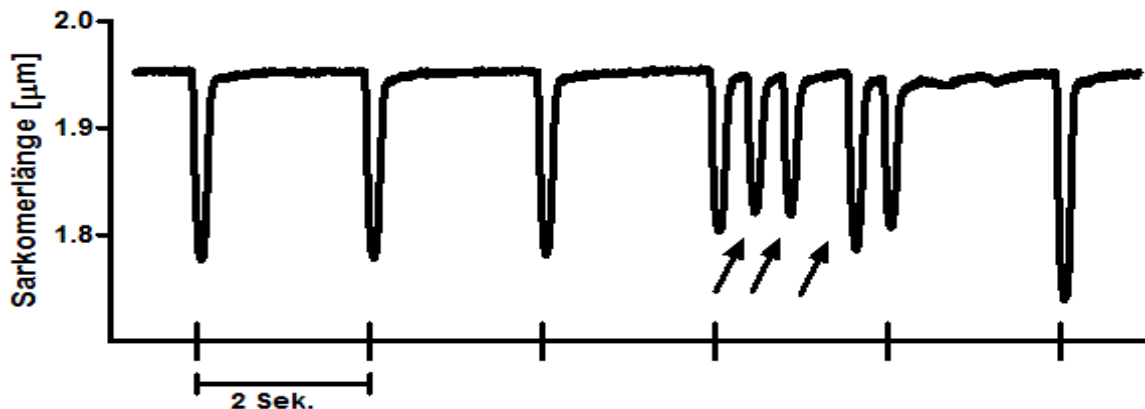


Abb.3.15 Originalabbildung von dreifachen DNSEs

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz. Pfeile deuten auf dreifache DNSEs.

Das Auftreten von drei aufeinanderfolgenden nicht-stimulierten Kontraktionen wird auch als dreifaches DNSE bezeichnet und konnte bei 6 von 18 WT - und bei 5 von 21 CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten beobachtet werden.

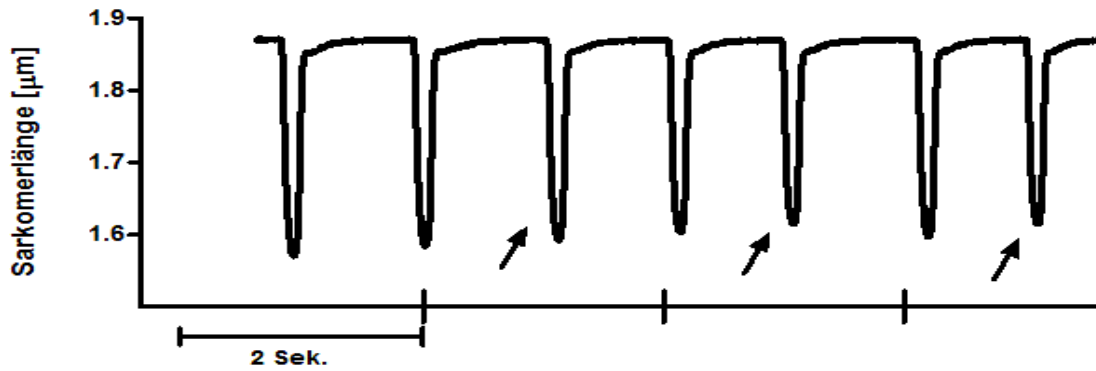


Abb.3.16 Bigeminusartige Rhythmusstörung dargestellt in einer Originalregistrierung

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz. Die Pfeile zeigen auf bigeminusartige Extrakontraktionen.

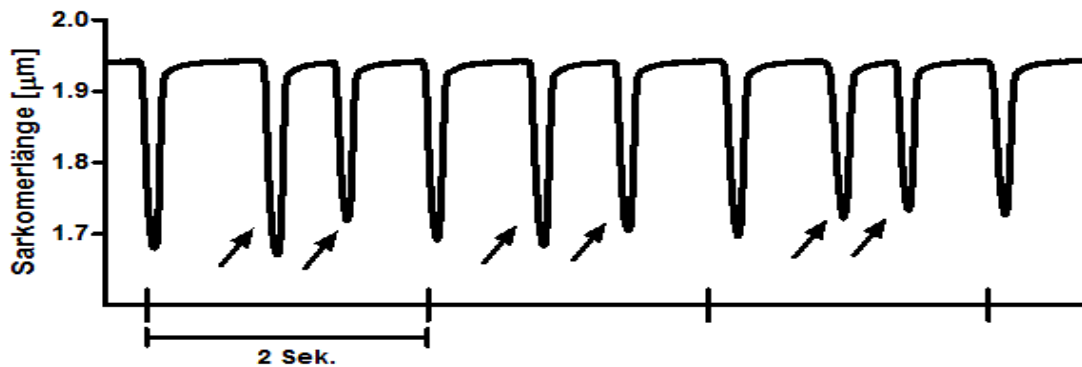


Abb.3.17 Originalregistrierung einer trigeminusartigen Rhythmusstörung

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz. Pfeile deuten auf trigeminusartige Extrakontraktionen.

Bei 33,3% der gemessenen WT-Kardiomyozten traten bigeminusartige Rhythmusstörungen, bei 16,7% trigeminusartige Rhythmusstörungen auf, während bigeminusartige Rhythmusstörungen nur bei 23,8% und trigeminusartige Rhythmusstörungen bei 14,3% der CaMKII $\delta^{-/-}$ -Herzmuskelzellen auftauchten.

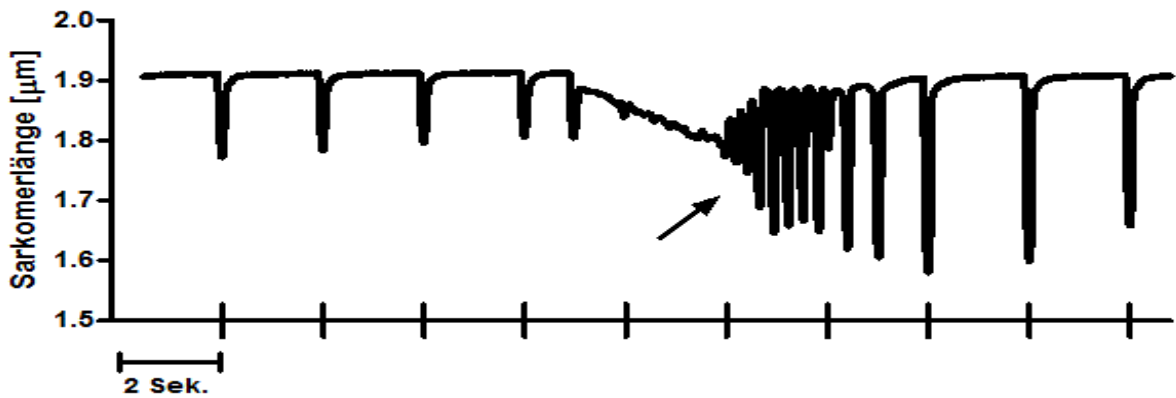


Abb.3.18 Originalregistrierung einer salvenartigen Rhythmusstörung nach Radikalexposition

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz. Der Pfeil zeigt auf eine salvenartige Rhythmusstörung.

Das Auftreten von mehr als drei bis zu zehn aufeinanderfolgenden nicht-stimulierten Kontraktionen, auch als salvenartige Rhythmusstörung bezeichnet, zeigte sich bei 8 von 16 Wildtyp- und bei 4 von 21 CaMKII $\delta^{-/-}$ -Myozyten.

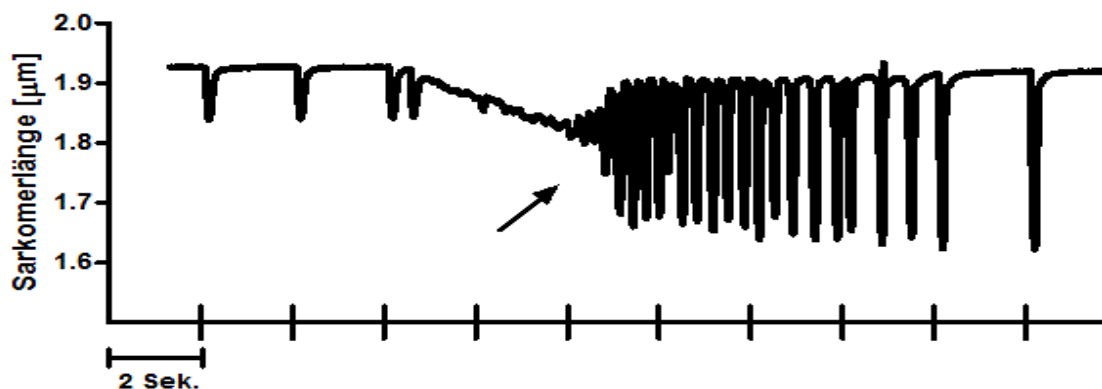


Abb.3.19 Originalabbildung einer nicht-anhaltenden zellulären Rhythmusstörung

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz. Der Pfeil deutet auf eine nicht-anhaltende zelluläre Rhythmusstörung.

Nicht-anhaltende zelluläre Rhythmusstörungen waren bei Kardiomyozyten, bei denen das Gen für die CaMKII δ ausgeschaltet ist, deutlich seltener zu beobachten (3 von 21) als bei Wildtyp-Myozyten (8 von 16).

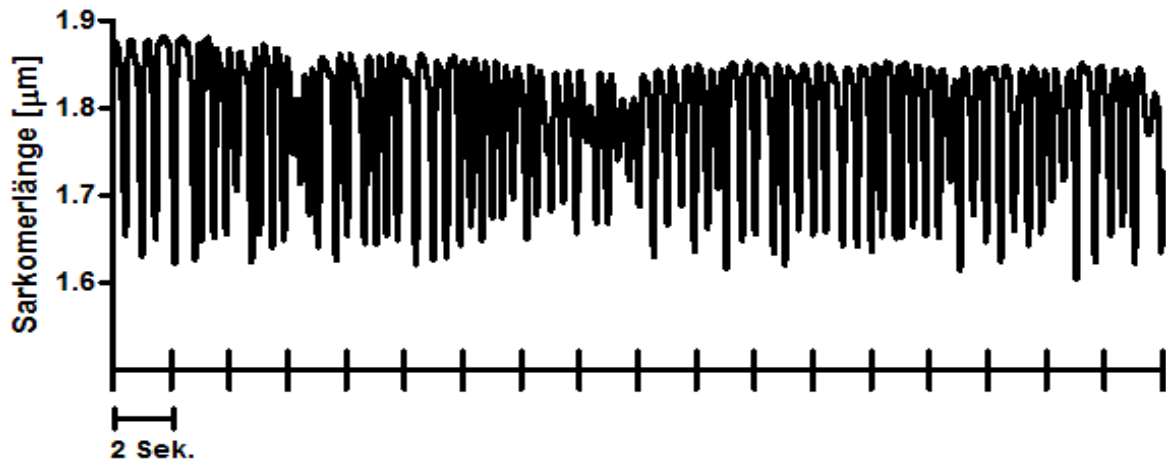


Abb.3.20 Originalregistrierung einer anhaltenden zellulären Rhythmusstörung

Dargestellt ist die Sarkomerlänge als Funktion der Zeit. Die in regelmäßigen Abständen aufgezeichneten kurzen vertikalen Striche zeigen die elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz.

Die schwerste Form aller beobachteten Arrhythmien stellt die anhaltende zelluläre Rhythmusstörung dar. Sie trat bei 55,5% aller WT-Kardiomyozyten und bei 42,9% aller CaMKII $\delta^{-/-}$ -Myozyten auf.

Um die unterschiedlichen Schweregrade verschiedener Arrhythmieformen in der Auswertung zu berücksichtigen, wurde ein Arrhythmie-Score verwendet. Dieser lehnt sich an den von Wu et al. (2002) verwendeten Score an (siehe 2.6). Dabei wurde für jeden Kardiomyozyten das Auftreten von einzelnen nicht-stimulierten Ereignissen mit einem Punkt, zwei oder drei aufeinanderfolgende nicht-stimulierte Ereignisse mit 2 Punkten, komplexere Arrhythmien wie bigeminusartige, trigeminusartige, salvenartige sowie nicht-anhaltende zelluläre Rhythmusstörungen mit 3 Punkten und die schwere anhaltende zelluläre Rhythmusstörung mit 4 Punkten bewertet. Dadurch konnte nach 30 Minuten ein Maximalscore von 10 Punkten pro Kardiomyozyt erreicht werden.

3.4.2 Arrhythmie-Score in WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten

Vergleicht man den gemittelten Arrhythmie-Score der WT-Kardiomyozyten mit dem von Kardiomyozyten mit ausgeschalteter CaMKII δ (siehe Abb.3.21), stellt man fest, dass die CaMKII $\delta^{-/-}$ -Herzmuskelzellen einen signifikant geringeren Arrhythmie-Score aufweisen ($P < 0,05$). Der gemittelte Arrhythmie-Score beträgt in den WT-Kardiomyozyten ($N=18$) $7,2 \pm 0,7$ versus $4,8 \pm 0,8$ in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten ($N=21$).

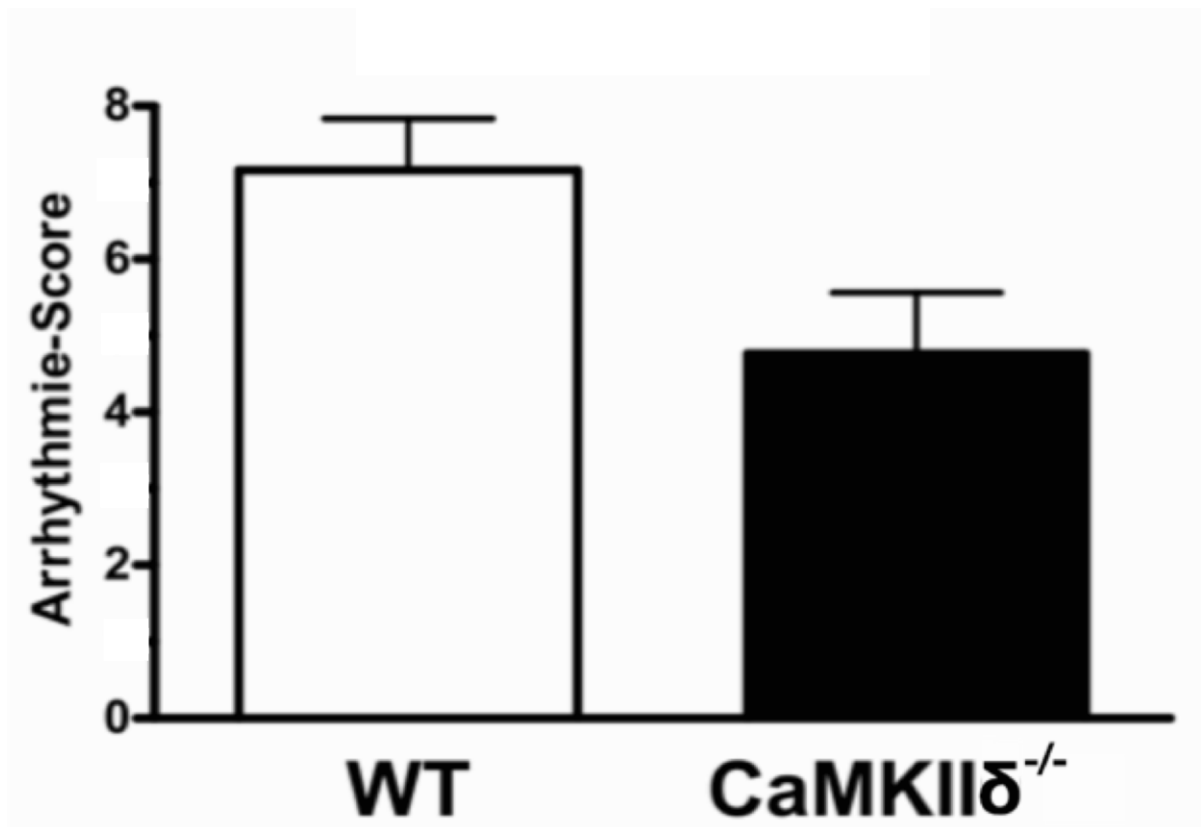


Abb.3.21 Arrhythmie-Score

Dargestellt ist der gemittelte Arrhythmie-Score aus 18 WT- versus 21 CaMKIIδ^{-/-}-Kardiomyozyten über einen Beobachtungszeitraum von maximal dreißig Minuten. In den ersten zehn Minuten wurden die Herzmuskelzellen mit H₂O₂ superfundiert. Die WT-Kardiomyozyten weisen gegenüber den CaMKIIδ^{-/-}-Kardiomyozyten einen signifikant höheren Arrhythmie-Score auf ($P < 0,05$, t-Test).

3.4.3 Normalisierter Arrhythmie-Score

Da der Zeitraum, in dem Arrhythmien auftreten können, bei den Zellen, die frühzeitig in Hyperkontraktur gehen, kürzer ist als bei den Zellen, die über die gesamten dreißig Minuten unter Beobachtung standen, wurde der Arrhythmie-Score auf die Beobachtungszeit normalisiert (Abb.3.22).

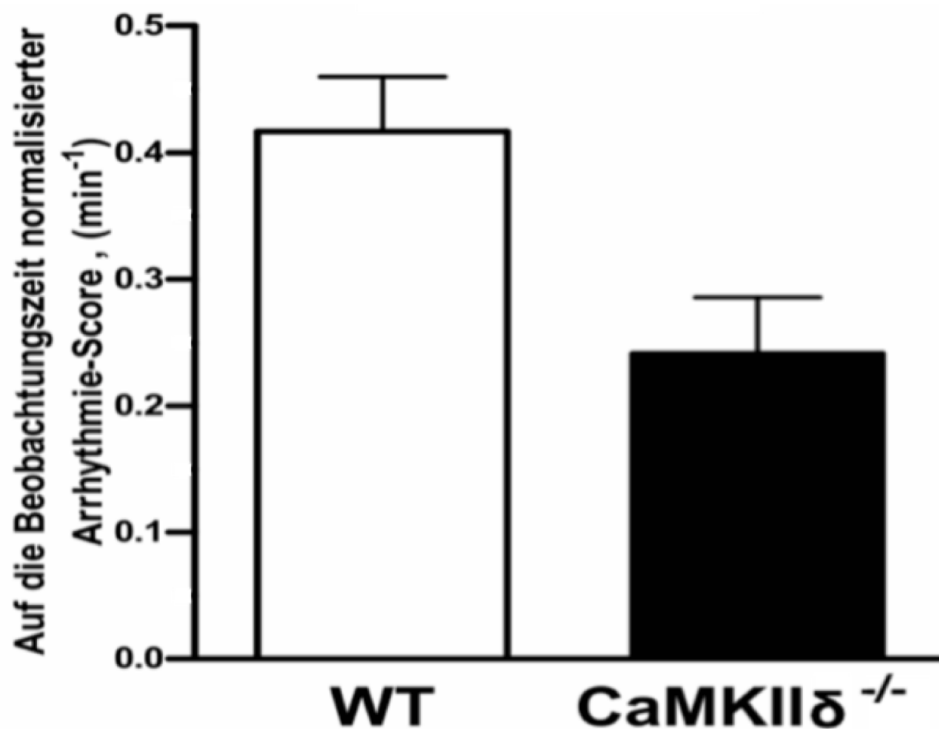


Abb.3.22 Auf die Beobachtungszeit normalisierter Arrhythmie-Score

Dargestellt ist der gemittelte normalisierte Arrhythmie-Score der WT (N=18) – und CaMKIIδ^{-/-} (N=21) – Kardiomyozyten unter Radikalexposition. Der Arrhythmie-Score/min ist unabhängig von der Beobachtungszeit jeder einzelnen Zelle. Hier zeigt sich noch eindrücklicher die im Vergleich zu den Wildtypkardiomyozyten deutlich geringere Arrhythmieneigung der CaMKIIδ^{-/-}-Kardiomyozyten ($P < 0,05$, *t*-Test).

Der normalisierte Arrhythmie-Score ist unabhängig von der Beobachtungszeit jeder einzelnen Zelle. Die normalisierten Werte verdeutlichen noch eindrücklicher die erhöhte Neigung zu Arrhythmien in WT-Kardiomyozyten ($P < 0,05$). In den CaMKIIδ^{-/-}-Herzmuskelzellen beträgt der normalisierte Arrhythmie-Score 0,24/min ± 0,05/min versus 0,42/min ± 0,04/min in den WT-Herzmuskelzellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch das Ausschalten der CaMKIIδ das Auftreten H₂O₂-induzierter Arrhythmien deutlich reduziert werden kann. Ob ein fehlendes CaMKIIδ-Gen letztendlich auch Überlebensvorteile bringt, soll nun untersucht werden.

3.5 Zytoprotektive Effekte des CaMKIIδ-knock-outs

Um zu überprüfen, ob CaMKIIδ^{-/-}-Zellen nach Radikaleinwirkung länger leben als Wildtyp-Kardiomyozyten, wurde der Überlebenszeitraum frisch isolierter ventrikulärer Zellen ausgewertet. Der Beobachtungszeitraum wurde auf maximal dreißig Minuten

festgelegt. Die Radikalsuperfusion war wie bei allen Versuchen auf die ersten zehn Minuten beschränkt.

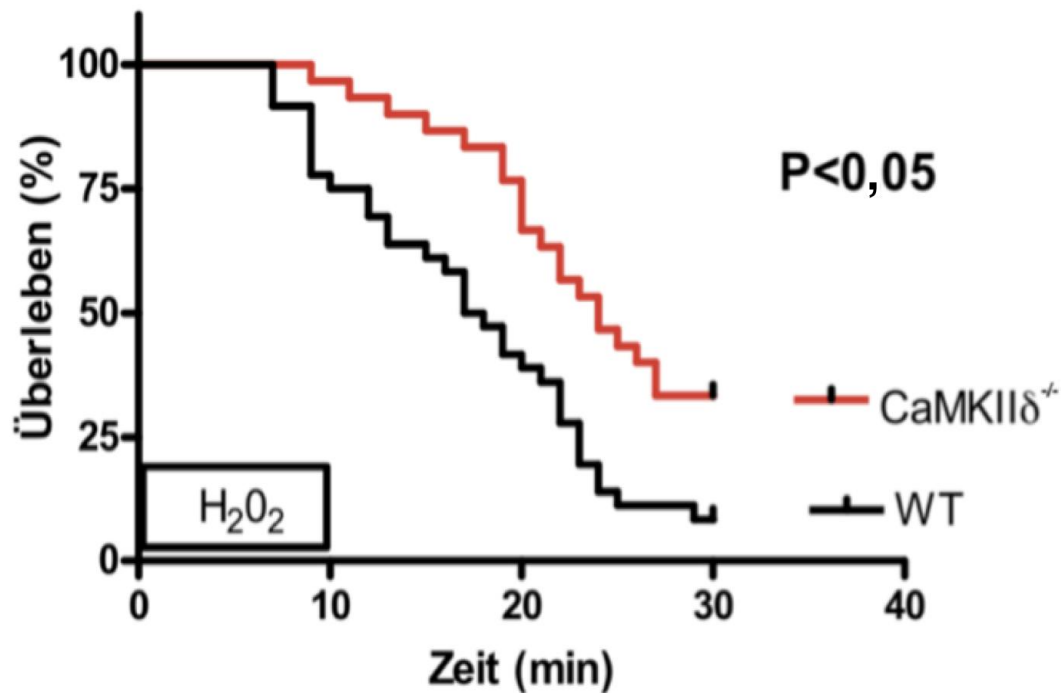


Abb.3.23 Kaplan-Meier-Survival-Kurve

Die Kaplan-Meier-Kurve stellt die Überlebenswahrscheinlichkeit als Funktion der Zeit dar. In den ersten zehn Minuten wurden die Zellen mit H₂O₂ superfundiert. Nach dreißig Minuten leben noch 33,3% der CaMKII $\delta^{-/-}$ (N=30) – versus 8,3% der WT (N=36) –Kardiomyozyten. (p<0,05, log-rank-Test).

Abbildung 3.23 zeigt das prozentuale Überleben der WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten als Funktion der Zeit, dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve. Nach dreißig Minuten sind noch 10 von insgesamt 30 ausgewerteten CaMKII $\delta^{-/-}$ -Zellen und nur noch 3 von insgesamt 36 Wildtyp-Zellen am Leben. Damit sind 67,7% der CaMKII $\delta^{-/-}$ -Zellen und 91,7% der WT-Zellen vor Ende des Beobachtungszeitraums beispielsweise durch Ausbildung einer Hyperkontraktur in den Zelltod gegangen.

Das mediane Überleben der Herzmuskelzellen der CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäuse beträgt damit 24 Minuten versus 17,5 Minuten bei den Wildtyp-Kardiomyozyten.

Insgesamt sind die Überlebenskurven signifikant verschieden (p<0,05), so dass das Ausschalten der CaMKII δ unter Radikaleinfluss tatsächlich zu Überlebensvorteilen führt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase II δ für die sauerstoffradikalvermittelte Toxizität in Herzmuskelzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein der CaMKII δ eine wichtige Voraussetzung für die unter Radikalexposition beobachtete Natrium- und Kalziumüberladung in Kardiomyozyten ist. Durch Ausschalten des CaMKII δ -Gens kommt es zur dramatischen Verzögerung der zytosolischen Natrium- und Kalziumüberladung. Mehr noch, die Entwicklung der zellulären Hyperkontraktur tritt erst deutlich verzögert auf. Ursache der zytosolischen Kalziumakkumulation ist dabei eine zelluläre Natriumüberladung, die über den sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauscher zum vermehrten Kalziumeinstrom und/oder verminderten Kalziumausstrom führt. Des Weiteren scheint die CaMKII δ an der Vermittlung von ROS-induzierten Nachdepolarisationen beteiligt zu sein. CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten entwickeln unter ROS-Exposition signifikant weniger Arrhythmien als Wildtyp-Kardiomyozyten und zeichnen sich letztendlich durch ein längeres Überleben aus.

4.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Dass Reaktive Sauerstoffspezies, die in dieser Arbeit untersucht wurden, in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle spielen, ist bereits seit vielen Jahren bekannt. Insbesondere werden im Rahmen einer Ischämie und auch in der Reperusionsphase vermehrt Reaktive Sauerstoffspezies gebildet (Mallat et al. 1998), die morphologisch zu linksventrikulärem Remodeling (Josephson et al. 1991) und klinisch zu einer Progression der Herzinsuffizienz führen. In der Zwischenzeit wurden zahlreiche Arbeiten über die ROS-Effekte auf einzelne Kardiomyozyten veröffentlicht. Dabei konnten veränderte Ionenkanalfunktionen mit konsekutiv gestörter Ionenhomöostase beobachtet werden. Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, die nach Exposition von Kardiomyozyten mit Reaktiven Sauerstoffspezies beobachtet wurden, im Einzelnen diskutiert werden.

4.2 ROS-Effekte auf den Natriumkanal

Es ist schon aus früheren Arbeiten bekannt, dass in insuffizienten Herzmuskelzellen der späte Natriumstrom deutlich verstärkt ausgeprägt ist (Valdivia et al. 2005), was mit einer verlängerten Aktionspotentialdauer und Nachdepolarisationen einhergehen

und zu lebensbedrohlichen Arrhythmien führen kann. Eine mögliche Erklärung dafür konnten Ma et al. 2005, Song et al. 2006 und Ward und Giles 1997 geben. Sie sowie auch unsere Arbeitsgruppe (Wagner et al. 2011) konnten zeigen, dass die im Rahmen der Herzinsuffizienz vermehrt gebildeten Reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Erhöhung des späten Natriumstroms führen. Der genau zugrunde liegende Mechanismus konnte allerdings bisher nicht genau eruiert werden. Möglicherweise spielen Veränderungen an der Lipidmembran (Fukuda et al. 2005) oder die Oxidation von verschiedenen Methioninresten am Natriumkanal (Kassmann et al. 2008) eine Rolle. Da Sauerstoffradikale eine extrem kurze Lebenshalbwertszeit haben, werden viele ihrer Einflüsse auf Enzyme, Transporter und Kanäle nicht durch direkte Oxidation derselben, sondern durch Aktivierung von Kinasen oder Inhibition von Phosphatasen vermittelt. Auch Natriumkanäle können durch redox-abhängige Aktivierung von Proteinkinasen reguliert werden. So kann die Proteinkinase A durch Oxidation der regulatorische Untereinheit I aktiviert werden (Brennan et al. 2006) und $\text{Na}_v1.5$ phosphorylieren, was zu einem gesteigerten Trafficking des Natriumkanals vom Golgi-Apparat zum Sarkolemm und konsekutiv zu einer erhöhten Natriumstromdichte (Hallaq et al. 2006), nicht aber zu einem veränderten Öffnungsverhalten des Natriumkanals (Frohnwieser et al. 1997) führt. Dahingegen konnte vor kurzem gezeigt werden, dass aus Mitochondrien stammende Reaktive Sauerstoffspezies zu einer Reduktion der Natriumstromdichte beitragen können, was mit schweren Arrhythmien einhergeht (Liu et al. 2010). Ursächlich dafür könnte eine Aktivierung der Proteinkinase C durch eine Erhöhung von zytosolischem NADH sein. Die aktivierte Proteinkinase C führt durch Phosphorylierung von Serin 1505 im Linker zwischen Domäne III und IV des kardialen Natriumkanals zu einer Abnahme des Natriumsstroms (Qu et al. 1996). Gopalakrishna und Anderson konnten bereits 1989 zeigen, dass milder oxidativer Stress die Proteinkinase C durch selektive Oxidation der regulatorischen Domäne aktivieren kann. Bei vermehrtem oxidativem Stress kommt es allerdings durch zusätzliche Oxidation der katalytischen Domäne zu einer irreversiblen Inaktivierung dieses Enzyms. Interessanterweise ist damit weder für die Proteinkinase A noch für die Proteinkinase C bisher ein eindeutiger Mechanismus bekannt, der ROS-abhängig direkt das Öffnungsverhalten von kardialen Natriumkanälen verändert (Wagner et al. 2012).

Dass der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II bei der Regulation der Kanalfunktion kardialer spannungsabhängiger Natriumkanäle eine Bedeutung

zukommt, vermuteten Deschênes et al. bereits 2002. Durch Verwendung von KN-93, einem Inhibitor der CaMKII, konnten sie das Öffnungsverhalten des Natriumkanals beeinflussen, der späte Natriumstrom wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Tan et al. konnten ebenfalls 2002 zeigen, dass durch Bindung von durch Kalzium aktiviertes Calmodulin an den Carboxy-Terminus der α -Einheit des Natriumkanals die schnelle Inaktivierung dieses Kanals verlangsamt und die intermediäre Inaktivierung verstärkt wird. Einige Jahre später jedoch waren es Wagner et al. (2006) aus unserer Arbeitsgruppe, die erstmals direkt zeigen konnten, dass die CaMKII das Öffnungsverhalten des kardialen Natriumkanals beeinflussen kann, was mit lebensbedrohlichen Arrhythmien im Mausmodell einhergeht. Neben einer beschleunigten intermediären Inaktivierung, einer verzögerten Erholung nach Inaktivierung und einer reduzierten Natriumkanalverfügbarkeit konnten sie u.a. zeigen, dass die CaMKII den späten Natriumeinstrom verstärkt. Dabei wurde durch Co-Immunopräzipitation eine Assoziation zwischen der CaMKII und dem kardialen Natriumkanal und mittels indirekter Nachweisverfahren eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung von $\text{Na}_v1.5$ nachgewiesen. Kürzlich beschrieben Hund et al. (2010) eine CaMKII-abhängige Natriumkanalphosphorylierung an Serin 571 im Linker zwischen Domäne I und II, welche entscheidend für die CaMKII-abhängige Regulation des Öffnungsverhaltens ist. In dieser Arbeit wurden jedoch nicht alle Veränderungen des Öffnungsverhaltens und insbesondere nicht die Verstärkung des späten Natriumstroms untersucht, so dass unklar bleibt, ob Serin 571 die entscheidende Phosphorylierungsstelle ist, welche die Veränderungen des späten Natriumstroms vermittelt. Neben der möglichen Phosphorylierung des Natriumkanals, könnten unabhängig davon auch noch andere Mechanismen in Frage kommen, wie z.B. eine Beeinflussung der Interaktion zwischen den α - oder β -Untereinheiten des Natriumkanals (Maltsev et al. 2009), die CaMKII-abhängig zur Zunahme des späten Natriumstroms führen könnten.

Die Tatsache, dass die CaMKII durch Reaktive Sauerstoffspezies aktiviert werden kann, ist erst seit wenigen Jahren bekannt (Erickson et al. 2008) und konnte vor kurzem durch unsere Arbeitsgruppe bestätigt werden (Wagner et al. 2011). Unklar war bisher jedoch, welche physiologische oder pathophysiologische Bedeutung dieser Aktivierungsmechanismus besitzt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die oxidierte CaMKII auch eine Rolle bei der Sinusknotendysfunktion spielen könnte (Gao et al. 2011).

Dass die oxidierte CaMKII auch für die Regulation des späten Natriumstroms von Bedeutung sein könnte, wurde erstmals von Wagner et al. 2011 gezeigt. In CaMKII δ -überexprimierten Herzmuskelzellen konnte nach Exposition mit 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 im Vergleich zu Wildtyp-Kardiomyozyten ein deutlich gesteigerter später Natriumstrom gemessen werden. Dieser Effekt war durch pharmakologische Hemmung der CaMKII δ reversibel (Wagner et al. 2011). Die H_2O_2 -Exposition führte dabei zu einer signifikanten Steigerung des Anteils oxidiertes CaMKII an der gesamten CaMKII. Interessanterweise war in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten die H_2O_2 -induzierte Steigerung des späten Natriumstroms nicht mehr nachweisbar, was klar darauf hinweist, dass die CaMKII für die ROS-induzierte Natriumkanalregulation von entscheidender Bedeutung ist. Dabei ist der genaue Mechanismus, wie die oxidierte CaMKII zu einer Steigerung des späten Natriumstroms führen kann, noch nicht bekannt. Vermutlich spielt jedoch die oben beschriebene Phosphorylierungsstelle (Serin 571) eine wichtige Rolle. Da der Natriumkanal ein Multiprotein-Komplex ist, könnte es jedoch auch sein, dass ein wichtiges Regulatorprotein (z.B. die β_1 -Untereinheit) von der oxidierten CaMKII beeinflusst wird, was dann in der Folge zur Steigerung des späten Natriumstroms führt.

4.3 Die Bedeutung von Sauerstoffradikalen für die zytosolische Natriumkonzentration in Kardiomyozyten

Die intrazelluläre Natriumkonzentration in Kardiomyozyten wird unter physiologischen Bedingungen durch ein Gleichgewicht zwischen Natriumeinstrom und -ausstrom aufrechterhalten (Bers et al. 2003). Insgesamt gibt es sechs verschiedene sarkolemmale Kanäle bzw. Transporter, die zu einem Natriumeinstrom in die Zelle führen. Dazu gehört der spannungsabhängige TTX-sensitive Na^+ -Kanal, der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), der Na^+/H^+ - bzw. der $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher, sowie der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ - und der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter. Neben diesen sarkolemmalen Transportmechanismen weisen Mitochondrien $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter und Na^+/H^+ -Austauscher auf und können damit, wenn auch nur zu einem sehr geringen Anteil, ebenfalls zu einem zytosolischen Natriumeinstrom beitragen. Unter physiologischen Bedingungen ist hauptsächlich der Na^+ -Kanal und der sarkolemmale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher für den Natriumeinstrom und die Na^+/K^+ -ATPase für die Natriumextrusion aus der Zelle verantwortlich (Bers et al. 2003). Der NCX kann durch Umkehr seiner Transportrichtung ebenfalls Natrium aus der Zelle

transportieren. Insgesamt kommt es allerdings unter physiologischen Bedingungen zu einem Netto-Natriumeinwärtstransport über den NCX während eines Erregungs-Kontraktionszyklus (Bers 2003).

In Myozyten insuffizienter Herzen ist die zytosolische Natriumkonzentration erhöht (Despa et al. 2002). Dies kann durch ein Ungleichgewicht zwischen Natriumeinstrom und -ausstrom erklärt werden, das entweder durch eine verminderte Natriumextrusion (durch eine verminderte Funktion der Na^+/K^+ -ATPase) oder durch einen gesteigerten Natriumtransport in die Zelle (über einen der oben genannten Transportmechanismen) zustande kommt. Bisher sind verschiedene Arbeiten mit unterschiedlichen Erklärungen für die Natriumüberladung insuffizienter Myozyten veröffentlicht worden. Shattock und Matsuura konnten 1993 zeigen, dass Reaktive Sauerstoffspezies die Funktion der Na^+/K^+ -ATPase hemmen. Dagegen konnten Despa et al. 2002 einen verstärkten TTX-sensitiven Natriumstrom als Ursache für die erhöhte Natriumkonzentration in Myozyten insuffizienter Herzen identifizieren, während die Funktion der Na^+/K^+ -ATPase in diesen Myozyten unverändert war. Wagner et al. konnten 2011 nachweisen, dass genau dieser TTX-sensitive Natriumeinstrom auch in Wildtyp-Kardiomyozyten nach Exposition mit Reaktiven Sauerstoffspezies stark erhöht ist und zu einem Anstieg der zytosolischen Natriumkonzentration führt, was durch Hemmung des späten Natriumstroms mittels Ranolazin verhindert werden konnte. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die bei der Herzinsuffizienz vermehrt gebildeten Reaktiven Sauerstoffspezies (Mallat et al. 1998) zu einer Verstärkung des späten Natriumstroms führen (Ma et al. 2005, Song et al. 2006, Wagner et al. 2011 und Ward und Giles 1997) und dieser für die Natriumüberladung insuffizienter Kardiomyozyten verantwortlich sein könnte. Mit Hilfe von Computerstimulationsprogrammen konnte allerdings berechnet werden, dass ein verstärkter späten Natriumstrom alleine die erhöhte Natriumkonzentration nicht erklären kann (Wagner et al. 2011). Dies konnte nur durch eine zusätzlich eingeschränkte Natriumelimination beispielsweise eine reduzierte Funktion der Natrium-Kalium-ATPase erreicht werden (Wagner et al. 2011).

Der NCX, der in der Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert wird (Hasenfuss et al. 1999, Studer et al. 1994), kann grundsätzlich auch zu einem Natriumeinstrom beitragen. Allerdings arbeitet der Austauscher im insuffizienten Herzen hauptsächlich

im Umkehrtransportmodus, so dass er sogar für eine Natriumelimination sorgt (Despa et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass die CaMKII δ wesentlich an der Vermittlung der ROS-induzierten zytosolischen Natriumüberladung beteiligt ist.

CaMKII δ_c -überexprimierte Kaninchenkardiomyozyten weisen unter Ruhebedingungen einen signifikant höheren Natriumeinwärtsstrom auf. Interessanterweise ist auch die intrazelluläre Natriumkonzentration im Vergleich zu Wildtyp-Kardiomyozyten höher, was bereits auf einen möglichen ursächlichen Zusammenhang hindeuten könnte (Wagner et al. 2006 und 2011). Nach Radikalexposition zeigen CaMKII δ_c -überexprimierte Myozyten eine weitere Zunahme des späten Natriumstroms sowie ein Anstieg der zytosolischen Natriumkonzentration, aber auch in Wildtyp-Kaninchenkardiomyozyten geht die Exposition mit einer Erhöhung des späten Natriumstroms und der Natriumkonzentration einher. Dieser Anstieg des zytosolischen Natriums konnte durch Blockierung des späten Natriumstroms mittels TTX verhindert werden (Wagner et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das Ausschalten der CaMKII δ zu einem signifikant verzögerten radikalinduzierten Anstieg der zytosolischen Natriumkonzentration führt. Dagegen zeigte sich vor Radikalexposition kein Unterschied in der Natriumkonzentration von Wildtyp- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Zellen, was gegen eine entscheidende Bedeutung der CaMKII δ für die Regulation der Natriumhomöostase unter Basalbedingungen spricht.

Das Fehlen der CaMKII δ konnte den Anstieg des Natriums allerdings nicht komplett verhindern, so dass die Verstärkung des späten Natriumstroms vermutlich nicht als einziger Mechanismus für die Zunahme der zytosolischen Natriumkonzentration verantwortlich ist, was mit den Ergebnissen aus der Computerstimulation (siehe oben) vereinbar ist. Interessanterweise hemmen ROS auch die Natrium-Kalium-ATPase und verhindern damit die Elimination von Natriumionen, was ebenfalls zu einer Natriumakkumulation führen könnte. Da der genaue Mechanismus der ROS-abhängigen Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase nicht bekannt ist, könnte dieser CaMKII-unabhängig sein. Des Weiteren wurde von Sabri et al. 1998 die Beobachtung gemacht, dass auch der Na⁺/H⁺-Austauscher durch ROS aktiviert werden kann und damit neben der ROS-abhängigen Hemmung der Natrium-Kalium-

ATPase für den Anstieg der Natriumkonzentration in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten mitverantwortlich sein könnte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ROS, die im Rahmen der Herzinsuffizienz vermehrt gebildet werden, insbesondere durch die Aktivierung der CaMKII δ zu einem Natriumeinstrom via Natriumkanal und zytosolischer Natriumüberladung führen.

4.4 Auswirkungen einer Radikal-Exposition auf die zytosolische Kalziumkonzentration

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Indo-1-Fluoreszenz semiquantitativ gezeigt werden, dass Reaktive Sauerstoffspezies in Wildtyp-Kardiomyozyten zu einer Zunahme der diastolischen Kalziumkonzentration führen. Dies geht einher mit Haigney et al. 1992, die schon damals eine ROS-induzierte Kalziumüberladung nachweisen konnten. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Reaktive Sauerstoffspezies die Eigenschaften verschiedener Kalziumkanäle, -pumpen oder -transporter verändern und damit die zytosolische Kalziumhomöostase beeinflussen. An Quellen für die erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration kämen grundsätzlich folgende Mechanismen in Frage. Zum Einen könnte ein vermehrter Kalziumeinstrom über spannungsabhängige L-Typ-Ca²⁺-Kanäle oder auch über den RyR2 dafür verantwortlich sein. Andererseits könnte aber auch eine reduzierte Funktion der SR-Ca²⁺-ATPase bzw. des NCX zu einer verminderten Elimination von Kalzium aus dem Zytosol und damit zu einer Kalziumakkumulation führen. Daneben könnte auch eine verminderte Aktivität von sarkolemmalen Kalziumpumpen oder mitochondrialen Uniportern in Frage kommen, was aber nicht sehr wahrscheinlich ist, da sie nur zu einem sehr geringen Anteil zur Kalziumelimination aus dem Zytosol beitragen (Bers 2001). Von einigen Transportmechanismen ist bekannt, dass sie durch ROS beeinflusst werden. Der Einfluss von Reaktiven Sauerstoffspezies auf den L-Typ-Kalziumkanalstrom ist bislang noch umstritten. Während Campbell et al. 1996 eine ROS-induzierte Zunahme des L-Typ-Ca²⁺-Stroms nachweisen konnten, konnten Goldhaber und Liu 1994 eine Abnahme desselben unter ROS-Exposition feststellen. Demgegenüber ist allgemein akzeptiert, dass Reaktive Sauerstoffspezies die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ryanodin-Rezeptoren steigern können (Xu L et al. 1998). Dabei nimmt unter H₂O₂ insbesondere die Rate an spontanen diastolischen Kalziumfreisetzungen zu, was zu einer Verminderung des SR-Kalziumgehaltes beiträgt. Des Weiteren wird die SERCA-Aktivität durch ROS reduziert (Xu KY et al.

1997). Dadurch wird weniger Kalzium in der Diastole zurück ins SR gepumpt, was zusätzlich zu den spontanen diastolischen Kalziumentladungen über den Ryanodin-Rezeptor zu einer SR-Kalziumdepletion, zu einem diastolischen Kalziumkonzentrationsanstieg und zu Kontraktilitätsstörungen beitragen kann. Die in den vorliegenden Experimenten beobachteten zunehmenden Kalziumtransienten durch gesteigerte systolische Kalziumfreisetzungen sprechen jedoch gegen einen deutlichen SERCA-inhibitorischen Effekt zumindest in den ersten Minuten der ROS-Exposition.

Undrovins et al. konnten 2010 zeigen, dass der späte Natriumstrom für die erhöhte diastolische Kalziumkonzentration in Kardiomyozyten chronisch insuffizienter Herzen verantwortlich ist. Nach bisherigen Erkenntnissen geht man davon aus, dass der Anstieg der zytosolischen Natriumkonzentration unter ROS-Einfluss zeitlich gesehen der Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration vorausgeht bzw. die Kalziumüberladung eine Folge der Natriumüberladung darstellt. Hinweise hierfür lieferten Haigney et al., die 1994 durch Reduktion des extrazellulären Natriums oder durch Hemmung von Natriumkanälen eine Verzögerung des Kalziumanstiegs unter hypoxischen Bedingungen erreichen konnten sowie auch Song et al., welche 2006 durch eine Blockade des späten Natriumstroms die ROS-induzierte zytosolische Natrium- und Kalziumakkumulation verzögern konnten. Die zytosolische Kalziumakkumulation wird dabei vermutlich durch den Natrium-Kalzium-Austauscher vermittelt (Haigney et al. 1992, Ladilov et al. 1999), der im insuffizienten Herzen vermehrt exprimiert wird (Hasenfuss et al. 1999, Studer et al. 1994). Wagner et al. konnten 2003 zeigen, dass eine gesteigerte NCX-Expression mit einer vermehrten Empfindlichkeit gegenüber ROS-induzierter Zellschäden einhergeht. Bei zytosolischer Natriumakkumulation verändert sich das elektrochemische Gleichgewichtspotential der Zellen. Der NCX transportiert durch das hohe zytosolische Natrium in reduziertem Ausmaß Kalzium aus der Zelle (reduzierter Vorwärtsmodus) und/oder arbeitet im sogenannten Umkehrtransportmodus, was letztendlich sogar zu einem Kalziumeinstrom führt (Haigney et al. 1992).

Für eine Umkehr der Transportrichtung des NCX als wesentlicher Mechanismus für die zytosolische Kalziumüberladung spricht, dass die in meinen Experimenten durchgeführte selektive Hemmung dieses Umkehrmodus mittels KB-R7943 (Iwamoto et al. 1996, Watano et al. 1996) vor einer ROS-induzierten diastolischen Kalziumüberladung in Wildtyp-Kardiomyozyten schützt. Diese Ergebnisse gehen

einher mit Ladilov et al. (1999). Trotz dieser beobachteten protektiven Effekte von KB-R7943 wurde die Selektivität dieses Inhibitors bezüglich des Umkehrtransportmodus des NCX von Reuter et al. 2002 in Frage gestellt. Bis dato gibt es allerdings keine Hinweise dafür, dass KB-R7943 als Radikalfänger fungiert und damit die protektiven Effekte unter H_2O_2 erklärt werden könnten. Allerdings ist bekannt, dass das als Lösungsmittel für KB-R7943 verwendete Dimethylsulfoxid (DMSO) geringe Radikalfängereigenschaften (Koulkes-Pujo et al. 1981) besitzt. Dieser Umstand kann jedoch für die Hemmung des ROS-induzierten Kalziumanstiegs in meinen Experimenten nicht in Frage kommen, da sich auch in der Kontrolllösung die gleiche Menge DMSO befand.

Vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, dass Reaktive Sauerstoffspezies auch direkt die NCX-Aktivität beeinflussen können (Soliman et al. 2009, Goldhaber 1996). So führt H_2O_2 selbst zu einer irreversiblen Erhöhung der Umkehrmodus-Aktivität des kardialen NCX (Soliman et al. 2009).

Auch die CaMKII spielt bei der Regulation des zytosolischen Kalziums eine wichtige Rolle. So führt eine chronische Überexpression, wie sie bei der Herzinsuffizienz zu finden ist, zu einer Phosphorylierung des RyR2 und damit zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit mit konsekutiv vermindertem SR- Ca^{2+} -Gehalt (Witcher et al. 1991, Maier et al. 2003). Der L-Typ-Kalziumeinstrom zeigt sich in CaMKII-überexprimierten Mäusen verstärkt, was durch Hemmung der CaMKII aufgehoben werden kann (Maier et al. 2003). Ebenso ist in diesen Mäusen die SERCA2-Expression vermindert und die NCX-Expression erhöht, wodurch der SR- Ca^{2+} -Gehalt bzw. das für die Systole zur Verfügung stehende Kalzium noch weiter reduziert wird (Maier et al. 2003). Dies geht mit verminderten systolischen Kalziumtransienten bzw. einer systolischen Dysfunktion einher.

Dass die CaMKII auch für die ROS-induzierte Kalziumüberladung entscheidend ist, konnte in der vorliegenden Arbeit elegant gezeigt werden. Während die zytosolische Kalziumkonzentration in Wildtyp-Kardiomyozyten unter H_2O_2 -Einfluss signifikant anstieg, war dieser Anstieg in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten stark verzögert. Dennoch ist zu ergänzen, dass die in Wildtyp-Kardiomyozyten unter ROS-Exposition beobachteten verstärkten Kalziumtransienten teilweise auch bei den mit KB-R7943 behandelten Wildtyp-Kardiomyozyten und in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Myozyten zu sehen waren, was spekulieren lässt, dass geringe Mengen an Kalzium weder über den NCX noch über die CaMKII δ -vermittelt in die Zelle gelangen und zumindest zeitweise

für eine bessere Kontraktionskraft sorgen. Denkbar wäre hierfür beispielsweise die oben beschriebene direkte Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR durch eine direkte ROS-induzierte Oxidation desselben (Xu L et al. 1998) oder aber auch eine indirekte Zunahme der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR durch eine oxidierte Proteinkinase A (Wagner et al. 2012). Möglicherweise könnte eine nicht adäquat erhöhte oder sogar eine im Verlauf durch ROS reduzierte Aktivität der SERCA (Xu KY et al. 1997) den gering nachweisbaren Anstieg der Kalziumkonzentration in den CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten und den WT-Zellen in Anwesenheit von KB-R7943 erklären. Außerdem ist zu beachten, dass intrazelluläres Kalzium und Natrium in der Zelle in Kompartimenten verteilt ist (Maier et al. 1997). Daher repräsentieren die über den Kardiomyozyten gemessenen Fluoreszenzratios vermutlich nicht exakt das Ausmaß der zytosolischen Kalziumüberladung, sondern implizieren zu einem kleinen Teil auch das durch die hohe zytosolische Kalziumkonzentration in die Mitochondrien langsam einströmende Kalzium. Des Weiteren ist in diesem Zusammenhang auch das Konzept des sogenannten „Fuzzy Space“ zu erwähnen. Es wurde erstmals von Leblanc und Hume 1990 beschrieben. Die beiden Wissenschaftler konnten experimentell zeigen, dass ein lokaler Einstrom von Natrium durch spannungsgesteuerte Na⁺-Kanäle zu einem ausreichenden lokalen Natriumanstieg führt, der durch eine Umkehr der Transportrichtung des Natrium-Kalzium-Austauschers einen Kalziumeinstrom erzeugen und konsekutiv eine Freisetzung von Kalzium auf dem SR hervorrufen kann, ohne dass sich dafür die gesamten sarkoplasmatischen Ionenkonzentrationen verändern müssen. Die Ionenveränderungen spielen sich also in subsarkolemmalen Mikrodomänen („Fuzzy Space“) ab, die sowohl spannungsgesteuerte Natriumkanäle als auch Natrium-Kalzium-Austauscher miteinschließen und sich jeweils durch eine eingeschränkte Diffusion auszeichnen. In diesem subsarkolemmalen Raum können deshalb kleine Natriumkonzentrationsveränderungen, die durch das Epifluoreszenzmikroskop nicht erfasst werden können, den Kalziumeinstrom und –ausstrom und somit die Kalziumbeladung viel unmittelbarer beeinflussen als durch Veränderungen des gesamten zytosolischen Kalziums.

4.5 ROS-Effekte auf die Arrhythmogenese

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufene arrhythmogene Ereignisse in Kardiomyozyten, in

denen das Gen für die CaMKII δ ausgeschaltet ist, signifikant weniger häufig auftreten als in Wildtyp-Kardiomyozyten. Diese Ergebnisse sind mit Anderson et al. 1998 und Wu et al. 2002 vereinbar, die durch Hemmung der CaMKII eine Abnahme der Arrhythmiehäufigkeit feststellten. Trotzdem konnte auch in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäusen eine gewisse Arrhythmogenität beobachtet werden, die nicht durch die aktivierte CaMKII δ erklärbar sind. Mögliche Trigger für elektrische Instabilität und das Auftreten von schweren Arrhythmien sind frühe und späte Nachdepolarisationen. Frühe Nachdepolarisationen werden vorrangig durch L-Typ-Ca $^{2+}$ -Ströme vermittelt. Dabei ist eine verlängerte Aktionspotentialdauer, die möglicherweise durch einen ROS-induzierten verstärkten späten Natriumstrom vermittelt wird, von Bedeutung (Song et al. 2006). Späte Nachdepolarisationen werden durch einen transienten Natriumeinwärtsstrom über den NCX ausgelöst. Ursache der transienten Aktivierung des NCX sind dabei spontane diastolische Kalziumfreisetzungen aus dem SR („Ca $^{2+}$ -Sparks“), die kurzfristig sehr lokalisiert das diastolische Kalzium erhöhen. Die NCX-Proteine in unmittelbarer Nähe erfahren eine dramatische Reduktion des elektrochemischen Gradienten für Kalzium, was zur Aktivierung des NCX führt, der nun Kalzium im Austausch gegen Natrium aus der Zelle befördert und damit zur Depolarisation führt (Bers et al. 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente ergaben, dass durch das Ausschalten der CaMKII δ sowohl die Häufigkeit von frühen Nachdepolarisationen bzw. Nachkontraktionen als auch das Auftreten von späten Nachdepolarisationen bzw. Nachkontraktionen unter H $_2$ O $_2$ signifikant vermindert werden konnten. Im insuffizienten Herzen ist die Aktionspotentialdauer durch vermehrt depolarisierende und vermindert repolarisierende Ströme verlängert (Näbauer und Käab 1997). Dies geht mit einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit von L-Typ-Kalziumkanälen (Anderson et al. 1998) und damit vermehrten frühen Nachdepolarisationen einher. Song et al. konnten 2006 zeigen, dass die Hemmung des späten Natriumstroms mittels TTX oder Ranolazin vor einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer und damit vor ROS-induzierten frühen Nachdepolarisationen schützt. Damit konnten sie darlegen, dass insbesondere die Verstärkung des späten Natriumstroms für die Verlängerung der Aktionspotentialdauer und damit für die Ausbildung von frühen Nachkontraktionen verantwortlich ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte 2011 (Wagner et al. 2011) zeigen, dass die CaMKII für die ROS-Effekte auf den späten Natriumstrom verantwortlich ist. So bleibt in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten sowohl die in WT-

Kardiomyozyten beobachtete Zunahme des späten Natriumstroms als auch die Verlängerung der Aktionspotentialdauer nach H_2O_2 -Exposition aus (Wagner et al. 2011). Die fehlende Verlängerung der Aktionspotentialdauer schützt vor der Aktivierung von L-Typ-Kalziumkanälen und damit vor frühen Nachdepolarisationen. Dies geht einher mit den Ergebnissen meiner Arbeit und erklärt, weshalb durch das Ausschalten der CaMKII δ die Häufigkeit von frühen Nachkontraktionen signifikant reduziert werden konnte. Dennoch könnten auch CaMKII-unabhängige Mechanismen zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer führen und das Auftreten von frühen Nachdepolarisationen begünstigen. Ebenso kann eine CaMKII-unabhängige Aktivierung der L-Typ-Kalziumkanäle durch Reaktive Sauerstoffspezies (Campbell et al. 1996), auch wenn sehr kontrovers diskutiert (Goldhaber und Liu 1994), nicht ganz ausgeschlossen werden.

Ursache für die signifikante Reduktion der Häufigkeit von späten Nachdepolarisationen in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten nach ROS-Exposition könnte möglicherweise die verminderte diastolische Kalziumüberladung sein. Denn ein Großteil des diastolischen Kalzium wird - zumindest solange die SR- Ca^{2+} -ATPase noch funktional ist - in das SR transportiert. Die ROS-induzierte Steigerung der RyR2-Öffnungswahrscheinlichkeit führt dann zu diastolischen SR-Kalziumfreisetzungen und damit zur Entstehung von Nachdepolarisationen. Ein verminderter Anstieg des diastolischen Kalziums in CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten führt demnach zu einer verminderten Aufladung des SR mit Kalzium und in der Folge zu geringerer diastolischer SR-Kalziumfreisetzung und damit zu weniger späten Nachdepolarisationen. Der genaue Mechanismus bleibt jedoch unklar, insbesondere da die CaMKII auch zusätzlich über eine Phosphorylierung des RyR2 direkt zu einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit desselben beitragen kann (Witcher et al. 1991, Maier et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass transgene CaMKII δ -überexprimierende Mäuse aufgrund einer CaMKII-abhängigen Phosphorylierung des RyR2 eine hohe Rate an spontanen diastolischen Kalziumfreisetzungen aufweisen, die mit einer verstärkten Arrhythmogenität einhergehen (Maier et al. 2003). Dennoch konnte in meinen Experimenten, wie oben bereits erwähnt, durch das Ausschalten der CaMKII δ das Auftreten von arrhythmogenen Potentialen nicht ganz verhindert werden, was weitere CaMKII δ -unabhängige Mechanismen vermuten lässt. Zum einen können, wie oben erwähnt, Reaktive Sauerstoffspezies selbst den RyR2 oxidieren (Anzai et al. 1989). Wagner et al. konnten 2011 zeigen, dass H_2O_2 -

Exposition zu einer direkten Steigerung der Frequenz spontaner diastolischer Kalziumfreisetzungen aus dem SR führt. Dabei ist die Steigerung durch CaMKII-Hemmung nicht zurückführbar, was vermuten lässt, dass dieser Mechanismus neben der CaMKII δ -abhängigen Phosphorylierung des RyR2 sogar der dominierende Mechanismus dafür ist.

Anhand dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten im Vergleich zu Wildtyp-Kardiomyozyten ein signifikant längeres Überleben aufweisen. Das Ausschalten der CaMKII δ scheint damit zytoprotektiv zu sein. Erklärungen hierfür könnten zum Einen sein, dass bei CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten Hyperkontrakturen während des Beobachtungszeitraums durch die verzögerte Entwicklung einer Kalziumüberladung deutlich seltener auftreten. Andererseits könnte sich ebenso die geringere Arrhythmogenität der CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten günstig auf das Überleben der Zellen auswirken. Aber auch eine direkte CaMKII-abhängige Induzierung des Zelltods könnte von Bedeutung sein (Palomeque et al. 2009). So konnten Palomeque et al. 2009 zeigen, dass durch eine Angiotensin II-induzierte ROS-Produktion die CaMKII aktiviert und dadurch der Apoptosevorgang eingeleitet werden kann. In meinen Experimenten war die Beobachtungszeit auf dreißig Minuten beschränkt. Wie sich das Überleben der Kardiomyozyten über die dreißig Minuten hinaus verhält, habe ich in meinen Experimenten nicht untersucht. Allerdings muss bei einer längeren Beobachtungszeitraum auch von vermehrtem Zelltod durch Nährstoffmangel ausgegangen werden, so dass ich meinen Beobachtungszeitraum bewusst auf dreißig Minuten beschränkt habe.

Zusammenfassend kann mit Hilfe dieser Arbeit gezeigt werden, dass die CaMKII δ bei der Herzinsuffizienz eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von kontraktile Dysfunktion und Arrhythmogenese spielt. Durch Ausschalten der CaMKII δ kann die sonst bei der Herzinsuffizienz beobachtete ROS-induzierte Natrium- und Kalziumakkumulation in den Kardiomyozyten deutlich verzögert werden und dadurch der Entstehung von vorzeitigen Hyperkontrakturen entgegengewirkt werden. Mit diesen Erkenntnissen könnte der Inhibition der CaMKII δ zukünftig eine bedeutende klinische Relevanz zukommen. Möglicherweise könnte man durch die Innovation von neuen gezielten pharmakologischen Inhibitoren der CaMKII δ eine neue Therapiestrategie in der Behandlung der Herzinsuffizienz zur Verfügung stellen, die zum einen antiarrhythmische Effekte aufweist und gleichzeitig die rasche Progredienz der Erkrankung verhindert könnte.

5 Zusammenfassung

Die Expression und Aktivität der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II δ ist in Kardiomyozyten insuffizienter Herzen erhöht und geht mit einer Krankheitsprogression einher. Ebenso führen Reaktive Sauerstoffspezies, die während einer Ischämie oder Reperfusionsphase vermehrt gebildet werden, zu einer Natrium- und Kalziumüberladung und letztendlich zu kontraktile Dysfunktion und zum Zelltod. Anhand dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die sauerstoffradikalinduzierte Toxizität über die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ vermittelt wird bzw. die aktivierte Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ für die Entstehung von oxidativen Zellschäden essentiell ist. Kardiomyozyten, in denen das Gen für die CaMKII δ ausgeschaltet ist, weisen eine deutlich verzögerte ROS-induzierte Zunahme der zytosolischen Natrium- und Kalziumkonzentration auf und präsentieren eine signifikant geringere arrhythmogene Aktivität unter Radikalexposition. In Wildtyp-Kardiomyozyten wird die Kalziumüberladung hauptsächlich über den Umkehrtransportmodus des sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauschers vermittelt, der bei hohen zytosolischen Natriumkonzentrationen Kalzium in die Zelle transportiert. Dies kann durch den ausbleibenden Kalziumanstieg in mit KB-R7943 behandelten Myozyten bestätigt werden. Letztendlich schützt der homozygote Knock-out der CaMKII δ durch eine ausbleibende ROS-induzierte Natriumakkumulation vor einer Umkehr der Transportrichtung des Natrium-Kalzium-Austauschers und damit konsekutiv vor einer Kalziumüberladung der Zelle. Dies geht mit einer verminderten Hyperkontraktorentwicklung einher und führt damit zu signifikanten Überlebensvorteilen durch das Ausschalten der CaMKII δ . In Anlehnung an die gewonnenen Erkenntnisse könnte eine gezielte pharmakologische Inhibition der CaMKII δ daher möglicherweise eine völlig neuartige Therapiestrategie in der Behandlung der Herzinsuffizienz darstellen.

6 Literaturverzeichnis

Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Wu Y, Schulman H, Sung RJ (1998): KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 996-1006

Anzai K, Ogawa K, Kuniyasu A, Ozawa T, Yamamoto H, Nakayama H (1998): Effects of hydroxyl radical and sulfhydryl reagents on the open probability of the purified cardiac ryanodine receptor channel incorporated into planar lipid bilayers. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 938-42

Askoxylakis V, Thieke C, Pleger ST, Most P, Tanner J, Lindel K, Katus HA, Debus J, Bischof M (2010): Long-term survival of cancer patients compared to heart failure and stroke: a systematic review. *BMC Cancer* 10, 150

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 U S A* 106, 2342-7

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, Dordrecht, The Netherlands 2001

Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205

Bers DM (2008): Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70, 23-49

Bers DM, Barry WH, Depa S (2003): Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 57, 897-912

Bers DM, Despa S, Bossuyt J. (2006): Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes. *Ann NY Acad Sci* 1080, 165-77

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E (1992): Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 83, 504-14

Bowditch HP (1871): Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Berl Sachs Ges (Akad) Wiss* 23, 652-689

Braun AP, Schulman H (1995): The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 57, 417-45

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, 21827-36

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982): Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307, 205–211

Campbell DL, Stamler JS, Strauss HC (1996): Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol* 108, 277-93

Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P (1995): Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 96, 2247-59

Deschênes I, Neyroud N, DiSilvestre D, Marbán E, Yue T, Tomaselli GF (2002): Isoform-specific modulation of voltage-gated Na⁺ channels by calmodulin. *Circ Res* 90, E49-57

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

Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O (1987): Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576-8

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

Edman CF, 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

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

Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6

Fenton HJH (1876): On a new reaction of tartaric acid. *Chem News* 33, 190

Fenton HJH (1894): Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc* 65, 899-910.

Frohnwieser B, Chen LQ, Schreibmayer W, Kallen RG (1997): Modulation of the human cardiac sodium channel α -subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J Physiol* 498, 309-18

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

Gao Z, Singh MV, Hall DD, Koval OM, Luczak ED, Joiner ML, Chen B, Wu Y, Chaudhary AK, Martins JB, Hund TJ, Mohler PJ, Song LS, Anderson ME (2011): Catecholamine-independent heart rate increases require Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4, 379-87

Goldhaber JI (1996): Free radicals enhance Na^+/Ca^{2+} exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol* 271, H823-33

Goldhaber JI, Liu E (1994): Excitation-contraction coupling in single guinea-pig ventricular myocytes exposed to hydrogen peroxide. *J Physiol* 477, 135-47

Gopalakrishna R, Anderson WB (1989): Ca^{2+} - and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6758-62

Graw J (2007): Nobelpreis 2007 in Medizin: Herstellung von knockout-Mäusen. *Biologie in unserer Zeit* 37, 352–354

Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993): Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73, 1155-64

Haber F, Weiss J (1932): Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften* 20, 948-950

Haber F, Willstätter R (1931): Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktionsmechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge. Ber Dtsch Chem Ges 64, 2844-2856

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

Haigney MC, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS (1994): Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading. Circulation 90, 391-9

Hallaq H, Yang Z, Viswanathan PC, Fukuda K, Shen W, Wang DW, Wells KS, Zhou J, Yi J, Murray KT (2006): Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. Cardiovasc Res 72, 250-61

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999): Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. Circulation 99, 641-8

Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (1999): Identification and expression of δ -isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. Circ Res 84, 713-21

Hoffman BF (1999): Cardiac arrhythmias: what do we need to know about basic mechanisms? J Cardiovasc Electrophysiol 10, 414-6

Hook SS, Means AR (2001): Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41, 471-505

Hudmon A, Schulman H (2002): Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Biochem J 364, 593-611

Hund TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, Qian L, Synder JS, Gudmundsson H, Kline CF, Davidson NP, Cardona N, Rasband MN, Anderson ME, Mohler PJ (2010): A β_{IV} -spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. J Clin Invest 120, 3508-19

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW (2009): 2009 Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 119, e391-479

Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-66

Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, Agulló L, Piper HM, Soler-Soler J (2002): Effect of inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* 55, 739-48

Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Academy Press, 1996

Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M (1996): A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem* 271, 22391-7

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, 2354-61

Kannel WB (2000): Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 5, 167-73

Kassmann M, Hansel A, Leipold E, Birkenbeil J, Lu SQ, Hoshi T, Heinemann SH (2008): Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. *Pflugers Arch* 456, 1085-95

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42, 254-61

Köhler A, von Rohr M (1904): Eine mikrographische Einrichtung für ultraviolettes Licht. Sonderabdruck aus der Zeitschrift für Instrumentenkunde 1904, Heft 12

Kohlhaas M: Die Bedeutung der subzellulären CaMKII δ -Überexpression auf den intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsel in Herzmuskelzellen. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Diss. Göttingen 2006

Koss KL, Kranias EG (1996): Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 79, 1059-63

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

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

Ladilov Y, Haffner C, Balsler-Schäfer C, Maxeiner H, Piper HM (1999): Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Am J Physiol* 276, H1868-76

Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H (1992): Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6232-6

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

Leblanc N, Hume JR (1990): Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 248, 372-6

Liu M, Liu H, Dudley SC Jr. (2010): Reactive oxygen species originating from mitochondria regulate the cardiac sodium channel. *Circ Res* 107, 967-74

Ma JH, Luo AT, Zhang PH (2005): Effect of hydrogen peroxide on persistent sodium current in guinea pig ventricular myocytes. *Acta Pharmacol Sin* 26, 828-34

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-dependant protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73, 631-40

Maier LS, Pieske B, Allen DG (1997): Influence of stimulation frequency on [Na⁺]_i and contractile function in Langendorff-perfused rat heart. *Am J Physiol* 273, H1246-54

Maier LS, Zhang T, Cheng 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

Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A (1998): Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂ α in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 97, 1536-9

Maltsev VA, Kyle JW, Undrovinas A (2009): Late Na⁺ current produced by human cardiac Na⁺ channel isoform Na_v1.5 is modulated by its β_1 subunit. *J Physiol Sci* 59, 217-25

Mandinov L, Eberli FR, Seiler C, Hess OM (2000): Diastolic heart failure. *Cardiovasc Res* 45, 813-25

Mann DL, Bristow MR (2005): Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* 111, 2837-49

Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988): Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-52

McCord JM (1985): Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312, 159-63

McMurray JJ, Stewart S (2000): Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83, 596-602

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

Molecular Probes: The Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies; 11. Auflage; Molecular Probes, 2010

<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>

Mulieri LA, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen PD, Alpert NR (1992): Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 85, 1743-50

Mullins LJ (1979): The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *Am J Physiol* 236, C103-10

Näbauer M, Kääh S (1997): Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 37, 324-34

Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA (1997): Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest* 100, 2362–2370

Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH (2007): Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 87, 425-456

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P (1997): Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336, 1131-41

Orban PC, Chui D, Marth JD (1992): Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6861-5

Palomeque J, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV, Mattiazzi A (2009): Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca^{2+} dependence of Ca^{2+} -calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circ Res* 105: 1204-12

Qu Y, Rogers J, Tanada T, Catterall W, Scheuer T (1996): Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na^+ channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C. *J Gen Physiol* 108, 375–379

Rasenack E: Regulation des kardialen sarkolemmalen Natriumkanals durch die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase $\text{II}\delta_c$ ($\text{CaMKII}\delta_c$). Ein neuer Mechanismus für die Entstehung von Arrhythmien. Med. Diss. Göttingen 2006

Sabri A, Byron KL, Samarel AM, Bell J, Lucchesi PA (1998): Hydrogen Peroxide Activates Mitogen-Activated Protein Kinases and Na^+ - H^+ Exchange in Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Circ Res.* 82, 1053-62

Schaper J, Froede R, Hein St, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N (1991): Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 83, 504 –514

Shattock MJ, Matsuura H (1993): Measurement of Na^+ - K^+ pump current in isolated rabbit ventricular myocytes using the whole-cell voltage-clamp technique. Inhibition of the pump by oxidant stress. *Circ Res* 72, 91-101

Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS (1985): Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature* 317, 230-4

Soliman D, Hamming KS, Matemisz LC, Light PE (2009): Reactive oxygen species directly modify sodium-calcium exchanger activity in a splice variant-dependent manner. *J Mol Cell Cardiol* 47, 595-602

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

Stewart S, MacIntyre J, Capewell S, Mcurray JJ (2003): Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart* 89, 49-53

Stokes GG (1852): On the Change of Refrangibility of Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 142, 463-562

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

Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A, Hoes A, Jaarsma T, Korewicki J, Lévy S, Kinde C, Lopez-Sendon JL, Nieminen MS, Piérard L, Remme WJ (2005): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26, 1115-40

Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stephanovic S, Roden DM, Wilde AA, Anderson ME, Balser JR (2002): A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* 415, 442-7

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000): Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-28

Thomas KR, Capecchi MR (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-12

Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR (1986): High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 44, 419-28

Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas W, Sossolla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, Grebe C, Preuss L, Gupta SN, Schmidt K, Lehnart SE, Krüger M, Linke WA, Backs J, Regitz-Zagrosek V, Schäfer K, Field LJ, Maier LS, Hasenfuss G (2010): Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122, 993-1003

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

Undrovinas NA, Maltsev VA, Belardinelli L, Sabbah HN, Undrovinas A (2010): Late sodium current contributes to diastolic cell Ca^{2+} accumulation in chronic heart failure. *J Physiol Sci* 60, 245-57

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

Wagner S, Seidler T, Picht E, Maier LS, Kazanski V, Teucher N, Schillinger W, Pieske B, Isenberg G, Hasenfuss G, Kögler H (2003): Na^+ - Ca^{2+} exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury. *Cardiovasc Res* 60, 404-12

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS (2006): Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na^+ channels. *J Clin Invest* 116, 3127-38

Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Grandi E, Bers DM, Backs J, Belardinelli L, Maier LS (2011): Reactive Oxygen Species-Activated Ca/Calmodulin Kinase II δ Is Required for Late INa Augmentation Leading to Cellular Na and Ca Overload. *Circ Res* 108, 555-65

Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS (2012): Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal* (in press)

- Wahl M, Lucherini MJ, Gruenstein E (1990): Intracellular Ca^{2+} measurement with Indo-1 in substrate-attached cells: advantages and special considerations. *Cell Calcium* 11, 487-500
- Ward CA, Giles WR (1997): Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 500, 631-42
- Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H (1996): A novel antagonist, No. 7943, of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol* 119, 555-63
- Weber KT (1997): Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 96, 4065-82
- Weiss J (1935): Elektronenübergangsprozesse im Mechanismus von Oxydations- und Reduktionsreaktionen in Lösungen. *Naturwissenschaften* 23, 64-69
- 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
- Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, Anderson ME (2002): Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106, 1288-93
- Xu KY, Zweier JL, Becker LC (1997): Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res* 80, 76-81
- Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998): Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279, 234-7
- Yuan W, Bers DM (1994): Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 267, H982-93

Zeitz O, Maass AE, Van Nguyen P, Hensmann G, Kögler H, Möller K, Hasenfuss G, Janssen PM (2002): Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na^+ - Ca^{2+} -exchange. *Circ Res* 90, 988-95

Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE Jr, Thiel W, Guatimosim S, Song LS, Madu EC, Shah AN, Vishnivetskaya TA, Atkinson JB, Gurevich VV, Salama G, Lederer WJ, Colbran RJ, Anderson ME (2005): Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 11, 409-17

Zhang T, Brown JH (2004): Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63, 476-86

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

Zipes DP (2003): Mechanisms of clinical arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14, 902-912

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

7 Anhang: Publikationen zum Thema der Dissertation

Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Grandi E, Bers DM, Backs J, Belardinelli L, Maier LS (2011): Reactive Oxygen Species-Activated Ca/Calmodulin Kinase II δ Is Required for Late INa Augmentation Leading to Cellular Na and Ca Overload. *Circ Res* 108, 555-65

Wagner S, Bellmann S, Peters T, Sossalla S, Seidler T, Backs J, Maier LS (2009): Knockout of Ca/calmodulin kinase II δ protects against ROS-induced injury. *Clin Res Cardiol* 98, 197

Wagner S, Bellmann S, Peters T, Sossalla S, Seidler T, Backs J, Maier LS (2009): Knockout of Ca/calmodulin kinase II δ protects against ROS-induced injury. *Circulation* 120: 694

Lebenslauf

Am 3. Januar 1985 wurde ich, Sarah Bellmann, als erste zweier Töchter von Monika Bellmann geb. Wahl und Richard Bellmann in Göppingen geboren. Nach dem vierjährigen Grundschulbesuch (1991-1994) in Ohmden, wechselte ich auf das Schloßgymnasium in Kirchheim Teck und legte dort 2004 das Abitur ab. Anschließend studierte ich während des Wintersemesters 2004/2005 an der Eberhard Karls Universität in Tübingen Geographie und BWL. Im Sommersemester 2005 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Nach erfolgreicher Absolvierung des vorklinischen Abschnitts im März 2007 begann der klinische Teil des Studiums mit Famulaturen in der Klinik am Eichert in Göppingen (Pädiatrie, Innere Medizin, Anästhesie und Schmerztherapie, Allgemeinchirurgie), im Universitätsklinikum Göttingen (Kinder- und Jugendpsychiatrie) sowie im Universitätsspital Zürich (Diagnostische Radiologie). Im Oktober 2008 begann ich meine Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Lars Maier unter der Betreuung von Stefan Wagner. Dafür erhielt ich ein Förderstipendium (Stipendienprogramm „Gö4med“) für exzellente Studierende von der Universität Göttingen. Mein praktisches Jahr absolvierte ich im Pius-Hospital Oldenburg (Innere Medizin), am Universitätsklinikum Göttingen (Pädiatrie) und im Kantonsspital Graubünden in Chur (Chirurgie). Das Staatsexamen habe ich im Dezember 2011 erfolgreich abgeschlossen (Gesamtnote: 1,3) und damit mein Studium beendet. Seit 15. Juni 2012 arbeite ich als Assistenzärztin in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Danksagung

Zur Entstehung dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich hiermit von Herzen danken möchte.

Mein aufrichtiger Dank geht an Prof. Dr. Lars Maier für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas.

Ganz besonders möchte ich Dr. Stefan Wagner für die durchweg hervorragende Betreuung danken, insbesondere für die geduldige Einarbeitung in die Epifluoreszenzmikroskopie, die stetige Bereitschaft zu Hilfestellung und Diskussion sowie seinem Vertrauen in meine Arbeit.

Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und für die technische Unterstützung durch die Mitarbeiter des Labors, insbesondere durch Herrn Dr. S.T. Sossalla, Herrn, Dr. S. Neef, Herrn T. Schulte und T. Sowa. Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des Labors für das freundliche Arbeitsklima und den regen Austausch danken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und bei meiner ganzen Familie sowie allen Freunden herzlich bedanken, die mich während der Fertigstellung meiner Doktorarbeit unterstützt und immer wieder neu ermutigt und motiviert haben.