

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

**Angiotensin II reguliert das Natriumkanal-
Öffnungsverhalten über zwei
Mechanismen:
IP₃-Rezeptoren aktivieren die CaMKII und
ROS die PKA**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Hannah Flebbe

aus

Gehrden

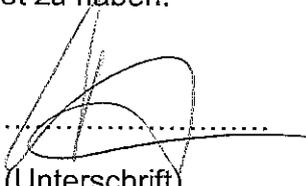
Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. L. S. Maier
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. D. Katschinski
Drittreferent/in:	Prof. Dr. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 27.09.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Angiotensin II reguliert das Natriumkanal-Öffnungsverhalten über zwei Mechanismen: IP3-Rezeptoren aktivieren die CaMKII und ROS die PKA" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 09.09.17


.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz	1
1.2 Die Herzmuskelzelle	2
1.2.1 Ultrastruktur	3
1.2.2 Elektromechanische Kopplung	5
1.2.3 Intrazelluläre Kalziumfreisetzung über IP ₃	9
1.2.4 Natriumhaushalt der Herzmuskelzelle	10
1.2.5 Veränderungen bei der Herzinsuffizienz	10
1.3 Herzrhythmusstörungen	12
1.3.1 Erregungsbildung und Erregungsleitung	13
1.3.2 Störungen der Erregungsbildung und Erregungsleitung	15
1.4 Der spannungsabhängige sarkolemmale Natriumkanal	17
1.4.1 Aufbau und Funktion des Natriumkanals	17
1.4.2 Regulation des Natriumkanals	19
1.4.3 Mutationen des Natriumkanals	21
1.5 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)	23
1.5.1 Struktur der CaMKII	23
1.5.2 Aktivierung und Funktion der CaMKII	24
1.5.3 Hemmung der CaMKII	25
1.5.4 Der Zusammenhang der CaMKII, Herzinsuffizienz und Arrhythmien	26
1.6 Die NADPH-Oxidase	27
1.6.1 Struktur der NADPH-Oxidase	28
1.6.2 Funktion und Aktivierung der Nox 2	29

1.6.3 Hemmung der NADPH-Oxidase	31
1.7 Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA)	32
1.7.1 Struktur der PKA	32
1.7.2 Aktivierung und Funktion der PKA	32
1.7.3 Hemmung der PKA	34
1.8 Angiotensin II	35
1.8.1 Das endogene Hormon Angiotensin II	35
1.8.2 Kardiale Effekte des Angiotensin II	39
1.9 Ziele und Fragestellungen	41
2 Material und Methoden	42
2.1 Verwendete Mauslinien	42
2.1.1 Herstellung transgener Mäuse	42
2.1.2 Herstellung der gp91phox Knockout-Maus	43
2.2. Isolation ventrikulärer Myozyten	44
2.3. Die Patch-Clamp-Technik	47
2.3.1 Lösungen	48
2.3.2 Versuchsaufbau	50
2.3.3 Patchpipette und Elektroden	52
2.3.4 Versuchsdurchführung	52
2.3.5. Messprinzip	54
2.3.6. Protokolle	56
2.4. Pharmakologische Materialien	58
2.4.1 Humanes Angiotensin II	58
2.4.2 H89	59
2.4.3 PKI	59
2.4.4 AIP	59
2.4.5 2-ABP	59
2.5. Datenerfassung und Auswertung	59

3 Ergebnisse	61
3.1 Angiotensin II beeinflusst das Öffnungsverhalten des Natriumkanals teilweise in Abhängigkeit von der Nox 2 und PKA	61
3.1.1 Untersuchung der Aktivierung	61
3.1.2 Angiotensin II hat keinen Einfluss auf die schnelle Inaktivierung des Natriumkanals	64
3.1.3 Angiotensin II führt zu einer verringerten globalen Verfügbarkeit der Natriumkanäle (Steady-State-Inaktivierung) unabhängig von der Nox 2 und PKA	65
3.1.4 Angiotensin II beschleunigt die intermediäre Inaktivierung der Natriumkanäle unabhängig von der Nox 2 und der PKA	67
3.1.5 Angiotensin II führt zu einer verlangsamten Reaktivierung der Natriumkanäle unabhängig von Nox 2 und PKA	70
3.2 Angiotensin II führt zu einer IP ₃ R-abhängigen CaMKII-vermittelten Erhöhung des späten Natriumstroms	74
4 Diskussion	77
4.1 Die Wirkung von Angiotensin II auf den spannungsabhängigen Natriumkanal	77
4.2 Die Bedeutung der Nox 2 und Proteinkinase A bei der Regulation des spannungsabhängigen Natriumkanals	80
4.3. Die Bedeutung von IP ₃ R und der CaMKII bei der Regulation des spannungsabhängigen Natriumkanals	83
4.4. Angiotensin II wirkt proarrhythmogen	85
5 Zusammenfassung	89
6 Literaturverzeichnis	90

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Schematische Darstellung der Diade	4
Abb. 1-2:	Der kontraktile Apparat	5
Abb. 1-3:	Der Querbrückenzyklus – Aktin und Myosin	6
Abb. 1-4:	Der Kalziumstoffwechsel der Herzmuskelzelle	8
Abb. 1-5:	Herzinsuffizienz und Kontraktile Dysfunktion bei CaMKII-Überfunktion	12
Abb. 1-6:	Das Aktionspotential im Kardiomyozyten	14
Abb. 1-7:	Nachdepolarisationen: EADs und DADs	15
Abb. 1-8:	Reentry	16
Abb. 1-9:	Schematische Darstellung des spannungsabhängigen Natriumkanals	18
Abb. 1-10:	EKG-Veränderungen beim Brugada-Syndrom	22
Abb. 1-11:	Schematische Darstellung der CaMKII	24
Abb. 1-12:	Schematische Darstellung der Nox 2	30
Abb. 1-13:	Die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA	33
Abb. 1-14:	Der ATR1 und die Signalkaskaden	37
Abb. 1-15:	Klassisches und neues RAS-System	38
Abb. 2-1:	Schematische Darstellung der Perfusionsanlage nach Langdorff	46
Abb. 2-2:	Schematische Darstellung einer <i>Whole-Cell</i> -Konfiguration	47
Abb. 2-3:	Das Patch-Clamp-Setting	51
Abb. 2-4:	Die Messprotokolle	58
Abb. 3-1:	Die Strom-Spannungsbeziehung	62
Abb. 3-2:	Die Natriumleitfähigkeit – Originalregistrierungen und Säulendiagramm	63
Abb. 3-3:	Mittelwerte der schnellen Inaktivierung	64
Abb. 3-4:	Originalregistrierungen der Steady-State-Inaktivierung	65
Abb. 3-5:	Der relative Stromfluss unter Einfluss von Ang II und H89	66
Abb. 3-6:	Die gemittelten Werte von $V_{1/2}$	67
Abb. 3-7:	Originalregistrierungen der intermediären Inaktivierung	68
Abb. 3-8:	Das Verhältnis von P_2/P_1 der intermediären Inaktivierung	69
Abb. 3-9:	Das gemittelte Plateau der intermediären Inaktivierung	70
Abb. 3-10:	Originalregistrierungen der Reaktivierung der Natriumkanäle	71

Abb. 3-11: Das Verhältnis von P_2/P_1 der Reaktivierung	72
Abb. 3-12: Die gemittelte Geschwindigkeitskonstante $K_{rec}(s^{-1})$	73
Abb. 3-13: Originalregisierungen des späten Natriumstroms	75
Abb. 3-14: Mittelwerte des späten Natriumstroms	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Isolationslösung	45
Tabelle 2-2: Badlösungen	49
Tabelle 2-3: Pipettenlösungen	50

Abkürzungsverzeichnis

2-APB	<i>2-Aminoethyl-diphenylborinat</i> , ein Hemmstoff der IP ₃ R
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensine converting enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
AIP	autocamtide-2-related inhibitory peptide, Hemmstoff der CaMKII
AKAPs	A-Kinase anchoring-Proteine
Ang II	Angiotensin II
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
ATR1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
ATR2	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
Ca ²⁺ , [Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CaM	Kalzium-Calmodulin
CaMKII	Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaMKIIδc	Splicevariante c der δ-Isoform der Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
DAD	Delayed afterdepolarization (späte Nachdepolarisationen)
DAG	1,2,-Diacylglycerol
DHPR	Dihydropyridinrezeptoren, spannungsabhängige L-Typ-Kalzium-Kanäle
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Träger der Erbinformation
EAD	Early afterdepolarization (frühe Nachdepolarisationen)
EKG	Elektrokardiogramm
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
gp91phox	katalytische Untereinheit der Nox 2
gp91 ^{phox-/-}	Knockout-Maus ohne funktionelle gp91phox
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H89	Dihydrochlorid Hydrat, ein PKA-Hemmstoff
I _{Ca}	sarkolemmaler Kalziumeinstrom
I _{fast}	inaktiverter Zustand des Natriumkanals, er sich nicht öffnen
I _M	intermediäre Inaktivierung des Natriumkanals
I _{Na}	sarkolemmaler Natriumeinstrom
I _{slow}	langsame Inaktivierung des Natriumkanals
I _{To} , I _{Ks} , I _{Kr}	sarkolemmale Kaliumausströme
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
I-V-Protokoll	Strom-Spannungsprotokoll
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
LQT3	Long-QT Syndrom 3
ms	Millisekunden

mV	Millivolt
Na ⁺ , [Na ⁺] _i	Natrium, intrazelluläre Natriumkonzentration
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NCX	sarkolemmaler Natrium-Kalzium-Austauscher
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NKA	Natrium-Kalium-ATPase
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
Nox 2	NADPH-abhängige Oxidase 2
P	Phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKI	<i>protein kinase inhibitor</i> , ein PKA-Hemmstoff
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
RAS	Renin-Angiotensin-System
RCL	Zellverkürzung bei Kontraktion
ROS	Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodinrezeptor
SCN5A	Ein Gen für die Kodierung der α-Untereinheit des Natriumkanals
SERCA	Ca ₂₊ -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TGM	transgenetische Maus mit CaMKII-Überfunktion
TnC	Troponin C
T-Tubuli	transversale Tubuli
TTX	Tetrodotoxin
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, welches durch eine unzureichende Auswurfleistung des Herzens einerseits zu einer arteriellen Minderversorgung der Peripherie und andererseits zu einem Rückstau des venösen Blutes führt.

In der Regel handelt es sich bei der Herzinsuffizienz um eine Erkrankung des höheren Alters mit steigender Prävalenz, welche in Zukunft durch die demographische Entwicklung erwartungsgemäß noch weiter ansteigen wird. Die Prognose ist trotz ständiger Weiterentwicklung der Therapieoptionen schlecht. Die Framingham-Herz-Studie beschreibt ein mittleres Überleben nach erster Diagnosedstellung der chronischen Herzinsuffizienz für Männer von 1,7 Jahren, für Frauen von 3,2 Jahren. Das 5-Jahres-Überleben liegt bei nur 25% für Männer beziehungsweise 38% für Frauen (Kannel 2000). Die Zahl der Patienten wird auf mehr als 10 Mio. geschätzt (Hoppe et al. 2005). Damit ist sie eine der häufigsten internistischen Krankheiten in Europa und kann als Volkskrankheit der Industrienationen bezeichnet werden.

In der geschädigten Herzmuskelzelle kommt es zu multiplen ultrastrukturellen Veränderungen, die zu elektrophysiologischen Veränderungen und damit über die Ausbildung elektrischer Instabilität einzelner Zellen zu Herzrhythmusstörungen führen können (Tomaselli und Marban 1999; Tomaselli und Zipes 2004). Liegt eine Herzinsuffizienz vor, ist das Risiko eines plötzlichen Herztodes durch Herzrhythmusstörungen im Vergleich zur gesunden Bevölkerung auf das 6- bis 9-Fache erhöht (Thom et al. 2006). Bei einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz sind Rhythmusstörungen mit 70% die häufigste Todesursache (Schirdewahn et al. 2004). Ist der Herzmuskel so schwach, dass eine Auswurfleistung von weniger als 35% Ejektionsfraktion erreicht wird, sollte ein Defibrillator primär prophylaktisch implantiert werden. Die zurzeit immer noch einzige kurative Behandlungsmethode ist als Ultima Ratio nur eine Herztransplantation.

Angiotensin II ist ein endogenes Hormon, welches eigentlich zur Blutdruckregulation ausgeschüttet wird. Bei vorgeschädigten Herzen oder chronischer Erhöhung hat das Hormon jedoch einen negativen Effekt auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz.

Zum einen konnten Arrhythmie-begünstigende Effekte nachgewiesen werden (Zhao et al. 2011), zum anderen fördert Angiotensin II das sogenannte kardiale Remodeling. So hat beispielsweise die schon im frühen Stadium der Herzinsuffizienz eingesetzte Medikamentengruppe der ACE-Hemmer einen positiven prognostischen Effekt (Stevenson et al. 1995).

Für die Entwicklung von neuen Therapieansätzen müssen zunächst die zellulären Mechanismen, die zu Entstehung und Vorantreiben einer Herzinsuffizienz führen, verstanden werden.

In dieser Arbeit werde ich zunächst auf die physiologischen und histologischen Begebenheiten bei der gesunden Herzmuskelzelle eingehen und die Veränderungen beschreiben, die bei dem insuffizienten Herzen stattfinden. Die Entstehung und Klassifizierung von Arrhythmien als häufigste Todesursache bei der chronischen Herzinsuffizienz werden in der Folge genauer erläutert, anschließend eine genauere Darstellung des kardialen spannungsabhängigen Natriumkanals. Zum Verständnis für die Angiotensin II vermittelte Signaltransduktion wird ein besonderes Augenmerk auf die intrazellulären Proteine Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δc (CaMKII δc), NADPH-abhängige Oxidase 2 (Nox 2) und cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) gelegt.

1.2 Die Herzmuskelzelle

Die Herzmuskelzellen bestehen aus quergestreiften Muskelzellen, die parallel zueinander liegen und miteinander im Bereich der Glanzstreifen, den Disci intercalares, sowohl mechanisch als auch elektrisch verbunden sind. Die Desmosomen ermöglichen eine starke mechanische Verknüpfung der Zellen. Über die gap junctions kann eine interzelluläre Kommunikation über Weiterleitung von Ionenströmen und damit auch die schnelle Erregungsausbreitung gewährleistet werden (Maeda und Tsukihara 2011; Makowski et al. 1977; Sjostrand et al. 1958; Unwin und Zampighi 1980). Auf diese Weise wirken die Zellen als ein funktionelles Synzytium und gewährleisten eine synchrone Kontraktion des gesamten Herzmuskels.

1.2.1 Ultrastruktur

Jede Herzmuskelzelle ist von einer Membran, dem Sarkolemm, umgeben, die aus einer Phospholipid-Doppelschicht besteht. Durch die Funktion des Sarkolemm als semipermeable Membran werden verschiedene Kompartimente getrennt, es bilden sich Intrazellulär- und Extrazellulärraum aus, welche sich in der Ionenkonzentration unterscheiden. Gleichzeitig ermöglichen in die Membran integrierte Membranproteine eine Kommunikation zwischen diesen Kompartimenten. Es können über regulierbare Kanäle Ionen transportiert oder durch verschiedene Proteine intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden.

Bei den kardialen Myozyten stülpt sich das Sarkolemm nach intrazellulär ein und bildet die sogenannten transversalen Tubuli (T-Tubuli). Diese stehen in enger Verbindung mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), einem intrazellulären Kalziumspeicher, welches sich als terminale Zisterne den T-Tubuli annähert. Gemeinsam mit dem dazwischen liegenden Zytosol bildet diese Verbindung die sogenannte Diade (Korbmacher et al. 2003). Auf Seiten der T-Tubuli liegen in diesem Bereich L-Typ-Kalzium-Kanäle, die Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) in nahem Kontakt zu den Ryanodinrezeptoren (RyR), welche in der Membran des SRs liegen (**Abb. 1-1**). Diese anatomische und funktionelle Nähe ist wichtig für die elektromechanische Kopplung (siehe Kapitel 1.2.3).

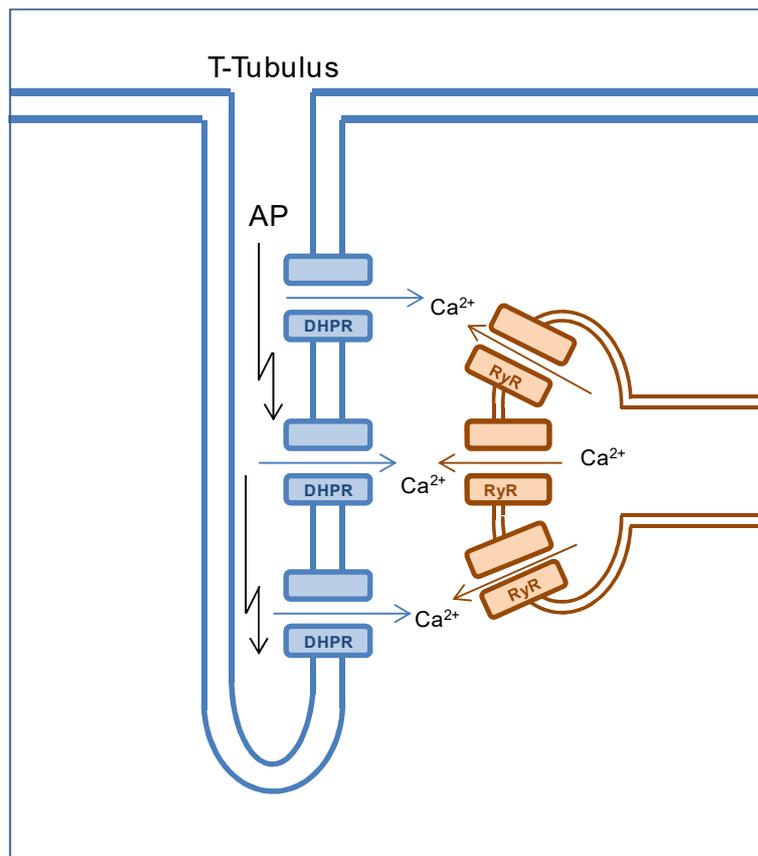


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Diade: Sie bildet sich aus dem T-Tubulus, einer Einstülpung des Sarkolemms, und der terminalen Zisterne des SRs. Hier liegen in enger anatomischer Nähe die Kalziumkanäle DHPR und RyR, welche durch Aktivierung und Öffnung der Kanäle die intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ stark erhöhen. Das Kalzium dient als *second messenger* für die elektromechanische Kopplung (Kapitel 1.2.2).

Die typische Querstreifung der Herzmuskelzellen entsteht über die regelmäßig zueinander angeordneten, parallel liegenden Myofibrillen (Hanson und Huxley 1953), die für die zelluläre Kontraktion zuständig sind. Die Myofibrillen setzen sich aus Aktin und Myosin-Myofilamenten zusammen und bilden gemeinsam ein Sarkomer (Abb. 1-2). Durch Ineinandergreifen der Filamente kann sich die Sarkomerlänge verkürzen oder verlängern und ermöglicht so eine Kontraktion oder Erschlaffung des Muskels (Korbmacher et. al 2003).

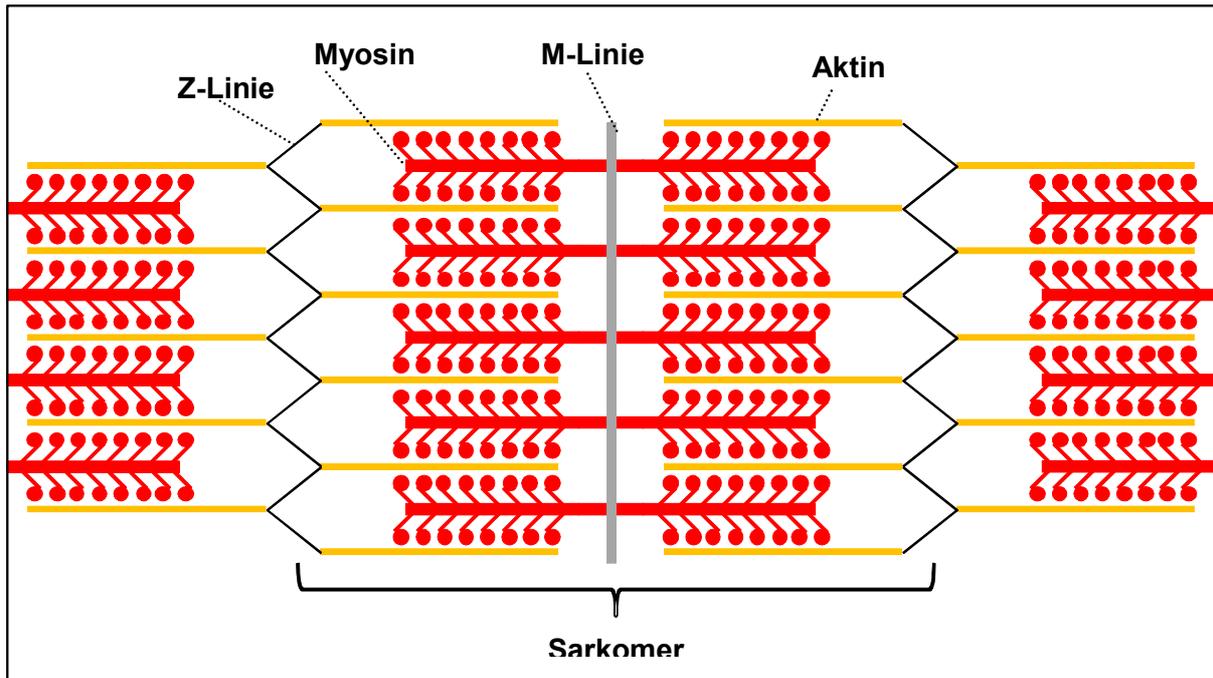


Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Kontraktiles Apparates aus Aktin und Myosin, welche gemeinsam das Sarkomer bilden. Bei der Kontraktion schieben sich das überlappende Aktin und Myosin aneinander vorbei nach der sogenannten Gleitfilamenttheorie. Das Sarkomer verkürzt sich durch mehrere Abläufe des Querbrückenzyklus effektiv, in der Summe aller sich durch diesen Mechanismus verkürzenden Zellen kommt es zur Muskelkontraktion (Huxley 1969, 2004).

Neben den genannten Strukturen, welche für den kontraktiles Mechanismus verantwortlich sind, enthält die Herzmuskelzelle weitere für die Funktionsaufrechterhaltung wichtige Zellorganellen, wie den Zellkern, die Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum.

1.2.2 Elektromechanische Kopplung

Die mechanische Kontraktion einer Herzmuskelzelle wird durch einen elektrischen Impuls getriggert und über den sogenannten Prozess der elektromechanischen Kopplung in eine mechanische Aktion umgewandelt, sodass es zur Kontraktion und anschließender Relaxation des gesamten Herzens kommt. Die Umwandlung von elektrischem Impuls zu der mechanischen Aktivität der Myofilamente geschieht über des Schlüsselion Kalzium, welches als *second messenger* agiert (Bers 2002b) .

Anstoß der Kontraktion ist ein Aktionspotential, das sich über spannungsabhängige Natriumkanäle in der Zellmembran und nach intrazellulär gerichtetem Natriumstrom weiterleitet und so eine Depolarisation bewirkt. Die spannungsabhängigen DHPR, welche vor allem in den T-Tubuli im Bereich der Diaden liegen, bewirken einen Kalziumeinstrom in die Zelle entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Die dadurch im diadischen Spalt ansteigende Kalziumionenkonzentration von rund 100 nmol/l auf bis zu 1-10 $\mu\text{mol/l}$ bewirkt eine Öffnung der RyR, wodurch das im SR gespeicherte Kalzium ausgeschüttet wird (Fabiato 1983; Langer und Peskoff 1996). Diese Kalzium-getriggerte Kalziumfreisetzung führt zu einer starken Erhöhung des intrazellulären freien Kalziums $[\text{Ca}^{2+}]_i$, welches an die Troponin-C-Untereinheit des Aktins bindet. Durch diese Bindung ändert sich die Struktur des Aktins und die Bindungsstelle für das Myosin wird frei. Die Myofilamente können sich fest aneinander lagern. Durch Abdiffusion des in das Myosin integrierten Adenosindiphosphates (ADP) dreht sich der Myosinkopf und das Sarkomer verkürzt sich. (**Abb. 1-3**). Die Lösung des Myosinkopfes von seiner Bindungsstelle am Aktin gelingt nur unter Energieaufwand durch Spaltung eines angelagerten Energieträgers Adenosintrisphosphat (ATP) in ADP und Phosphat (P). So gelangen die Filamente wieder in ihre Ausgangslage zurück und der Querbrückenzyklus kann erneut ablaufen (Finer et al. 1994; Huxley 1973).

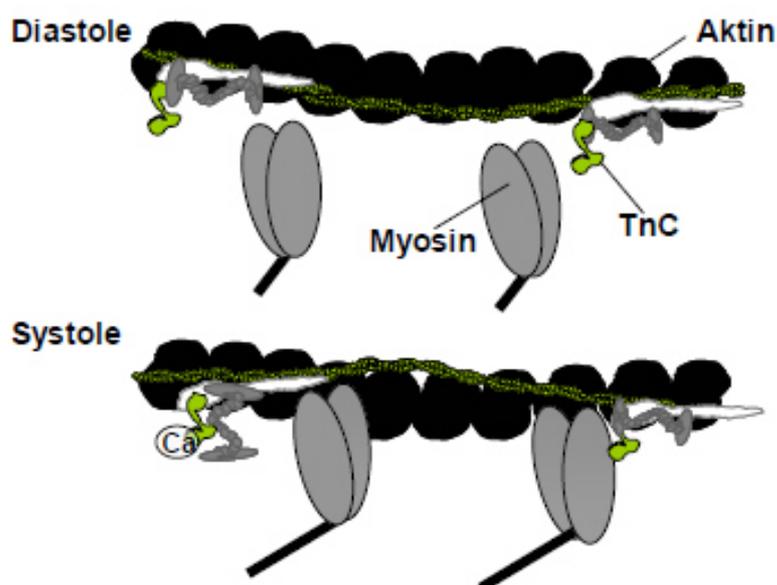


Abb. 1-3: Schematische Darstellung des Querbrückenzyklus (modifiziert aus BERS 2001). Das Ca^{2+} bindet an Troponin C (TnC), die Troponinmyosinmoleküle (TnI, TnT, Tm) lagern sich so um, dass Myosin und Aktin aneinander binden können. Durch Abkippen des Myosins kommt es zum Gleiten der Filamente.

Damit eine Muskelrelaxation stattfinden kann, muss das Kalzium von seiner Bindungsstelle wieder abdiffundieren. Dafür muss das $[Ca^{2+}]_i$ wieder auf den diastolischen Wert von etwa 100 nmol/l gesenkt werden. Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die zu der Senkung des intrazellulären Kalziums führen. Schon kurz nach der Depolarisation bewirkt im Sinne einer negativen Rückkopplung die aus dem SR ausgeschüttete Kalziumkonzentrationssteigerung ein Schließen der DHPR (Sham et al. 1998; Sipido et al. 1995).

Die Elimination aus dem Zytosol erfolgt über vier verschiedene Pumpen (Abb. 1-4). Die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) transportiert das Kalzium zurück in das SR und spielt bei der zytosolischen Kalziumelimination und intrazellulären –speicherung eine wichtige Rolle. Durch den endogenen Inhibitor Phospholamban, welcher im unphosphorylierten Zustand an die SERCA bindet, wird die Aktivität dieser reguliert. Ist Phospholamban zum Beispiel durch die PKA oder die CaMKII phosphoryliert, kann es seine Inhibitorsche Wirkung nicht entfalten und die SERCA nimmt vermehrt Kalzium in das SR auf (Brittsan und Kranias 2000; Li L et al. 2000).

Der sarkolemmale Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX) transportiert 3 Natriumionen gegen ein Kalziumion in jeweils entgegengesetzte Richtungen entlang des elektrochemischen Gradienten, welcher als treibende Kraft wirkt. Der Transporter kann in beide Richtungen arbeiten.

Neben diesen Möglichkeiten, welche den größten Anteil der Kalziumelimination einnehmen, gibt es eine weitere sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase sowie einen mitochondrialen Kalziumtransporter (Bers 2002c).

Der Anteil der genannten Eliminationsmöglichkeiten unterscheidet sich in unterschiedlichen Spezies. Während bei Kaninchenmyozyten, mit denen elektrophysiologisch die humanen Myozyten am ehesten vergleichbar sind (Bers 2002c), die SERCA 70% des intrazellulären Kalziums entfernt, übernimmt sie bei Ratten und Mäusen deutlich mehr Anteil an der Kalziumelimination und entsprechend wird deutlich mehr Kalzium in das SR aufgenommen (Bassani JW et al. 1994).

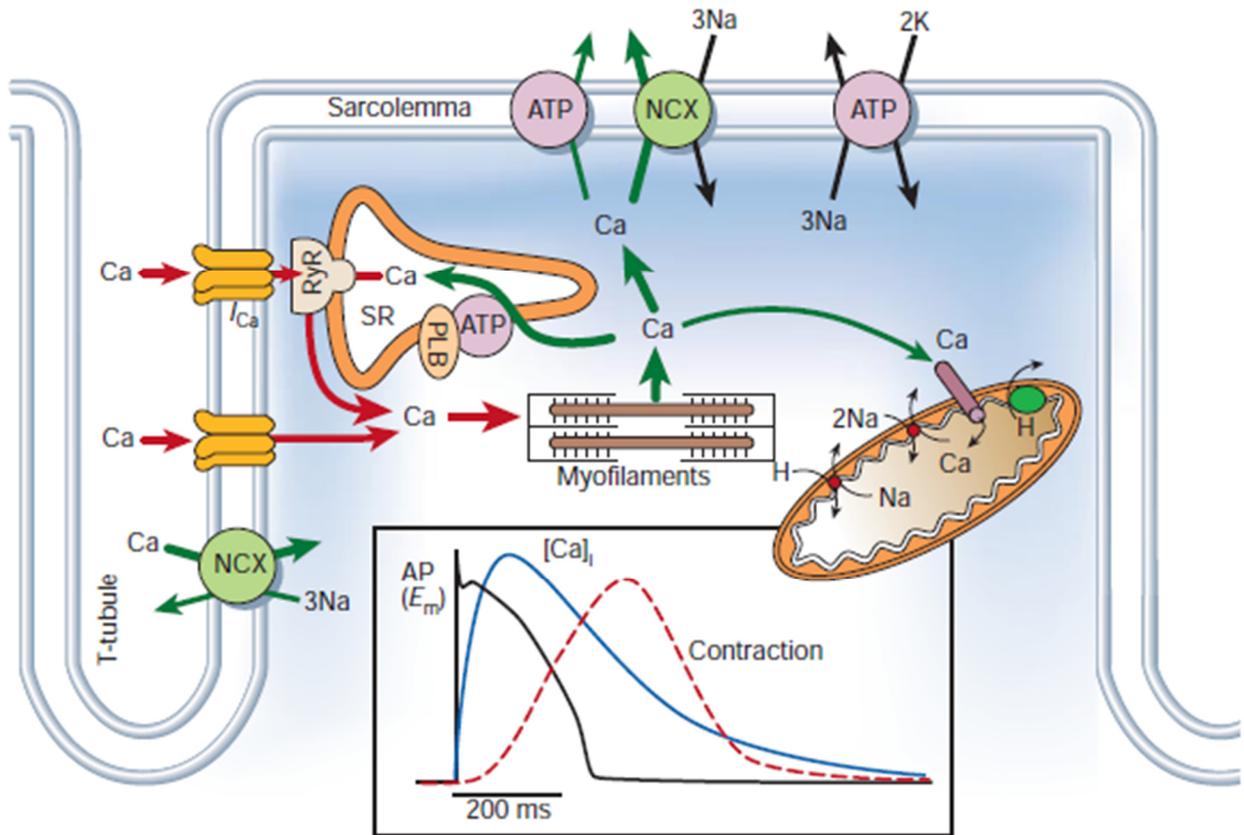


Abb. 1-4: Der Kalziumstoffwechsel der Herzmuskelzelle: Der Kalziumeinstrom im Bereich der Diade bewirkt ein Öffnen der RyR und ein Entleeren der intrazellulären Kalziumspeicher. Das intrazelluläre Kalzium lagert sich an die Myofilamente und bewirkt die Kontraktion. Nach Abdiffusion von den Myofilamenten transportiert die in ihrer Funktion vom Phospholamban (PLB) abhängige SERCA das Kalzium zum einen wieder in das SR, zum anderen transportiert eine Kalzium-ATPase unter Energieaufwand Kalzium nach extrazellulär. Ebenfalls nach Extrazellulär transportiert der NCX im Austausch zu Natriumionen das Kalzium. Ein weiterer Kalziumkanal in den Mitochondrien transportiert einen geringen Anteil der Ionen, angetrieben durch weitere Pumpen, in das Zellorganell (modifiziert aus Bers 2002b).

Weitreichende Folgen ergeben sich für die Zelle, wenn der Kalziumhaushalt nicht konstant bleibt. Verlust oder Kumulation des intrazellulären Kalziums begünstigt die Entstehung von Herzrhythmusstörungen und kontraktile Dysfunktion (Bers 2002a; Pogwizd et al. 2001).

1.2.3 Intrazelluläre Kalziumfreisetzung über IP₃

Neben der kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung gibt es noch einen alternativen Mechanismus, der Kalzium aus intrazellulären Speichern freisetzt.

Über den *second messenger* Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP₃), der in fast allen eukaryoten Zellen vorkommt, kann Kalzium durch Aktivierung von IP₃ Rezeptoren (IP₃R), die als Kalziumkanäle fungieren, freigesetzt werden. IP₃R liegen nicht nur in der Membran des SR, sondern auch des Nucleus oder des Golgi-Apparates (Rizzuto und Pozzan 2006). In der Vergangenheit war den kardialen IP₃R nur geringe Aufmerksamkeit zuteil geworden, da diese der Menge der RyR deutlich unterlegen sind (Lipp et al. 2000).

Anders als die RyR werden die IP₃R durch den *second messenger* IP₃ aktiviert, welches über eine Signalkaskade, ausgelöst durch extrazelluläre Liganden, freigesetzt wird. Durch Bindung des Liganden an seinen G-Protein gekoppelten Rezeptor wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert und spaltet aus dem Membranbestandteil Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) das IP₃. Das hydrophile IP₃ diffundiert in das Plasma und hat eine deutlich größere Reichweite als viele andere *second messenger*. Es kann bis zum SR oder Nucleus diffundieren (Allbritton et al. 1992; Wu X et al. 2006). Das Zielprotein ist der IP₃R, von dem drei Isoformen existieren. Der häufigste am Herzen ist der IP₃R Typ 2 (Bare et al. 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass auch eine IP₃-abhängige Aktivierung der RyR stattfinden kann. Eine Exposition der Zellen mit membrangängigem IP₃ erzeugte verstärkte Kalziumfreisetzung aus dem SR (Domeier et al. 2008; Drawnel et al. 2012) und konnte durch Hemmung der RyR wieder gemindert werden (Harzheim et al. 2009). Interessanterweise konnten Signore et al auch einen RyR-unabhängigen Effekt des IP₃ auf das Aktionspotential nachweisen, sodass möglicherweise IP₃ auch einen direkten Effekt auf Ionenkanäle haben kann (Roderick und Knollmann 2013; Signore et al. 2013). Welchen Stellenwert das IP₃, IP₃R und die durch sie bedingte Kalziumausschüttung bei der Herzinsuffizienz einnehmen ist noch weitestgehend unbekannt.

1.2.4 Natriumhaushalt der Herzmuskelzelle

Um den elektrochemischen Gradienten der Zelle aufrecht zu erhalten, pumpt die Natrium/Kalium-ATPase (NKA) unter hohem Energieaufwand 3 Natriumionen im Austausch für zwei Kaliumionen aus der Zelle. Der dadurch entstehende Natriumgradient mit niedriger intrazellulärer Natriumkonzentration $[Na^+]_i$ wird von der Zelle für verschiedene Funktionen genutzt. Bei der Öffnung von spannungsabhängigen Natriumkanälen folgen die Ionen ihrem elektrochemischen Gradienten, es kommt zum Natriumeinstrom in die Zelle. Dieser Natriumeinstrom führt durch die Ladungsverschiebung zur Depolarisation und zum schnellen Aufstrich des Aktionspotentials. Der durch die NKA entstandene Kaliumgradient führt dagegen während der Repolarisation zur Ausbildung des Ruhemembranpotentials (Ruan et al. 2009).

Des Weiteren nutzen verschiedene sekundär aktive Transporter diesen Gradienten. Der NCX spielt eine Rolle bei der Relaxation des Myozyten (siehe Kapitel 1.2.2), der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) reguliert über den Gradienten den intrazellulären pH-Wert (Deitmer und Ellis 1980).

1.2.5 Veränderungen bei der Herzinsuffizienz

Bei der Herzinsuffizienz -ursächlich können mechanische Belastung durch Klappenfehler und arterielle Hypertonie oder humorale Faktoren wie Angiotensin II und Katecholamine sein- kommt es zu ultrastrukturellen Veränderungen im Herzen, dem sogenannten kardialen Remodeling.

Mikroskopisch sichtbar ist eine Zunahme der extrazellulären Matrix und von Kollagenfasern (Weber und Brilla 1991; Weber et al. 1993), des Laminins (Morishita et al. 1996) und Fibronektins (Farhadian et al. 1996), welche die Myozyten durch den erhöhten Zelluntergang strukturell ersetzen.

Innerhalb der einzelnen Zellen führt eine gesteigerte Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, siehe Kapitel 1.6) zu einer erhöhten Apoptoserate der Zellen (Cheng W et al. 1995; Dowell et al. 1993; Ide et al. 2000; McMurray et al. 1993), den Zelluntergang versuchen die übrigen Myozyten durch Hypertrophie auszugleichen.

Auch spielen Störungen des intrazellulären Kalziumhaushaltes eine wichtige Rolle (Gwathmey et al. 1987). Eine verminderte Expression der SERCA (Hasenfuss et al. 1994; Ito Yet al. 1974; Meyer et al. 1995; Pieske et al. 1999; Schillinger et al. 1998) sowie ein relatives Überwiegen des inhibierenden PLB (Arai et al. 1993; Meyer et al. 1995) führen dazu, dass weniger Kalzium in das SR aufgenommen wird. Kompensatorisch wird das intrazellulär kumulierende Kalzium verstärkt über den NCX nach extrazellulär eliminiert. Es kommt nicht nur zu einer funktionellen Aktivitätserhöhung, sondern auch zu einer erhöhten Expression des NCX (Flesch et al. 1996; Lehnart et al. 1998; Pogwizd et al. 1999; Reinecke et al. 1996; Studer et al. 1994). Diese beiden Mechanismen führen dazu, dass langfristig weniger Kalzium in der Systole zur Verfügung steht. Außerdem könnte der gesteigerte nicht elektrogen ausgeglichene Transport des NCX, durch sich in der Zelle akkumulierende positive Ladungen, zu einem Anstieg des Ruhemembranpotentials führen und damit möglicherweise eine Ursache für die Ausbildung von Arrhythmien sein. Eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR (Beuckelmann et al. 1993; Marx et al. 2000), welche vor allem zu diastolischen Kalziumströmen aus dem SR führen, ist ein weiterer entscheidender Faktor, der den Kalziumverlust verstärkt.

Neben dem Kalzium spielen auch die Natrium- und Kaliumionen und ihre Kanäle und Transporter eine Rolle bei den zellulären Veränderungen der Herzinsuffizienz. Es konnte gezeigt werden, dass der Kalium-Kanal, der transient Kaliumionen nach extrazellulär transportiert und für die Repolarisation wichtig ist, weniger stark exprimiert wird (Beuckelmann et al. 1993; Kaab et al. 1998), wodurch sich die Aktionspotentialdauer verlängert (Kaab et al. 1996), was ein Risiko für die Entstehung von Arrhythmien sein kann. Ein verstärkter später Natriumstrom führt ebenfalls zu einer gestörten Repolarisation (Valdivia et al. 2005) und zu der zellulären Überladung mit Natriumionen (Wagner et al. 2006).

Ein Enzym, das im Rahmen der Herzinsuffizienzforschung in den letzten Jahren vermehrt an Bedeutung gewonnen hat, ist die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Als Kinase beeinflusst es über Phosphorylierung zahlreiche Enzyme in ihrer Aktivität (siehe Kapitel 1.5). So konnte gezeigt werden, dass die CaMKII nicht nur stark vermehrt in den insuffizienten Myozyten vorliegt (Hoch et al. 1999), sondern eine chronische Überexpression der CaMKII sogar zu der Entstehung einer Herzinsuffizienz führt (Kreusser und Backs 2014; Zhang T et al. 2003) und durch direkte Wirkung auf die Genexpression an der

Hypertrophieentstehung beteiligt ist (Zhang M et al. 2015; Zhang T et al. 2007) (siehe **Abb. 1-5**).

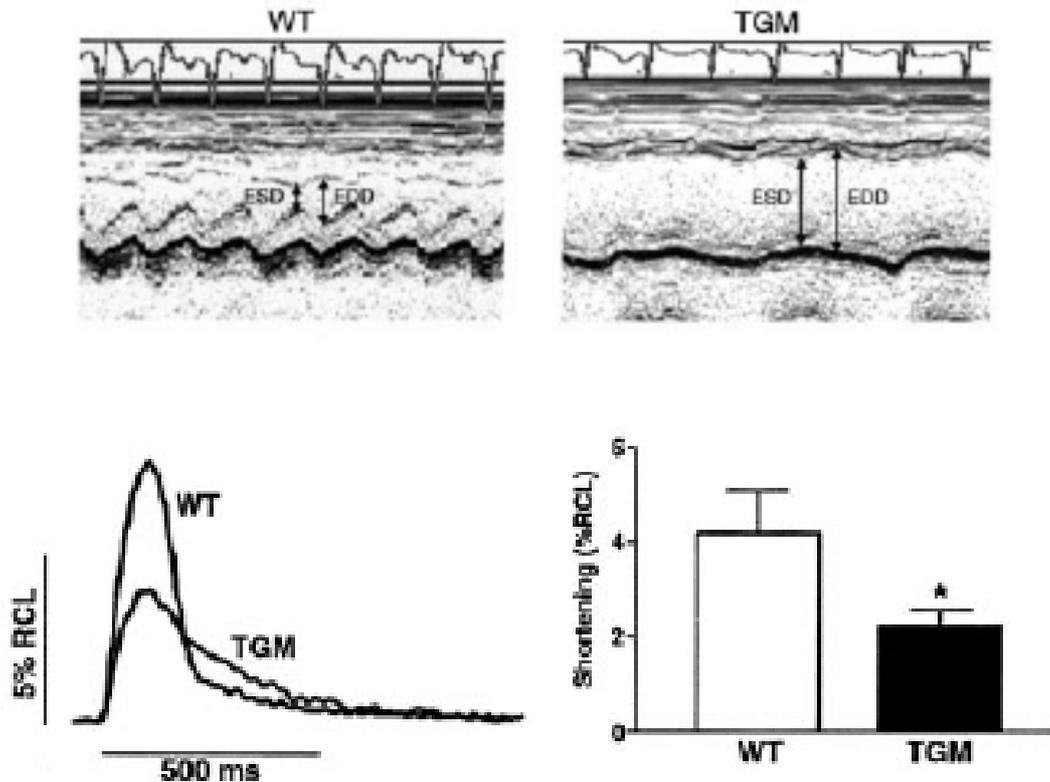


Abb. 1-5: Zhang et al. konnten im Jahr 2003 zeigen, dass in einer transgenetischen Maus mit CaMKII Überfunktion (TGM) im Vergleich zu einem Wildtyp (WT) im Ultraschall im M-Mode eine deutliche Herzinsuffizienz ausbilden. Auch die Kontraktile Dysfunktion, gemessen als Zellverkürzung bei Kontraktion (RCL), ist sowohl in der Originalregistrierung als auch dem Mittelwert eindrücklich dargestellt.

1.3 Herzrhythmusstörungen

Zur suffizienten Blutversorgung des Körpers muss das Herz rhythmisch reguliert kontrahieren. Störungen dieses Herzrhythmus können durch akute Mangelversorgung des Gehirns und der inneren Organe zum Tod führen. Unter den Begriff Herzrhythmusstörung fallen arrhythmische Erregungsbildung und -abfolge, Abweichen der normalen Herzfrequenz unter 50 Schläge/min oder über 100

Schläge/min (Bradykardie, Tachykardie) und eine gestörte einzelne Herzaktion (Xiao YF 2011).

Die häufigste erworbene Ursache von Rhythmusstörungen ist die ischämische Herzerkrankung, wobei auch Elektrolyt- oder Hormonstörungen in Arrhythmien resultieren können. Es gibt aber auch angeborene Gründe. So können akzessorische Leitungsbahnen wie beim Präexzitationssyndrom eine AV-Reentry-Tachykardie auslösen. Auch hereditäre Kanalopathien bergen das Risiko des plötzlichen Herztodes durch Rhythmusstörungen. Das Long-QT-Syndrom, häufig durch eine Mutation des Kalium- oder Natriumkanals verursacht (Curran ME et al. 1995; Wang Q et al. 1995), führt zu einer gestörten Repolarisation und äußert sich im EKG durch ein verlängertes QT-Intervall. Ein weiteres Beispiel für eine primär elektrische Herzerkrankung ist das Brugada-Syndrom, welches mit einer Störung des Natriumkanals assoziiert ist (Siehe Kapitel 1.4.3).

1.3.1 Erregungsbildung und Erregungsleitung

Die Erregungsbildung geschieht im Normalfall in speziellen Herzmuskelzellen im Sinusknoten, den Schrittmacherzellen. Diese kennzeichnen sich durch ein instabiles Ruhemembranpotential, das bei Überschreiten eines Schwellenpotentials depolarisiert und ein Aktionspotential (AP) bildet, das über das Reizleitungssystem fortgeleitet wird. Über dieses Reizleitungssystem wird das gesamte Myokard geordnet elektrisch erregt und führt zu einer effektiven Kontraktion des Herzens.

Das AP am Herzen unterscheidet sich zu anderen Geweben durch einige Besonderheiten. Das Sarkolemm ist im unerregten Zustand nur für Kaliumionen permeabel, was dazu führt, dass die Kaliumionen ihrem elektrischen Gleichgewicht (elektrische Spannung) und chemischen (Konzentrations-) Gleichgewicht folgen. Das Ruhemembranpotential an der Herzmuskelzelle von -85 mV liegt aufgrund dieser Kaliumdurchlässigkeit dem Gleichgewichtspotential (vgl. Kapitel 2.3.5) der Kaliumionen von -90 mV sehr nahe (Korbmacher et. al 2003).

Ein meist elektrischer Reiz kann bei den Myozyten das AP auslösen. Das AP kann in fünf Phasen unterteilt werden (**Abb. 1-6**; (Birkeland et al. 2005). In der Phase 0 kommt es zur Depolarisation. Durch den elektrischen Reiz öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle und bewirken einen kurzen schnellen

Natriumeinstrom (I_{Na}), der entlang seines Gleichgewichtspotentials fließt (Siehe Kapitel 2.3.5). Das Membranpotential wird positiv und steigt auf etwa +40 mV an. In der Phase 1 kommt es zum Ausstrom von Kaliumionen (I_{To}) durch geöffnete Kaliumkanäle, so kommt es zu einer kurzen schnellen Repolarisationsphase, in der das AP leicht abfällt. Die Plateauphase schließt sich als 2. Phase an. Das Plateau entsteht durch das durch die Depolarisation ausgelöste Öffnen von spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und einen Einstrom von Kalzium- (I_{Ca}) und gleichzeitigem Ausstrom von Kaliumionen (I_{Ks} und I_{Kr}). Das Membranpotential bleibt für mehrere Millisekunden konstant. Durch ein Abnehmen des Kalziumeinstroms und ein Steigen des Kaliumausstroms kommt es anschließend zur Repolarisation bis schließlich das Ruhemembranpotential wieder erreicht ist. In der letzten Phase bleibt das Ruhemembranpotential stabil, bis eine erneute Depolarisation ein Aktionspotential auslöst.

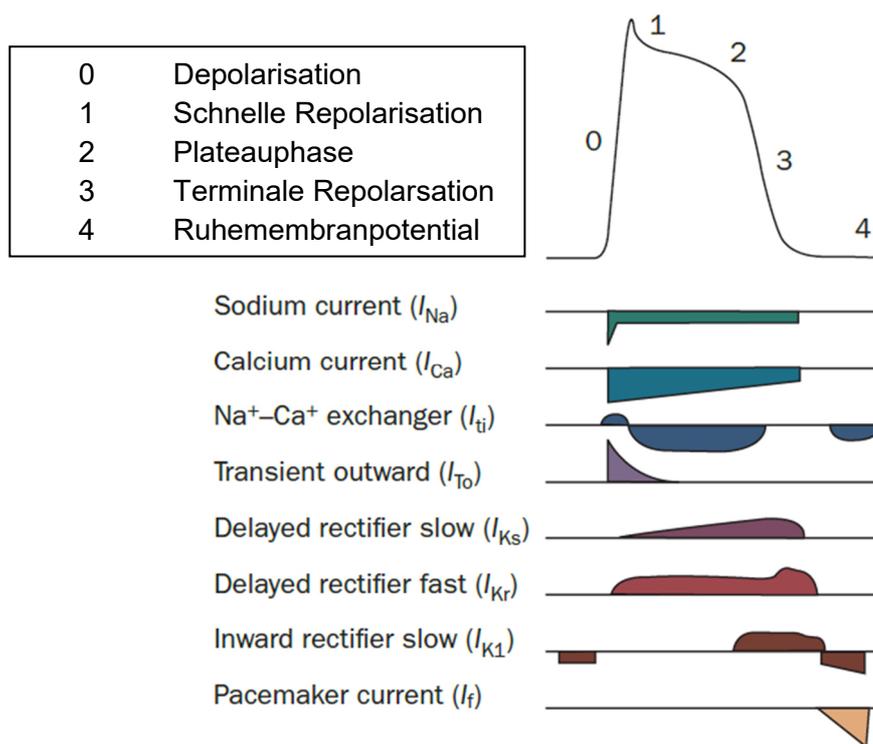


Abb. 1-6: Schematische Darstellung eines Aktionspotentials im Kardiomyozyten und den Ionenströmen. (0) Depolarisation, durch schnellen Natriumeinstrom kommt es zum Aktionspotentialaufstrich, (1) Schnelle Repolarisationsphase durch Ausstrom von Kaliumionen, (2) die Plateauphase kommt durch die intrazelluläre Kalziumfreisetzung zustande, (3) Repolarisation durch Kaliumausstrom und abnehmenden Kalziumeinstrom bis zum (4) Ruhemembranpotential (modifiziert aus (Ruan et al. 2009)).

1.3.2 Störungen der Erregungsbildung und Erregungsleitung

Kommt es zu Schäden an der Zellmembran, zum Beispiel durch Ischämie oder Elektrolytstörungen, kann diese undicht werden und die Gradienten zwischen dem Intrazellular- und Extrazellularraum nicht mehr aufrechterhalten. Das Ruhemembranpotential wird positiver und erreicht schneller sein Schwellenpotential, wodurch ein abnorm gebildetes AP entstehen kann (Zipes 2003).

Eine weitere Ursache für die Arrhythmieentstehung ist die sogenannte getriggerte Aktivität. Hervorgerufen wird diese durch Spannungssoszillationen an der Zellmembran und kann zu Nachdepolarisationen (*afterdepolarisations*) führen. Man unterscheidet *early afterdepolarisations* (EADs), welche vor Erreichen des Ruhemembranpotentials auftreten und vor allem durch eine verlängerte AP-Dauer hervorgerufen werden, von *delayed afterdepolarisations* (DADs, Zipes 2003). Diese treten nach Erreichen des Ruhemembranpotentials auf (**Abb. 1-7**). Eine Aktionspotentialverlängerung kann durch persistierenden Natrium- und Kalziumeinstrom oder verminderten Kaliumausstrom bedingt sein (Tomaselli und Zipes 2004). DADs sind vor allem ein Effekt der Kalziumüberladung und spontaner Kalziumfreisetzung aus dem SR, welches über den NCX einen Natriumeinstrom und eine Depolarisation bewirkt (Bers et al. 2002; Zipes 2003).

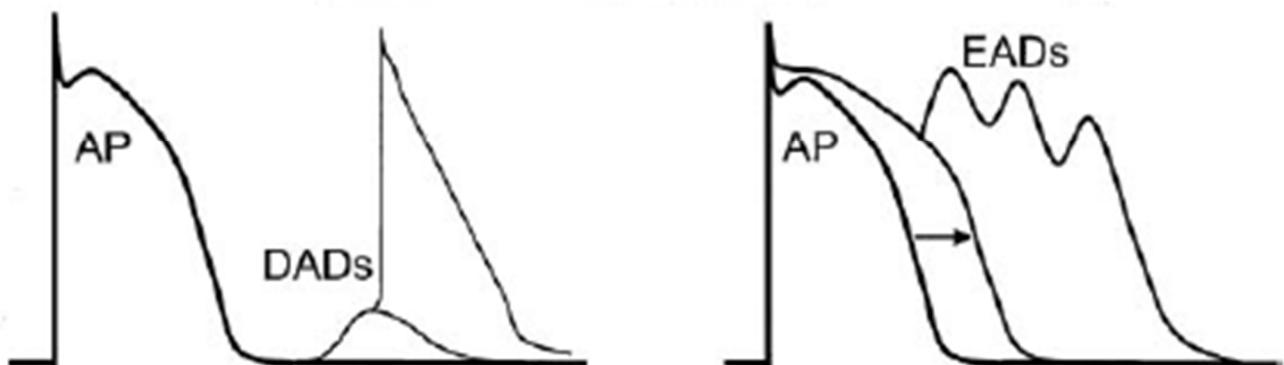


Abb. 1-7: Nachdepolarisationen werden unterschieden in EADs und DADs, welche beide von einem vorausgegangenen AP getriggert sind. Gegenübergestellt sind EADs und DADs. Wird bei einem DAD das Schwellenpotential der Zelle erreicht, kommt ein neues AP zustande. EADs entstehen bei einer verlängerten Dauer des APs (modifiziert aus Bers 2002a).

Neben gestörter Erregungsbildung können auch durch Störungen in der Erregungsleitung Arrhythmien entstehen. Leitungsstörungen können entweder durch kreisende Erregungen (*Reentry*) oder durch einen Leitungsblock hervorgerufen werden.

Ein Block der Erregungsleitung kann durch nicht erregbare narbige Fibrosen im Myokard hervorgerufen werden. Auch ein fehlendes Öffnen der spannungsabhängigen Natriumkanäle kann einen Block hervorrufen. Dies kann durch ein Verschließen der Gap junctions bei zu hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen vorkommen (Weingart 1977).

Normalerweise schützt sich das Myokard vor kreisenden Erregungen, indem nach einer Erregung das Gewebe für eine gewisse Zeit refraktär ist und damit direkt nach einer Erregung kein neues Aktionspotential an der Zelle generiert werden kann. Besitzen benachbarte Myokardareale unterschiedliche Refraktärzeiten und damit unterschiedliche Leitungseigenschaften (*dual pathway*), können an dieser Stelle kreisende Erregungen entstehen (Abb. 1-8)

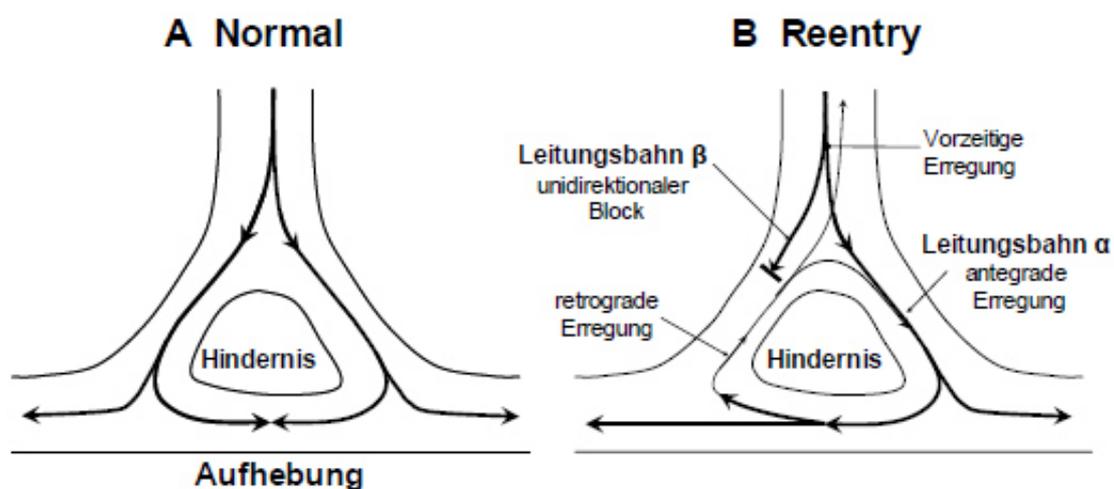


Abb. 1-8: Liegen ein Abschnitt α mit einer kurzen und ein Abschnitt β mit einer langen Refraktärzeit nebeneinander, kann der Abschnitt β bei einer vorzeitig eintreffenden Erregung nicht leiten. Die Erregung wird anterograd in Abschnitt α weitergeleitet, kann dann aber retrograd das Gewebe β , welches nun nicht mehr refraktär ist, erregen und über Abschnitt α den Kreis der Erregung schließen und weiter fortleiten, solange diese erregbare Lücke vorliegt (Zipes 2003). Da β nur in einer Richtung retrograd erregbar ist spricht man vom unidirektionalen Block (modifiziert aus BERS 2001)

Neben dem beschriebenen Reentry um ein anatomisches Hindernis gibt es eine kreisende Erregung, deren Refraktarität durch die kreisende Erregung bedingt ist. Dieses funktionelle Reentry variiert in der Länge der Erregungswellen (Zipes 2003).

1.4 Der spannungsabhängige sarkolemmale Natriumkanal

Der Natriumkanal spielt in der Elektrophysiologie eine entscheidende Rolle. Er ist für die Depolarisation der Zellmembran und für die elektrische Erregung und Weiterleitung verantwortlich, eine essentielle Eigenschaft vor allem der Nerven und Muskelzellen. Dies spiegelt sich auch in der relativen Anzahl des Natriumkanals im Vergleich zu anderen Ionenkanälen wider, so gibt es am Herzen bei Säugetieren etwa 5-mal so viele spannungsabhängige sarkolemmale Natriumkanäle wie L-Typ-Kalziumkanäle (Makielski et al. 1987; Rose et al. 1992).

Der Natriumkanal ist zu Beginn des APs für den schnellen Aufstrich zuständig und bewirkt die schnelle kardiale Überleitung im Myokard, damit ist dieser Kanal hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung des Herzrhythmus.

1.4.1 Aufbau und Funktion des Natriumkanals

Der Natriumkanal setzt sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen. Der Durchtritt der Natriumionen durch die Zellmembran geschieht in der α -Untereinheit, weitere 1-3 β -Untereinheiten haben regulierende Funktionen (Catterall 1992).

Die α -Untereinheit setzt sich aus 4 homologen Domänen DI-IV zusammen, welche wiederum aus jeweils 6 transmembranären Segmenten S1-6 bestehen. Insgesamt ergibt sich für die α -Untereinheit ein Molekulargewicht von etwa 260 kDa. Die eigentliche Pore, welche für die Selektivität und Leitfähigkeit des Kanals zuständig ist, bildet sich aus allen Verbindungen (*Linkern*) zwischen den Segmenten S5 und S6 (Catterall 1992; Marban et al. 1998). Die spannungsabhängige Öffnung wird über das positiv geladene Segment S4 reguliert, welches bei Depolarisation die Kanalformation ändert, was in einer Öffnung resultiert (Stuhmer et al. 1989). Diese Kanalöffnung ist direkt mit einer schnellen Inaktivierung nach weniger als 10 ms verbunden und beendet automatisch den Natriumeinstrom (Chen LQ et al. 1996;

Kontis et al. 1997; O'Leary et al. 1995). Dem Prozess der schnellen Inaktivierung scheint ein komplexer Mechanismus zugrunde zu liegen und ist bis heute nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass die Inaktivierung über eine Verbindung reguliert wird, die auf intrazellulärer Seite zwischen den Domänen DIII und DIV liegt, die sogenannte IFM-Region bestehend aus Isoleucin, Phenylalanin und Methionin. Antikörper gegen diese Region sowie Mutationen in diesem Bereich führen zu Veränderungen des Inaktivierungsprozesses (Stuhmer et al. 1989; Vassilev et al. 1988). Der Aufbau des Kanals ist in **Abb. 1-9** dargestellt.

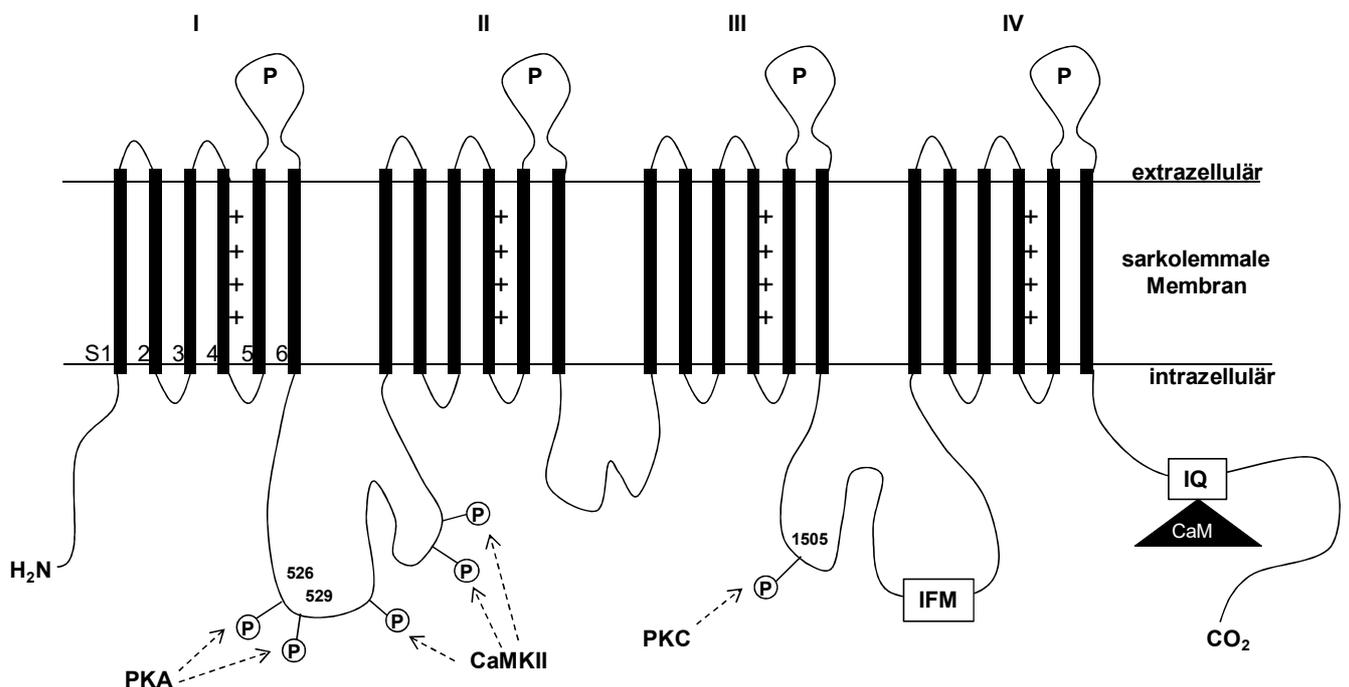


Abb. 1-9: Schematische Darstellung der α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals. Diese wird gebildet aus 4 Domänen jeweils bestehend aus 6 transmembranären Segmenten S1-6, wobei das positiv geladene S4 spannungsabhängig die Öffnung der Pore, die sich aus den *Linkern* zwischen den S5 und S6 bildet, reguliert. Für die schnelle Inaktivierung des Natriumkanals ist unter anderem die IFM-Region verantwortlich, welche über komplizierte Wechselwirkungen den Kanal schließt. Die Phosphorylierungsstellen liegen intrazellulär im Linker I-II (PKA und CaMKII) sowie Linker III-IV (PKC). Ein Kalziumsensor, der das Calmodulin (CaM) bindet, liegt am IQ-Motiv des C-Terminus.

Neben diesem III-IV-Linker scheinen auch andere Regionen, wie beispielsweise der oben genannte aktivierende S4, an der Inaktivierung beteiligt zu sein (Tang et al. 1996). Man vermutet, dass die Inaktivierung allosterisch über hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb des Natriumkanals reguliert wird (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott 1999). Der geschlossene Zustand des Kanals wird zusätzlich über Wechselwirkungen zwischen dem III-IV-Linker und dem C-Terminus stabilisiert (Motoike et al. 2004).

Zum weiteren Verständnis muss der geschlossene Kanal vom inaktivierten Zustand (I_{fast}) abgegrenzt werden. Im inaktivierten Zustand ist der Kanal geschlossen und lässt sich durch eine Depolarisation nicht öffnen. Um wieder in den aktivierbaren Zustand zu gelangen, muss eine Hyperpolarisation erfolgen. Außerdem gibt es den sogenannten *closed-state-inactivation* Zustand, bei dem der Kanal ohne vorher geöffnet zu werden in den inaktivierbaren Zustand übergeht (Horn et al. 1981).

Neben dem I_{fast} gibt es noch eine langsame (I_{slow}) und eine von der Kinetik dazwischen liegende intermediäre Inaktivierung (I_M) (Kambouris et al. 1998; Wang DW et al. 2000). Diese wird durch eine verlängerte Depolarisationsdauer von mehreren Millisekunden induziert und kann über mehrere Sekunden andauern (Adelman und Palti 1969; Chandler und Meves 1970). Bei wiederholter zyklischer Aktivierung wird so die Verfügbarkeit der Natriumkanäle reduziert und die Zelle weniger erregbar.

Den β -Untereinheiten wird eine regulatorische Funktion zugeordnet, die bisher aber noch weitestgehend ungeklärt ist. Man vermutet dass sie das Gating-Verhalten des Natriumkanals beschleunigen (Makita et al. 1996). Ein Knockout der β -Untereinheit führte im Maus-Modell zu verlängerten QT-Zeiten und größeren RR-Abständen (Lopez-Santiago et al. 2007) und ist ebenfalls assoziiert mit kardialen Arrhythmien (Medeiros-Domingo et al. 2007; Watanabe et al. 2008).

1.4.2 Regulation des Natriumkanals

Der Natriumkanal kann durch Phosphorylierung reguliert werden. Durch unterschiedliche Phosphorylierungsstellen (siehe oben **Abb. 1-9**) ergeben sich unterschiedliche komplexe Effekte. Die PKA, eine Proteinkinase, kann den Kanal zwischen Domäne I und II phosphorylieren. Angriffspunkt sind dort zwei Serin-Reste (Ser526 und Ser529) (Murphy et al. 1996). Die Phosphorylierung bewirkt eine

Zunahme der Leitfähigkeit ohne Einfluss auf die Spannungsregulation zu nehmen (Frohnwieser et al. 1997; Schreibmayer et al. 1994).

Durch Phosphorylierung eines Serin-Restes (Ser1505) im Bereich des Linkers III-IV durch die Proteinkinase C (Murray et al. 1997) kommt es zu einem gegenteiligen Effekt, die Leitfähigkeit nimmt ab. Zusätzlich kommt es zu einer schnelleren Inaktivierung des Kanals (Qu et al. 1994; Qu et al. 1996).

Auch die CaMKII kann den spannungsabhängigen Natriumkanal an verschiedenen Aminosäuren (beispielsweise Ser-516, Thr-594 und Ser571) phosphorylieren. Diese liegen zwischen Domäne I und II (Ashpole et al. 2012; Glynn et al. 2015). Durch die Wirkung der CaMKII an dem Natriumkanal wird dessen Gating-Verhalten verändert (Hund et al. 2010; yyWagner et al. 2006). Im Mausmodell mit transgenetischer Überexpression der CaMKII δ_c konnte gezeigt werden, dass der Natriumspitzenstrom unverändert bleibt während es vor allem zu einer signifikanten Steigerung des späten Natriumstroms kommt. Bezüglich des Gating-Verhaltens des Kanals findet die Erholung aus dem inaktivierten Zustand verzögert statt (Wagner et al. 2006).

(Hund et al. 2010) zeigten, dass die CaMKII auch einen regulatorischen Effekt auf den Natriumkanal über β_{IV} -Spektrin hat. Dieses Protein ist signifikant im Gewebe von insuffizienten Herzen vermindert (Hund et al. 2014).

Neben der Kalzium-abhängigen Regulation über die CaMKII, kann das CaM auch direkt am Natriumkanal binden. Am C-Terminus des Natriumkanals befindet sich das IQ-Motiv als CaM-Bindungsstelle (**Abb. 1-9**), hierüber wird das Gating-Verhalten des Kanals verändert und die langsame Inaktivierung verlängert (Tan et al. 2002).

Gewebsspezifische Genexpression kann durch Transkription der oben genannten α - und β -Untereinheiten ebenfalls den Natriumkanal beeinflussen. Genauso kann durch posttranslationale Modifikation, wie Glykosylierung und Phosphorylierung, der Kanal weiter reguliert werden (Cai et al. 2014; Ednie und Bennett 2012; Marionneau und Abriel 2015; van den Boogaard et al. 2014).

Viele exogene Toxine und Medikamente entfalten ihre Wirkung am Natriumkanal. Lokalanästhetika hemmen die neuronale AP-Weiterleitung, indem sie am S6-Segment der Domäne IV des Kanals binden (Ragsdale et al. 1994) und so eine schnellere Inaktivierung erfolgt (Balsler et al. 1996). Auch Neurotoxine wirken am Natriumkanal. Das aus dem Kugelfisch bekannte Tetrodotoxin (TTX) wirkt schon in geringen Dosen sehr effektiv. Die Bindungsstelle liegt im Bereich der Domäne I zwischen S5 und S6, der Kanal wird blockiert (Lipkind und Fozzard 1994). Die

Toxine der Seeanemone (ATX II) und das α -Toxin des Skorpions binden im Bereich des Linkers zwischen S3 und S4 der Domäne IV und bewirken eine Inhibierung der schnellen Inaktivierung (Rogers et al. 1996). Die Wirkungen dieser Neurotoxine konnten viel zum Verständnis der Struktur und Funktionsweise des sarkolemmalen spannungsabhängigen Natriumkanals beitragen.

1.4.3 Mutationen des Natriumkanals

Verschiedene Mutationen, die sowohl die α - als auch die β -Untereinheit des Natriumkanals betreffen können, führen zu Funktionsänderungen des Natriumkanals und zu einem deutlich erhöhtem Risiko der Ausbildung von lebensbedrohlichen Arrhythmien (Ruan et al. 2009).

Multiple Mutationen des Gens SCN5A, welches die Kodierung für die α -Untereinheit beinhaltet (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott 1999), führen zu dem hereditären Krankheitsbild des Long-QT Syndroms 3 (LQT3). Bei diesen Mutationen kommt es nach der Depolarisation zu einem Ausbleiben der schnellen Inaktivierung, der Natriumkanal öffnet sich erneut während der Plateauphase des APs, insgesamt kommt es also zu einer gesteigerten Aktivität (*gain of function*) (Bennett et al. 1995). Durch die dadurch verlängerte Repolarisationsdauer, im EKG ist diese Repolarisationsstörung als eine Verlängerung des QT-Intervalls sichtbar, ist das Gewebe anfälliger für EADs und Ausbildung polymorpher ventrikulärer Tachyarrhythmien, den sogenannten *Torsade-de-pointes-Tachykardien*.

Eine gegenteilige Funktionseinschränkung über eine *loss of function* des Natriumkanals, die ebenfalls das Risiko des plötzlichen Herztodes birgt, findet bei Mutationen statt die zu dem Brugada-Syndrom (Brugada und Brugada 1992) führen. Die Mutationen, die mit diesem Krankheitsbild in Verbindung gebracht werden, sind variabel und liegen auf fast allen Regionen des Natriumkanals verstreut (Tan et al. 2003), einige Mutationen können bis hin zum kompletten Funktionsverlust des Natriumkanals führen (Chen Q et al. 1998). Ist der Natriumstrom so gering, dass die DHPR nicht aktiviert werden, resultiert daraus ein stark verkürztes AP ohne Ausbildung des Plateaus. Bei einer ausreichenden Depolarisation, um Kalziumeinstrom zu aktivieren, ist das AP durch den verzögerten Ablauf verlängert. Es handelt sich hierbei um ein Alles-oder-Nichts-Prinzip. Im EKG sind bei den Mutationsträgern typische ST-Strecken-Hebungen in den rechts-präcordialen

Ableitungen V_1 - V_3 ableitbar (**Abb 1-10**) (Antzelevitch et al. 1999; Nielsen et al. 2013), bei unauffälligem EKG können diese durch Natriumkanalblocker demaskiert werden (Fujiki et al. 1999; Miyazaki et al. 1996).

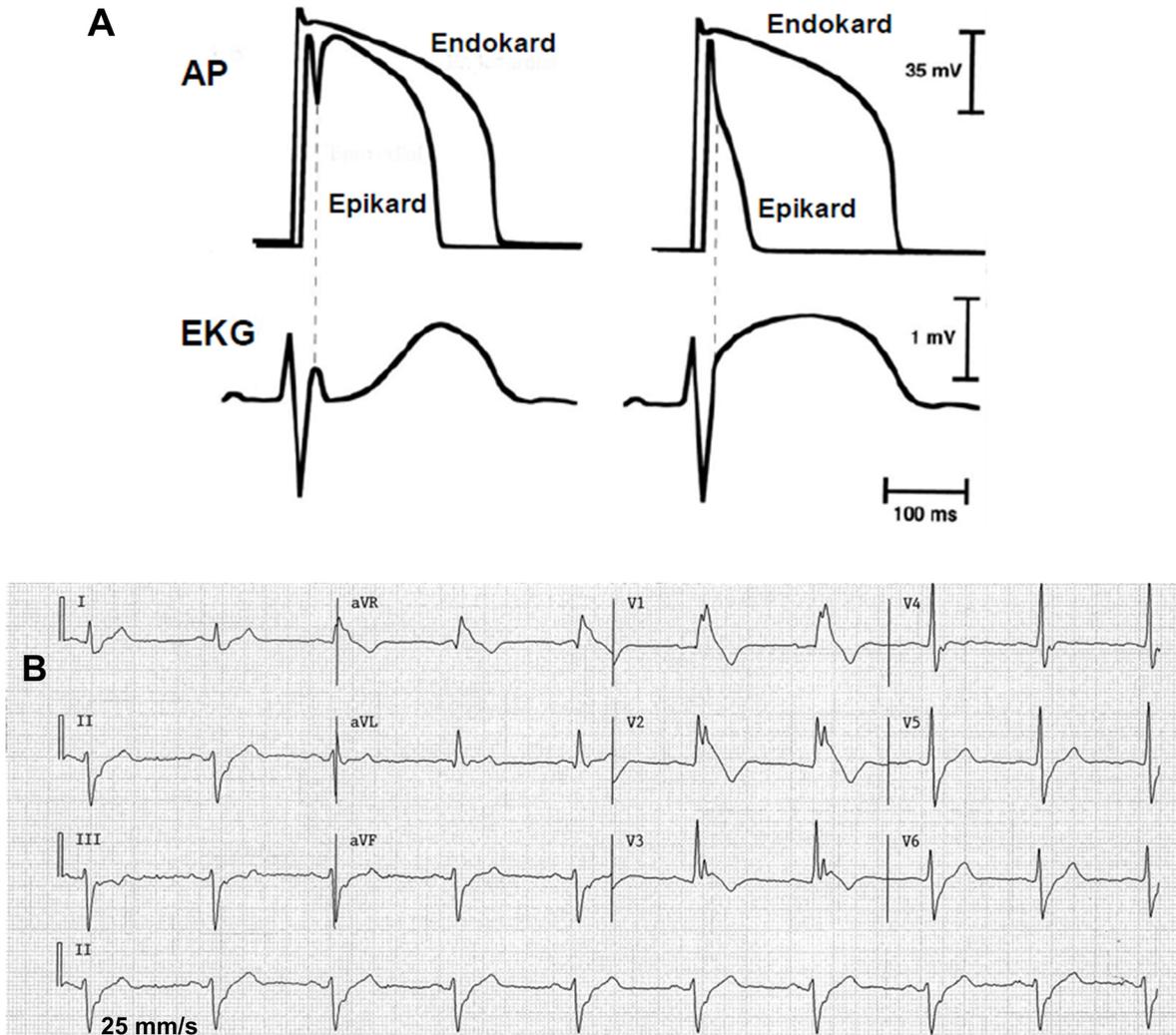


Abb. 1-10: Dargestellt sind typische Veränderungen beim Brugada Syndrom. (A) demonstriert die EKG typischen Auswirkungen auf das EKG bei den AP – Unterschieden zwischen Epikard und Endokard. (B) Zeigt eine typische EKG-Ableitung eines Brudgada-Syndroms. Man erkennt rechtspräkordiale ST-Streckenhebungen (V_1 und $V_3 > 0.1$ mV), sowie einen Rechtsschenkelblock. (Aus Alings und Wilde 1999, Seite 667-669).

Neben den typischen Veränderungen in der α -Untereinheit konnte in den Phänotypen sowohl des LQT3 als auch des Brugada-Syndroms, bei denen keine Mutationen im SCN5A-Gen nachweisbar waren, Mutationen in den β -Untereinheiten identifiziert werden (Medeiros-Domingo et al. 2007; Watanabe et al. 2008).

In den letzten Jahren wurden diverse Mutationen des SCN5A-Gens auch anderen Rhythmusstörungen zugeordnet. So konnten auch beim Sick-Sinus-Syndrom (Benson et al. 2003; Smits et al. 2005) und im strukturell gesunden Herzen mit Vorhofflimmern (Darbar 2008) Genmutationen in diesem Locus nachgewiesen werden.

1.5 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II gehört zu den Proteinkinasen, die über Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine deren Aktivität modulieren können. Diese Untergruppe der Proteinkinasen wird über Bindung von Kalzium-gebundenen Calmodulin (CaM) aktiviert.

Von den unterschiedlichen Isoformen der CaMKII (α , β , γ , δ) ist die CaMKII δ diejenige, die am meisten im Myokard vorliegt (Maier und Bers 2002). Die Splicevariante CaMKII δ_C ist hauptsächlich im Zytosol, CaMKII δ_B überwiegend im Zellkern vorhanden (Edman und Schulman 1994).

1.5.1 Struktur der CaMKII

Die CaMKII setzt sich aus 6 bis 12 Monomeren zusammen, von denen sich die einzelnen Monomere aus jeweils drei Untereinheiten zusammensetzen. Am aminoterminalen Ende befindet sich die katalytische Einheit, mittig liegt eine regulatorische Domäne und am Carboxylterminus eine für die Oligomerisierung zuständige Einheit (Braun und Schulman 1995). Die Monomere sind radiär zueinander angeordnet, wobei die C-terminalen Bindungsdomänen zentral und die katalytischen Untereinheiten am N-terminalen Domänen außen liegen (**Abb. 1-11**) (Kanaseki et al. 1991).

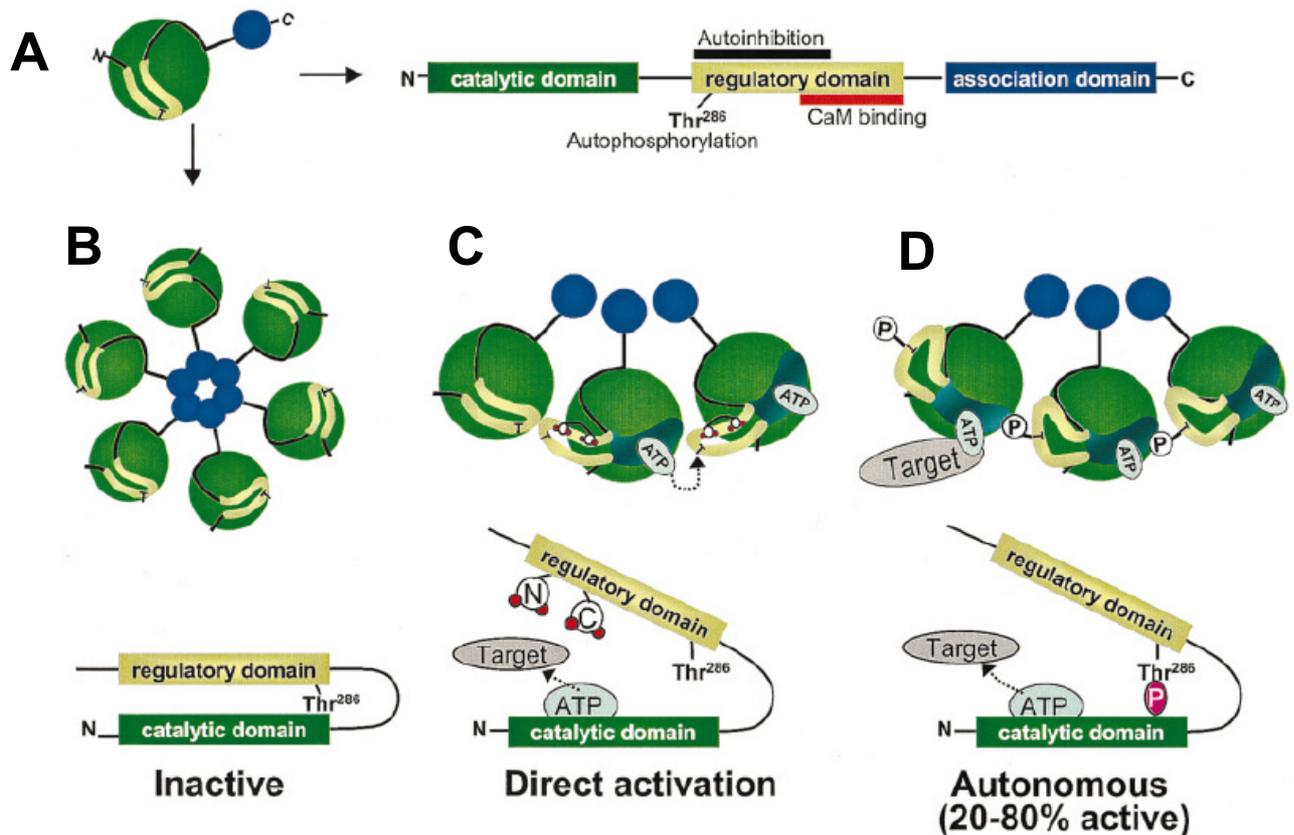


Abb. 1-11: Schematischer Aufbau der CaMKII. (A) Ein Monomer und seine Bildung aus katalytischer, regulatorischer und oligomerisierender Domäne. (B) Radiäre Anordnung der Monomere zur CaMKII, die katalytische Domäne liegt außen. (C) Durch Bindung von Ca²⁺/Calmodulin wird die CaMKII aktiviert und (D) bleibt auch nach Abdiffusion von Ca²⁺/Calmodulin durch Autophosphorylierung aktiviert (Maier und Bers 2002).

1.5.2 Aktivierung und Funktion der CaMKII

Der klassische Aktivierungsweg der CaMKII erfolgt über Ca²⁺/Calmodulin. Zunächst bindet Calmodulin zytosolisches Kalzium und wird dadurch aktiviert. Durch die Bindung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes an der regulatorischen Domäne der CaMKII wird die Autoinhibition unterbrochen und das aktive Zentrum der katalytischen Domäne steht damit zur Interaktion mit Substraten zur Verfügung. Unter Spaltung eines ATPs können die Zielproteine phosphoryliert werden. Ferner kann die CaMKII sich autophosphorylieren, indem benachbarte Untereinheiten in Kontakt treten und Threonin an Position 287 (Thr-287) phosphoryliert wird (Hudmon und Schulman 2002). Diese Autophosphorylierung bewirkt vor allem eine

Affinitätssteigerung des Calmodulins für die CaMKII, sodass das Calmodulin auch bei sinkendem Kalziumspiegel und damit verbundener Abdiffusion des Kalziums an die CaMKII bindet, das sogenannte *CaM trapping* (Meyer et al. 1992). Des Weiteren bewirkt die Autophosphorylierung eine anhaltende Aktivierung der CaMKII auch über die Bindungsphase des Calmodulins hinaus. 20-80% der CaMKII bleiben so längerfristig aktiviert (**Abb. 1-11**, (Maier und Bers 2002).

Ferner kann die CaMKII auch über eine Oxidation des Methionins 281/282 aktiviert werden. Dieser Kalzium-unabhängige Mechanismus konnte 2008 (Erickson et al. 2008) nachgewiesen werden und wird durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, siehe Kapitel 1.6.2) hervorgerufen.

Eine weitere mögliche Aktivierung der CaMKII über β -adrenerge Stimulation ist Gegenstand der aktuellen Forschung, dieser Weg scheint ebenfalls unabhängig von Kalzium über NO-Freisetzung vermittelt zu werden (Gutierrez et al. 2013).

Die aktivierte CaMKII beeinflusst durch Phosphorylierung vor allem verschiedene Proteine der elektromechanischen Kopplung. Zu den Zielproteinen gehören die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, die Ryanodinrezeptoren und Phospholamban, wodurch das Protein Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration nimmt (Maier und Bers 2002) und damit modulatorisch auf die elektromechanische Kopplung wirkt.

Neben diesen akuten Wirkungen der CaMKII gibt es noch langfristige Wirkungen, welche durch Modulation der Transkription beeinflusst werden. Durch Phosphorylierung des Histons *Deacetylase Type II* (HDACs, (McKinsey et al. 2000) durch intrazelluläre CaMKII kommt es zu einer gesteigerten Transkription in den Kardiomyozyten (Wu X et al. 2006).

1.5.3 Hemmung der CaMKII

Die CaMKII kann durch verschiedene Mechanismen sowie an verschiedenen Stellen inhibiert werden.

Das Peptid 273-302 ist ein synthetisch produzierter kompetitiver Hemmer, der im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne bindet und damit die Phosphorylierung der Zielsubstrate verhindert. Etwas anders wirkt das Peptid 291-317, dieses bindet das Calmodulin im aktiven Zentrum der CaMKII und verhindert auf diese Weise die Aktivierung der Kinase (Anderson et al. 1994; Payne et al. 1988; Smith et al. 1990).

Ein Inhibitor, der spezifisch in den Herzmuskelzellen die CaMKII hemmt, ist das an die regulatorische Domäne bindende KN93 (Anderson et al. 1998; Bassani RA et al. 1995). Es konnten jedoch interferierende CaMKII-unabhängig vermittelte Effekte an Kalziumkanälen nachgewiesen werden (Gao et al. 2006).

Ein Peptid, das über die Hemmung der Autophosphorylierung eine Inhibierung der CaMKII bewirkt, ist das *autocamtide-2-related inhibitory peptide* (AIP). Dieser hoch potente und spezifische Inhibitor (Ishida et al. 1995) wurde in der vorliegenden Arbeit zur Hemmung der CaMKII verwendet.

1.5.4 Der Zusammenhang der CaMKII, Herzinsuffizienz und Arrhythmien

Die CaMKII ist in den letzten Jahren vermehrt in das Interesse der Forschung gerückt. Es konnte eine Überexpression der CaMKII δ bei Herzinsuffizienz nachgewiesen werden (Hoch et al. 1999; Kirchhefer et al. 1999). Im transgenen Mausmodell führte eine Überexpression der CaMKII δ_c zu ventrikulärer Hypertrophie, dilatativer Kardiomyopathie und Störungen im Kalziumhaushalt mit Ausbildung einer Herzinsuffizienz. Eine Hemmung der CaMKII führte zu einem Schutz vor dem kardialen Remodeling (Zhang R et al. 2005). Bei einer vermehrten Bildung der Isoform CaMKII δ_B war das Krankheitsbild deutlich milder ausgeprägt (Zhang T et al. 2002; Zhang T et al. 2003). Verantwortlich für die Effekte der CaMKII ist unter anderem eine Hyperphosphorylierung der RyR, wodurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöht wird (Maier et al. 2003; Wehrens et al. 2004). Die Kalziumfreisetzung aus dem SR führt einerseits zu diastolischem Kalziumverlust und andererseits zu einer zytosolischen Kalziumüberladung mit dem erhöhtem Auftreten von DADs (siehe Kapitel 1.3.2). Tatsächlich konnte eine vermehrte Arrhythmie neigung bei CaMKII Überexpression oder erhöhter CaMKII-Aktivität beobachtet werden. Durch Hemmung der Kinase war die erhöhte Arrhythmie neigung rückläufig (Anderson et al. 1998; Sag et al. 2014; Sag et al. 2009; Wu Y et al. 2002). Die CaMKII kann auch direkte Effekte auf die Kanäle erzielen. Durch Phosphorylierung am Linker I-II des Natriumkanals am Serin 571 werden die Kanäle aktiviert und es kommt zu einer Steigerung des späten Natriumstroms (Aiba et al. 2010; Hund et al. 2010; Wagner et al. 2006). Der gesteigerte späte Natriumstrom führt zu einer Verlängerung des Aktionspotentials (Toischer et al. 2013), was in vermehrten EADs und Arrhythmien enden kann. In vitro konnte gezeigt werden, dass

eine Exposition der Zellen mit H_2O_2 die CaMKII aktiviert und darüber den späten Natriumstrom steigert (Wagner et al. 2011). Inwiefern dieser Mechanismus in der Ang II vermittelten ROS-Entstehung (siehe Kapitel 1.8.1) eine Rolle spielt, soll in dieser Doktorarbeit untersucht werden.

Es konnte sogar ein direkter Effekt der CaMKII auf die Transkription nachgewiesen werden (McKinsey et al. 2000; Olson und Schneider 2003; Ramirez et al. 1997; Zhang CL et al. 2002). Die nukleäre CaMKII δ_B wird über einen alternativen kalziumabhängigen Weg aktiviert. Über sarkolemmale Freisetzung von IP_3 (siehe Kapitel 1.2.3) und dessen Diffusion durch das Zellplasma gelangt es zur Kernmembran (NE), in welcher IP_3R2 liegen. Diese Rezeptoren sind Kalziumkanäle und interagieren über eine intranukleäre Kalziumausschüttung mit der CaMKII (Bare et al. 2005; Wu X et al. 2006).

Neben der nukleären Lokalisation der IP_3R2 liegen diese auch im sarkoplasmatischen Retikulum in enger Nähe zu den RyR. Interessanterweise führt eine Aktivierung der IP_3R2 zur Kalziumausschüttung im Bereich dieser Co-Lokalisation. (Lipp et al. 2000). Dieser Mechanismus scheint eine Rolle in der Arrhythmogenese zumindest in den atrialen Zellen zu spielen (Mackenzie et al. 2002) und könnte auch Einfluss auf die elektromechanische Kopplung haben.

Ob diese IP_3R2 abhängige Kalziumfreisetzung auch eine separate Rolle als *second messenger* spielt, beispielsweise als Aktivierungsmechanismus der im Plasma liegenden CaMKII δ_C , unterliegt noch keinen weiteren Erkenntnissen und soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.6 Die NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase (Nox) wurde ursprünglich in den neutrophilen Granulozyten entdeckt. Sie sitzt in der Zellmembran und produziert reaktive Sauerstoffpezies (ROS) über eine Oxidase. Die dort gebildeten ROS spielen eine Rolle bei der Immunabwehr (Babior et al. 2002). Als Nebenprodukte entstehen ROS aber nicht nur in der Zellmembran, sondern beispielsweise auch in den Mitochondrien in der Atmungskette (Thannickal und Fanburg 2000).

Reaktive Sauerstoffspezies werden aus Sauerstoff katalysiert und besitzen ein freies reaktives Elektron, welches sie sehr instabil macht und zu einer hohen Bereitschaft zur chemischen Reaktion mit Nachbarstrukturen führt. Im Unterschied zu den freien Radikalen mit einem freien Elektron (Superoxid O_2^- und Hydroxydion OH^-) besitzt das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kein freies Elektron (Kuroda und Sadoshima 2010). Die als Nebenprodukte entstandenen ROS werden von antioxidativen Enzymen abgefangen (Thannickal und Fanburg 2000). Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen ROS-Entstehung und antioxidativer Kapazität leidet die Zelle unter oxidativem Stress. Eine erhöhte ROS-Produktion ist mit diversen Krankheiten assoziiert, wie der Krebsentstehung und neurodegenerativen Erkrankungen (Fimognari 2015; Hureau und Faller 2009; Liu et al. 2012).

Auch im Herzen spielt oxidativer Stress eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie des kardialen Remodelings und Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Munzel et al. 2015; Tsutsui et al. 2011).

1.6.1 Struktur der NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase wird in fünf verschiedenen Isoformen exprimiert (Nox1-5), des Weiteren gibt es noch zwei verwandte duale Oxidasen Duox1 und Duox2 (Lambeth 2004).

Die Nox 2 (**Abb. 1-12**), welche in der Herzinsuffizienz eine bedeutende Rolle spielt (Parajuli et al. 2014), ist eine Untereinheit eines Cytochrom b558-Komplexes, der in der Zellmembran integriert ist. Dieses Glykoprotein besteht aus der katalytischen Einheit gp91phox, einer regulatorischen Einheit p22phox, sowie drei zytosolischen Untereinheiten (p47phox, p67phox und G-protein-rac). Das große membrangebundene gp91phox wiegt 91 kDa, besteht aus sechs transmembranären Domänen und zwei Häm-Liganden zwischen der dritten und fünften transmembranären Domäne (Biberstine-Kinkade et al. 2001) sowie einem coenzymatischen Flavin-Adenine-Dinucleotid (FAD) an der C-Terminalen Region auf der zytosolischen Seite und eine NADPH-bindende Seite (Vignais 2002).

Die Nox1, welche vor allem in glatten Muskelzellen vorkommt (Dikalova et al. 2005), setzt sich neben der regulatorischen p22phox aus der NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1), einer NADPH oxidase activator 1 (NOXA1) und dem Rac zusammen (Ambasta et al. 2006; Kajla et al. 2012).

Die Nox 3 funktioniert Rac-unabhängig und wird durch die p47phox und p67phox aktiviert. Des Weiteren kann sie zusammen mit der p22phox ein Heterodimer bilden und gemeinsam wirken (Hordijk 2006).

Die Nox 4 ist ebenfalls in ihrer Funktion unabhängig von dem Rac, sie interagiert lediglich mit p22phox (Martyn et al. 2006) und erzeugt eine basale Produktion von ROS (Kuroda et al. 2010). Die Nox 4 ist in allen Zellen vorhanden, liegt aber nicht in der Plasmamembran, sondern ist in der Membran der Mitochondrien lokalisiert (Ago et al. 2010), im gesunden Herzen ist sie in nur sehr geringen Konzentrationen vorhanden (Nabeebaccus et al. 2011).

Die Nox 5 ist überwiegend in glatten Muskelzellen zum Beispiel in Gefäßen vorhanden und konnte bisher bei keinem Säugetier außer dem Menschen nachgewiesen werden. Sie funktioniert ohne die regulatorische Einheiten und wird durch Kalzium aktiviert. Dieses bindet an eine dem Calmodulin ähnelnde Einheit (EF-Motiv oder auch EF-Hand) am aminoterminalen Ende (Nabeebaccus et al. 2011).

Die kardial relevanten Isoformen sind die Nox 2 (Bendall et al. 2002; Xiao L et al. 2002) und Nox 4 (Byrne et al. 2003; Li J et al. 2006).

1.6.2 Funktion und Aktivierung der Nox 2

Die Aktivierung der Nox kann über unterschiedliche Mediatoren erreicht werden. So führen neben Angiotensin II, welches in dieser Doktorarbeit relevant sein soll, nicht nur endogene Hormone wie Wachstumsfaktoren, Endothelin-1 und α -adrenerge Agonisten, sondern auch metabolische Stoffe (Insulin, Glukose) (Akki et al. 2009), Zytokine wie TNF- α (Nabeebaccus et al. 2011) und mechanische Belastung (Li JM et al. 2002; Prosser et al. 2011) zu einer Funktionssteigerung der Nox 2. Die Signaltransduktionskaskade ist dabei von Ihrem Aktivator abhängig variabel (Lassegue und Clempus 2003). In dieser Arbeit interessiert vor allem die Angiotensin II vermittelte Aktivierung, die über G-Proteine stattfindet.

Die Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors führt zu der Dissoziation in seine heterotrimeren Untereinheiten, in die α -Untereinheit und die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die α -Untereinheit führt über eine Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Phosphorylierung der zytosolischen p47phox. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit spielt über Hochregulation von Rac ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung (Lassegue und Clempus 2003). Diese Mechanismen führen zu einer Bindung der zytosolischen

Untereinheiten an die membrangebundene gp91phox und p22phox, in diesem Zustand kann die Nox 2 ROS generieren (**Abb 1-12**). Dabei fungiert ein vorher an das Enzym gebundene NADPH als Elektronendonator (Gupte 2008). Das NADPH wird zu NADP oxidiert, das freie Elektron auf ein Sauerstoffmolekül transferiert und es entsteht ein Superoxid. Das entstandene Proton wird nach Extrazellulär transportiert (Lassegue und Clempus 2003).

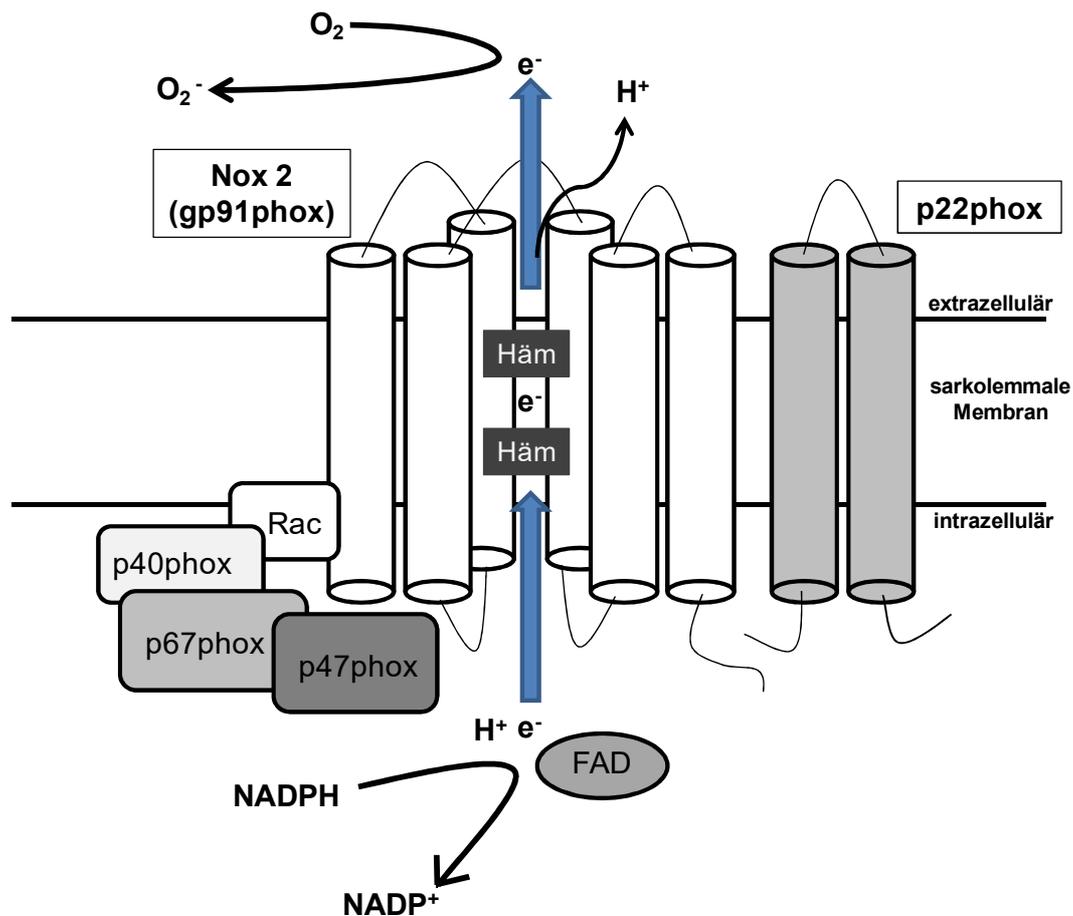


Abb. 1-12: Schematische Darstellung der Nox 2 und ROS-Produktion. Es bildet sich ein Heterodimer aus der gp91phox, bestehend aus sechs transmembranen α -Helices, und p22phox, welche an die im Zytosol gelegenen regulatorischen Untereinheiten Rac, p40phox, p67phox und p47phox bindet. Das NADPH⁺ fungiert als Elektronen-Donor, welches über zwei Häm-Liganden und schließlich auf ein Sauerstoffmolekül transferiert wird. Die Bindungsstellen für NADPH⁺ und FAD liegen auf der zytosolischen Seite (Garrido und Griendling 2009; Kuroda und Sadoshima 2010).

Die entstandenen ROS sind durch ihre Reaktionsfreude in der Lage intrazelluläre Lipide, Proteine oder DNA zu oxidieren. Um einen Schaden durch übermäßige ROS-

Produktion zu verhindern gibt es im Organismus zahlreiche antioxidative Systeme wie zum Beispiel Glutathion oder Vitamin C und E. Neben ihrer schädigenden Rolle bei unkontrollierter Produktion nehmen ROS in geringen Dosen auch eine *second messenger* Funktion ein (Rhee 1999; Santos et al. 2011).

Überwiegt die ROS-Entstehung über dem antioxidativen Schutz drohen der Zelle unspezifische Oxidationen. Im Herzmuskel führt die Oxidation der RyR zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit sowie zu einer Hemmung der SERCA, was in einer Kalziumüberladung resultiert. Ebenfalls wird der späte Natriumstrom erhöht und die Natrium/Kalium-ATPase gehemmt, wodurch ebenfalls die intrazelluläre Natriumkonzentration ansteigt. Durch das erhöhte Natrium kommt es zu einem *reverse-mode* des NCX, der das Natrium im Austausch zu Kalzium aus der Zelle heraus transportiert. Die Kalziumüberladung wird weiter vorangetrieben (Giordano 2005; Wagner et al. 2011; Wagner et al. 2003).

Ein weiteres Enzym, das durch ROS aktiviert werden kann, ist die CaMKII. An der regulatorischen Untereinheit kann ROS am Methionin 281/282 oxidieren und führt darüber zu einer Aktivierung, die mit der Aktivierung durch Phosphorylierung gleichzusetzen ist (Erickson et al. 2008). Diese ROS-abhängige Aktivierung der CaMKII wird mit kontraktile Dysfunktion und Rhythmusstörungen in der Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht (Sag et al. 2014; Wagner et al. 2011; Wagner et al. 2006). Auch die erhöhte Ausschüttung des Kalziums durch die oxidierten RyR und SERCA führt zu einer Aktivierung der CaMKII (Wagner et al. 2011).

Langfristig führt eine chronisch erhöhte ROS-Produktion in der Herzmuskelzelle zu Hypertrophie und Apoptose. ROS wird eine große Bedeutung bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz beigemessen (Sawyer et al. 2002; Suematsu et al. 2003).

1.6.3 Hemmung der NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gehemmt werden. Einige *in vitro* genutzte Hemmstoffe sind beispielsweise Diphenyliodonium, Proteinkinase C Inhibitoren, Aminoethyl Benzenesulfono Fluoride, S17834, PR39, und VAS2870. Zwei sehr selektive Inhibitoren, die *in vivo* eingesetzt werden, sind gp91ds-tat und das Apocynin. Im Tiermodell wurden diese beiden Medikamente erfolgreich gegen Bluthochdruck verwendet (Williams und Griendling 2007).

Noch spezifischer in der Forschung ist der Einsatz von Tiermodellen, bei denen mittels Gene Targeting die gp91phox ausgeschaltet wurde (siehe Kapitel 2.1). Diese Knockout Mauslinie ist in der hier durchgeführten Arbeit verwendet worden.

1.7 Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA)

Bei der PKA handelt es sich um eine Proteinkinase, welche durch den zytosolischen *second messenger* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert wird. Freigesetzt wird dieser Botenstoff zum Beispiel bei β -adrenerger Stimulation. Die PKA ist in jedem zellulärem Gewebe vorhanden und spielt eine essentielle Rolle bei der Enzymmodulation durch Phosphorylierung.

1.7.1 Struktur der PKA

Die PKA ist ein Tetramer, bestehend aus zwei homodimeren katalytischen und zwei homodimeren regulatorischen Untereinheiten. Man kann zwei verschiedene Isoformen differenzieren, die PKA Typ I (PKAI) und die PKA Typ II (PKAII). Der Unterschied besteht aus verschiedenen regulatorischen Untereinheiten RI und RII und der unterschiedlichen intrazellulären Verteilung. Während die PKAI überwiegend im Zytosol vorliegt und deutlich sensitiver auf cAMP anspricht (Corbin et al. 1975; Corbin et al. 1973; Corbin et al. 1977), ist die PKAII an spezifischen subzellulären Zielproteinen lokalisiert (Brunton et al. 1981; Corbin et al. 1977; Di Benedetto et al. 2008). Diese spezifische Assoziation zu den verschiedenen Proteinen wird über A-Kinase anchoring Proteine (AKAPs) gewährleistet, die damit die Reichweite der PKA auf bestimmte Regionen begrenzen (Michel und Scott 2002).

Im Kardiomyozyten werden beide Isoformen der PKA exprimiert (Scholten et al. 2007).

1.7.2 Aktivierung und Funktion der PKA

Die PKA wird durch Bindung eines cyclischen Nukleodits, dem cAMP aktiviert. Dieser *second messenger* entsteht durch β -adrenerge Stimulation der Zelle, G-Protein

gekoppelt wird aus ATP cAMP gebildet (Rockman et al. 1996). Durch Bindung von cAMP an der regulatorischen Domäne verringert sich die Affinität der Domänen zueinander und die katalytischen Domänen dissoziieren ab (**Abb. 1-13**). Das nun nach Dissoziation freiliegende aktive Zentrum der katalytischen Domäne kann die Zielproteine phosphorylieren (Skalhegg und Tasken 2000).

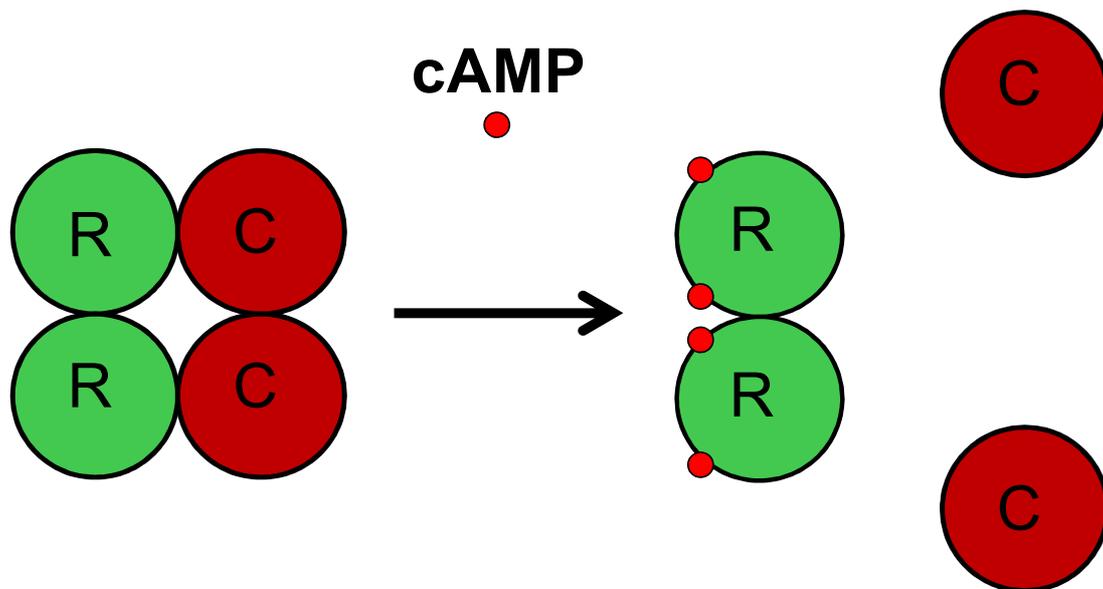


Abb. 1-13: Schematische Darstellung der cAMP-abhängigen Aktivierung der PKA. Die PKA ist ein Tetramer, bestehend aus zwei regulatorischen Domänen (R) und zwei katalytischen Domänen (C). Durch Bindung von insgesamt vier cAMP, jeweils zwei an jeder regulatorischen Domäne, verändert sich die Affinität zu den katalytischen Domänen und diese diffundieren ab. Dadurch ist das aktive Zentrum für die Zielproteine zugänglich und kann diese phosphorylieren (modifiziert aus (Skalhegg und Tasken 2000).

2006 wurde ein cAMP unabhängiger Mechanismus entdeckt, der zu einer Aktivierung der PKA führt (Brennan et al. 2006). Exposition der Zellen mit H₂O₂ führt zur Oxidation zwischen den regulatorischen Untereinheiten RI und Ausbildung einer Disulfidbrücke, wodurch es ebenfalls zur Abdiffusion der katalytischen Domänen kommt. In vivo könnte eine ROS-vermittelte Oxidation und damit Aktivierung der PKA eine entscheidende Rolle bei der durch Oxidation ausgelösten Phosphorylierung diverser Zielproteine spielen.

Die Aktivierung der Kinase über Disulfidbrückenbildung kann auch NO-vermittelt über β -adrenerge Stimulation ausgelöst werden (Burgoyne und Eaton 2009).

Die PKA ist eine essentielle Kinase, die im Kardiomyozyten als ein Schlüsselenzym die elektromechanische Kopplung reguliert und insgesamt positiv inotrop wirkt. Dies geschieht über Phosphorylierung des L-Typ Kalziumkanals, des RyR, der SERCA, des PLB, sowie des Troponin I, wodurch neben einer gesteigerten intrazellulären Kalziumfreisetzung auch die Sensitivität der Myofilamente für Kalzium erhöht wird (Ramirez-Correa et al. 2010). Außerdem bewirkt die PKA einen positiv lusitropen Effekt. Die beschleunigte Relaxation ist zum Großteil durch die Phosphorylierung des PLBs bedingt (Bers 2002b; Li L et al. 2000). Aber auch die Phosphorylierung von Troponin I führt zu einer beschleunigten Abdiffusion des Kalziums (Layland et al. 2005). Marx et al. konnten nachweisen, dass bei Herzinsuffizienz PKA zu einer Hyperphosphorylierung der RyR führt (Marx et al. 2000). Dies könnte zu diastolischen Kalziumleckströmen führen. Andere Arbeiten konnten diese Ergebnisse jedoch nicht verifizieren und stellten diese Hypothese infrage (Curran J et al. 2010; Guo et al. 2006; Li Y et al. 2002). Auch der Natriumkanal kann über die PKA aktiviert werden, er besitzt zwei Phosphorylierungsstellen, durch dessen Phosphorylierung der Natriumstrom gesteigert wird (siehe Kapitel 1.4.2).

1.7.3 Hemmung der PKA

Es gibt unterschiedliche selektive Hemmstoffe der PKA. Ein seit langem bekannter etablierter Inhibitor der PKA ist das H89, welcher in der Forschung schon viele Jahre als selektiver und potenter Inhibitor eingesetzt wird (Chijiwa et al. 1990). Das H89 wirkt als kompetitiver Inhibitor an der ATP Bindungsstelle (Hidaka et al. 1990). Inzwischen konnten jedoch einige Studien zeigen, dass H89 nicht nur an mehreren Kinasen wirkt (Davies et al. 2000) sondern sogar einen direkten PKA-unabhängigen Effekt an transmembranären Kanälen hat. So konnte außerdem in Endothelzellen eine direkte Wirkung des H89 auf den Natriumkanal und damit auf den Natriumstrom nachgewiesen werden (Marunaka und Niisato 2003). Ein deutlich spezifischerer Hemmstoff mit weniger Nebeneffekten ist das PKI. In dieser Doktorarbeit wurden beide Hemmstoffe verwendet.

Eine neue Mauslinie ermöglicht eine weitere Möglichkeit der gezielten Hemmung der PKA. Durch Gentransfektion (siehe Kapitel 2.1.1) wurde eine *Knockin*-Mauslinie geschaffen, bei dem gezielt die Aktivierung der PKA durch Oxidation nicht mehr möglich ist. Brennan et al. gelang es 2014, das Cystein17, welches bei Oxidation die

Abdiffusion der katalytischen Domäne bewirkt, durch die Aminosäure Serin zu ersetzen (Burgoyne et al. 2015). Durch dieses gezielt geänderte Gen kann die PKA nicht mehr via Oxidation aktiviert werden, während die Regulation über cAMP-Bindung weiterhin stattfinden kann. Mit diesem Mausmodell kann in Zukunft gezielt diejenigen Aktivierungsmechanismen untersucht werden, bei denen die PKA eine Rolle spielt.

1.8 Angiotensin II

Angiotensin II ist ein endogenes Peptidhormon aus dem Renin-Angiotensin-System (RAS), das zur Regulation des Blutdrucks, Wasser- und Elektrolythaushaltes zuständig ist und dessen Hemmung erfolgreich bei der Behandlung von Bluthochdruck angewandt wird (Timmermans et al. 1993). Des Weiteren ist aber auch ein direkter Effekt auf die Herzmuskelzellen nachgewiesen worden (Drimal und Boska 1973; Koch-Weser 1965; Moravec et al. 1990).

1.8.1 Das endogene Hormon Angiotensin II

Das Vorläufermolekül Angiotensinogen des Effektorhormons Angiotensin II wird in den Hepatozyten der Leber gebildet. Angiotensinogen besteht aus 452 Aminosäuren (Ohkubo et al. 1983) und wird in das Blut sezerniert. Das Angiotensinogen kann, wenn es im Blut zirkuliert, durch das Hormon Renin in Angiotensin I gespalten werden. Renin wird in der Niere gebildet und bei niedrigem Blutdruck im vas afferens oder bei geringer Natriumkonzentration im distalen Tubulus des Harntransportsystems freigesetzt. Angiotensin I muss weiter gespalten werden um als aktives Hormon wirken zu können. Dies geschieht durch das *Angiotensin converting enzyme* (ACE), das vor allem in der Lungenstrombahn im Endothel liegt. Von den ursprünglich 452 Aminosäuren bleibt das aktive Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) übrig (Braun-Menendez et al. 1940; Page und Helmer 1940) und hat multiple gewebeabhängige Effekte.

Es gibt zwei spezifische Rezeptoren, an die das Ang II binden kann. Der Ang II-Rezeptor 1 (ATR1) und Ang II-Rezeptor 2 (ATR2). Beide sind G_q-Protein-gekoppelte

Rezeptoren und lösen gegenteilige Effekte aus. An der Wand der Gefäßmuskulatur bewirkt die Aktivierung des ATR1 beispielsweise eine Vasokonstriktion, die Aktivierung des ATR2 bewirkt dagegen eine Vasodilatation. In der Nebennierenrinde induziert Ang II eine Ausschüttung von Aldosteron, welches den Elektrolyt- und Volumenhaushalt des Körpers reguliert. Wie bereits genannt kann Ang II über zwei verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren wirken. Der am humanen ventrikulären Myokard überwiegend exprimierte Rezeptor ist der ATR1. Die durch den ATR1 ausgelösten Signalkaskaden sind komplex, allein für die Aktivierung der CaMKII über den ATR1 sind mindestens zwei mögliche Mechanismen bekannt (**Abb. 1-14**). Durch die Bindung des Ang II an den G-Protein gekoppelten ATR1 wird die PLC aktiviert, welche aus dem PIP₂ zwei *second messenger* hydrolysiert: 1,2-Diacylglycerol (DAG) und IP₃. IP₃ mobilisiert Kalzium aus intrazellulären Speichern, und kann über die CaM-abhängige Aktivierung und Autophosphorylierung die CaMKII aktivieren (siehe Kapitel 1.2.3 und 1.5.2). Das DAG aktiviert die Proteinkinase C, welche über eine Phosphorylierung der p47phox als Untereinheit der Nox an der ROS-Generierung beteiligt ist (Lavigne et al. 2001; Seshiah et al. 2002) und über Oxidation der CaMK selbige aktiviert (siehe Kapitel 1.5.2). Des Weiteren kann der ATR1 die regulatorische Untereinheit Rac1 und über diesen Weg die Nox 2 aktivieren (Cheng G et al. 2006; Choi et al. 2008; Lassegue und Clempus 2003).

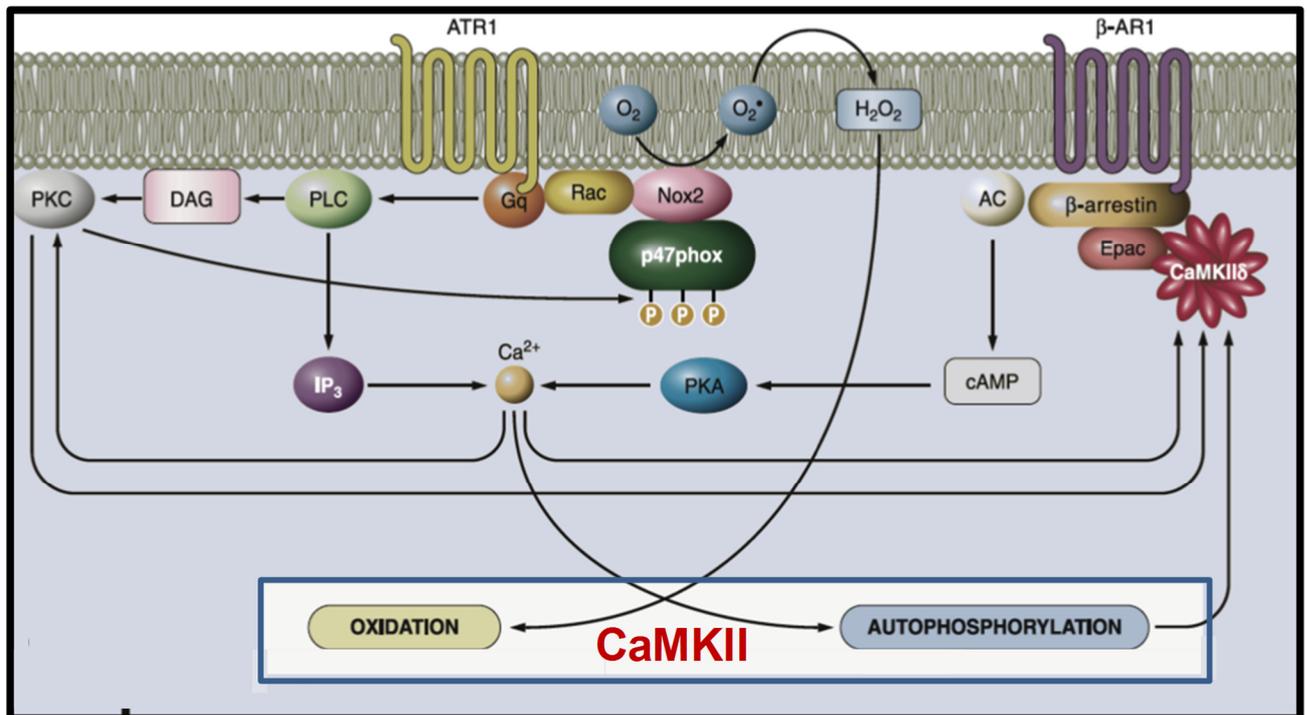


Abb. 1-14: Schematische Darstellung des ATR1 und der Signalkaskaden. Der ATR1 agiert über ein G-Protein. Dabei gibt es mindestens zwei Signalkaskaden, die ausgelöst werden. Über Aktivierung der PLC wird IP₃ freigesetzt und darüber das intrazelluläre Kalzium erhöht. Das ebenfalls über PLC freigesetzte DAG aktiviert die PKC, welche über Phosphorylierung an mehreren Enzymen agieren kann, beispielsweise am β-adrenergen Rezeptor oder an der NOX 2. Außerdem wirkt das G-Protein über Rac auch direkt aktivierend auf die NOX 2. Sowohl die ROS-Entstehung als auch die Kalziumfreisetzung sind Mechanismen, die die CaMKII aktivieren können und zur Autophosphorylierung führen (modifiziert aus Erickson et al. 2011).

Neben der ursprünglich bedeutenden Rolle des ATR2 während der fetalen Entwicklung und anschließender Reduktion der Rezeptordichte konnte auch in erkrankten Herzen ein erhöhtes Vorkommen dieser Rezeptoren nachgewiesen werden (Brink et al. 1996). Die genaue Funktion, die der Rezeptor einnimmt hat in der aktuellen Forschung noch kontroverse Ergebnisse geliefert (Avila et al. 2011; Schneider und Lorell 2001).

Interessanterweise wurden vor Kurzem neben dieser klassischen Wirkungsweise des Ang II neuartige Wirkungen durch verschiedene weitere Angiotensin Peptide (**Abb. 1-15**) und darüber andere Effektorrezeptoren entdeckt (Kumar et al. 2012). Das Ang 1-7 zum Beispiel entsteht als Spaltprodukt durch das ACE 2. Es wirkt gegensätzlich

zum Ang II kardioprotektiv und verhindert das kardiale Remodeling (Grobe et al. 2007; Marques et al. 2011).

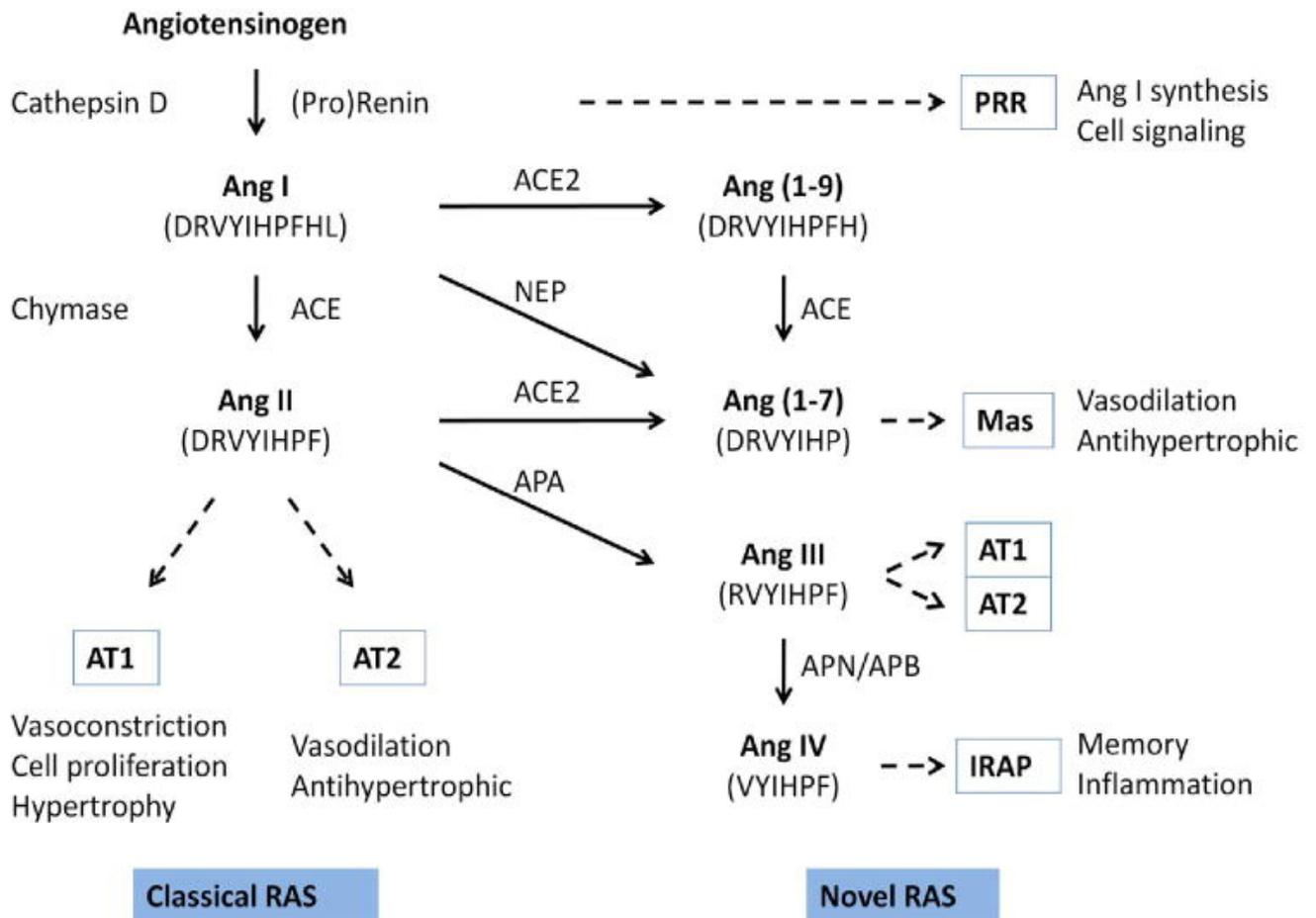


Abb. 1-15: Es sind das klassische RAS (links) und das neue RAS (rechts) nebeneinander dargestellt. Das klassische RAS spaltet das Angiotensinogen durch Renin in Ang I, dieses wird erst durch ACE in das Effektorhormon Ang II gespalten. Die Rezeptoren AT1 und AT2 haben teilweise gegenteilige Effekte. In dem neuen RAS-Modell werden auch andere Ang-Spaltprodukte in ihren Effekten und Zielrezeptoren berücksichtigt. Neben den Ang-Peptiden zeigt auch schon das (Pro)Renin in manchen Geweben Effekte. Die neu entdeckten Spaltprodukte wirken teilweise über andere Rezeptoren und erzielen ganz andere Effekte als bisher bekannt. APA: Aminopeptidase A, APB: Aminopeptidase B, APN: Aminopeptidase N, NEP: Neutrale Endopeptidase (Kumar et al. 2012).

1.8.2 Kardiale Effekte des Angiotensin II

Die kardialen Effekte des Ang II muss man in akute und chronische Effekte unterteilen. Während akute Effekte die Kontraktilität, Arrhythmogenese und Apoptoseinduktion betreffen, wirken chronische Effekte vor allem auf das kardiale Remodeling.

Die Frage nach dem Einfluss des Angiotensins auf die Kontraktilität ergab in der Forschung bislang kontroverse Ergebnisse. So konnten sowohl positive (Drimal und Boska 1973; Ikenouchi et al. 1994) als auch negativ inotrope Effekte (Li P et al. 1994) oder keine Effekte (Ito N et al. 1997) nachgewiesen werden. Diese Unterschiede lassen sich am ehesten durch die verschiedenen Spezies erklären (Ishihata und Endoh 1995). So konnte bei Mäusen mit einer vermehrten Expression von ATR1 gezeigt werden, dass die reduzierte Kontraktilität durch direkte Effekte des Ang II unabhängig von der Hypertrophieentwicklung entsteht, am ehesten aufgrund der gesteigerten intrazellulären Kalziumkonzentration (Mattiuzzi 1997; Rivard et al. 2011).

Da der Einsatz von ACE-Hemmern und ATR1-Blockern neben dem besseren Outcome auch eine deutliche Risikoreduktion ventrikulärer und supraventrikulärer Rhythmusstörungen bewirkt (Garg et al. 2006; Makkar et al. 2009), liegt der Verdacht nahe, dass Ang II bei der Entstehung von Arrhythmie-begünstigenden Faktoren eine essentielle Rolle spielt. Auch auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass Ang II in Myozyten das Auftreten von EADs und getriggert Aktivität induziert, indem über den ATR1 die intrazelluläre ROS-Produktion über die Aktivierung der Nox 2 erhöht wird und es zu einer Steigerung sowohl des Natrium- als auch Kalziumeinstroms kommt (Zhao et al. 2011). Entgegen der Vermutung von Zhao et al. konnte widerlegt werden, dass diese Effekte auf die Kanäle auf eine ROS-induzierte CaMKII-Aktivierung zurückzuführen sind beziehungsweise der Natriumspitzenstrom, das Gating-Verhalten des Natriumkanals und der späte Natriumstrom differenziert betrachtet werden müssen (Wagner et al. 2014). Diese Doktorarbeit befasst sich mit der genaueren Fragestellung, ob der Natriumspitzenstrom ROS-abhängig -anders als bisher angenommen- nicht durch die CaMKII, sondern durch Aktivierung der PKA reguliert wird.

Ein Übergang zwischen akutem und chronischem Effekt des Ang II betrifft die erhöhte Apoptoserate, welche schon nach 24 Stunden Exposition mit Ang II

nachweisbar ist (Schroder et al. 2006). Ein wesentlicher Faktor, der hier beteiligt ist, ist zum einen die Nox (Qin et al. 2006) und zum anderen die CaMKII (Palomeque et al. 2009).

Die Langzeiteffekte des Ang II führen zu dem sogenannten kardialen Remodeling. Durch Hypertrophie, Entzündungsreaktion und Fibrose kommt es zu einem Umbauprozess der physiologischen Strukturen und langfristig zu einer Ausbildung und Verstärkung der Herzinsuffizienz. Das Remodeling betrifft auch den Umbau von Ionenkanälen und -transportern, welches man auch als das elektrische Remodeling bezeichnet. So führt Ang II langfristig zu einer erhöhten Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers (Matsui et al. 1995). Im Gegensatz dazu wird die Na⁺/K⁺-Pumpe über eine Proteinkinase C abhängige Nox-Aktivierung gehemmt (White et al. 2009). Auch das elektrische Synzytium des Myokards wird langfristig gestört, indem die elektrische Leitfähigkeit der Gap junctions herunter reguliert und damit auch die elektrische Weiterleitung im Myokard gestört wird (De Mello 1996).

Die Langzeiteffekte des Ang II schließen auch die Genexpression für Zellwachstum ein (Neyses et al. 1993), wodurch es zu der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie kommt. Dies geschieht über verschiedene komplexe Aktivierungsmechanismen, einer beinhaltet die Aktivierung der ADPR-Zyklase (Gul et al. 2009), weitere die Proteinkinase C und mitogen-aktivierte Proteinkinase Kaskade (MAPKs, (Sugden und Clerk 1998). Auch die CaMKII δ_B spielt eine Rolle bei der Hypertrophieentwicklung (McKinsey et al. 2000), sie wird über IP₃ aktiviert (siehe Kapitel 1.5.5, (Bare et al. 2005).

Auch die durch die Ang II ausgelöste Erhöhung der intrazellulären ROS führt, zumindest in glatten Muskelzellen, zu der Ausbildung einer Hypertrophie (Ushio-Fukai et al. 1996).

Neben diesen komplexen intrazellulären Signalkaskaden führt Ang II außerdem zur gesteigerten Expression von proinflammatorischen Mediatoren (Mann 2002; Singh et al. 2015). Durch diese Entzündungsreaktion kommt es zur Fibrosebildung (Frangogiannis 2004).

Der Einsatz von Ang II-antagonistisch wirkenden Medikamenten verhindert die durch dieses Hormon induzierten schädlichen Effekte und führt zu einer deutlich geringeren Mortalität bei Patienten, die unter strukturellen Herzkrankheiten leiden (Pfeffer et al. 1992; Pfeffer et al. 2003; Stevenson et al. 1995).

1.9 Ziele und Fragestellungen

1 Welchen Effekt hat Angiotensin II auf den Natriumkanal?

- 1.1. Wie ändert sich das Öffnungsverhalten des Natriumkanals unter Angiotensin II?
- 1.2. Nimmt der Natriumstrom unter Angiotensin II zu?

2 Lässt sich der Effekt von Angiotensin II durch Hemmung der Nox 2 vermindern?

- 2.1. Wie verhält sich das Öffnungsverhalten des Natriumkanals unter Angiotensin II in gp91phox^{-/-} Mäusen?
- 2.2. Wie verhält sich der Natriumstrom unter Angiotensin II in gp91phox^{-/-} Mäusen?

3 Lässt sich der Effekt des Angiotensin II durch Hemmung der PKA vermindern?

- 3.1 Welchen Effekt zeigt Angiotensin II auf das Natriumkanal-Öffnungsverhalten, wenn die PKA mit H89 gehemmt wird?
- 3.2. Wie verhält sich der Natriumstrom unter Angiotensin II Einfluss und zusätzlicher Hemmung der PKA?

4 Welchen Effekt hat Angiotensin II auf den späten Natriumstrom?

- 4.1. Wie verhält sich der späte Natriumstrom unter Angiotensin II Einfluss?
- 4.2. Lässt sich der Angiotensin II Effekt in gp91phox^{-/-} Mäusen mindern?
- 4.3. Bewirkt eine Hemmung der PKA durch PKI eine Verminderung des Angiotensin II-Effektes?
- 4.4. Wie beeinflusst eine Hemmung der IP₃R durch 2-APB den Effekt des Angiotensin II auf den späten Natriumstrom?
- 4.5. Kann durch Hemmung der CaMKII durch AIP der Effekt des Angiotensin II gehemmt werden?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mauslinien

Für die Experimente dieser Doktorarbeit wurde eine Knockout-Mauslinie genutzt, bei der die katalytische Untereinheit gp91 der NADPH Oxidase 2 ausgeschaltet worden ist (gp91^{phox^{-/-}}, (Pollock et al. 1995), sowie ihre Wildtypgeschwister als Kontrollgruppe.

2.1.1 Herstellung transgener Mäuse

Zur Herstellung von Knockout-Mäusen wird durch Gene-Targeting gezielt ein oder mehrere Gene ausgeschaltet, sodass bestimmte Proteine ihre Funktion verlieren. Dafür werden Stammzellen, gewonnen aus Blastozysten von Inzucht-Mäusen, *in vitro* kultiviert. Diesen Stammzellen wird ein Inaktivitätsvektor (zum Beispiel via Elektroporation durch ein elektrisches Feld) eingebracht. Der Inaktivitätsvektor ist ein künstlich produzierter DNA-Abschnitt, welcher dem Ziel-Gen sehr ähnelt aber in der Transkription inaktivierend wirkt, wodurch dann ein inaktives Protein gebildet wird. Durch die Ähnlichkeit dieses Inaktivitätsvektors zu dem Ziel-Gen bauen diese einige wenige Zellen, durch den natürlichen Prozess der homologen Rekombination, in ihre Chromosomen ein. Damit diese wenigen Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber den Wildtypzellen aufweisen wird mit dem übertragenen DNA-Abschnitt auch ein Resistenzfaktor exprimiert, beispielsweise gegen das Zytostatikum Neomycin. Durch Behandlung der Stammzellen mit Neomycin überleben nur die Zellen, die das veränderte Gen aufgenommen haben.

Die auf diese Weise genveränderten Stammzellen werden dann in Blastozysten einer Maus eingesetzt und anschließend die Blastozyste einer Amme eingepflanzt. Aus diesen Blastozysten reifen gesunde chimäre Mäuse heran, die sowohl Zellen mit dem Wildtyp-Gen als auch mit dem veränderten Gen tragen. Durch Kreuzung der chimären Mäuse mit Wildtyp-Mäusen können, wenn bei der Kreuzung Ei- oder Samenzelle das genetisch veränderte Chromosom tragen, heterozygote Tiere entstehen. Bei erneuter Kreuzung von zwei heterozygoten Mäusen entstehen nach dem Mendel'schen Prinzip in 25% der Fälle homozygote Träger des Knockout-Gens (Capecchi 1989).

2.1.2 Herstellung der gp91^{phox} Knockout-Maus

Bei der der gp91^{phox} Knockout-Maus ist die katalytische Untereinheit gp91^{phox} der NADPH-Oxidase Typ 2 (Nox 2) funktionslos, dadurch kann die NADPH-Oxidase keine *Reactive Oxygen Species* (ROS) mehr bilden. Das für die Nox 2 kodierende Gen ist auf dem X Chromosom gelegen (Brockdorff et al. 1988). Um diesen Funktionsverlust zu erreichen wird eine Thymidinkinase des Herpes simplex Virus zusammen mit einem neo-Gen um die Exone 2 und 3 eingefügt, die durch dieses Gen exprimierten gp91^{phox} Proteine sind funktionslos (Pollock et al. 1995).

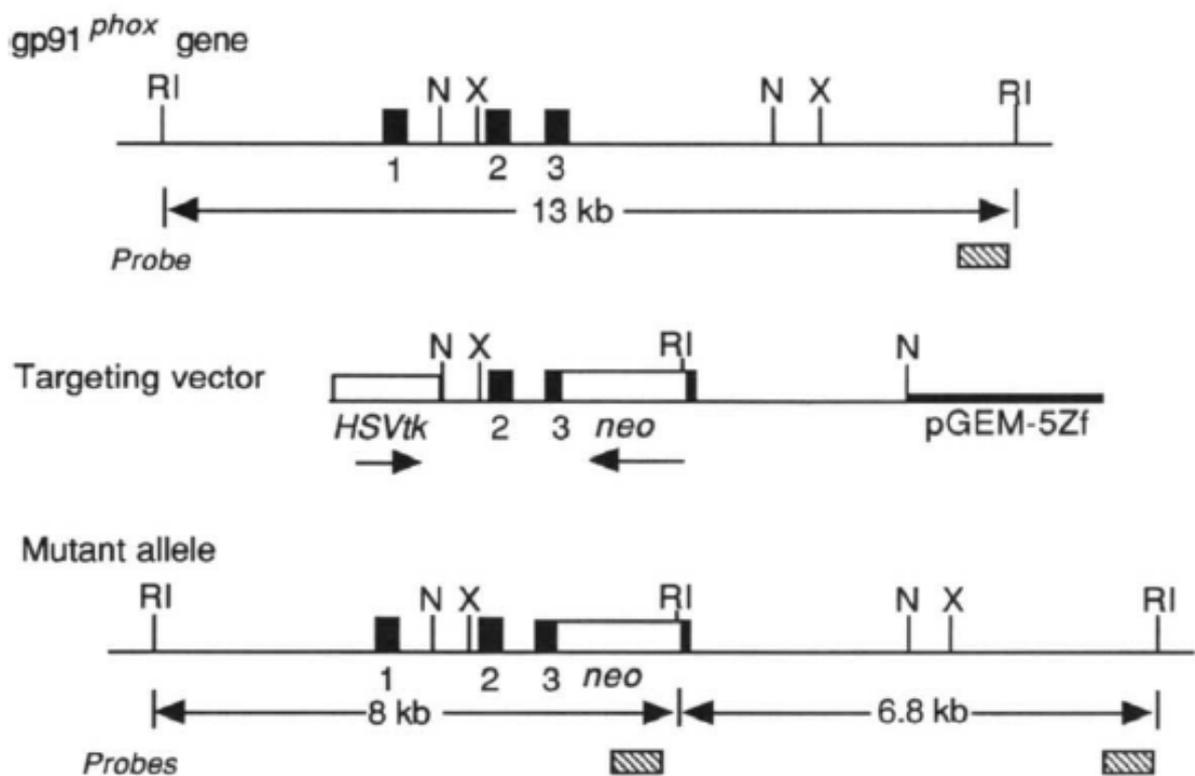


Abb. 2-1: Gen-Targeting für den gp91^{phox}-Knockout. In das Exon 3 wird das neo-Gen eingebracht. Die ebenfalls eingebrachte Thymidinkinase des Herpes simplex Virus (HSVtk) wird zwischen Exon 1 und 2 eingefügt. Die Proteinprodukte sind funktionslos (Pollock et al. 1995).

2.2. Isolation ventrikulärer Myozyten

Die Experimente wurden nach dem „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996) durchgeführt und vorher der zuständigen Tierschutzbehörde Braunschweig gemeldet (Tierversuchsanzeige Mai 2003 für die „Tötungen von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß § 4 TierSchG, Aktenzeichen T 9.02, Bezirksregierung Braunschweig, Anzeigender Dr. Harald Kögler).

Gp91phox^{-/-}-Mäuse und die Wildtypen derselben Zuchtlinie wurden für diese Experimente verwendet. Die Mäuse wurden zunächst, die Menge angepasst an ihr Körpergewicht, mit Isofluran (Abbott GmbH & Co KG, 100%) exponiert, die Beurteilung der Narkosetiefe anhand von Atemfrequenz und –tiefe beurteilt. Sobald die Narkose tief genug war, wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet.

Für die Präparation des Herzens wurde der Thorax mit der Schere von der Mitte des Abdomens schräg zu den Vorderpfoten eröffnet, mit einer Kornzange das Sternum fixiert und mit der Durchtrennung des Zwerchfells bis zum Herzen präpariert. Nach Absetzen des noch schlagenden Herzens an der Aorta und den pulmonalen Gefäßen wurde dieses sofort in einem Tyrodepuffer (**Tabelle 2-1**) gegeben und mehrfach manuell ausgedrückt um das Blut auszuspülen und damit die Entstehung von Thromben zu verhindern.

Lösung	Substanz/Ion	Konzentration	
← Tyrodepuffer	NaCl	113 mmol/l	Gelöst in ddH ₂ O; pH 7,42 mit NaOH bei 36,5 °C
	KCl	4,7 mmol/l	
	KH ₂ PO ₄	0,6 mmol/l	
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mmol/l	
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,6 mmol/l	
	Phenol-red	0,032 mmol/l	
	NaHCO ₃	12 mmol/l	
	KHCO ₃	10 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
	Taurine	30 mmol/l	
	BDM (2,3-Butadionemonoxime)	10 mmol/l	
	Glukose	5,5 mmol/l	
← Enzymlösung	Liberase TM	1,5 mg	Gelöst in 20 ml Tyrodepuffer; pH 7,42 bei 36,5 °C
	Trypsin	111,2 µl	
	CaCl ₂	0,0125 mmol/l	
← Stopplösung	Bovine calf serum	0,25 ml	Gelöst in 2.25 ml Tyrode pH 7,42 bei 36,5 °C
	CaCl ₂	0,0125 mmol/l	

Tabelle 2-1: Die Lösungen, die für die Myozytensolation verwendet wurden (ddH₂O steht für doppelt destilliertes Wasser)

Zum Lösen der Zellen aus ihrem Zellverband wurde die Aorta unter dem Binokular kanüliert, mittels Naht fixiert und an die Perfusionsanlage, eine modifizierte Langendorff-Apparatur (**Abb. 2-1**), angeschlossen. Dort wurde das Herz retrograd mit einer Enzym-Lösung mit LiberaseTM (Kollagenasen und Proteasen) für 5-8 min perfundiert und damit die Kardiomyozyten aus ihren interzellulären Verbindungen gelöst. Die Zellen des ventrikulären Teils des Herzens wurden mechanisch in einer Tyrode vorsichtig aus ihren Verbänden gelöst und dann das Zellensediment durch ein Nylongaze mit der Porengröße 200 µm gefiltert.

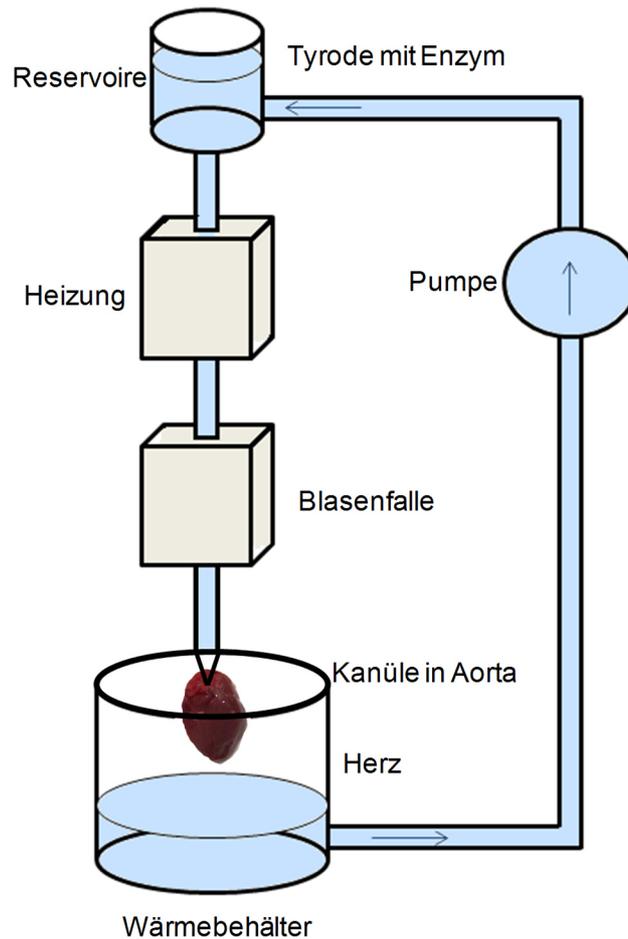


Abb. 2-1: Die Langendorff-Apparatur schematisch dargestellt (Langendorff 1895). Die Pipettenspitze der Perfusionsanlage wurde in die Aorta oberhalb der Klappe eingeführt und die Tyrode-Enzym-Lösung retrograd infundiert.

Im Anschluss wurden die Zellen einer steigenden Kalziumkonzentration ausgesetzt, um sie langsam an die Kalziumkonzentration der Badlösung zu gewöhnen ohne die Zellen dabei zu schädigen. Dafür wurde jeweils das Sediment für die nächst höhere Kalziumkonzentration genutzt. Die nicht-kalziumtoleranten Zellen aus dem Überstand wurden verworfen. Am Ende des Kalziumaufbaus wurden 500 µl der zellhaltigen Suspension auf eine Messkammer gegeben. Vorherige Beschichtung der Kammer mit Laminin (Laminin L2020 – 1 mg, Bestellnummer: 8200807121, Sigma-Aldrich), welches sich aus kollagenähnlichen Glykoproteinen zusammensetzt, sorgte für Haftung der Zellen. Dies war nach 15 min Wartezeit gewährleistet, sodass der Überstand mit einer Pipette entfernt und durch die Badlösungen ersetzt werden konnte.

2.3. Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht es, durch die Verwendung von Glaspipetten mit einem Spitzendurchmesser von 1-5 μm , auf entsprechend kleinen Flächen (ca. 1 μm^2) geringe Ströme (pA) in einer hohen zeitlichen Auflösung zu messen.

Um einen Zugang zu der Zelle zu erhalten, wird die feine Glaspipette vorsichtig an die Zellmembran angenähert, welches durch ein Ansteigen des Widerstandes sichtbar wird. Legt sich die Membran an die Pipettenspitze an, steigt der Widerstand in den Gigaohm-Bereich, diese Situation nennt man Giga Seal. Das Membranstück (*patch*) innerhalb der Pipettenspitze ist nun elektrisch isoliert. Die dichte Verbindung zwischen Pipette und Membran verhindert einen Stromfluss und entsprechend ist die fehlende Stromantwort auf den angelegten Kommandospannungspuls als gerade Linie sichtbar. Diese Situation nennt man *cell-attached-* oder auch *on-cell-*Konfiguration.

Durch ein anschließendes kurzes ruckartiges Anlegen eines Unterdrucks wird die Membran innerhalb der Pipette aufgerissen (*ruptured patch*), die Lösung innerhalb der Pipette und der Interzellularraum bilden eine Einheit (**Abb. 2-3**). Diese Situation nennt man „*whole-cell-Konfiguration*“. Neben der mechanischen Ruptur kann man durch Verwendung von beispielsweise Nystatin die Membran chemisch permeabel machen (*perforated patch*), auch hierbei handelt es sich um eine *whole-cell-Konfiguration* (Horn und Marty 1988).

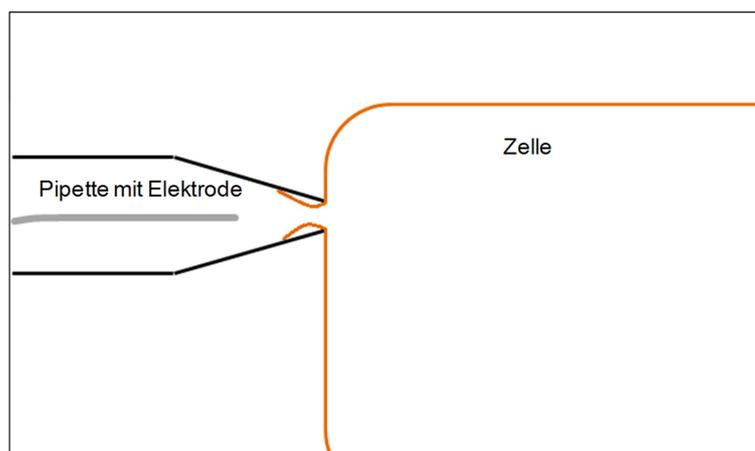


Abb. 2-2: Schematische Darstellung einer *whole-cell-Konfiguration*, erreicht durch die *ruptured-patch-Methode*. Pipettenlösung und Intrazellularraum bilden eine Einheit, die Bestandteile und Ionen verteilen sich gleichmäßig.

Bei der Messung gibt es die Möglichkeiten der *current-clamp* oder *voltage-clamp*-Technik. Bei der *voltage-clamp*-Technik wird eine feste Spannung angelegt, diese entspricht dann der Membranspannung der zu untersuchenden Zelle. Die dabei fließenden Ionenströme, wie zum Beispiel Natrium und Kalzium, werden gemessen.

Bei der *current-clamp*-Technik wird die Zelle mit einer definierten Stromstärke stimuliert und das Membranpotential gemessen, dieses Verfahren wird beispielsweise bei der Messung von Aktionspotentialen angewandt.

In dieser Doktorarbeit wurden die Natriumströme durch spannungsabhängige Kanäle in der *ruptured-patch*-Konfiguration in lebenden Mausmyozyten untersucht.

2.3.1 Lösungen

Badlösung (**Tabelle 2-2**): Basis für die extrazelluläre Badlösung, die in der Ionenkonzentration dem Extrazellularraum entspricht, ist eine isotone Tyrodelösung, bei der das Kalium zur Vermeidung von Kaliumleckströmen durch Cäsium ersetzt ist. Um Fehlerströme durch spontane Kalziumfreisetzung über die Aktivierung des Natrium/Kalzium-Austauschers (NCX) zu verhindern, wurde Thapsigargin eingesetzt. Dieses verhindert die Entstehung von Kalziumsparks, indem es die SERCA und damit die Aufnahme von Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum hemmt. Der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,4 eingestellt.

Für die Messung der Strom-Spannungskurve des Natriumkanals wurde die Badlösung weiter modifiziert, zu große Natriumströme würden ansonsten über eine schlechte Spannungskontrolle zu Messungenauigkeiten führen. Dafür wurde die Natriumkonzentration von ihrem physiologischen Wert 135 mmol/l auf 5 mmol/l reduziert, die NaCl-Differenz wurde durch einen elektrophysiologisch äquivalenten Stoff, dem Tetramethylammoniumchlorid, ersetzt. Dieses Molekül kann die Membrankanäle nicht passieren und ermöglicht so eine bessere Spannungskontrolle.

Lösung	Substanz/Ion	Konzentration	
Badlösung [Na⁺] 135 mmol/l	NaCl	135 mmol/l	Gelöst in dd H ₂ O, pH 7,4 mit CsOH bei RT
	Tetramethylammonium- chlorid (TMAC)	5 mmol/l	
	CsCl	4 mmol/l	
	MgCl ₂	2 mmol/l	
	Glukose	10 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
Reduzierte Badlösung [Na⁺] 5 mmol/l	NaCl	5 mmol/l	Gelöst in dd H ₂ O, pH 7,4 mit CsOH bei RT
	Tetramethylammonium- chlorid (TMAC)	135 mmol/l	
	CsCl	4 mmol/l	
	MgCl ₂	2 mmol/l	
	Glukose	10 mmol/l	
	CaCl ₂	0,4 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	

Tabelle 2-2: Die Badlösungen zur Messung der Natriumströme. Zur Messung der Strom-Spannungsbeziehung und Aktivitätsmessung des Natriumkanals wurde die Natriumkonzentration reduziert.

Pipettenlösung: (**Tabelle 2-3**): In der Pipettenlösung ist die Ionenkonzentration der intrazellulären Zusammensetzung angepasst. Auch hier wurde das Kalium durch Cäsium ersetzt.

Um die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf dem diastolischen Kalziumwert von 100 nmol/l, zu halten wurde Ethylenglycol-bisaminoethylether (EGTA) als Kalziumpuffer eingesetzt. Bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert mit CsOH auf 7,4 eingestellt. Desweiteren wurden unterschiedliche Inhibitoren eingesetzt, um Effekte zu unterdrücken, die mit den Messungen interferieren würden. Strophantidin (4 µmol/l) hemmt die Natrium/Kalium-ATPase in der Plasmamembran. Nifedipin (20 µmol/l) wurde zur Inhibition spannungsabhängiger Kalziumkanäle eingesetzt und Niflummat (30 µmol/l) zur Hemmung von Kalzium-aktivierten Chloridkanälen.

Lösung	Substanz/ion	Konzentration	
Pipettenlösung für Late I_{Na} 100 nmol/l [Ca]	CsCl	95 mmol/l	Gelöst in dd H ₂ O, pH 7,2 mit CsOH bei RT
	Cs-Glutamate	40 mmol/l	
	NaCl	10 mmol/l	
	MgCl ₂	0,92 mmol/l	
	EGTA	1 mmol/l	
	Mg-ATP	5 mmol/l	
	Li-GTP	0,3 mmol/l	
	CaCl ₂	0,36 mmol/l	
	Niflumiat	0,03 mmol/l	
	Nifedipin	0,02 mmol/l	
	Strophanthidin	0,004 mmol/l	
	HEPES	5 mmol/l	
Pipettenlösung Reduzierte [Na] 100 nmol/l [Ca]	CsCl	100 mmol/l	Gelöst in dd H ₂ O, pH 7,0 mit CsOH bei RT
	Cs-Glutamate	40 mmol/l	
	NaCl	5 mmol/l	
	MgCl ₂	0,92 mmol/l	
	EGTA	1 mmol/l	
	Mg-ATP	5 mmol/l	
	Li-GTP	0,3 mmol/l	
	CaCl ₂	0,36 mmol/l	
	Niflumic Acid	0,03 mmol/l	
	Nifedipin	0,02 mmol/l	
	Strophanthidin	0,004 mmol/l	
	HEPES	5 mmol/l	
optional	PKI	25 µmol/l	

Tabelle 2-3: Die Pipettenlösungen zur Messung der Natriumströme je zur physiologischen als auch zur Reduzierten Natrium-Konzentration.

2.3.2 Versuchsaufbau

Die Messung der Zellen erfolgte unter einem invertierten Mikroskop (Nikon Eclipse TE-200) mit maximal 200-facher Vergrößerung (20 x Objektiv, 10 x Okular). Die Versuchskammern mit den Zellen wurden auf dem Arbeitstisch des Mikroskops befestigt. Der gesamte Messapparat war auf einem schwingungsgedämpften Tisch angebracht um die Zellen vor mechanischen Bewegungen zu schützen. Ein Faradaykäfig diente dazu die Erfassung der Ströme nicht durch elektrische Interferenzen zu verfälschen. Der Pipettenhalter am Arbeitstisch hatte eine Verbindung zu einem Über- und Unterdrucksystem sowie einen Mikromanipulator,

2.3.3 Patchpipette und Elektroden

Die Patchpipetten wurden vor jeder Messung neu aus Glaskapillaren durch ein Pipettenziehgerät der Firma Zeitz-Instruments GmbH (DMZ Universal Puller) hergestellt. Diese Kapillaren (Precision Instruments, Inc.) hatten einen Außendurchmesser von 1,5 mm, einen Innendurchmesser von 1,2 mm und eine Länge von 76 mm. In einem dreistufigen Prozess wurde die Kapillare durch Hitze und Zugkraft zentral soweit verjüngt, bis durch einen Bruch zwei Pipetten mit konisch zulaufendem Ende entstanden. Die Modifikation der Parameter Hitze, Zugkraft und Zugintervall erlaubten eine optimale Einstellung der Pipetteneigenschaften, sodass der Widerstand in der mit Pipettenlösung befüllten Pipette 2 - 3 M Ω betrug. Dieser im Verhältnis geringe Widerstand ermöglicht einerseits eine gute Erfassung von Strömen und andererseits durch den trotzdem kleinen Pipettendurchmesser die Ausbildung eines Giga Seals, der mit zu großen Durchmessern nicht möglich wäre. Jede Pipette wurde nur einmalig für Messvorgänge verwendet und danach verworfen, da die Spitze für die Ausbildung eines Giga Seals frei von Membranresten sein muss. Die Pipetten- und Referenzelektrode bestanden aus chloriertem Silberdraht (Silber/Silberchloridelektroden), die Potentialdifferenz zwischen den beiden Elektroden sollte bei gleicher Chloridkonzentration in der Lösung null betragen, da die Ausbildung von Elektrodenpotentialen zu Messungenauigkeiten führen können. Bei der Versuchsdurchführung führte die unterschiedliche Konzentration der mobilen Anionen zu einer Ausbildung eines Donan-Ungleichgewichts der Pipetten- und Badlösung, das Junctionspotential (Grenzflächenpotential), von etwa -14 mV und musste durch den HEKA Verstärker ausgeglichen werden.

2.3.4 Versuchsdurchführung

Die vorbereitete Messkammer wurde in das Mikroskop eingespannt und die Pipette in dem Pipettenhalter so befestigt, dass die Pipettenelektrode mit der Spitze in die Pipettenlösung ragte. Vor Eintauchen der Pipettenspitze in die Badlösung wurde ein leichter Überdruck angelegt, dieser sollte die Membran durch ein Flüssigkeitspolster vor den Bewegungen der Pipette schützen und verhinderte das Festsetzen von

Schmutzpartikeln an der Spitze. Nach dem Eintauchen wurde über einen Funktionsmodus des Computers das Nullpotential zwischen den beiden Elektroden bestimmt und festgelegt, sodass zwischen der Badelektrode und der offenen Pipette kein Strom floss. Nach der Einstellung des Nullpotentials wurde eine rechteckige Wechselfspannung angelegt mit einer Amplitude von 5 mV in beide Richtungen, der dadurch generierte Strom konnte auf dem Bildschirm beobachtet werden. Als nächstes wurde die Pipette unter mikroskopischer Kontrolle mit dem Mikromanipulator möglichst nah an die ausgewählte, ruhig liegende nicht spontan kontrahierende Zelle gebracht. Als Zeichen der gesunden lebenden Zelle musste auf eine regelmäßige Querstreifung und glatte Kontur geachtet werden. Die letzte Annäherung erfolgte unter der Kontrolle des durch den Testimpuls ausgelösten Stroms, welcher indirekt den durch die Zellmembran gebildeten Widerstand darstellt. War der Widerstand auf etwa das doppelte angestiegen, im Umkehr dazu fiel die Stromkurvenamplitude auf die Hälfte, befand sich die Pipette in ausreichender Nähe zu der Zellmembran. Durch Entfernung des Überdrucks und gegebenenfalls Anlegen eines geringen Unterdrucks legte sich die Membran an die Pipettenspitze an, ein Giga Seal (der Widerstand befand sich in einem G Ω -Bereich) zeigte das dichte Anliegen der Membran an. Gleichzeitig bildete sich die Stromkurve auf einer geraden Linie ab. Im nächsten Schritt wurde der Funktionsmodus auf *on-cell* gewechselt, in diesem Modus werden die kapazitiven Ströme durch den Verstärker ausgeglichen. Diese Ströme entstehen durch Ladungsbewegungen an der Zellmembran und Pipettenwand, die jeweils eine schwache Kondensatoreigenschaft besitzen, jeweils beim Wechsel eines Spannungspotentials. Ein nun ruckartig erzeugter Unterdruck führte zu einer Ruptur der Membran innerhalb des Pipettendiameters, die Membran legte sich von innen an die Pipette an, es bestand nun eine Verbindung zwischen Pipettenlösung mit Pipettenelektrode und dem Zellplasma. Der hierdurch entstandene Serienwiderstand, sich bildend aus dem Pipettenwiderstand, dem Zellwiderstand und dem Widerstand der Badlösung, sollte so gering wie möglich gehalten werden, da dieser die angelegte Sollspannung herabsetzt und damit auch zu einer herabgesetzten Spannung in der Zelle führt. In unseren Messungen betrug der Serienwiderstand durchgehend weniger als 8 M Ω . Das Wechseln des Verstärkers in den *whole-cell*-Modus führte zu einer kontinuierlichen Serienwiderstandskompensation und auch zu einem weiteren Abgleich der kapazitiven Ströme. Zusätzlich musste auch noch die Kapazität der Gesamtzelle

kompensiert werden, welche direkt von der Membranoberfläche abhängig ist. Diesen Wert kann man nutzen um eine Aussage über die Zellgröße zu treffen. Nach dem Rupturing wurde 5 Minuten abgewartet, sodass sich die in der Pipettenlösung beigemischten Zellstabilisatoren und Hemmstoffe (siehe Kapitel 2.3.1) durch Diffusion gleichmäßig in der Zelle verteilen und ihre hemmende Wirkung entfalten konnten.

Erst danach erfolgten die Messungen nach den in 2.3.6 Beschriebenen Protokollen.

2.3.5. Messprinzip

Die *whole-cell*-Methode beim Patch-Clamp ermöglicht beispielsweise die Messung des gesamtzellulären Natriumstroms. Damit sich die Membranspannung nicht verändert, wird diese automatisch durch den HEKA Verstärker auf einem bestimmten Wert, der Soll- oder Kommandospannung, gehalten. Dafür wurde die aktuelle Membranspannung gemessen und, verglichen mit der Kontrollspannung, in einem Rückkopplungsmechanismus ein Kompensationsstrom erzeugt, der dem Membranstrom entgegen gerichtet ist.

Der ermittelte Messtrom, abzüglich des Kompensationsstroms, kann Aufschluss geben über die elektrische Leitfähigkeit zum Beispiel von Natrium. Grundlage hierfür ist das Ohm'sche Gesetz:

$$R = U/I$$

Die Membran erzeugt einen Widerstand R, der aus der angelegten Spannung (U) und des darauf erzeugten Stroms (I) errechnet werden kann. In der Elektrophysiologie wird statt des Widerstandes häufig die Leitfähigkeit g (mit der Einheit Siemens) benutzt, diese ist der Kehrwert des Widerstandes:

$$g = 1/R$$

daraus ergibt sich:

$$g = I/U.$$

Die Spannung U lässt sich unterteilen in die Sollspannung U_{Soll} abzüglich des Gleichgewichtspotentials E_m an der Zellmembran der Ionen, deren Strom wir messen wollen:

$$U = U_{\text{Soll}} - E_m.$$

Die Gleichung lautet also:

$$g = I / (U_{\text{Soll}} - E_m)$$

Die Sollspannung U_{Soll} wird in der Messung durch das Messprotokoll vorgegeben. Das Gleichgewichtspotential E_m ist das Potential, bei dem auf beiden Seiten der Membran das Fließgleichgewicht derjenigen Ionen, die den zu messenden Strom erzeugen, ausgeglichen ist und hier für die Natriumionen bestimmt wird. Das Gleichgewichtspotential kann neben der experimentellen Ermittlung auch über die sogenannte Nerst'sche Gleichung errechnet werden:

$$E_{\text{Na}} = R * T / F \ln ([\text{Na}^+]_o / [\text{Na}^+]_i)$$

R [J / K * mol] = allgemeine Gaskonstante

T [K] = absolute Temperatur

F [A * s / mol] = Faradaykonstante

$[\text{Na}^+]_o$ bzw. $[\text{Na}^+]_i$ [mol / l] = Natriumkonzentration extra- bzw intrazellulär

Die Zellmembran fungiert physikalisch als selektive semipermeable Membran zwischen zwei Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Sie ist durchlässig für die kleinen Kationen, nicht jedoch für die großen Anionen. Die Kationen können also getrieben vom osmotischen Druck entlang des chemischen Gefälles von der höher konzentrierten Seite in die niedriger konzentrierte Lösung diffundieren. Auf diese Weise entsteht durch die damit verbundene Ladungsverschiebung ein elektrischer Gradient. Die Nerst'sche Gleichung berücksichtigt in ihrer Berechnung beide, den elektrischen sowie den chemischen Gradienten und ermöglicht so die Errechnung des Potentials, bei dem der elektrochemische Gradient gleich Null ist. Der errechnete Wert für Natrium beträgt 68 mV.

Die Leitfähigkeit der Membran bei der vorbestimmten Spannung U_{Soll} kann mit diesen Werten ermittelt werden und spiegelt so die Zahl und das Öffnungsverhalten der Ionenkanäle wieder.

2.3.6. Protokolle

Das erste Protokoll (**Abb. 2-5 A**) untersucht die Natriumleitfähigkeit der Zelle in Abhängigkeit der angelegten Spannung, also die Strom-Spannungsbeziehung des Natriumkanals (I-V-Protokoll). Ausgehend von einem Ruhepotential von -140 mV, bei dem sich fast alle Natriumkanäle in einem geschlossen aber aktivierbaren Zustand befinden, wurde für 40 ms die Spannung in 10 mV Schritten erhöht, bis ein Wert von 60 mV erreicht wurde. Um alle Kanäle wieder in den aktivierbaren geschlossenen Zustand zu bekommen wurde zwischen den Messungen wieder auf das Ruhepotential von -140 mV gewechselt. Die erfassten Ströme wurden durch die dazugehörige Membrankapazität der Zelle geteilt. Damit sind die Werte unabhängig von der Zellgröße vergleichbar. Die erfasste maximale Amplitude des Natriumstroms, genormt gegen die Membrankapazität, wurde gegen die Membrankapazität aufgetragen und konnte als doppelte Exponentialfunktion angenähert werden:

$$f(x) = A_{\text{fast}} \exp(-t/\tau_{\text{fast}}) + A_{\text{slow}} \exp(-t/\tau_{\text{slow}}) + y_0.$$

Das zweite Protokoll (**Abb. 2-5 B**) untersuchte die Verfügbarkeit der gesamten Natriumkanäle einer Zelle in Abhängigkeit des bestehenden Membranpotentials E_m . Ausgehend von dem Ruhemembranpotential von -140 mV wurde für 500 ms eine variierende Membranspannung von -120 mV bis -20 mV angelegt und dann für 20 ms auf -20 mV depolarisiert (P_2). Bei -20 mV öffnete sich der größte Anteil der aktivierbaren Natriumkanäle und beteiligte sich am Natriumstrom. Je nach vorheriger angelegter Membranspannung E_m war die Anzahl der aktivierbaren Natriumkanäle und entsprechend auch der gemessene Strom kleiner oder größer. Bei einem Ruhemembranpotential von -120 mV waren die meisten Kanäle aktivierbar und standen damit dem Natriumstrom zur Verfügung. Mit steigendem Membranpotential waren mehr Kanäle in den inaktivierbaren Zustand übergegangen und entsprechend wurde der erfasste Strom kleiner. Jeder durch Depolarisation erzeugte Strom P_2 wurde gegen die maximale Strommessung P_1 genormt (P_2/P_{max}) und in einer

Funktionskurve gegen das Membranpotential aufgetragen. Diese Steady-State-Inaktivierungskurve wurde durch die Boltzmannfunktion beschrieben:

$$h_{\infty} = 1 / \{1 + \exp [(V_{1/2} - V) / k_{\infty}]\}.$$

Das dritte Protokoll (**Abb. 2-5 C**) untersuchte die intermediäre Inaktivierung der Natriumkanäle. Es wurde, ausgehend von einem Ruhemembranpotential von -140 mV, zweimal auf -20 mV depolarisiert, dazwischen wurde für 20 ms wieder auf das Ruhemembranpotential zurückgegangen. Die erste Depolarisation P_1 wurde mit jedem Durchgang verlängert, beginnend mit einer Depolarisationsdauer von 15 ms ansteigend bis auf 1054 ms. Je länger die erste Vordepolarisation andauerte, desto geringer wurde der Stromfluss bei der zweiten Depolarisation P_2 , es befanden sich mit länger andauernder Vordepolarisation weniger Kanäle im aktivierbaren Zustand. Das Verhältnis zwischen den Strömen (P_2/P_1) beschreibt also die Fähigkeit der Kanäle von dem inaktivierbaren in den aktivierbaren Zustand überzugehen. Das Verhältnis (P_2/P_1) wurde gegen die Zeit aufgetragen und mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben:

$$y(t) = A \exp (-k_{IM} t) + y_0.$$

Das vierte Protokoll (**Abb. 2-5 D**) untersuchte die Erholung der inaktivierten Kanäle. Dafür wurde nach einer Depolarisation von -140 mV auf -20 mV für 1000 ms, dabei gehen nahezu alle Natriumkanäle in den inaktivierbaren Zustand über, für eine variable Erholungszeit von 1 ms bis zu 165 ms wieder auf das Ruhemembranpotential zurückgegangen, bevor dann für 10 ms erneut auf -20 mV depolarisiert wurde. Je länger das Erholungsintervall andauerte, desto mehr Kanäle konnten aus dem inaktivierbaren Zustand wieder in den aktivierbaren Zustand wechseln und standen damit bei der Depolarisation P_2 wieder dem Stromfluss zur Verfügung. Das Verhältnis von P_2/P_1 beschreibt die Menge der reaktivierten Natriumkanäle, es wurde gegen die Dauer der Erholungszeit aufgetragen und mit einer einfachen Exponentialfunktion genauer beschrieben:

$$y(t) = A [1 - \exp(-k_{rec} t)].$$

Durch das fünfte Protokoll (**Abb. 2-5 E**) wurde der späte Natriumstrom (Late I_{Na}) erfasst. Dabei wurde, ausgehend von einem Ruhemembranpotential von -120 mV, für 5 ms auf 50 mV depolarisiert, dann für 1000 ms auf ein Potential von -30 mV zurückgegangen. Der in diesem Zeitraum fließende Strom durch noch geöffnete Natriumkanäle wird später Natriumstrom genannt. Er wurde als Integral zwischen 50 und 450 ms erfasst.

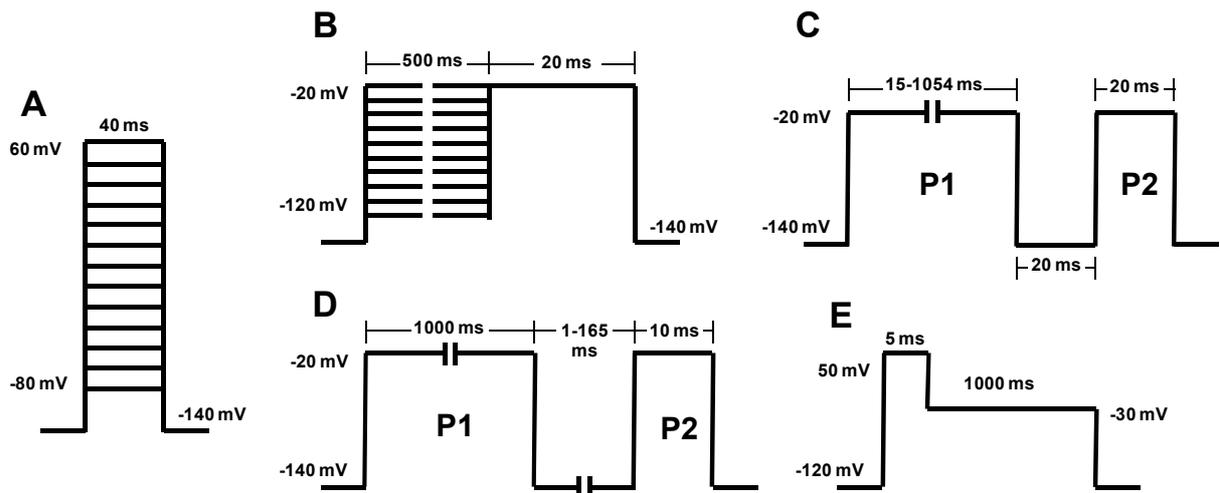


Abb. 2-5: Standardprotokolle für die Messungen des Natriumstroms mittels Patch-Clamp. (A) Strom-Spannungsbeziehung des Natriumkanals, (B) Steady-State-Inaktivierung, (C) intermediäre Inaktivierung, (D) Reaktivierung des Natriumkanals, (E) Später Natriumstrom (Late I_{Na})

2.4. Pharmakologische Materialien

2.4.1 Humanes Angiotensin II

Angiotensin II (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: A9525, Molekulargewicht 1046,81 g/mol) ist ein natürliches, sowohl im menschlichem als auch im Organismus der Maus, vorkommendes Hormon. Die inaktive Vorstufe Angiotensinogen hat seinen Bildungsort in der Leber und wird über zwei Prozesse enzymatisch in das aktive Angiotensin II gespalten, welches im Menschen auf unterschiedliche Organe multipel wirkt (siehe Kap. 1-8). Angiotensin II wurde in der Konzentration: 1 $\mu\text{mol/l}$ verwendet und zu der Badlösung hinzugefügt.

2.4.2 H89

H89 Dihydrochlorid Hydrat (Bestellnummer: B1427, Sigma-Aldrich, Molekulargewicht: 519,28 g/mol) ist ein synthetisch hergestellter selektiver Hemmer der cAMP abhängigen PKA (Konzentration 5 $\mu\text{mol/L}$). Es wurde zusammen mit dem Angiotensin II zu der Badlösung gegeben.

2.4.3 PKI

Neben dem H89 wurde ein weiterer sehr selektiver kompetitiver Hemmer der cAMP abhängigen PKA verwendet, der *protein kinase inhibitor* (PKI) (Sigma-Aldrich, Bestellnummer SCP0064-5MG Molekulargewicht: 1989,29 g/mol). Da das Polypeptid nicht plasmagängig ist wurde dieser mit der Konzentration 25 $\mu\text{mol/l}$ direkt in der Pipettenlösung eingesetzt.

2.4.4 AIP

Zur Hemmung der CaMKII δ wurde mit dem Hemmstoff *autocamtide-2 related inhibitory peptide* (AIP) (Sigma-Aldrich, Bestellnummer A4308-1MG, Molekulargewicht: 1497,74 g/mol) in der Konzentration 0,1 $\mu\text{mol/l}$ in der Badlösung gearbeitet. Dieses Peptid ist ein hochselektiver spezifischer Inhibitor der CaMKII δ .

2.4.5 2-ABP

2-Aminoethyldiphenylborinat (2-APB) (Bestellnummer D9754, Sigma-Aldrich, Molekulargewicht: 225,09 g/mol) wurde zur Hemmung des IP₃-Rezeptors verwendet. Es wirkt am IP₃-Rezeptor antagonistisch und wurde in der Konzentration 2 $\mu\text{mol/l}$ in der Badlösung eingesetzt.

2.5. Datenerfassung und Auswertung

Die gemessenen und mit dem Computerprogramm Patchmaster™ (HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH) erfassten Ströme und Daten wurden mit der Software Clampfit

weiter verarbeitet. Die auswertbaren Messungen wurden in Microsoft Excel importiert und bearbeitet (Gruppenzusammenfassung, Tabellenkalkulation). Der Standardfehler errechnete sich folgendermaßen:

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

(σ = Standardabweichung; σ^2 = Varianz; n = Anzahl der Beobachtungen)

Die Endauswertung, statistische Testungen und graphische Abbildungen erfolgten mit der Software GraphPad Prism™ (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die statistischen Auswertungen erfolgten mit ANOVA.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Um den Effekt des Ang II auf den Natriumkanal genauer zu beurteilen, wurden Kardiomyozyten von Mäusen verwendet und mit Ang II exponiert. Zur genaueren Untersuchung des intrazellulären Signaltransduktionsweges des Ang II wurden Mäuse verwendet, deren Gen für die katalytische Einheit der Nox 2 gp91phox ausgeschaltet worden ist (gp91phox^{-/-}) und mit Kardiomyozyten ihrer Wildtypgeschwister verglichen.

Zum weiteren Verständnis der Signaltransduktion wurden die Zellen mit den Hemmstoffen der PKA (H89 oder PKI), der CaMKII (AIP) sowie einem Hemmstoff der IP₃R (2-APB) behandelt.

3.1 Angiotensin II beeinflusst das Öffnungsverhalten des Natriumkanals teilweise in Abhängigkeit von der Nox 2 und PKA

3.1.1 Untersuchung der Aktivierung

Zur Untersuchung der Aktivierung und des Öffnungsverhaltens des Natriumkanals wurde in der extrazellulären Lösung die Natriumkonzentration ($[Na^+]_o$) reduziert, um Messfehler durch zu hohe Natriumströme, die durch den Amplifier nicht ausgeglichen werden können, zu verhindern.

In **Abb. 3-1** sind die Strom-Spannungsbeziehungen (I-V-Beziehung) und damit die Natriumleitfähigkeit von WT-Mäusen mit Ang II-Exposition dargestellt, Vehicle-Zellen derselben Mäuse ohne Ang II-Exposition als Kontrollgruppe. Aufgetragen ist die Stromdichte in Abhängigkeit vom Membranpotential. Die Stromdichte berechnet sich aus dem Verhältnis der Stromstärke zur Membranoberfläche. Da diese proportional abhängig von der Membrankapazität ist (siehe Kapitel 3.1.2) wurde diese in Abhängigkeit der Membrankapazität (pF) errechnet.

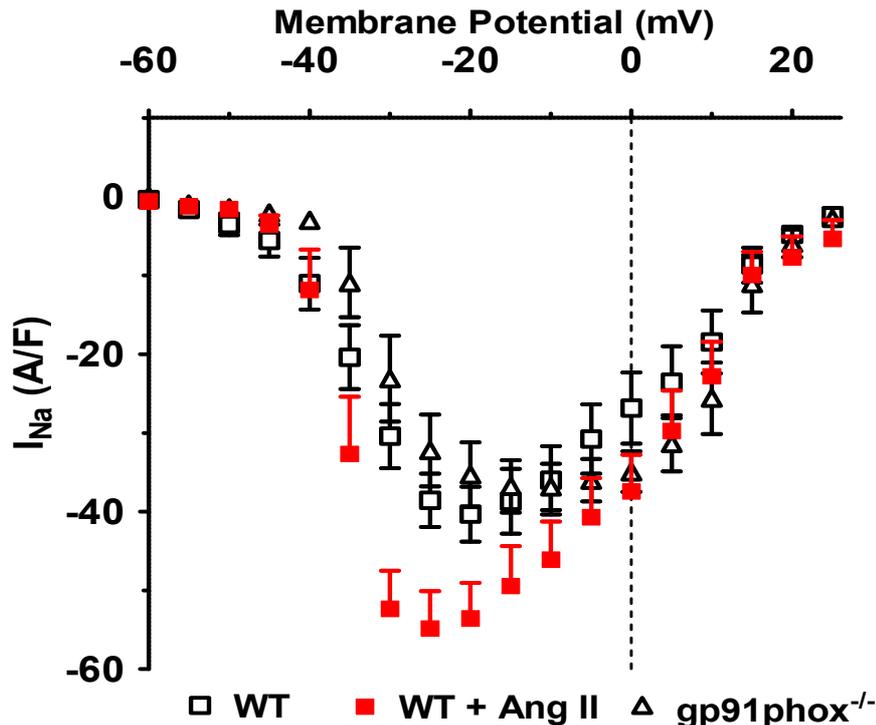


Abb. 3-1: Dargestellt ist die Strom-Spannungsbeziehung (I-V-Beziehung) des Natriumkanals von WT-Vehicle-Zellen und WT-Zellen mit Exposition von Ang II. Man erkennt eine deutliche Steigerung der Stromdichte durch den Einfluss von Ang II.

Ang II bewirkt in den WT-Zellen eine signifikante Steigerung des maximalen Natriumstroms, welcher sein Maximum durch Depolarisation ausgehend von einem Ruhemembranpotential von -140 mV bei etwa -25 mV erreicht. Die Stromdichte (pA/pF) lag bei Depolarisation auf -25 mV in den WT-Vehicle-Zellen $-38,6 \pm 3,4$ (N=16), im Vergleich dazu steigt die Stromdichte bei Exposition mit Ang II auf $-54,8 \pm 4,7$ (N=9) signifikant, Ein-Wege ANOVA ($p < 0,05$), an (**Abb. 3-2**).

Da Ang II die Nox 2 aktivieren kann, wurden Messungen in gp91phox^{-/-} Mäusen durchgeführt, um zu überprüfen, ob dieser Effekt des Ang II abhängig von der Nox 2 vermittelt wird. Gp91phox^{-/-}-Vehicle-Zellen erreichten einen vergleichbaren Wert der Stromdichte zu den WT-Vehicle-Zellen von $-32,3 \pm 4,6$ (N=11). In den gp91phox^{-/-}-Zellen konnte der Effekt des Ang II signifikant zu den Ang II-exponierten WT-Zellen inhibiert werden und lag im vergleichbaren Bereich zu den Vehicle Zellen bei $-33,6 \pm 3,3$ (N=7) ($p < 0,05$).

Die Zusätzliche Gabe von H89 zur Inhibierung der PKA konnte den Effekt des Ang II signifikant hemmen, die Stromdichte lag bei $-26,6 \pm 6,6$ (WT + Ang II + H89 N=5, $P < 0,05$).

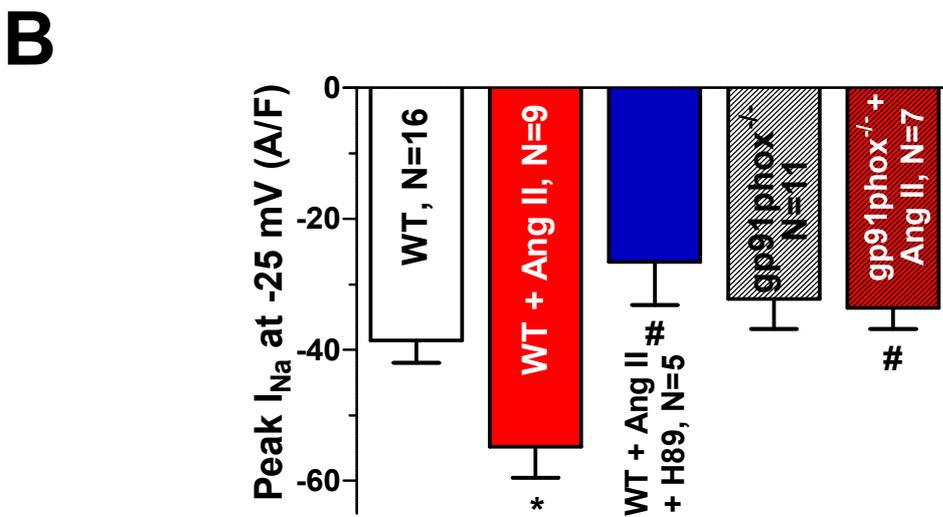
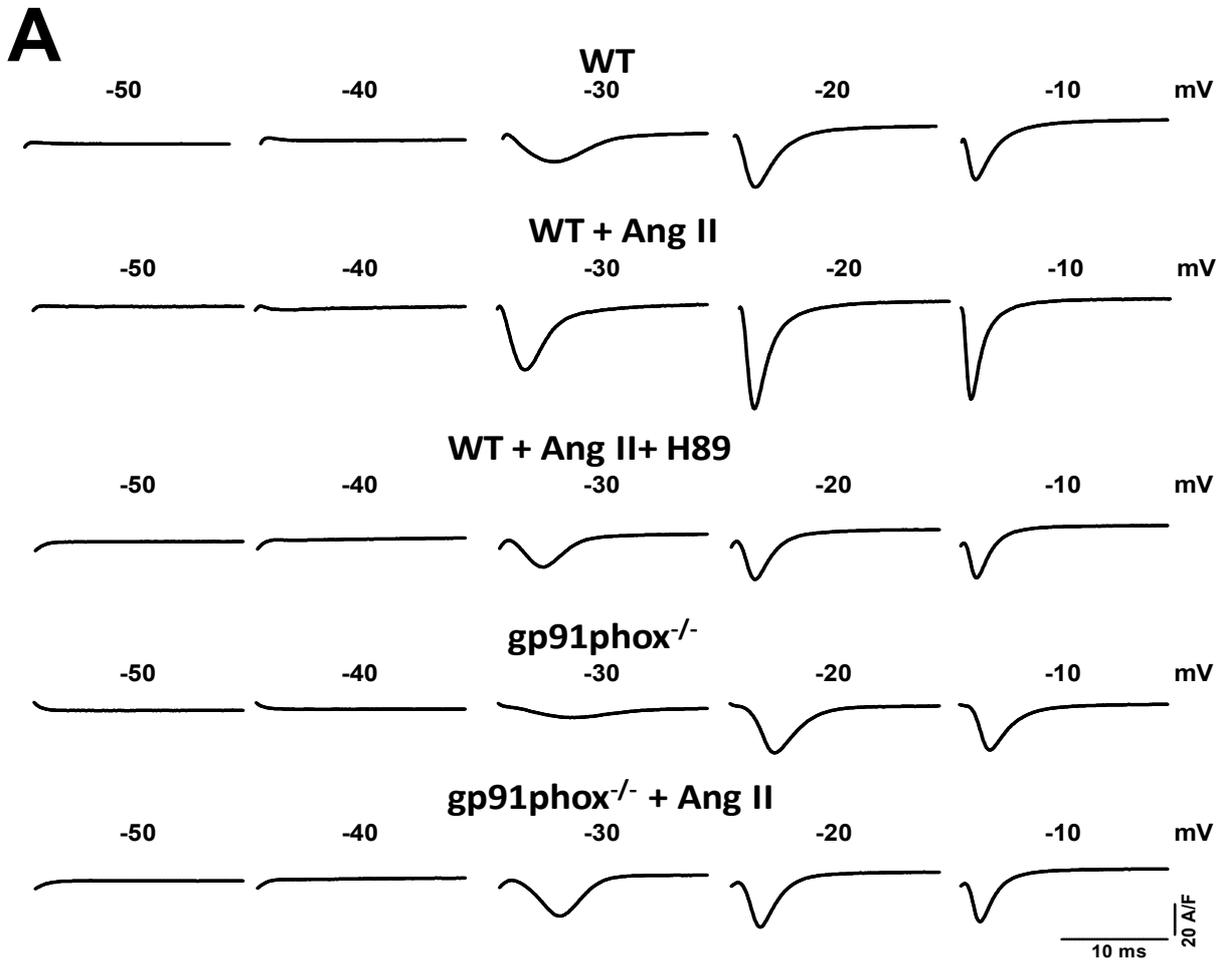


Abb. 3-2: (A) Originalregistrierungen und (B) Säulendiagramm zur Übersicht der Natriumleitfähigkeit bei -25 mV. * $P < 0,05$ vs WT, # $P < 0,05$ vs WT + Ang II.

Zusammenfassend kann man schlussfolgern, dass die Effekte des Ang II Nox 2 vermittelt über die Aktivierung der PKA reguliert werden.

3.1.2 Angiotensin II hat keinen Einfluss auf die schnelle Inaktivierung des Natriumkanals

Um die schnelle Inaktivierung zu ermitteln, wurde der Abfall des Stroms nach der maximalen Aktivierung, bei -25 mV, gemessen. Man kann dabei zwei Phasen der schnellen Inaktivierung unterteilen, die frühe Phase τ_1 und die späte Phase τ_2 . Unter dem Einfluss von Ang II veränderte sich keine Phase der schnellen Inaktivierung. In **Abb. 3-3** sind die Mittelwerte der schnellen Inaktivierung dargestellt. Deutlich wird, dass weder τ_1 noch τ_2 unter Ang II Wirkung verändert sind. Entsprechend gibt es auch keine signifikanten Unterschiede im $gp91phox^{-/-}$ oder durch zusätzliche Inkubation mit H89.

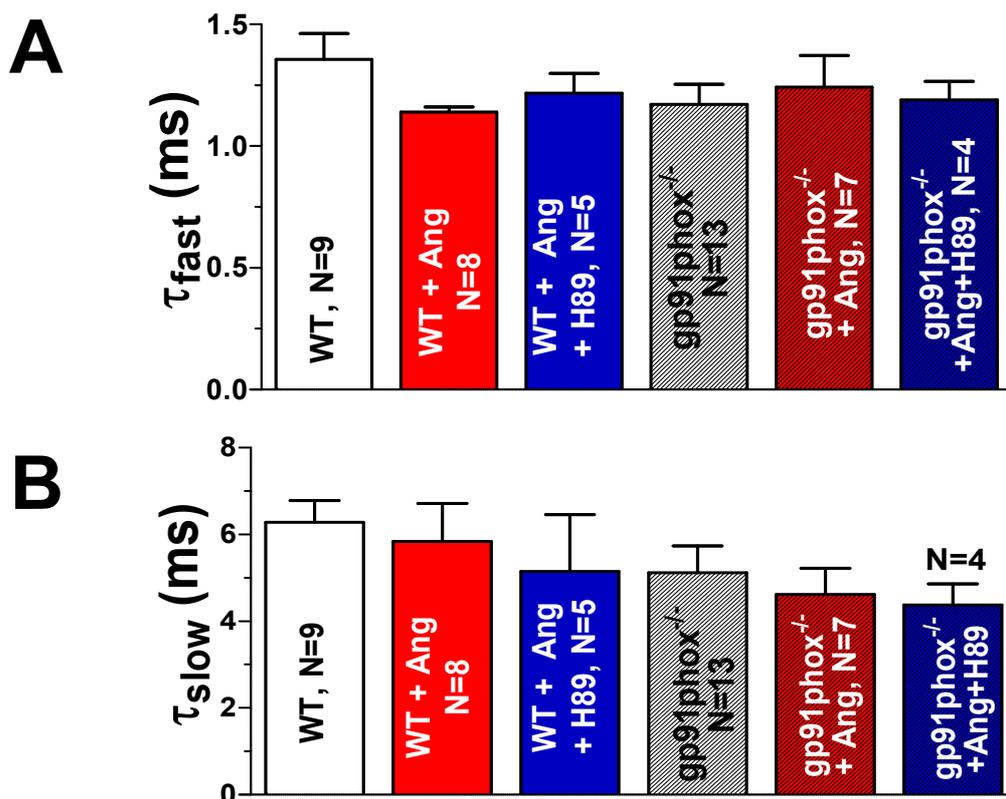


Abb. 3-3: Mittelwerte der schnellen Inaktivierung (A) in der frühen Phase τ_1 und (B) in der späten Phase τ_2 . Es gibt keine signifikanten Veränderungen unter Ang II Einfluss.

3.1.3 Angiotensin II führt zu einer verringerten globalen Verfügbarkeit der Natriumkanäle (Steady-State-Inaktivierung) unabhängig von der Nox 2 und PKA

Um den Einfluss des Ang II auf das Natriumkanal-Öffnungsverhalten zu untersuchen wurde zunächst die globale Verfügbarkeit in Abhängigkeit von einem gegebenen Membranpotential untersucht. In **Abb. 3-4** sind Originalregistrierungen von WT Mäusen mit und ohne Ang II-Exposition dargestellt, sowie die Kontrollgruppe in *gp91phox^{-/-}* und mit dem PKA-Hemmstoff H89. Gemessen wurde der Natriumstrom, der als Maß für die Verfügbarkeit der Kanäle betrachtet werden kann.

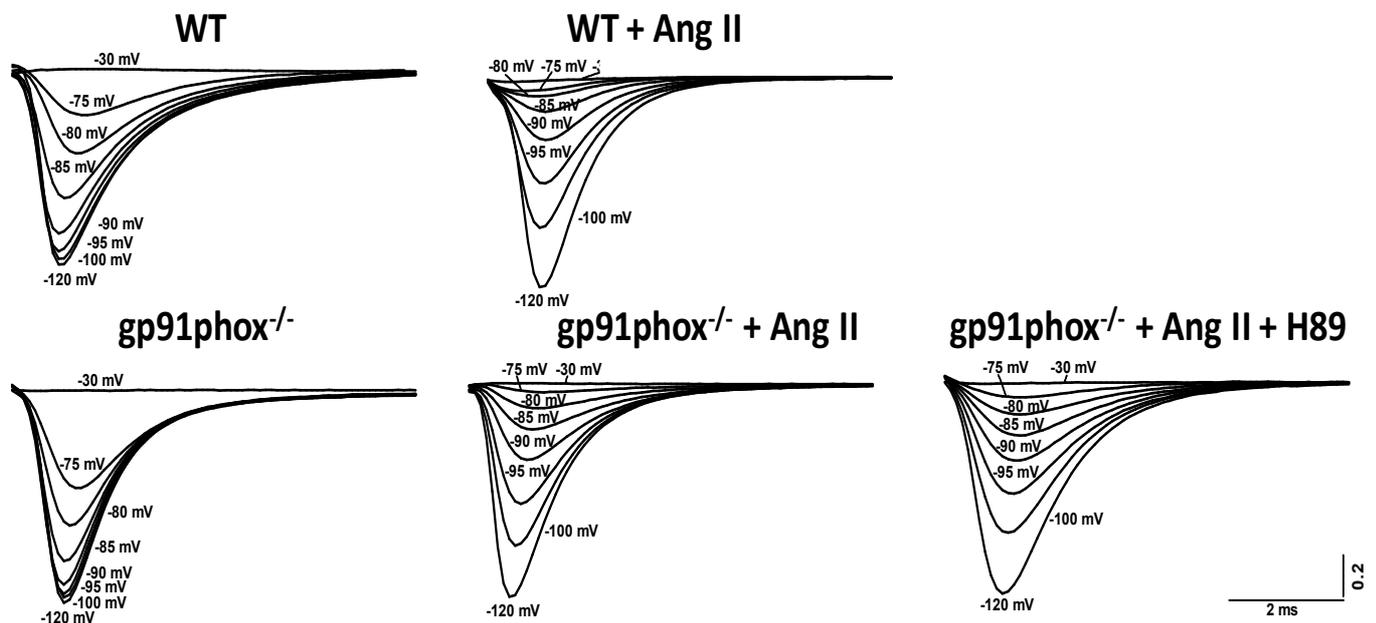


Abb. 3-4: Originalregistrierungen der globalen Verfügbarkeit der Natriumkanäle (Steady-State-Inaktivierung). Die demonstrierten Peaks stellen die Natriumströme dar, die durch den Testimpuls P_2 ausgelöst wurden, nachdem ein variierender Konditionierungspuls P_1 mit steigender Spannung angelegt wurde. Man erkennt unter Ang II eine deutlich frühere Inaktivierung der Natriumkanäle.

Ang II führt zu einer verminderten Verfügbarkeit der Natriumkanäle im Vergleich zu Vehicle Zellen. Bei einem angelegten Konditionierungsimpuls von -95 mV ist in der Kontrollgruppe der Natriumstrom kaum verringert im Vergleich zum maximalen Stromfluss bei einem Konditionierungsimpuls von -120 mV, während durch die Inkubation mit Ang II der Stromfluss bei -95 mV nur noch knapp die Hälfte zum

maximalen Fluss beträgt und damit deutlich weniger Natriumkanäle bei einer Depolarisation zur Verfügung standen als in der Kontrollgruppe.

Dieser Effekt des Ang II war auch in den *gp91phox^{-/-}* Mäusen zu sehen und ließ sich nicht durch den Einsatz von H89 inhibieren.

In der Auftragung der Mittelwerte in der Verfügbarkeitskurve (**Abb. 3-5**) wird der relative Strom vom maximalen Stromfluss gegen die als Konditionierungsimpuls angelegte Membranspannung aufgetragen. Man erkennt eine Linksverschiebung unter Ang II Einfluss, dieser Effekt ist durch H89 nicht inhibierbar und auch in *gp91phox^{-/-}* Mäusen weiter auslösbar.

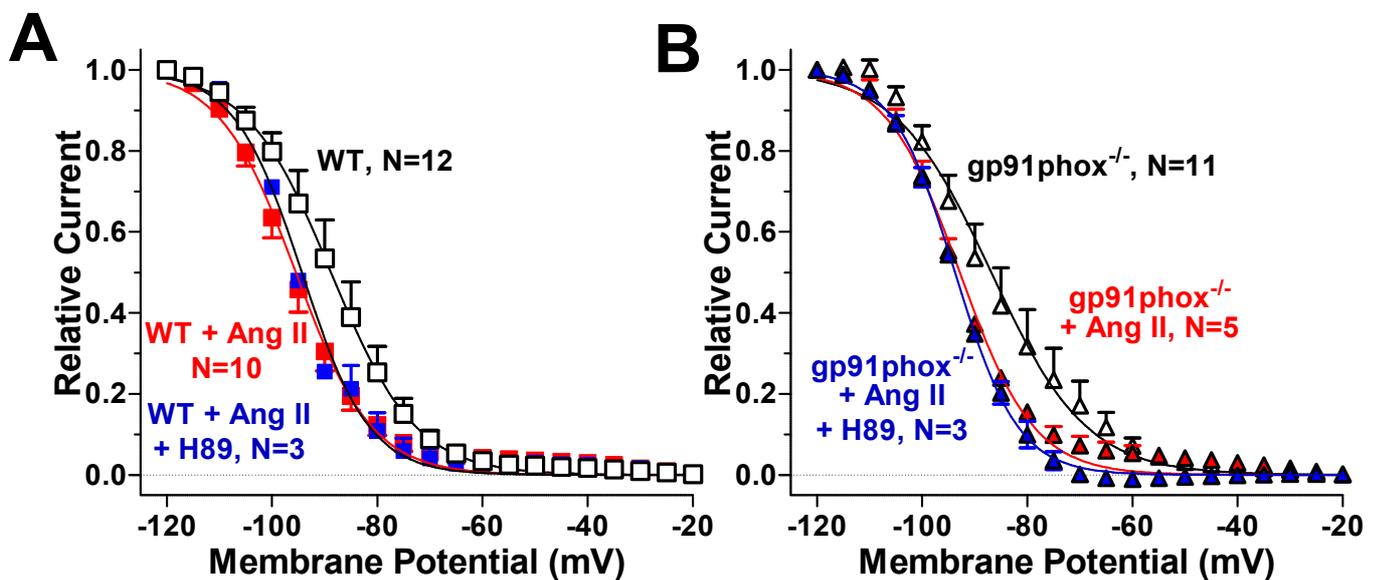


Abb. 3-5: Der Einfluss des Ang II und H89 auf die Verfügbarkeit der Natriumkanäle. Aufgetragen ist der relative Stromfluss vom maximalen Fluss in Abhängigkeit von der angelegten Membranspannung P_1 (A) im WT und (B) in *gp91phox^{-/-}*. In beiden Gruppen ist die Verfügbarkeit signifikant vermindert ($P < 0,05$) und lässt sich durch Inhibition der PKA nicht wieder steigern.

Das Potential, bei dem noch die Hälfte des maximalen Stroms fließt ($V_{1/2}$), ist also unter Inkubation mit Ang II bereits bei negativeren Membranpotentialen erreicht, in den WT Vehiclen lag der $V_{1/2}$ -Wert (**Abb. 3-6**) bei $-88,0 \pm 0,6$ mV ($N=12$), im WT + Ang II signifikant niedriger bei $-95,5 \pm 0,4$ mV ($N=12$) ($P < 0,05$). Der durch Ang II ausgelöste Effekt ließ sich durch den Einsatz von H89 als PKA-Inhibitor nicht vermindern und lag bei $-94,4 \pm 0,5$ mV ($N=3$).

Dieser Effekt des Ang II war auch in $gp91phox^{-/-}$ signifikant gesteigert. Während in Vehicle-Zellen der Mittelwert bei $-86,9 \pm 0,7$ mV (N=11) lag, führte die Inkubation mit Ang II zur deutlich geringeren Verfügbarkeit bei im Mittel $-92,8 \pm 0,3$ mV (N=5) und unter Ang II und H89 $-93,7 \pm 0,2$ mV (N=3) ($P < 0,05$).

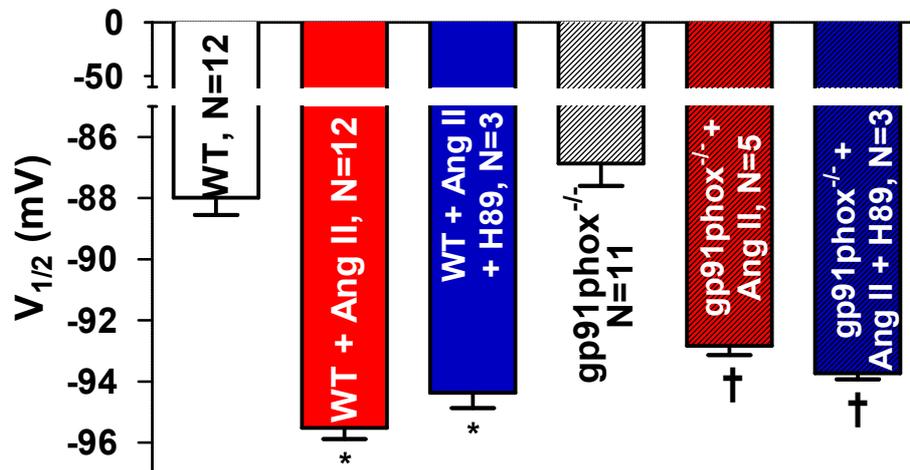


Abb. 3-6: Aufgetragen sind die gemittelten Werte des $V_{1/2}$. Unter Ang II verschiebt sich sowohl im WT als auch im $gp91phox^{-/-}$ die Verfügbarkeit der Kanäle $V_{1/2}$ signifikant in negativere Potentiale, dieser Effekt ist durch H89 nicht inhibierbar, * $P < 0,05$ vs. WT, † $P < 0,05$ vs. $gp91phox^{-/-}$.

3.1.4 Angiotensin II beschleunigt die intermediäre Inaktivierung der Natriumkanäle unabhängig von der Nox 2 und der PKA

Eine mögliche Ursache für die reduzierte Verfügbarkeit der Natriumkanäle durch Ang II kann in einer beschleunigten intermediären Inaktivierung (I_M) liegen.

Abb. 3-7 zeigt die Originalregistrierungen. Die Stärke des gemessenen Natriumstroms des Testimpulses P_2 ist abhängig von der Dauer des Inaktivierungspulses P_1 (siehe Kapitel 2.3.6). Es ist erkennbar, dass nach Inkubation mit Ang II im Vergleich zu den Vehicle-Zellen mit steigender Dauer des Inaktivierungspulses deutlich mehr Natriumkanäle in den inaktivierbaren Zustand übergehen und damit der gemessene Strom deutlich geringer ausfällt. Dieser Effekt des Ang II ist auch in $gp91phox^{-/-}$ Mäusen und unter Hemmung der PKA noch vorhanden.

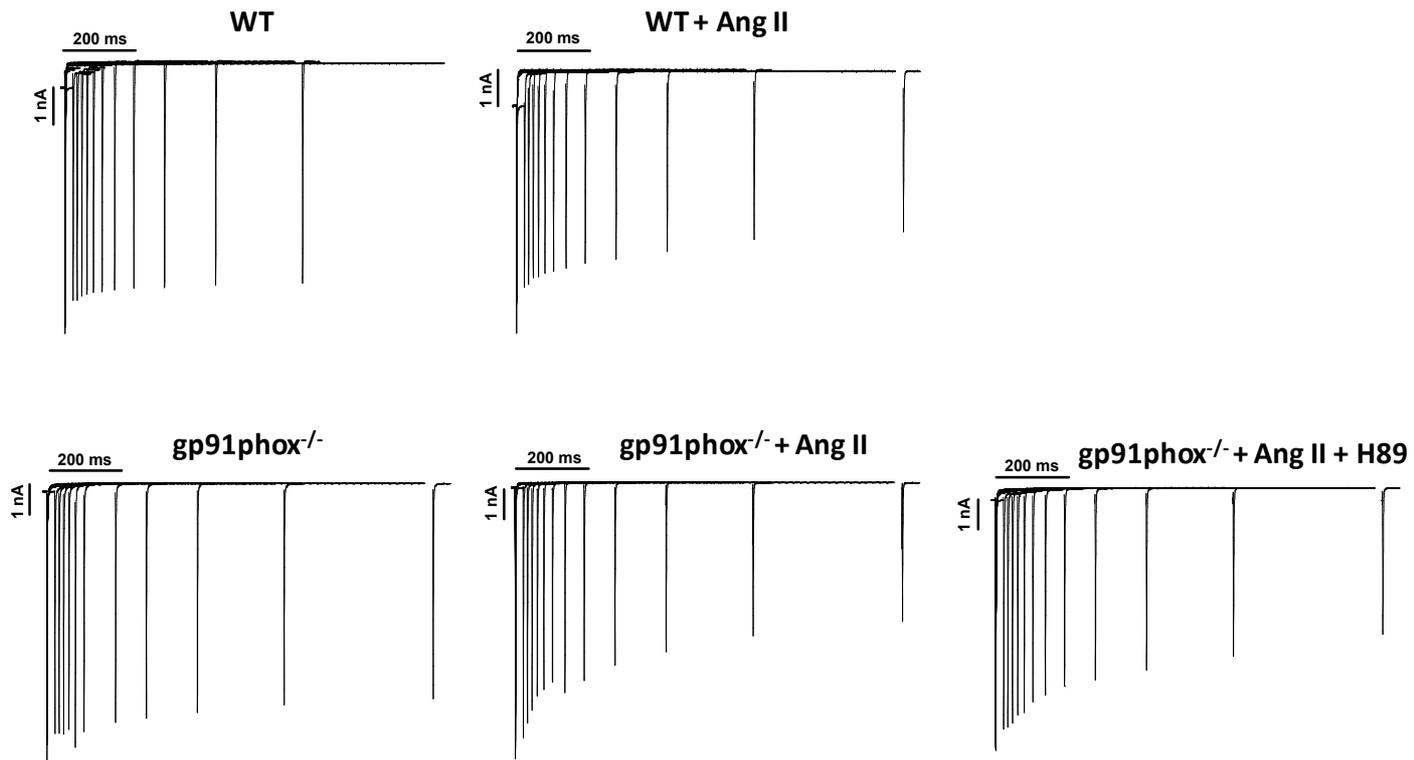


Abb. 3-7: Originalregistrierungen der I_M . Dargestellt ist nur induzierte Strom P_2 . Bei zunehmender Dauer zwischen den Depolarisationen (P_1 nicht dargestellt) gehen mehr Natriumkanäle in den Zustand der intermediären Inaktivierung über und der Strom nimmt ab. Ang II führt zu einem verstärkten Übergang der Kanäle in einen inaktivierbaren Zustand, $gp91phox^{-/-}$ und H89 können den Effekt nicht verhindern.

In **Abb 3-8** sind die Mittelwerte des Verhältnisses der Ströme P_2/P_1 der WT-Zellen aufgetragen in Abhängigkeit zu der Dauer des Intervalls P_1 . Unter Ang II stehen deutlich weniger Kanäle für den Stromfluss zur Verfügung als in den Vehicle-Zellen, bei einer Dauer von $P_1 = 1054$ ms betrug das Verhältnis von P_2/P_1 $0,76 \pm 0,02$ (WT + Ang II N=5) im Vergleich zu $0,83 \pm 0,01$ (WT N=7), $P < 0,05$. Interessanterweise wurden durch zusätzliche Gabe von H89 die Natriumkanäle signifikant stärker inaktiviert als Ang II allein ($0,64 \pm 0,01$ WT + Ang II + H89 N=4, $P < 0,05$).

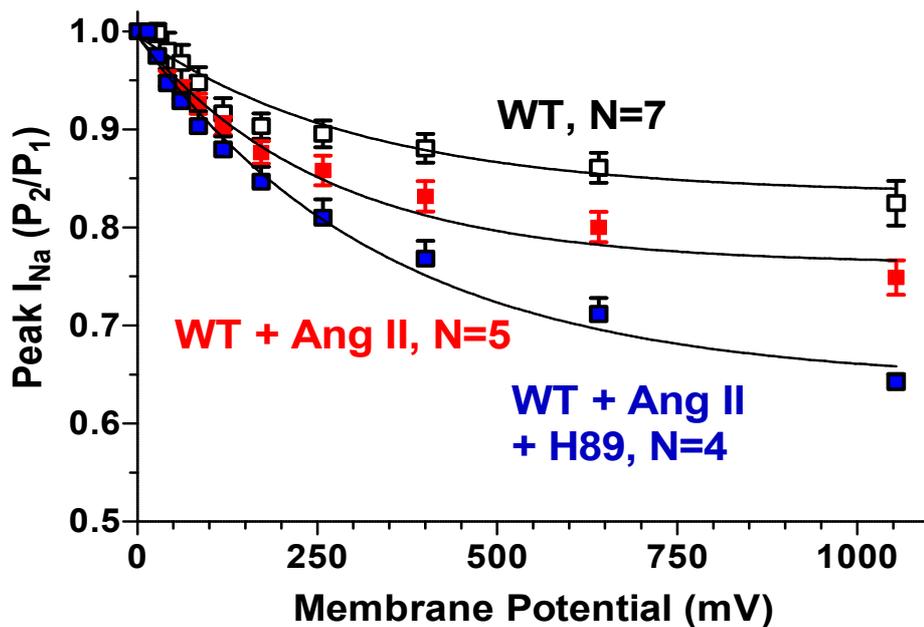


Abb. 3-8: Das Verhältnis von P_2/P_1 in Abhängigkeit von der Dauer des Inaktivierungsimpulses. Unter Ang II kommt es zu einer signifikanten Reduzierung des Natriumstromes durch eine verstärkte Inaktivierung der Natriumkanäle. Wird zusätzlich H89 zu den Zellen gegeben findet sogar eine zu Ang II signifikant vermehrte Inaktivierung statt.

Der Effekt des Ang II und H89 sind ebenfalls in $gp91phox^{-/-}$ signifikant nachweisbar. In **Abb. 3-9** ist das Plateau der unterschiedlichen Gruppen gegeneinander aufgeführt, signifikant ist das Plateau im Knockout unter Ang II vermindert auf $0,76 \pm 0,01$ mV ($gp91phox^{-/-}$ + Ang II N=6) zur Vergleichsgruppe $0,83 \pm 0,01$ mV ($gp91phox^{-/-}$ N=8, $P < 0,05$) sowie durch die zusätzliche Gabe von H89 gegenüber beiden Gruppen signifikant geringer $0,67 \pm 0,02$ mV ($gp91phox^{-/-}$ + Ang II N=6, $P < 0,05$).

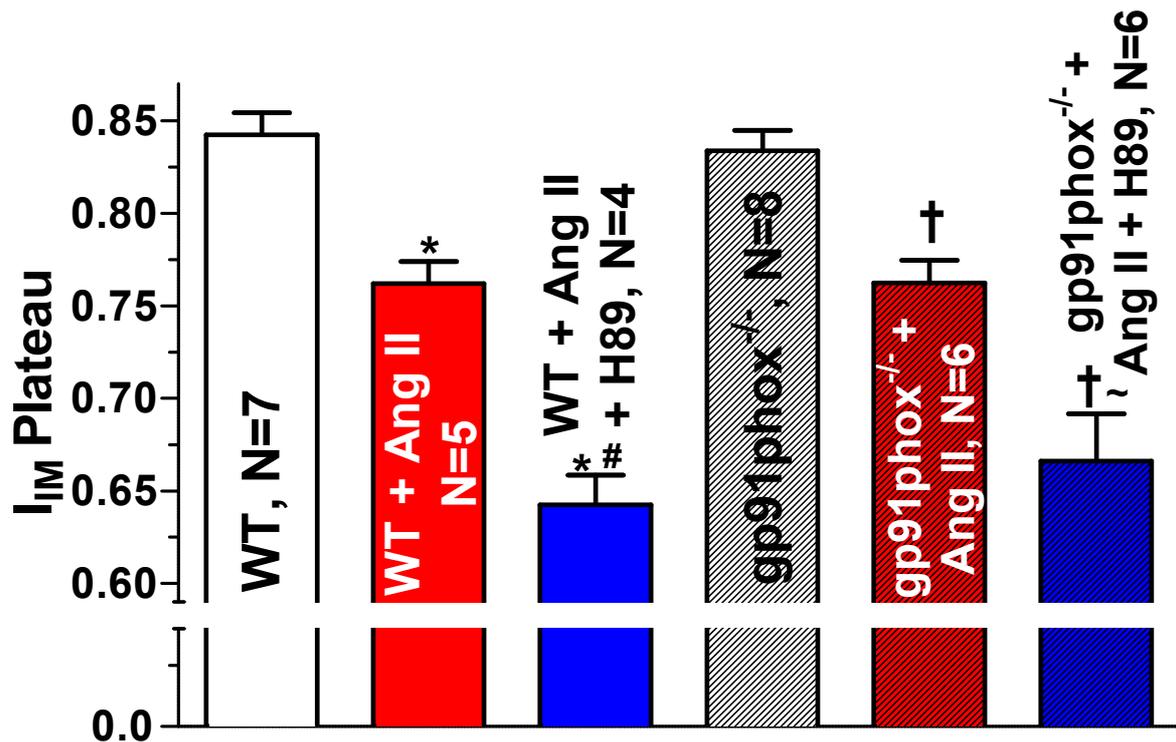


Abb. 3-9: Das gemittelte Plateau der einzelnen Gruppen. Der Strom ist unter Ang II in WT und im Knockout vermindert, zusätzliche Exposition mit H89 vermindert das Plateau weiter signifikant zur alleinigen Exposition mit Ang II. * $P < 0,05$ vs. WT, † $P < 0,05$ vs. gp91phox^{-/-}, # $P < 0,05$ vs. WT + Ang II, ~ $P < 0,05$ vs. gp91phox^{-/-} + Ang II.

3.1.5 Angiotensin II führt zu einer verlangsamten Reaktivierung der Natriumkanäle unabhängig von Nox 2 und PKA

Die verringerte Verfügbarkeit kann neben der beschleunigten intermediären Inaktivierung auch durch eine verzögerte Erholung der Natriumkanäle aus ihrem inaktivierten Zustand bedingt sein.

Die durch den Testimpuls P_2 ausgelösten Ströme nehmen mit sich verlängernder Reaktivierungsphase nach dem Konditionierungspuls P_1 zu. In **Abb. 3-10** sind die Originalregistrierungen dargestellt. Man erkennt, dass im WT mit Ang II die Stromstärke von P_2 länger braucht um sich der Stromstärke von P_1 anzunähern. Das bedeutet, dass die Reaktivierung der Natriumkanäle deutlich langsamer stattfindet als in der Vergleichsgruppe. Interessanterweise ist unter zusätzlichem Einsatz von H89 die Erholung noch deutlich langsamer als mit Ang II allein.

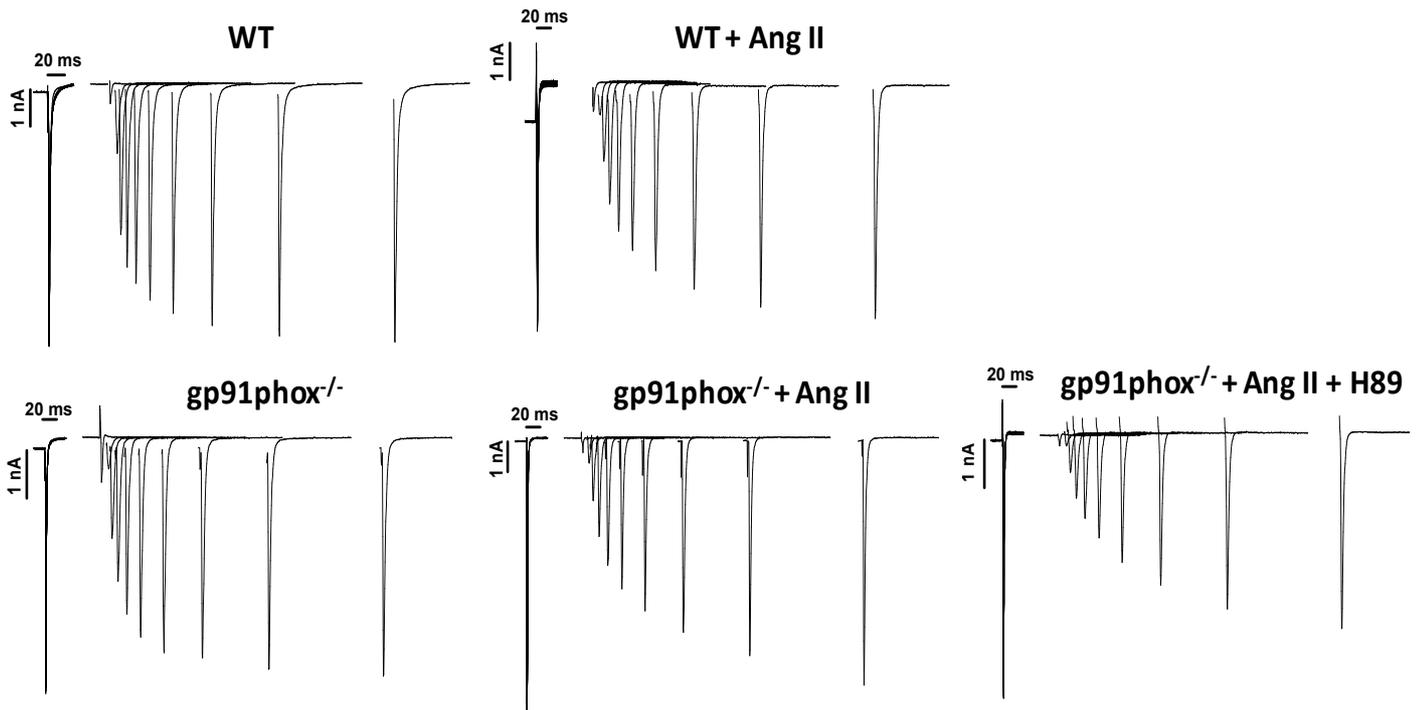


Abb. 3-10: Originalregistrierungen erfasst mit der Patch-Clamp-Technik. Man erkennt, dass sich die Ströme durch P₂ mit längerem Erholungsintervall dem Strom des Konditionierungsimpulses P₁ zu Beginn der Messung annähern. In beiden Gruppen ist diese Reaktivierung der Kanäle unter dem Einfluss von Ang II deutlich verlangsamt. Durch zusätzliche Gabe von H89 ist die Erholung weiterhin deutlich verzögert.

Deutlich wird dieser Effekt des Ang II bei der Auftragung der Mittelwerte des Verhältnisses von P₂/P₁ gegen die Erholungsdauer in **Abb. 3-11**. Die Erholungsrate K_{rec} (s⁻¹) betrug gemittelt in der Vehicle Gruppe $81,6 \pm 5,8$ (N=10). Unter Ang II Wirkung war die Erholungsrate signifikant erniedrigt auf $64,6 \pm 5,6$ (N=8), $P < 0,05$. Die zusätzliche Exposition von H89 zeigte tendenziell eine noch niedrigere Erholungsrate der Kanäle auf $53,8 \pm 5,4$ (N=8), wobei der Effekt zu Ang II nicht signifikant ist.

Dieser Effekt war auch in gp91phox^{-/-} reproduzierbar, die Mittelwerte waren vergleichbar in den Vehicle Gruppen $85,4 \pm 5,3$ (gp91phox^{-/-} N=13) vs $60,1 \pm 4,4$ (gp91phox^{-/-} + Ang II N=10), $P < 0,05$, auch hier nicht signifikant niedriger bei $53,5 \pm 4,5$ (gp91phox^{-/-} + Ang II + H89 N=12).

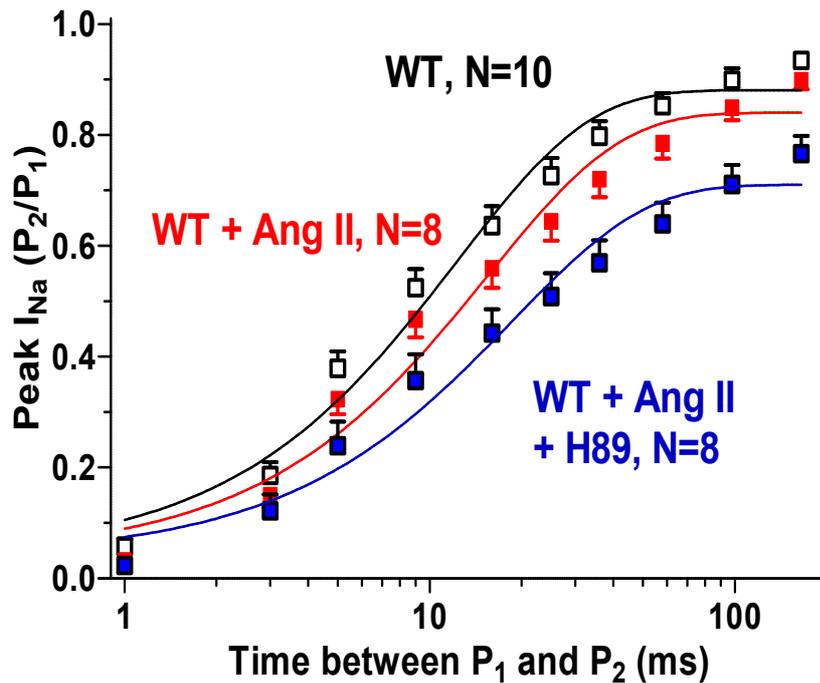


Abb. 3-11: Auftragung der Mittelwerte der Stromverhältnisse P_2/P_1 in Abhängigkeit von der Erholungsdauer zwischen den Impulsen P_1 und P_2 . Unter den Einfluss von Ang II erfolgt die Erholung der Natriumkanäle langsamer als in der Kontrollgruppe. Dieser Effekt wird durch zusätzliche Gabe von H89 noch deutlich verstärkt.

Die gemittelte Rate der Geschwindigkeitskonstante k_{rec} (s^{-1}) der Exponentialfunktion verdeutlicht den Effekt des Ang II auf die Erholungsfähigkeit der Kanäle in beiden Gruppen in **Abb. 3-12** noch einmal.

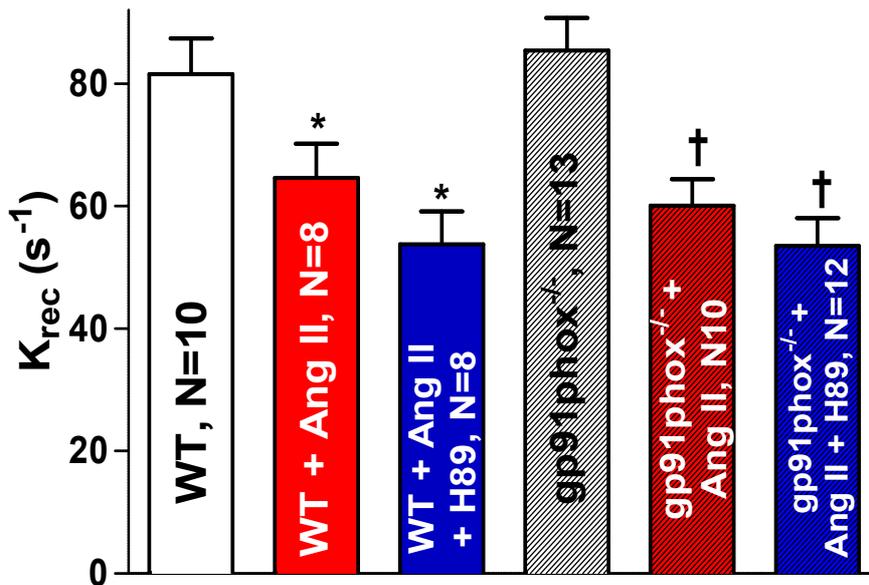


Abb. 3-12: Darstellung der gemittelten Geschwindigkeitskonstante k_{rec} (s^{-1}). Ang II bewirkt eine signifikant verlangsamte Erholung der Natriumkanäle, zusätzlicher Einsatz von H89 verstärkt diesen Effekt in der Tendenz sogar, ist aber zu Ang II nicht signifikant. Auch im Knockout sind diese Resultate signifikant nachweisbar. * $P < 0,05$ vs. WT, † $P < 0,05$ vs. gp91phox^{-/-}.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es unter Ang II zum einen zu einer gesteigerten Aktivierung und damit verbunden zu einer gesteigerten Natriumleitfähigkeit der Zelle kommt. Zum anderen kommt es zu einer verminderten Verfügbarkeit der Natriumkanäle, bedingt durch eine beschleunigte Inaktivierung und verlangsamte Erholung der Natriumkanäle im Mausmodell. Ang II führt damit sowohl zu einer *gain of function* durch die gesteigerte Aktivierbarkeit, als auch zu einer *loss of function* der Natriumkanäle. Auf die schnelle Inaktivierung hat Ang II dagegen keinen Einfluss.

Die gesteigerte Aktivierung durch Ang II ließ sich sowohl durch Inhibition der PKA als auch durch Ausschaltung der ROS-Produktion durch eine funktionslose Nox 2 im gp91phox^{-/-} komplett rückgängig machen. Im Gegensatz dazu führte weder die Hemmung der PKA noch der gp91phox^{-/-} zu einem Rückgang der Ang II bedingten *loss of function*.

3.2 Angiotensin II führt zu einer IP_3R -abhängigen CaMKII-vermittelten Erhöhung des späten Natriumstroms

Die Messungen des späten Natriumstromes erfolgten in physiologischer Zusammensetzung der extrazellulären Natriumkonzentration.

Die Exposition der Zellen mit Ang II führte zu einer signifikanten Erhöhung des späten Natriumstroms (WT -27.94 ± 2.36 (N=21) vs. WT + Ang II -66.79 ± 5.94 (N=21), $P < 0,05$), auch im $gp91phox^{-/-}$ war dieser Effekt signifikant nachweisbar ($gp91phox^{-/-}$ -29.96 ± 4.06 (N=6) vs. $gp91phox^{-/-}$ + Ang II -47.33 ± 4.93 (N=7), $P < 0,05$), dargestellt in **Abb 3-14**, die Originalregistrierungen sind in dargestellt **Abb 3-13**. Die Hemmung der PKA mittels PKI konnte den Effekt des Ang II nicht inhibieren und war von den Werten vergleichbar mit denen des Ang II $-69,8 \pm 5,6$ (N=11). Dagegen konnte eine Inkubation der Zellen mit Ang II und AIP zur Hemmung der CaMKII δ den späten Natriumstrom signifikant senken auf das Stromniveau der Vehicle-Zellen von $-31,0 \pm 5,7$ (N=7). Auch eine Hemmung der IP_3R mit 2-APB führte zu einem signifikanten Abfall des Stroms im Vergleich zu Ang II sowohl in WT als auch im $gp92phox^{-/-}$ (WT + Ang II + 2-APB $-32,4 \pm 3,2$ (N=16), $gp91phox^{-/-}$ + Ang II + 2-APB $-33,7 \pm 2,9$ (N=10).

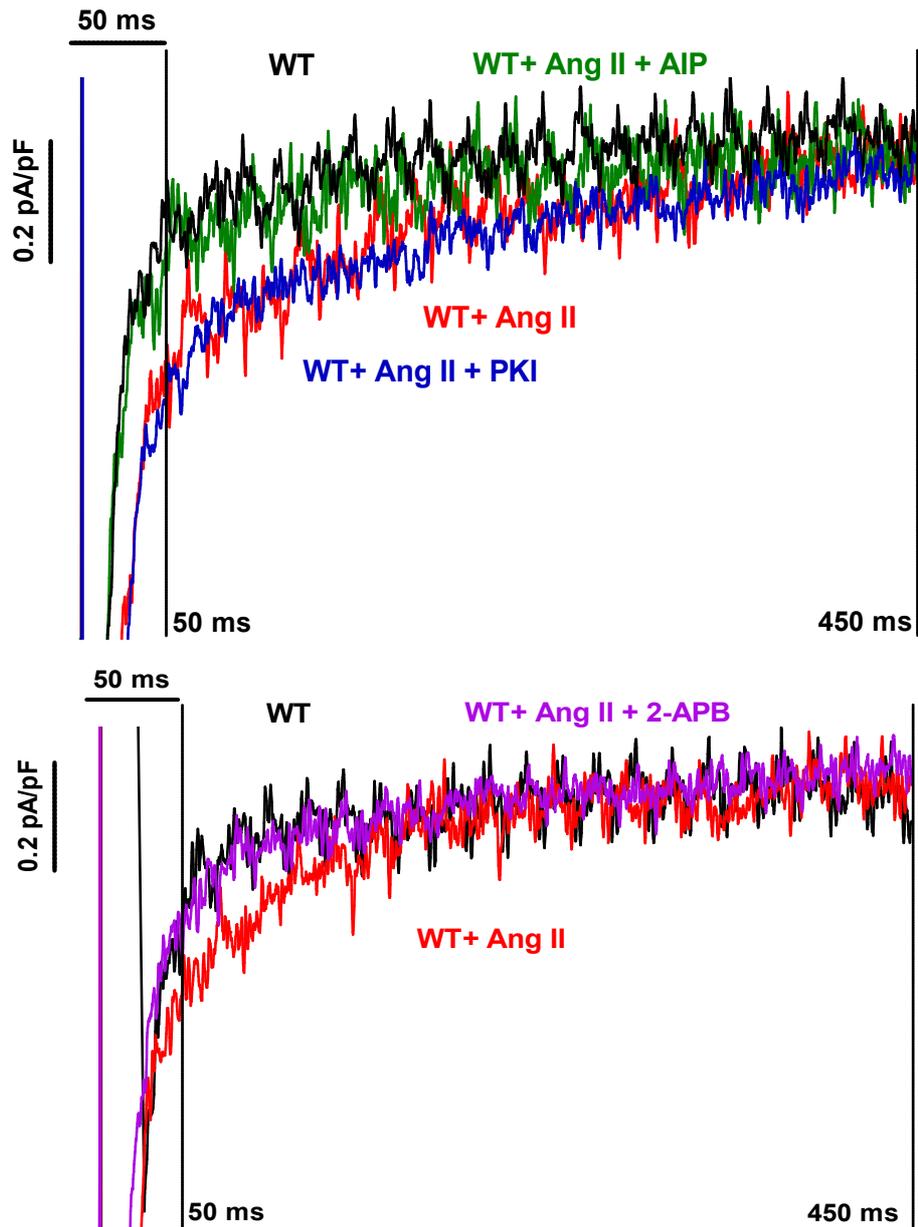


Abb. 3-13: Originalregistrierungen der WT-Zellen des späten Natriumstroms. Man sieht eine deutliche Zunahme des Stroms unter Ang II-Einwirkung. AIP und 2-APB heben diesen Effekt optisch wieder auf während PKI keinen Effekt zu haben scheint.

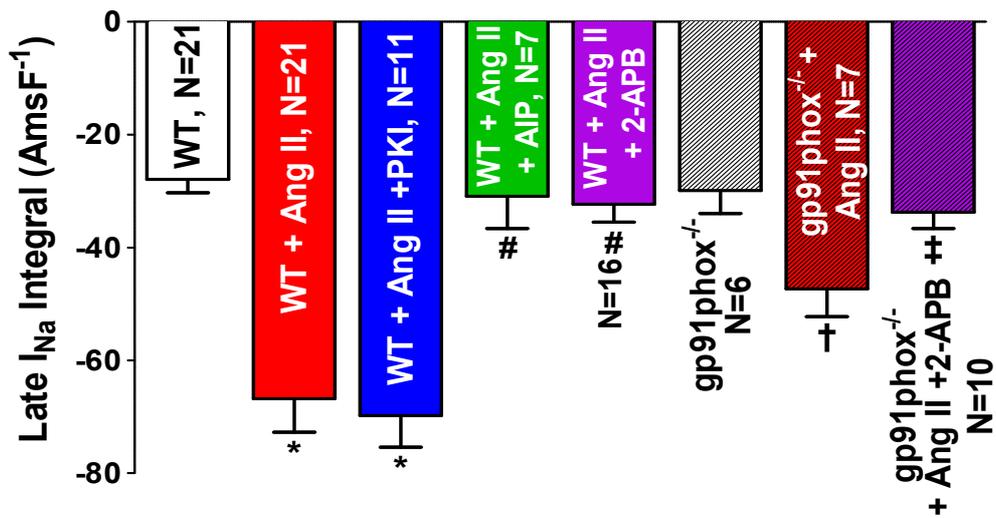


Abb. 3-14: Mittelwerte des späten Natriumstroms. Ang II führt zu einer signifikanten Erhöhung des Stroms sowohl im WT als auch im gp91phox^{-/-}, wenn auch in letzterem nicht ganz so stark. AIP und 2-APB konnten den Effekt des Ang II erfolgreich inhibieren, während es unter der Verwendung von PKI zu keiner Senkung des Ang II-Effektes kam. * P<0,05 vs. WT, # P<0,05 vs. WT + Ang II, † P<0,05 vs. gp91phox^{-/-}, ‡ P<0,05 vs. gp91phox^{-/-} + Ang II.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Ang II zu einer Steigerung des späten Natriumstroms über IP₃R und CaMKII δ führt. Die PKA sowie ROS scheinen an der Signaltransduktion nicht beteiligt zu sein.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels der Patch-Clamp-Methode gezeigt werden, dass Angiotensin II auf den spannungsabhängigen Natriumkanal in Herzmuskelzellen wirkt. Dabei hat das Ang II zum einen den Effekt in Form einer *gain of function*, indem es insgesamt die Stromdichte erhöht. Dies betrifft sowohl den Natriumspitzenstrom, als auch den späten Natriumstrom. Zum anderen beeinflusst Ang II das Gating-Verhalten des Natriumkanals in Form von einer *loss of function* durch eine beschleunigte Inaktivierung und verzögerte Reaktivierung. Dabei scheinen in der Signaltransduktionskaskade zur Natriumkanalregulation mindestens zwei verschiedene Wege eine Rolle zu spielen.

Während die Natriumleitfähigkeit des Natriumspitzenstroms Nox 2-abhängig über die PKA vermittelt zu werden scheint, findet die Regulation des späten Natriumstroms unabhängig von der Nox 2 statt und scheint über die Aktivierung von IP3R und die CaMKII vermittelt zu werden. Auch das Gating-Verhalten des Natriumkanals, insbesondere die intermediäre Inaktivierung und Erholung der Kanäle, wird Nox 2 unabhängig reguliert. Eine Hemmung der PKA mittels H89 verstärkt den Effekt auf das Gatingverhalten im Vergleich zu Ang II allein. Welche Möglichkeiten bei dieser Regulation in Frage kommen, soll im Folgenden genauer diskutiert werden.

4.1 Die Wirkung von Angiotensin II auf den spannungsabhängigen Natriumkanal

Es konnte bereits durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Ang II die Morphologie des Aktionspotentials verändert, indem es zu einer erhöhten Aufstrichgeschwindigkeit führt (Wagner et al. 2014). Die Aufstrichgeschwindigkeit wird vor allem über sich öffnende Natriumkanäle erzeugt (Berecki et al. 2010; Cohen et al. 1985; Hondeghem et al. 1985; Kleber 2005). Bereits 1955 stellte Weidmann nach seinen Patch-Clamp-Experimenten an Purkinje-Fasern, den Zellen des Erregungsleitungssystems des Herzmuskels, diese Hypothese auf (Weidmann 1955).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass tatsächlich Ang II-vermittelt ein verstärkter Natriumspitzenstrom durch Depolarisation erzeugt wird. Dass Ang II einen Effekt auf den Natriumstrom in Herzmuskelzellen hat, ist bereits seit einiger Zeit bekannt. 1989 konnten Moorman et al. an ventrikulären Myozyten von Ratten eine gesteigerte Natriumkanalaktivität nach Exposition mit Ang II nachweisen (Moorman et al. 1989). Nilius et al. zeigten 1989 diesen Effekt ebenfalls. Auch in Meerschweinchen-Zellen war die Öffnungswahrscheinlichkeit für Natriumkanäle unter Ang II-Einfluss deutlich erhöht. Weiterhin konnten Nilius et al. eine verzögerte schnelle Inaktivierung nachweisen, also ein Hinweis, dass Ang II einen direkten Einfluss auf das Öffnungsverhalten der Natriumkanäle hat (Nilius et al. 1989). In den hier durchgeführten Messungen konnte keine signifikante Änderung der schnellen Inaktivierung nachgewiesen werden. Allerdings beeinflusste Ang II das weitere Gating-Verhalten des Natriumkanals eindeutig. Das Hormon führte in meinen Experimenten zu einer deutlich beschleunigten *steady-state*-Inaktivierung mit einer signifikanten Linksverschiebung (Vgl. **Abb. 3-5**) sowie zu einer beschleunigten intermediären Inaktivierung. Aber nicht nur die Inaktivierung, auch die Erholung der Natriumkanäle aus dem nicht-reaktivierbaren Zustand war unter Ang II stark verzögert. Soweit mir bekannt ist, gibt es keine weiteren Publikationen, die sich bisher mit den Effekten von Ang II auf das Gating-Verhalten des Natriumkanals befasst haben.

Einen Einfluss auf den späten Natriumstrom konnten wir in den aktuellen Messungen ebenfalls nachweisen. Hier kommt es zu einer *Gain of function*, der späte Natriumstrom ist unter der Wirkung von Ang II signifikant erhöht. Diese Wirkung konnte schon in der Vergangenheit gezeigt werden. Der späte Natriumstrom ist zwar, vor allem im Vergleich zu dem Natriumspitzenstrom, ein nur sehr geringer Strom, kumuliert aber über die Zeit, sodass die intrazelluläre Natriumkonzentration ansteigt und letztendlich zu einer Überladung der Zelle mit Natriumionen führt (Antzelevitch et al. 2014; Ashpole et al. 2012; Wagner et al. 2006). Ein erhöhter später Natriumstrom wird mit Ausbildung von EADs und der erhöhten Gefahr von Herzrhythmusstörungen in Zusammenhang gebracht (Zhao et al. 2011). In Kapitel 4.4 werde ich genauer darauf eingehen.

Auch angeborene Kanalfehlfunktionen, die Kanalopathien aufgrund von Mutationen im SCN5A-Gen im Bereich der C-terminalen Domäne, sind bekannt gleichsinnige Veränderungen des Gating-Verhaltens wie in unseren Experimenten auszubilden.

Veldkamp und Bezzina beschrieben bei den genannten Mutationen neben den Veränderungen des Gating-Verhaltens auch einen gesteigerten späten Natriumstrom. Die Genträger können einen Phänotypus ausbilden, der eine Mischung aus Brugada- und LQT-Syndrom darstellt (Bezzina et al. 1999; Veldkamp et al. 2000). Diese Mutationen sind mit Arrhythmien und plötzlichem Herztod verbunden.

Der Natriumkanal ist nicht der einzige transmembranäre Ionenkanal, der durch Ang II moduliert wird. Unsere Arbeitsgruppe konnte im selben Mausmodell auch einen gesteigerten Kalziumstrom durch L-Typ Kalziumkanäle nachweisen (Wagner et al. 2014). Dieser Effekt konnte bereits in kultivierten neonatalen Ratten-Myozyten nachgewiesen werden (Allen et al. 1988). Die kultivierten Myozyten zeigten einen signifikant erhöhten Kalziumstrom bei Depolarisation nach einer Inkubation mit 100 nM Ang II. Diese Ergebnisse konnten in diversen Untersuchungen reproduziert werden (De Mello 1998; De Mello und Monterrubio 2004; Petroff et al. 2000; Tsai et al. 2011). Alle bisher aufgeführten Versuche arbeiteten allerdings mit Myozyten von gesunden Mäusen ohne Vorhandensein einer Herzinsuffizienz.

Interessanterweise ergaben andere Nachforschungen einen verminderten L-Typ-Kalziumstrom in insuffizienten Herzmuskelzellen (Bouron et al. 1992; Nuss und Houser 1991; Shi et al. 2007). Alvin et al. konnten 2011 diese Ergebnisse reproduzieren. In Ratten-Myozyten war bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz der L-Typ-Kalziumstrom signifikant reduziert. Interessanterweise zeigte Ang II, anders als die aktuellen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, bei gesunden Herzmuskelzellen in der Arbeit von Alvin et al. keinen Effekt auf die Kalziumstromdichte, wohingegen die orale Applikation von Captopril, einem ACE-Hemmer, den basalen Kalziumstrom herabsetzte. In hypertrophierten Myozyten führte Ang II dagegen zu einer signifikanten Zunahme des Kalziumstromes (Alvin et al. 2011). Inwiefern der Ang II Effekt sich in insuffizienten Herzzellen auf den Natriumstrom auswirkt ist meines Wissens noch nicht beforscht.

Aktuelle Ergebnisse zeigten auch Effekte der erst seit kurzen bekannten Angiotensinogen-Nebenprodukte. So konnte Zhou 2015 nachweisen, dass Angiotensin (1-7) einen steigernden Effekt auf den L-Typ-Kalziumstrom in insuffizienten Myozyten hat. Ein weiteres Spaltprodukt aus Angiotensinogen, das Apelin, ist ebenfalls in der Herzinsuffizienz hochreguliert. Es entsteht durch das

ACE2 und wirkt an dem *angiotensin-like putative receptor* (Zhou et al. 2003). Chamberland et al. konnten Apelin-abhängig einen gesteigerten Natriumstrom und eine verzögerte Inaktivierung des Kanals in myokardialen Zellen von Hunden nachweisen (Chamberland et al. 2010). Es scheint als wären die Wirkungen des RAS deutlich komplexer als man lange Zeit angenommen hat.

Die zum Teil kontroversen Ergebnisse der Ang II-Wirkung können unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen gibt es unterschiedliche Möglichkeiten im Tiermodell eine Herzinsuffizienz zu erzeugen. Während Alvin et al. über einen Aorto-Cavalen-Shunt eine Volumen-Überladung (Vorlastmodell) und darüber induzierte Herzinsuffizienz erzeugten, kann auch eine Herzinsuffizienz durch Ligatur der Aorta oder Pulmonalarterien über eine Druck-Überladung (Nachlastmodell) herbeigeführt werden. Auch über transgenetische Tiermodelle ist es möglich, eine Herzinsuffizienz zu induzieren. Die unterschiedlichen Wege, die zu einer Herzinsuffizienz führen, können gegebenenfalls über andere intrazelluläre Mechanismen zu der Ausbildung einer Herzschwäche führen. Zum anderen kann auch der Einsatz von unterschiedlichen Spezies die zum Teil kontroversen Ergebnisse erklären. Unterschiedliche Expression der Kanäle in verschiedenen Spezies kann ebenfalls zu kontroversen Ergebnissen führen.

4.2 Die Bedeutung der NOX 2 und Proteinkinase A bei der Regulation des spannungsabhängigen Natriumkanals

Über welche Mechanismen Ang II seine intrazelluläre Wirkung entfaltet sollte durch meine weiteren Messungen genauer beleuchtet und verstanden werden. Die intrazellulären Auswirkungen von Ang II sind komplex, das Hormon kann allein über AT1-Rezeptor unterschiedliche Mediatoren und Signalstoffe aktivieren. Ein Enzym, das über den ATR1 aktiviert wird, ist die Nox 2. Durch dessen Aktivierung wird die intrazelluläre ROS-Produktion gesteigert (Bendall et al. 2002; de Gasparo 2002; Griendling et al. 1994; Mollnau et al. 2002; Zafari et al. 1998).

ROS stehen schon seit einiger Zeit im Fokus der Herzinsuffizienz-Forschung. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Nox 2 bei der Herzinsuffizienz gesteigert (Heymes et al. 2003) und die Konzentration der Sauerstoffradikale deutlich

erhöht ist (Ide et al. 2000; Mallat et al. 1998). Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Sauerstoffradikalen zu unspezifischen Oxidationen führen. So können die RyR an ihren Cysteinresten durch ROS oxidiert werden und induzieren so pathologische Kalziumleckströme aus dem SR (Terentyev et al. 2008). Auch führt die Exposition eines Myozyten mit H_2O_2 zu einer gesteigerten Autophosphorylierung der CaMKII und bewirkt einen gesteigerten späten Natriumstrom (Wagner et al. 2011).

Interessanterweise war in meinen durchgeführten Messungen der durch Ang II hervorgerufene gesteigerte späte Natriumstrom nicht durch Knockout der Nox 2 hemmbar. Auch das Gating-Verhalten des Natriumkanals scheint nach meinen Ergebnissen nicht über eine gesteigerte ROS-Bildung moduliert zu werden. Man muss offensichtlich die unselektive zelluläre Exposition mit Sauerstoffradikalen wie H_2O_2 von den tatsächlich intrazellulär durch die Nox 2 gebildeten ROS und deren Wirkung unterscheiden. ROS scheinen *in vivo* nicht unbedingt bei allen Redox-aktivierbaren Kinasen eine Rolle zu spielen. Möglicherweise hat die genaue Lokalisation der Nox 2 und damit verbunden der gebildeten ROS und der CaMKII, sowie gegebenenfalls auch deren Lokalisation zueinander, einen wichtigen Einfluss auf das Wirkungsspektrum. Aufgrund der hohen Reaktionsbereitschaft liegt die Vermutung nahe, dass ROS nur eine geringe Reichweite und damit eine lokal eingeschränkte Wirkung haben.

Brennan et al. konnten bei der ubiquitär vorkommenden Proteinkinase A ebenfalls eine Redox-abhängige Aktivierung neben der bisher bekannten cAMP-abhängigen Aktivierung nachweisen (Brennan et al. 2006). Dieser Nachweis rückt die PKA in den Blickwinkel der ROS-Targets, insbesondere ihrer diversen Angriffspunkte und vielfältigen Zielenzyme innerhalb der Herzmuskelzelle. So wirkt die PKA durch Phosphorylierung auf die wichtigsten Modulatoren der elektromechanischen Kopplung. Auch der Natriumkanal gehört zu den Zieltargets der PKA, die durch Phosphorylierung moduliert werden (Frohnwieser et al. 1997; Hallaq et al. 2006). Interessanterweise konnte ich tatsächlich den durch Ang II gesteigerten Natriumspitzenstrom sowohl durch Hemmung der Nox 2 als auch durch Hemmung der PKA komplett unterbinden. Es könnte also sein, dass die durch Oxidation aktivierte PKA durch Phosphorylierung des Natriumkanals zu einer gesteigerten Leitfähigkeit führt.

ROS können aber nicht nur Kinasen modulieren, sondern auch direkt am Natriumkanal wirken. Der myokardiale spannungsabhängige Natriumkanal besitzt im Bereich der Pore-formenden Untereinheit Methionin-Reste. Kassmann et al. identifizierten diese 2008 im Bereich der IFM-Einheit des Natriumkanals. Durch ROS können die Methioninreste oxidiert werden. Die IFM-Region ist für die schnelle Inaktivierung des Natriumkanals zuständig (Kassmann et al. 2008). In Zusammenschau der erhobenen Befunde, dass die schnelle Inaktivierung durch Ang II und auch Knockout der Nox 2 unbeeinflusst bleibt, sowie dass die Hemmung der PKA gleichermaßen zu einer Inhibition des Ang II-Effektes führt wie der genetische Knockout der Nox 2, machen es unwahrscheinlich, dass die Ang II-abhängige ROS-Produktion direkt am Natriumkanal wirkt. Viel mehr scheinen die ROS über eine Oxidation und damit verbundene Aktivierung der PKA den Natriumkanal zu beeinflussen.

Kritisch betrachten muss man allerdings die Ergebnisse in Anbetracht des *dirty-drug*-Effektes des H89. Marunaka et al. konnten 2003 in alveolären Zellen eine Translokation des unselektiven Kationen-Kanal NSC, bestehend aus vier α -Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals (ENaC), durch H89 nachweisen. Dieser Effekt war unabhängig von der PKA durch H89 hervorzurufen (Marunaka und Niisato 2003). Diese unspezifische Wirkung könnte auch auf den kardialen Natriumkanal wirken, würde jedoch primär nur eine erhöhte Stromdichte erklären, nicht das veränderte Gating-Verhalten, welches in meinen hier aufgeführten Ergebnissen ebenfalls gezeigt werden konnte.

Weitere Arbeitsgruppen konnten mindestens 8 Kinasen nachweisen, die ebenfalls durch H89 inhibiert werden (Davies et al. 2000). Auch Effekte direkt auf unterschiedliche transmembranäre Kanäle sind durch H89 beschrieben worden. Dies könnte eine Ursache für die signifikant beschleunigte intermediäre Inaktivierung nach Inkubation mit H89 und Ang II im Vergleich zu Ang II oder sogar Vehicle-Zellen sein. Dagegen spricht, dass nicht gleichermaßen auch die Erholung des Natriumkanals durch H89 moduliert wird. Auch die intermediäre Inaktivierung wird durch den Einsatz von H89 nicht beeinflusst.

Um die hier erhobenen Ergebnisse unabhängig von den Nebeneffekten des H89 bewerten zu können, sollte eine Verifizierung mit selektiveren PKA-Inhibitoren, wie zum Beispiel dem PKI, oder der Knock-In-Mauslinie von Brennan et al. reproduziert werden.

Eine weitere Proteinkinase, welche durch Ang II über den ATR1 aktiviert werden kann, ist die Proteinkinase C (PKC) (Garrido und Griendling 2009). Diese Proteinkinase ist ebenfalls ein Enzym, das am Natriumkanal modulierend wirkt (Sag et al. 2013). Die Phosphorylierung am Serin 1505 (Qu et al. 1996) beziehungsweise Serin-1503 (Hallaq et al. 2012) des Linkers zwischen Domäne III und IV, bewirkt eine Reduktion des Natriumstroms. Qu et al. führten diese Effekte auf eine Linksverschiebung mit beschleunigter steady-state Inaktivierung zurück (Qu et al. 1994; Qu et al. 1996). Hallaq et al. konnten die Reduktion des Natriumspitzenstroms durch PKC-Aktivierung auf eine verringerte Anzahl der Natriumkanäle innerhalb der Zellmembran zurückführen, wobei die Aktivierung der PKA einen gegenteiligen Effekt bewirkte. Interessanterweise scheint die Aktivierung der PKC ebenfalls Nox 2-abhängig reguliert zu werden (Hallaq et al. 2012). Diese Ergebnisse passen auch zu den von mir erhobenen Befunden bezüglich des PKA-Einflusses. Ob die PKC an dem Channel-Gating, insbesondere der *steady-state*-Inaktivierung beteiligt ist sollte geprüft werden.

4.3. Die Bedeutung von IP3R und der CaMKII bei der Regulation des spannungsabhängigen Natriumkanals

Die CaMKII ist ein zentrales Enzym, das in der Herzinsuffizienz stark hochreguliert ist sowie an der Entstehung und dem Vorantreiben der Herzmuskelschwäche beteiligt ist. Die CaMKII hat einen modulierenden Effekt auf den Natriumkanal. So konnten Wagner et al. zeigen, dass die CaMKII regulierend auf das Gating-Verhalten des Natriumkanals wirkt indem dieser phosphoryliert wird. CaMKII Überexpression führt zu einer beschleunigten Inaktivierung des Natriumkanals und zu einem erhöhten späten Natriumstrom (Wagner et al. 2006). Durch weitere Arbeitsgruppen konnte die Phosphorylierungsstelle der CaMKII am Serin 571 im Linker zwischen Domäne I und II identifiziert werden (Aiba et al. 2010; Hund et al. 2010). 2012 konnten Koval et al. zeigen, dass die Phosphorylierung in dieser Domäne durch CaMKII in der Herzinsuffizienz deutlich gesteigert ist und einen proarrhythmogenen Effekt hat (Koval et al. 2012). Weitere Phosphorylierungsstellen der CaMKII am Natriumkanal konnten Ashpole et al. 2012 identifizieren, das Serin 516 und Threonin 594 liegen

ebenfalls im Linker zwischen Domäne I-II. Der bekannte links-*shift* der *steady-state*-Inaktivierung durch CaMKII-Phosphorylierung des Natriumkanals war in sogenannten Phosphomutanten, bei denen jeweils die entsprechenden Phosphorylierungsstellen der CaMKII nicht mehr phosphorylierbar waren, nicht mehr auslösbar. Wurde hingegen eine sogenannte phosphomimetische Mutation eingesetzt, war keine CaMKII für den *left-shift* nötig. Eine Steigerung des Natriumspitzenstroms konnte durch die CaMKII nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse passen genau zu meinen Resultaten, dass der Ang II induzierte erhöhte Natriumspitzenstrom CaMKII unabhängig reguliert wird. Hingegen sollte das Gating-Verhalten, das durch Ang II moduliert wird, auf den Einfluss der CaMKII untersucht werden. Vor allem durch die Untersuchungen von Wagner et al. 2006 konnte bereits die gleichsinnige Wirkung der CaMKII auf die beschleunigte intermediäre Inaktivierung sowie verzögerte Reaktivierung nachgewiesen werden (Wagner et al. 2006). Die gleichen Effekte waren unter Inkubation mit Ang II zu verzeichnen. Auch die bekannte Wirkung der CaMKII auf den späten Natriumstrom konnte ich verifizieren, so scheint dieser Ang II-abhängige Effekt durch die CaMKII-Aktivierung bedingt zu sein. Die weiterführenden Untersuchungen meiner Arbeit hatten eine ROS-unabhängige Regulation gezeigt, es stellte sich also die Frage welcher Aktivierungsmechanismus dabei eine Rolle spielt. Es ist bekannt, dass die CaMKII über unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden kann. Neben dem in der Herzinsuffizienz überwiegend bisher gewichteten Weg über ROS-abhängige Oxidation gibt es den klassischen Weg über Kalziumfreisetzung. Diese kann neben den in den Myozyten in der Überzahl vorhanden RyR auch IP3-abhängig geschehen. Inwiefern eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit von IP3R eine Rolle bei der Herzinsuffizienz spielt, ist bisher kaum untersucht worden. Aufgrund der deutlich höheren Anzahl der IP3R in den Vorhofzellen im Vergleich zu den ventrikulären Myozyten (Lipp et al. 2000) wurde der Einfluss der IP3R in der Vergangenheit vor allem in diesen Zellen untersucht. So konnten Mackenzie et al. in atrialen Ratten-Zellen eine Co-Lokalisation der IP3R zu peripheren RyR feststellen. Sie konnten einen IP3-abhängigen Anstieg von subsarkolemmalen Kalzium-Leckströmen nachweisen, unter Stimulation des IP3R ergab sich eine erhöhte Arrhythmogenität (Mackenzie et al. 2002). Hohendanner et al. verglichen gesunde und herzinsuffiziente Myozyten bezüglich ihrer Kalziumtransienten. Es zeigte sich eine deutlich gesteigerte IP3-abhängige Erhöhung der Kalziumtransienten mit einer verminderten Fähigkeit der Wiederaufnahme in den Zellen einer Herzinsuffizienz.

Diese Ergebnisse wurden als eine mögliche Ursache für atriale Arrhythmien bei Patienten mit Herzschwäche gewertet (Hohendanner et al. 2015).

2005 konnte durch Fauconnier et al. in ventrikulären Myozyten eine durch Insulin ausgelöste IP3R-abhängige Erhöhung von Kalziumtransienten bei elektrischer Stimulation nachgewiesen werden. Ein erster Hinweis, dass auch in ventrikulären Myozyten der Kalziumhaushalt IP3R-abhängig reguliert wird (Fauconnier et al. 2005). Da auch der AT1R über die Aktivierung der PLC zu einer Induktion der IP3-Kaskade führt (Dolgacheva et al. 2016; Godin et al. 2010), lässt sich vermuten, dass auch das Ang II am ventrikulären Myozyten über diesen Aktivierungsweg intrazelluläre Wirkungen erzielen kann. Diese These wird durch meine erhobenen Ergebnisse unterstützt. Der durch Ang II erhöhte späte Natriumstrom konnte durch Hemmung der IP3R wieder auf sein normales Niveau im Vergleich zu Vehicle-Zellen gesenkt werden. Es scheint also, als wäre, trotz seiner im Verhältnis zu den RyR geringeren Anzahl, auch der IP3R ein entscheidender Faktor bei den intrazellulären Signalkaskaden. Inwiefern die Rezeptoren eine Rolle im insuffizienten Myokard spielen, sollte in der Zukunft genauer betrachtet werden. Insbesondere in dem Hinblick darauf, dass Go et al. bereits im Jahr 1995 eine gesteigerte Bildung von IP3R bei Herzinsuffizienz nachweisen konnten.

In der Umkehr gelang es Nakayama et al. zu zeigen, dass eine Überexpression von IP3-Rezeptoren zu kardialer Hypertrophie führt (Nakayama et al. 2010). Die dafür verantwortlichen IP3R sitzen in der Kernmembran und aktivieren die intranukleär gelegene CaMKII (Wu X et al. 2006). So wäre auch im Weiteren Interessant, wo die IP3R, welche durch den AT1R aktiviert werden, lokalisiert sind. Ist deren Lokalisation im peripheren SR und bedingen sie eine Aktivierung nahe gelegener RyR oder befinden sie sich sogar perinukleär und aktivieren über die Freisetzung von Kalzium durch die IP3R die CaMKII direkt?

4.4. Angiotensin II wirkt proarrhythmogen

Ang II ist ein Hormon, das einen proarrhythmogenen Effekt hat. Yahiro et al. konnten im Tiermodell nach kardialer Ischämie und anschließender Reperfusion Arrhythmien durch den Einsatz von ACE-Hemmern sowie AT1R-Blockern um 60-70% reduzieren. Der Einsatz von L-Typ-Kalziumkanalblocker, Na⁺/Ca⁺-Exchanger-Blocker sowie

einem Hemmer des Na^+/H^+ -Austauscher zeigten sogar eine Reduktion der Arrhythmien um 90%. Dieses Ergebnis ließ die Autoren vermuten, dass die zelluläre Kalziumüberladung eine zentrale Rolle bei der Arrhythmogenese spielt (Yahiro et al. 2003). Yamada et al. konnten 2016 in einem Mausmodell mit transgenen Mäusen, welche durch Expression des kardialen *neuron-restrictive silencer factor* (dnNRSF-Tg) eine Herzinsuffizienz mit letalen Herzrhythmusstörungen entwickelten, durch Inhibition des Renins mittels Alisikren die Arrhythmieentstehung und auch das kardiale Remodeling verhindern. Auch durch genetische Suppression des ATR1 konnten diese Effekte unterbunden werden. Diese Ergebnisse wiesen *in vivo* auch in nicht-ischämisch bedingter Kardiomyopathie den arrhythmogenen Effekt des Ang II nach (Yamada et al. 2016). Vergleichende Experimente zwischen transgenen Knockout-Mäusen, welche keinen AT1R exprimieren, und ihren Wildtypgeschwistern führten Yasuno et al. 2013 durch. Die beiden Populationen erhielten als *pressure-overload* Hypertrophie-Reiz eine Konstriktion der Aorta. In beiden Subgruppen entwickelte sich eine kardiale Hypertrophie, wobei sich kardiale Arrhythmien vermehrt bei den Wildtypen mit Expression des funktionellen ATR1 zeigten (Yasuno et al. 2013).

Eine weitere aktuelle Studie (Rajtik et al. 2016) untersuchte Rattenherzen in einer Langendorff-Perfusionsanlage und zeigte interessanterweise gegenteilige Effekte. So führte nach induzierter Ischämie und darauf folgender Reperfusion die Zugabe von Losartan, einem auch im klinischen Gebrauch häufig eingesetzten ATR1-Rezeptor-Antagonisten, in der Reperusionsphase zu keiner Reduktion der auftretenden Arrhythmien. Wobei bei Rajtik et al. die Ischämiephase 30 Minuten und die Reperusionsphase 40 Minuten betrug, im Vergleich zu den Experimenten von Yahiro et al. wurden dort die Messungen nach 5 Minuten Ischämiezeit und 30 Minuten Reperfusion *in vivo* durchgeführt. Die Unterschiede könnten sich also durch die unterschiedlich langen Ischämiezeiten ergeben. Fraglich ist ob eine komplette kardiale Ischämie über einen Zeitraum von 30 Minuten *in vivo* eine Überlebenschance hätte. Gegebenenfalls kommt es durch diese lange Dauer der fehlenden Sauerstoffversorgung zu solch gravierenden zellulären Funktionsstörungen, dass sich kaum realistische Ergebnisse erzielen lassen. Interessanterweise wurde zusätzlich in den Experimenten von Rajtik et al. in der akuten Ischämie und Reperusionsphase die oxidierte CaMKII gemessen. Hier zeigte sich nach Reperfusion eine reduzierte Menge an oxidiertem CaMKII, durch den

Einsatz von Losartan kam es zu keinen Mengenänderungen der oxidierten CaMKII. Diese Ergebnisse passen auch zu unseren Messungen, dass ROS, welche in Ischämiephasen vermehrt entstehen, zumindest den Natriumkanal betreffend keine Aktivierung der CaMKII und darüber Kanalmodulation bewirken.

Auf zellulärer Ebene konnten Zhao et al. 2011 nachweisen, dass Ang II zu EADs und getriggelter Aktivität führt. Die proarrhythmogenen Effekte des Ang II konnten durch Hemmung des ATR1, hier ebenfalls durchgeführt mittels Losartan, gehemmt werden. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass Ang II über einen Nox 2- und CaMKII-vermittelten Signalweg zu den EADs führt. In ihren Experimenten ließen sich die EADs ebenfalls durch Hemmung der CaMKII (mittels AIP) sowie durch den Nox-Inhibitor Apocynin verhindern. Genauso konnte die Hemmung des späten Natriumstroms mittels Ranolazin und auch des L-Typ-Kalziumkanals mit Nifedipin die Entstehung von EADs verhindern (Zhao et al. 2011). Wagner et al. konnten 2014 diese Messungen zum Großteil verifizieren, mit dem Unterschied, dass sich in unserer Arbeitsgruppe hauptsächlich DADs manifestierten. Der späte Natriumstrom führte zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer und führte kumuliert zu einer intrazellulären Überladung mit Natriumionen (Wagner et al. 2014; Wagner et al. 2011). Ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich EADs und DADs könnten die unterschiedlichen Spezies sein, die für die Untersuchungen verwendet wurden. So haben Kaninchenmyozyten ein deutlich längeres Aktionspotential als Mäuse und damit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von EADs. Mäuse haben durch ihr kurzes Aktionspotential eine „Prädisposition“ für DADs. *In vivo* konnte die erhöhte Arrhythmieeigung in transgenen CaMKII-überexprimierenden Mäusen anhand von EKGs verifiziert werden. Elektrische Stimulation führte in den transgenen Mäusen zu monomorphen, Isoproterenol-Injektion zusätzlich zu polymorphen ventrikulären Arrhythmien. In WT-Mäusen war dagegen kein proarrhythmogener Effekt nachzuweisen (Wagner et al. 2006).

Auch Toischer et al. gelang es auf zellulärer Ebene zu zeigen, dass ein erhöhter später Natriumstrom zu einem deutlich gesteigerten Auftreten von EADs und DADs führt, welche sowohl durch Hemmung der CaMKII als auch des späten Natriumstroms verhindert werden konnte (Toischer et al. 2013).

Welche Folgen ein erhöhter später Natriumstrom haben kann, arbeiteten Antzelevitch et al. 2014 sehr genau heraus. Einige Mutationen des SCN5A-Gens, die zu dem LQT3-Syndrom führen, beschreiben neben dem gestörten Gating-Verhalten auch

einen gesteigerten late I_{Na} (siehe Kapitel 4.1) (Hartmann et al. 1994; Rivolta et al. 2001). Diese Mutationen sind verbunden mit Herzrhythmusstörungen wie *Torsade-de-pointes-Tachykardien*, Vorhofflimmern und dem plötzlichen Herztod (Antzelevitch et al. 2014; Antzelevitch et al. 1999; Benito et al. 2008; Darbar et al. 2008; Zellerhoff et al. 2009). Anscheinend können schon kleine Konzentrationsänderungen der intrazellulären Ionenzusammensetzung sowie Modulation von Signalkaskaden, die anderen Enzymen in der Zelle deutlich unterlegen sind, einen großen Einfluss auf das gesamte Individuum haben.

5 Zusammenfassung

Für das Hormon Ang II konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass es zum einen die Entstehung einer Herzinsuffizienz vorantreibt und zum anderen in vorgeschädigten Herzmuskelzellen zu der Ausbildung von Rhythmusstörungen führt, welche im schlimmsten Fall tödlich verlaufen können. Die medikamentöse Hemmung von Ang II hat nachweislich einen positiven prognostischen Effekt.

In der hier zugrunde liegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass Ang II über mindestens zwei unterschiedliche Signalkaskaden intrazellulär seine komplexe Wirkung entfaltet. Über eine ROS-abhängige Aktivierung der PKA nimmt Ang II Einfluss auf die Regulation des Natriumspitzenstroms und das Gating-Verhalten des Natriumkanals. Hingegen findet die Erhöhung des späten Natriumstroms ROS-unabhängig statt. Dieser letztere Mechanismus wird durch die CaMKII reguliert, an deren Aktivierung IP3R beteiligt sind. Möglicherweise kommt es zu einer Kalziumfreisetzung durch die IP3R und damit verbunden zu einer Ca/Calmodulin-abhängigen Aktivierung der CaMKII.

Die weitere Aufschlüsselung der intrazellulären Signalkaskaden durch das Ang II hat eine hohe Relevanz für Patienten, die an einer Herzinsuffizienz leiden. Insbesondere im Hinblick auf die teilweise protektiven Effekte des vor kurzem entdeckten neuen Renin-Angiotensin-Systems auf den Organismus, die durch den Einsatz von beispielsweise ACE-Hemmern ebenfalls gehemmt werden. Durch ein genaueres Verständnis der intrazellulären Wirkungsweisen können langfristig neue Grundvoraussetzungen für die Entwicklung von spezifischeren Medikamenten in der Behandlung der Herzinsuffizienz geschaffen werden.

6 Literaturverzeichnis

Adelman WJ, Jr., Palti Y (1969): The effects of external potassium and long duration voltage conditioning on the amplitude of sodium currents in the giant axon of the squid, *Loligo pealei*. *J Gen Physiol* 54, 589-606

Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J (2010): Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res* 106, 1253-1264

Aiba T, Hesketh GG, Liu T, Carlisle R, Villa-Abrille MC, O'Rourke B, Akar FG, Tomaselli GF (2010): Na⁺ channel regulation by Ca²⁺/calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 85, 454-463

Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM (2009): NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *J Mol Cell Cardiol* 47, 15-22

Allbritton NL, Meyer T, Stryer L (1992): Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* 258, 1812-1815

Allen IS, Cohen NM, Dhallan RS, Gaa ST, Lederer WJ, Rogers TB (1988): Angiotensin II increases spontaneous contractile frequency and stimulates calcium current in cultured neonatal rat heart myocytes: insights into the underlying biochemical mechanisms. *Circ Res* 62, 524-534

Alvin Z, Laurence GG, Coleman BR, Zhao A, Hajj-Moussa M, Haddad GE (2011): Regulation of L-type inward calcium channel activity by captopril and angiotensin II via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in cardiomyocytes from volume-overload hypertrophied rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol* 89, 206-215

Ambasta RK, Schreiber JG, Janiszewski M, Busse R, Brandes RP (2006): Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. *Free Radic Biol Med* 41, 193-201

Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA (1994): Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca⁽²⁺⁾-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 75, 854-861

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

Antzelevitch C, Yan GX, Shimizu W (1999): Transmural dispersion of repolarization and arrhythmogenicity: the Brugada syndrome versus the long QT syndrome. *J Electrocardiol* 32 Suppl, 158-165

Antzelevitch C, Nesterenko V, Shryock JC, Rajamani S, Song Y, Belardinelli L (2014): The role of late I_{Na} in development of cardiac arrhythmias. *Handb Exp Pharmacol* 221, 137-168

Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P, Periasamy M (1993): Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ Res* 72, 463-469

Ashpole NM, Herren AW, Ginsburg KS, Brogan JD, Johnson DE, Cummins TR, Bers DM, Hudmon A (2012): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *J Biol Chem* 287, 19856-19869

Avila MD, Morgan JP, Yan X (2011): Genetically modified mouse models used for studying the role of the AT₂ receptor in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Biomed Biotechnol* 2011, 141039

Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W (2002): The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397, 342-344

Balser JR, Nuss HB, Orias DW, Johns DC, Marban E, Tomaselli GF, Lawrence JH (1996): Local anesthetics as effectors of allosteric gating. Lidocaine effects on inactivation-deficient rat skeletal muscle Na channels. *J Clin Invest* 98, 2874-2886

Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM, Mignery GA (2005): Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 280, 15912-15920

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1994): Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476, 279-293

Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM (1995): CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268, H703-712

Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM (2002): Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 105, 293-296

Benito B, Brugada R, Perich RM, Lizotte E, Cinca J, Mont L, Berruezo A, Tolosana JM, Freixa X, Brugada P, et al. (2008): A mutation in the sodium channel is responsible for the association of long QT syndrome and familial atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 5, 1434-1440

Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL, Jr. (1995): Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376, 683-685

Benson DW, Wang DW, Dyment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL, Jr. (2003): Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* 112, 1019-1028

Berecki G, Wilders R, de Jonge B, van Ginneken AC, Verkerk AO (2010): Re-evaluation of the action potential upstroke velocity as a measure of the Na⁺ current in cardiac myocytes at physiological conditions. *PLoS One* 5, e15772

Bers DM (2002a): Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ Res* 90, 14-17

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

Bers DM (2002c): Cardiac Na/Ca exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference?. *J Mol Cell Cardiol* 34, 369-373

Bers DM, Pogwizd SM, Schlotthauer K (2002): Upregulated Na/Ca exchange is involved in both contractile dysfunction and arrhythmogenesis in heart failure. *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1, 136-42

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E (1993): Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73, 379-385

Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, van Langen IM, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MT, van Der Hout AH, et al. (1999): A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res* 85, 1206-1213

Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC (2001): Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem* 276, 31105-31112

Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I (2005): EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J* 39, 13-23

Bouron A, Potreau D, Raymond G (1992): The L type calcium current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res* 26, 662-670

Braun AP, Schulman H (1995): The Multifunctional Calcium Calmodulin-Dependent Protein-Kinase - from Form to Function. *Annual Review of Physiology* 57, 417-445

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM (1940): The substance causing renal hypertension. *J Physiol* 98, 283-298

Brennan JP, Bardswell SC, Burgoyne JR, Fuller W, Schroder 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, 21827-21836

Brink M, Erne P, de Gasparo M, Rogg H, Schmid A, Stulz P, Bullock G (1996): Localization of the angiotensin II receptor subtypes in the human atrium. *J Mol Cell Cardiol* 28, 1789-1799

Brittsan AG, Kranias EG (2000): Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2131-2139

Brockdorff N, Fisher EM, Orkin SH, Lyon MF, Brown SD (1988): Localization of the human X-linked gene for chronic granulomatous disease to the mouse X chromosome: implications for X-chromosome evolution. *Cytogenet Cell Genet* 48, 124-125

Brugada P, Brugada J (1992): Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report *J Am Coll Cardiol* 20, 1391-1396

Brunton LL, Hayes JS, Mayer SE (1981): Functional compartmentation of cyclic AMP and protein kinase in heart. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14, 391-397

Burgoyne JR, Eaton P (2009): Transnitrosylating nitric oxide species directly activate type I protein kinase A, providing a novel adenylate cyclase-independent cross-talk to beta-adrenergic-like signaling. *J Biol Chem* 284, 29260-29268

Burgoyne JR, Rudyk O, Cho HJ, Pryszyzna O, Hathaway N, Weeks A, Evans R, Ng T, Schroder K, Brandes RP, et al. (2015): Deficient angiogenesis in redox-dead Cys17Ser PKAR1alpha knock-in mice. *Nat Commun* 6, 7920

Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, Shah AM (2003): Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 93, 802-805

Cai B, Wang N, Mao W, You T, Lu Y, Li X, Ye B, Li F, Xu H (2014): Deletion of FoxO1 leads to shortening of QRS by increasing Na(+) channel activity through enhanced expression of both cardiac NaV1.5 and beta3 subunit. *J Mol Cell Cardiol* 74, 297-306

Capecchi MR (1989): The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5, 70-76

Catterall WA (1992): Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev* 72, S15-48

Chamberland C, Barajas-Martinez H, Haufe V, Fecteau MH, Delabre JF, Burashnikov A, Antzelevitch C, Lesur O, Chraïbi A, Sarret P, et al. (2010): Modulation of canine cardiac sodium current by Apelin. *J Mol Cell Cardiol* 48, 694-701

Chandler WK, Meves H (1970): Slow changes in membrane permeability and long-lasting action potentials in axons perfused with fluoride solutions. *J Physiol* 211, 707-728

Chen LQ, Santarelli V, Horn R, Kallen RG (1996): A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol* 108, 549-556

Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, et al. (1998): Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392, 293-296

Cheng G, Diebold BA, Hughes Y, Lambeth JD (2006): Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* 281, 17718-17726

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, 2247-2259

Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H (1990): Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein

phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 265, 5267-5272

Choi H, Leto TL, Hunyady L, Catt KJ, Bae YS, Rhee SG (2008): Mechanism of angiotensin II-induced superoxide production in cells reconstituted with angiotensin type 1 receptor and the components of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 283, 255-267

Cohen IS, Datyner NB, Gintant GA, Mulrine NK, Pennefather P (1985): A note on the relation of maximum upstroke velocity to peak inward current recorded by the voltage clamp. *Circ Res* 57, 482-484

Corbin JD, Soderling TR, Park CR (1973): Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Preliminary characterization of the adipose tissue enzyme in crude extracts. *J Biol Chem* 248, 1813-1821

Corbin JD, Keely SL, Park CR (1975): The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *J Biol Chem* 250, 218-225

Corbin JD, Sugden PH, Lincoln TM, Keely SL (1977): Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J Biol Chem* 252, 3854-3861

Curran J, Brown KH, Santiago DJ, Pogwizd S, Bers DM, Shannon TR (2010): Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Mol Cell Cardiol* 49, 25-32

Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT (1995): A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795-803

Darbar D (2008): Genetics of atrial fibrillation: rare mutations, common polymorphisms, and clinical relevance. *Heart Rhythm* 5, 483-486

Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL, Jr., Roden DM (2008): Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 117, 1927-1935

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351, 95-105

de Gasparo M (2002): Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev* 7, 347-358

De Mello WC (1996): Renin-angiotensin system and cell communication in the failing heart. *Hypertension* 27, 1267-1272

De Mello WC (1998): Intracellular angiotensin II regulates the inward calcium current in cardiac myocytes. *Hypertension* 32, 976-982

De Mello WC, Monterrubio J (2004): Intracellular and extracellular angiotensin II enhance the L-type calcium current in the failing heart. *Hypertension* 44, 360-364

Deitmer JW, Ellis D (1980): Interactions between the regulation of the intracellular pH and sodium activity of sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 304, 471-488

Di Benedetto G, Zoccarato A, Lissandron V, Terrin A, Li X, Houslay MD, Baillie GS, Zaccolo M (2008): Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ Res* 103, 836-844

Dikalova A, Clempus R, Lassegue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, et al. (2005): Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* 112, 2668-2676

Dolgacheva LP, Turovskaya MV, Dynnik VV, Zinchenko VP, Goncharov NV, Davletov B, Turovsky EA (2016): Angiotensin II activates different calcium signaling pathways in adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 593, 38-49

Domeier TL, Zima AV, Maxwell JT, Huke S, Mignery GA, Blatter LA (2008): IP3 receptor-dependent Ca²⁺ release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H596-604

Dowell FJ, Hamilton CA, McMurray J, Reid JL (1993): Effects of a xanthine oxidase/hypoxanthine free radical and reactive oxygen species generating system on endothelial function in New Zealand white rabbit aortic rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 22, 792-797

Drawnel FM, Wachten D, Molkentin JD, Maillet M, Aronsen JM, Swift F, Sjaastad I, Liu N, Catalucci D, Mikoshiba K, et al. (2012): Mutual antagonism between IP(3)R1 and miRNA-133a regulates calcium signals and cardiac hypertrophy. *J Cell Biol* 199, 783-798

Drimal J, Boska D (1973): Effects of angiotensin-II on myocardial mechanics and contractile state of heart muscle. *Eur J Pharmacol* 21, 130-138

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

Ednie AR, Bennett ES (2012): Modulation of voltage-gated ion channels by sialylation. *Compr Physiol* 2, 1269-1301

Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, et al. (2008): A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462-474

Erickson JR, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME (2011): CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states *Physiol Rev* 91, 889-915

Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245, C1-14

Farhadian F, Contard F, Sabri A, Samuel JL, Rappaport L (1996): Fibronectin and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. *Cardiovasc Res* 32, 433-442

Fauconnier J, Lanner JT, Zhang SJ, Tavi P, Bruton JD, Katz A, Westerblad H (2005): Insulin and inositol 1,4,5-trisphosphate trigger abnormal cytosolic Ca²⁺ transients and reveal mitochondrial Ca²⁺ handling defects in cardiomyocytes of ob/ob mice. *Diabetes* 54, 2375-2381

Fimognari C (2015): Role of Oxidative RNA Damage in Chronic-Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 358713

Finer JT, Simmons RM, Spudich JA (1994): Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* 368, 113-119

Flesch M, Schwinger RH, Schiffer F, Frank K, Sudkamp M, Kuhn-Regnier F, Arnold G, Bohm M (1996): Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger in failing human myocardium. *Circulation* 94, 992-1002

Frangogiannis NG (2004): Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res* 53, 585-595

Frohnwieser B, Chen LQ, Schreibmayer W, Kallen RG (1997): Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J Physiol* 498 (Pt 2), 309-318

Fujiki A, Usui M, Nagasawa H, Mizumaki K, Hayashi H, Inoue H (1999): ST segment elevation in the right precordial leads induced with class IC antiarrhythmic drugs: insight into the mechanism of Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10, 214-218

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

Garg S, Narula J, Marelli C, Cesario D (2006): Role of angiotensin receptor blockers in the prevention and treatment of arrhythmias. *Am J Cardiol* 97, 921-925

Garrido AM, Griendling KK (2009): NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 302, 148-158

Giordano FJ (2005): Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115, 500-508

Glynn P, Musa H, Wu X, Unudurthi SD, Little S, Qian L, Wright PJ, Radwanski PB, Gyorke S, Mohler PJ, et al. (2015): Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo. *Circulation* 132, 567-577

Godin CM, Ferreira LT, Dale LB, Gros R, Cregan SP, Ferguson SS (2010): The small GTPase Ral couples the angiotensin II type 1 receptor to the activation of phospholipase C-delta 1. *Mol Pharmacol* 77, 388-395

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994): Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74, 1141-1148

Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, Speth RC, Raizada MK, Katovich MJ (2007): Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H736-742

Gul R, Park JH, Kim SY, Jang KY, Chae JK, Ko JK, Kim UH (2009): Inhibition of ADP-ribosyl cyclase attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 81, 582-591

Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM (2006): Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 99, 398-406

Gupte SA (2008): Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases. *Curr Opin Investig Drugs* 9, 993-1000

Gutierrez DA, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E (2013): NO-dependent CaMKII activation during beta-adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 100, 392-401

Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP (1987): Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61, 70-76

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, 250-261

Hallaq H, Wang DW, Kunic JD, George AL, Jr., Wells KS, Murray KT (2012): Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H782-789

Hanson J, Huxley HE (1953): Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* 172, 530-532

Hartmann HA, Tiedeman AA, Chen SF, Brown AM, Kirsch GE (1994): Effects of III-IV linker mutations on human heart Na⁺ channel inactivation gating. *Circ Res* 75, 114-122

Harzheim D, Movassagh M, Foo RS, Ritter O, Tashfeen A, Conway SJ, Bootman MD, Roderick HL (2009): Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca²⁺ transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11406-11411

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

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

Hidaka H, Hagiwara M, Chijiwa T (1990): Molecular pharmacology of protein kinases. *Neurochem Res* 15, 431-434

Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (1999): Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 84, 713-721

Hohendanner F, Walther S, Maxwell JT, Kettlewell S, Awad S, Smith GL, Lonchyna VA, Blatter LA (2015): Inositol-1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release and excitation-contraction coupling in atrial myocytes from normal and failing hearts. *J Physiol* 593, 1459-1477

Hondeghem LM, Clarkson CW, Matsubara T (1985): Is tetrodotoxin block of cardiac sodium channels voltage dependent?. *Proc West Pharmacol Soc* 28, 9-10

Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E, Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie--Herz- und Kreislau fforschung e V (2005): [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94, 488-509

Hordijk PL (2006): Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res* 98, 453-462

Horn R, Marty A (1988): Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92, 145-159

Horn R, Patlak J, Stevens CF (1981): Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature* 291, 426-427

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, Snyder JS, Gudmundsson H, Kline CF, Davidson NP, Cardona N, et al. (2010): A beta(IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* 120, 3508-3519

Hund TJ, Snyder JS, Wu X, Glynn P, Koval OM, Onal B, Leymaster ND, Unudurthi SD, Curran J, Camardo C, et al. (2014): beta(IV)-Spectrin regulates TREK-1 membrane targeting in the heart. *Cardiovasc Res* 102, 166-175

Hureau C, Faller P (2009): Abeta-mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimie* 91, 1212-1217

Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1365

Huxley HE (1973): Muscular contraction and cell motility. *Nature* 243, 445-449

Huxley HE (2004): Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. *Eur J Biochem* 271, 1403-1415

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, Takeshita A (2000): Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* 86, 152-157

Ikenouchi H, Barry WH, Bridge JH, Weinberg EO, Apstein CS, Lorell BH (1994): Effects of angiotensin II on intracellular Ca²⁺ and pH in isolated beating rabbit hearts and myocytes loaded with the indicator indo-1. *J Physiol* 480 (Pt 2), 203-215

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

Ishihata A, Endoh M (1995): Species-related differences in inotropic effects of angiotensin II in mammalian ventricular muscle: receptors, subtypes and phosphoinositide hydrolysis. *Br J Pharmacol* 114, 447-453

Ito N, Kagaya Y, Weinberg EO, Barry WH, Lorell BH (1997): Endothelin and angiotensin II stimulation of Na⁺-H⁺ exchange is impaired in cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 99, 125-135

Ito Y, Suko J, Chidsey CA (1974): Intracellular calcium and myocardial contractility. V. Calcium uptake of sarcoplasmic reticulum fractions in hypertrophied and failing rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 6, 237-247

Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF (1996): Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 78, 262-273

Kaab S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Nabauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF (1998): Molecular basis of transient outward potassium

current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 98, 1383-1393

Kajla S, Mondol AS, Nagasawa A, Zhang Y, Kato M, Matsuno K, Yabe-Nishimura C, Kamata T (2012): A crucial role for Nox 1 in redox-dependent regulation of Wnt-beta-catenin signaling. *FASEB J* 26, 2049-2059

Kambouris NG, Nuss HB, Johns DC, Tomaselli GF, Marban E, Balsler JR (1998): Phenotypic characterization of a novel long-QT syndrome mutation (R1623Q) in the cardiac sodium channel. *Circulation* 97, 640-644

Kanaseki T, Ikeuchi Y, Sugiura H, Yamauchi T (1991): Structural Features of Ca²⁺ Calmodulin-Dependent Protein Kinase-II Revealed by Electron-Microscopy. *Journal of Cell Biology* 115, 1049-1060

Kannel WB (2000): Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 5, 167-173

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, 1085-1095

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

Kleber AG (2005): The shape of the electrical action-potential upstroke: a new aspect from optical measurements on the surface of the heart. *Circ Res* 97, 204-206

Koch-Weser J (1965): Nature of the Inotropic Action of Angiotensin on Ventricular Myocardium. *Circ Res* 16, 230-237

Kontis KJ, Rounaghi A, Goldin AL (1997): Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J Gen Physiol* 110, 391-401

Koval OM, Snyder JS, Wolf RM, Pavlovicz RE, Glynn P, Curran J, Leymaster ND, Dun W, Wright PJ, Cardona N, et al. (2012): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-based regulation of voltage-gated Na⁺ channel in cardiac disease. *Circulation* 126, 2084-2094

Kreusser MM, Backs J (2014): Integrated mechanisms of CaMKII-dependent ventricular remodeling. *Front Pharmacol* 5, 36

Kumar R, Thomas CM, Yong QC, Chen W, Baker KM (2012): The intracrine renin-angiotensin system. *Clin Sci (Lond)* 123, 273-284

Kuroda J, Sadoshima J (2010): NADPH oxidase and cardiac failure. *J Cardiovasc Transl Res* 3, 314-320

Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J (2010): NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15565-15570

Lambeth JD (2004): NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4, 181-189

Langer GA, Peskoff A (1996): Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. *Biophys J* 70, 1169-1182

Lassegue B, Clempus RE (2003): Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R277-297

Lavigne MC, Malech HL, Holland SM, Leto TL (2001): Genetic demonstration of p47phox-dependent superoxide anion production in murine vascular smooth muscle cells. *Circulation* 104, 79-84

Layland J, Solaro RJ, Shah AM (2005): Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res* 66, 12-21

Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K (1999): Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* 79, 1317-1372

Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, Hasenfuss G (1998): Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 853, 220-230

Li J, Stouffs M, Serrander L, Banfi B, Bettiol E, Charnay Y, Steger K, Krause KH, Jaconi ME (2006): The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell* 17, 3978-3988

Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM (2002): Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 40, 477-484

Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM (2000): Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H769-779

Li P, Sonnenblick EH, Anversa P, Capasso JM (1994): Length-dependent modulation of ANG II inotropism in rat myocardium: effects of myocardial infarction. *Am J Physiol* 266, H779-786

Li Y, Kranias EG, Mignery GA, Bers DM (2002): Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 90, 309-316

Lipkind GM, Fozzard HA (1994): A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na⁺ channel. *Biophys J* 66, 1-13

Lipp P, Laine M, Tovey SC, Burrell KM, Berridge MJ, Li W, Bootman MD (2000): Functional InsP₃ receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol* 10, 939-942

Liu Z, Celotto AM, Romero G, Wipf P, Palladino MJ (2012): Genetically encoded redox sensor identifies the role of ROS in degenerative and mitochondrial disease pathogenesis. *Neurobiol Dis* 45, 362-368

Lopez-Santiago LF, Meadows LS, Ernst SJ, Chen C, Malhotra JD, McEwen DP, Speelman A, Noebels JL, Maier SK, Lopatin AN, et al. (2007): Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J Mol Cell Cardiol* 43, 636-647

Mackenzie L, Bootman MD, Laine M, Berridge MJ, Thuring J, Holmes A, Li WH, Lipp P (2002): The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca²⁺ signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *J Physiol* 541, 395-409

Maeda S, Tsukihara T (2011): Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell Mol Life Sci* 68, 1115-1129

Maier LS, Bers DM (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res* 92, 904-911

Makielski JC, Sheets MF, Hanck DA, January CT, Fozzard HA (1987): Sodium current in voltage clamped internally perfused canine cardiac Purkinje cells. *Biophys J* 52, 1-11

Makita N, Bennett PB, George AL, Jr. (1996): Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na⁺ channels. *J Neurosci* 16, 7117-7127

Makkar KM, Sanoski CA, Spinler SA (2009): Role of angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin II receptor blockers, and aldosterone antagonists in the prevention of atrial and ventricular arrhythmias. *Pharmacotherapy* 29, 31-48

Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA (1977): Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol* 74, 629-645

Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A (1998): Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂α 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, 1536-1539

Mann DL (2002): Angiotensin II as an inflammatory mediator: evolving concepts in the role of the renin angiotensin system in the failing heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 16, 7-9

Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF (1998): Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* 508 (Pt 3), 647-657

Marionneau C, Abriel H (2015): Regulation of the cardiac Na⁺ channel NaV1.5 by post-translational modifications. *J Mol Cell Cardiol* 82, 36-47

Marques FD, Ferreira AJ, Sinisterra RD, Jacoby BA, Sousa FB, Calviari MV, Silva GA, Melo MB, Nadu AP, Souza LE, et al. (2011): An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. *Hypertension* 57, 477-483

Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG (2006): Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18, 69-82

Marunaka Y, Niisato N (2003): H89, an inhibitor of protein kinase A (PKA), stimulates Na⁺ transport by translocating an epithelial Na⁺ channel (ENaC) in fetal rat alveolar type II epithelium. *Biochem Pharmacol* 66, 1083-1089

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

Matsui H, Barry WH, Livsey C, Spitzer KW (1995): Angiotensin II stimulates sodium-hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 29, 215-221

Mattiazzi A (1997): Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca²⁺ or changes in myofilament Ca²⁺ responsiveness?. *J Pharmacol Toxicol Methods* 37, 205-214

McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN (2000): Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106-111

McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ (1993): Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* 14, 1493-1498

Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna MT, et al. (2007): SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116, 134-142

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

Michel JJ, Scott JD (2002): AKAP mediated signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 235-257

Miyazaki T, Mitamura H, Miyoshi S, Soejima K, Aizawa Y, Ogawa S (1996): Autonomic and antiarrhythmic drug modulation of ST segment elevation in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 27, 1061-1070

Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, et al. (2002): Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90, E58-65

Moorman JR, Kirsch GE, Lacerda AE, Brown AM (1989): Angiotensin II modulates cardiac Na⁺ channels in neonatal rat. *Circ Res* 65, 1804-1809

Moravec CS, Schluchter MD, Paranandi L, Czerska B, Stewart RW, Rosenkranz E, Bond M (1990): Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation* 82, 1973-1984

Morishita N, Kusachi S, Yamasaki S, Kondo J, Tsuji T (1996): Sequential changes in laminin and type IV collagen in the infarct zone--immunohistochemical study in rat myocardial infarction. *Jpn Circ J* 60, 108-114

Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS (2004): The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 123, 155-165

Munzel T, Gori T, Keaney JF, Jr., Maack C, Daiber A (2015): Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur Heart J*

Murphy BJ, Rogers J, Perdichizzi AP, Colvin AA, Catterall WA (1996): cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *J Biol Chem* 271, 28837-28843

Murray KT, Hu NN, Daw JR, Shin HG, Watson MT, Mashburn AB, George AL, Jr. (1997): Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na⁺ channel. *Circ Res* 80, 370-376

Nabeebaccus A, Zhang M, Shah AM (2011): NADPH oxidases and cardiac remodelling. *Heart Fail Rev* 16, 5-12

Nakayama H, Bodi I, Maillet M, DeSantiago J, Domeier TL, Mikoshiba K, Lorenz JN, Blatter LA, Bers DM, Molkenstein JD (2010): The IP₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res* 107, 659-666

Neyses L, Nouskas J, Luyken J, Fronhoffs S, Oberdorf S, Pfeifer U, Williams RS, Sukhatme VP, Vetter H (1993): Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens* 11, 927-934

Nielsen MW, Holst AG, Olesen SP, Olesen MS (2013): The genetic component of Brugada syndrome. *Front Physiol* 4, 179

Nilius B, Tytgat J, Albitz R (1989): Modulation of cardiac Na channels by angiotensin II. *Biochim Biophys Acta* 1014, 259-262

Nuss HB, Houser SR (1991): Voltage dependence of contraction and calcium current in severely hypertrophied feline ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 23, 717-726

O'Leary ME, Chen LQ, Kallen RG, Horn R (1995): A molecular link between activation and inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol* 106, 641-658

Ohkubo H, Kageyama R, Ujihara M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S (1983): Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2196-2200

Olson EN, Schneider MD (2003): Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev* 17, 1937-1956

Page IH, Helmer OM (1940): A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *J Exp Med* 71, 29-42

Palomeque J, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV, Mattiazzi A (2009): Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca²⁺ dependence of Ca²⁺-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circ Res* 105, 1204-1212

Parajuli N, Patel VB, Wang W, Basu R, Oudit GY (2014): Loss of NOX2 (gp91phox) prevents oxidative stress and progression to advanced heart failure. *Clin Sci (Lond)* 127, 331-340

Payne M, Ono T, Colbran R, Kemp B, Soderling T, Means A (1988): Calcium Calmodulin-Dependent Protein Kinase- α - Characterization of Distinct Calmodulin Binding and Inhibitory Domains. *Faseb Journal* 2, A555-A555

Petroff MG, Aiello EA, Palomeque J, Salas MA, Mattiazzi A (2000): Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. *J Physiol* 529 Pt 1, 189-203

Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al. (1992): Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 327, 669-677

Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S, et al. (2003): Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 362, 759-766

Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G (1999): Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 85, 38-46

Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM (1999): Upregulation of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res* 85, 1009-1019

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM (2001): Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 88, 1159-1167

Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuk CM, Dinauer MC (1995): Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet* 9, 202-209

Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ (2011): X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* 333, 1440-1445

Qin F, Patel R, Yan C, Liu W (2006): NADPH oxidase is involved in angiotensin II-induced apoptosis in H9C2 cardiac muscle cells: effects of apocynin. *Free Radic Biol Med* 40, 236-246

Qu Y, Rogers J, Tanada T, Scheuer T, Catterall WA (1994): Modulation of cardiac Na⁺ channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3289-3293

Qu Y, Rogers JC, Tanada TN, Catterall WA, 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

Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA (1994): Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* 265, 1724-1728

Rajtik T, Carnicka S, Szobi A, Giricz Z, J OU, Hassova V, Svec P, Ferdinandy P, Ravingerova T, Adameova A (2016): Oxidative activation of CaMKII δ in acute myocardial ischemia/reperfusion injury: A role of angiotensin AT1 receptor-NOX2 signaling axis. *Eur J Pharmacol* 771, 114-122

Ramirez MT, Zhao XL, Schulman H, Brown JH (1997): The nuclear δ B isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J Biol Chem* 272, 31203-31208

Ramirez-Correa GA, Cortassa S, Stanley B, Gao WD, Murphy AM (2010): Calcium sensitivity, force frequency relationship and cardiac troponin I: critical role of PKA and PKC phosphorylation sites. *J Mol Cell Cardiol* 48, 943-953

Reinecke H, Studer R, Vetter R, Just H, Holtz J, Drexler H (1996): Role of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 779, 543-545

Rhee SG (1999): Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger *Exp. Mol Med* 31, 53-59

Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG, Fiset C (2011): Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H2018-2027

Rivolta I, Abriel H, Tateyama M, Liu H, Memmi M, Vardas P, Napolitano C, Priori SG, Kass RS (2001): Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes. *J Biol Chem* 276, 30623-30630

Rizzuto R, Pozzan T (2006): Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86, 369-408

Rockman HA, Koch WJ, Milano CA, Lefkowitz RJ (1996): Myocardial beta-adrenergic receptor signaling in vivo: insights from transgenic mice. *J Mol Med (Berl)* 74, 489-495

Roderick HL, Knollmann BC (2013): Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: "exciting" players in cardiac excitation-contraction coupling?. *Circulation* 128, 1273-1275

Rogers JC, Qu Y, Tanada TN, Scheuer T, Catterall WA (1996): Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit. *J Biol Chem* 271, 15950-15962

Rose WC, Balke CW, Wier WG, Marban E (1992): Macroscopic and unitary properties of physiological ion flux through L-type Ca²⁺ channels in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 456, 267-284

Ruan Y, Liu N, Priori SG (2009): Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat Rev Cardiol* 6, 337-348

Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, et al. (2009): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail* 2, 664-675

Sag CM, Wagner S, Maier LS (2013): Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 63, 338-349

Sag CM, Mallwitz A, Wagner S, Hartmann N, Schotola H, Fischer TH, Ungeheuer N, Herting J, Shah AM, Maier LS, et al. (2014): Enhanced late INa induces proarrhythmogenic SR Ca leak in a CaMKII-dependent manner. *J Mol Cell Cardiol* 76, 94-105

Santos CX, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM (2011): Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 50, 777-793

Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS (2002): Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* 34, 379-388

Schillinger W, Lehnart SE, Prestle J, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Meyer M, Just H, Hasenfuss G (1998): Influence of SR Ca(2+)-ATPase and Na(+)-Ca(2+)-exchanger on the force-frequency relation. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 1, 38-45

Schirdewahn P, Kottkamp H, Dorszewski A, Kobza R, Tanner H, Hindricks G. Plötzlicher Herztod und ICD- Therapie. *J Kardiol* 2004; 11: 3-10

Schneider MD, Lorell BH (2001): AT(2), judgment day: which angiotensin receptor is the culprit in cardiac hypertrophy?. *Circulation* 104, 247-248

Scholten A, van Veen TA, Vos MA, Heck AJ (2007): Diversity of cAMP-dependent protein kinase isoforms and their anchoring proteins in mouse ventricular tissue. *J Proteome Res* 6, 1705-1717

Schreibmayer W, Frohnwieser B, Dascal N, Platzer D, Spreitzer B, Zechner R, Kallen RG, Lester HA (1994): Beta-adrenergic modulation of currents produced by rat cardiac Na⁺ channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Receptors Channels* 2, 339-350

Schroder D, Heger J, Piper HM, Euler G (2006): Angiotensin II stimulates apoptosis via TGF-beta1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat. *J Mol Med (Berl)* 84, 975-983

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002): Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 91, 406-413

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

Shi CX, Wang YH, Dong F, Zhang YJ, Xu YF (2007): Transmural L-type calcium current in a pressure-overloaded mouse model with heart failure. *Sheng Li Xue Bao* 59, 19-26

Signore S, Sorrentino A, Ferreira-Martins J, Kannappan R, Shafaie M, Del Ben F, Isobe K, Arranto C, Wybieralska E, Webster A, et al. (2013): Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors and human left ventricular myocytes. *Circulation* 128, 1286-1297

Singh MV, Cicha MZ, Meyerholz DK, Chappleau MW, Abboud FM (2015): Dual Activation of TRIF and MyD88 Adaptor Proteins by Angiotensin II Evokes Opposing Effects on Pressure, Cardiac Hypertrophy, and Inflammatory Gene Expression. *Hypertension* 66(3), 647-56

Sipido KR, Carmeliet E, Pappano A (1995): Na⁺ current and Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum during action potentials in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 489 (Pt 1), 1-17

Sjostrand FS, Andersson-Cedergren E, Dewey MM (1958): The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *J Ultrastruct Res* 1, 271-287

Skalhegg BS, Tasken K (2000): Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 5, D678-693

Smith MK, Colbran RJ, Soderling TR (1990): Specificities of autoinhibitory domain peptides for four protein kinases. Implications for intact cell studies of protein kinase function. *J Biol Chem* 265, 1837-1840

Smits JP, Koopmann TT, Wilders R, Veldkamp MW, Opthof T, Bhuiyan ZA, Mannens MM, Balseer JR, Tan HL, Bezzina CR, et al. (2005): A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol* 38, 969-981

Stevenson WG, Stevenson LW, Middlekauff HR, Fonarow GC, Hamilton MA, Woo MA, Saxon LA, Natterson PD, Steimle A, Walden JA, et al. (1995): Improving survival for patients with advanced heart failure: a study of 737 consecutive patients. *J Am Coll Cardiol* 26, 1417-1423

Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm 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, 443-453

Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S (1989): Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597-603

Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, et al. (2003): Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 107, 1418-1423

Sugden PH, Clerk A (1998): "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 83, 345-352

Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AA, Anderson ME, Balsler JR (2002): A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* 415, 442-447

Tan HL, Bezzina CR, Smits JP, Verkerk AO, Wilde AA (2003): Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc Res* 57, 961-973

Tang L, Kallen RG, Horn R (1996): Role of an S4-S5 linker in sodium channel inactivation probed by mutagenesis and a peptide blocker. *J Gen Physiol* 108, 89-104

Terentyev D, Gyorke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, de Blanco EC, Khanna S, Sen CK, Cardounel AJ, et al. (2008): Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure. *Circ Res* 103, 1466-1472

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000): Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028

Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng ZJ, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, et al. (2006): Heart disease and stroke statistics--

2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 113, e85-151

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Smith RD (1993): New perspectives in angiotensin system control. *J Hum Hypertens* 7 Suppl 2, S19-31

Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, Sag CM, Hund TJ, Mohler PJ, Belardinelli L, et al. (2013): Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 61, 111-122

Tomaselli GF, Marban E (1999): Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 42, 270-283

Tomaselli GF, Zipes DP (2004): What causes sudden death in heart failure?. *Circ Res* 95, 754-763

Tsai CT, Chiang FT, Chen WP, Hwang JJ, Tseng CD, Wu CK, Yu CC, Wang YC, Lai LP, Lin JL (2011): Angiotensin II induces complex fractionated electrogram in a cultured atrial myocyte monolayer mediated by calcium and sodium-calcium exchanger. *Cell Calcium* 49, 1-11

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2011): Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H2181-2190

Unwin PN, Zampighi G (1980): Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 283, 545-549

Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK (1996): p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271, 23317-23321

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, 475-483

van den Boogaard M, Barnett P, Christoffels VM (2014): From GWAS to function: genetic variation in sodium channel gene enhancer influences electrical patterning *Trends. Cardiovasc Med* 24, 99-104

Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA (1988): Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241, 1658-1661

Veldkamp MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde AA, Balsler JR (2000): Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na(+) channel. *Circ Res* 86, E91-97

Vignais PV (2002): The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59, 1428-1459

Wagner S, Dantz C, Flebbe H, Azizian A, Sag CM, Engels S, Mollencamp J, Dybkova N, Islam T, Shah AM, et al. (2014): NADPH oxidase 2 mediates angiotensin II-dependent cellular arrhythmias via PKA and CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 75, 206-215

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

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, et al. (2006): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3138

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, et al. (2006): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3138

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

Wang DW, Makita N, Kitabatake A, Balsler JR, George AL, Jr. (2000): Enhanced Na(+) channel intermediate inactivation in Brugada syndrome. *Circ Res* 87, E37-43

Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT (1995): SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80, 805-811

Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, et al. (2008): Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 118, 2260-2268

Weber KT, Brilla CG (1991): Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83, 1849-1865

Weber KT, Brilla CG, Janicki JS (1993): Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 27, 341-348

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70

Weidmann S (1955): The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 127, 213-224

Weingart R (1977): The actions of ouabain on intercellular coupling and conduction velocity in mammalian ventricular muscle. *J Physiol* 264, 341-365

White CN, Figtree GA, Liu CC, Garcia A, Hamilton EJ, Chia KK, Rasmussen HH (2009): Angiotensin II inhibits the Na⁺-K⁺ pump via PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C693-700

Williams HC, Griendling KK (2007): NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents?. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 9-16

Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM (2006): Local InsP₃-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest* 116, 675-682

Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, et al. (2002): Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106, 1288-1293

Xiao L, Pimentel DR, Wang J, Singh K, Colucci WS, Sawyer DB (2002): Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C926-934

Xiao YF (2011): Cardiac arrhythmia and heart failure: From bench to bedside. *J Geriatr Cardiol* 8, 131-132

Yahiro E, Ideishi M, Wang LX, Urata H, Kumagai K, Arakawa K, Saku K (2003): Reperfusion-induced arrhythmias are suppressed by inhibition of the angiotensin II type 1 receptor. *Cardiology* 99, 61-67

Yamada C, Kuwahara K, Yamazaki M, Nakagawa Y, Nishikimi T, Kinoshita H, Kuwabara Y, Minami T, Yamada Y, Shibata J, et al. (2016): The renin-angiotensin system promotes arrhythmogenic substrates and lethal arrhythmias in mice with non-ischaemic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 109, 162-173

Yasuno S, Kuwahara K, Kinoshita H, Yamada C, Nakagawa Y, Usami S, Kuwabara Y, Ueshima K, Harada M, Nishikimi T, et al. (2013): Angiotensin II type 1a receptor signalling directly contributes to the increased arrhythmogenicity in cardiac hypertrophy. *Br J Pharmacol* 170, 1384-1395

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK (1998): Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32, 488-495

Zellerhoff S, Pistulli R, Monnig G, Hinterseer M, Beckmann BM, Kobe J, Steinbeck G, Kaab S, Haverkamp W, Fabritz L, et al. (2009): Atrial Arrhythmias in long-QT syndrome under daily life conditions: a nested case control study. *J Cardiovasc Electrophysiol* 20, 401-407

Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN (2002): Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110, 479-488

Zhang M, Hagenmueller M, Riffel JH, Kreusser MM, Bernhold E, Fan J, Katus HA, Backs J, Hardt SE (2015): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II couples Wnt signaling with histone deacetylase 4 and mediates dishevelled-induced cardiomyopathy. *Hypertension* 65, 335-344

Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE, Jr., Thiel W, Guatimosim S, Song LS, et al. (2005): Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 11, 409-417

Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, et al. (2002): The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277, 1261-1267

Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH (2003): The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912-919

Zhang T, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, Chang S, Ling H, Bers DM, Maier LS, et al. (2007): CaMKII δ isoforms differentially affect calcium

handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J Biol Chem* 282, 35078-35087

Zhao Z, Fefelova N, Shanmugam M, Bishara P, Babu GJ, Xie LH (2011): Angiotensin II induces afterdepolarizations via reactive oxygen species and calmodulin kinase II signaling. *J Mol Cell Cardiol* 50, 128-136

Zhou J, Kodirov S, Murata M, Buckett PD, Nerbonne JM, Koren G (2003): Regional upregulation of Kv2.1-encoded current, $I_{K,slow2}$, in Kv1DN mice is abolished by crossbreeding with Kv2DN mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H491-500

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

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. med. L. S. Maier danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe die Möglichkeit erhalten habe, in diesem spannenden und komplexen Gebiet zu forschen. Dies ermöglichte mir einen guten Einblick nicht nur in den Bereich der experimentellen Forschung, sondern auch darüber hinaus. Unter anderem bekam ich die Gelegenheit, mich auf Kongressen weiter fortzubilden und dort meine Ergebnisse vorzustellen.

Auch möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. med. S. Wagner für seine Unterstützung danken. Insbesondere während der experimentellen Versuche und der Erstellung der Ergebnisse stand er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Ebenfalls möchte ich den anderen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Dr. med. S. Neef, Timo Schulte, Thomas Sowa, Felicia Steuer und Natalya Dybkova, für die konstruktive Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft danken, mir bei akuten Problemen oder Fragen zu helfen.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. med. M. Ghadimi, PD. Dr. med. J. Gaedcke und PD Dr. med. M. Grade für die Unterstützung, meine Dissertation parallel zu meiner Berufstätigkeit abzuschließen.

Lebenslauf

Am 25.09.1988 bin ich in Gehrden geboren worden und in Hannover aufgewachsen. Meine Eltern sind Dr. med. Alexandra Fischer-Flebbe, Fachärztin für Kinder- und Jugendpsychiatrie und tiefenpsychologisch fundierte und analytische Psychotherapie und Werner Flebbe, Diplom-Mathematiker. Nach der regelhaften Schullaufbahn legte ich im Jahr 2008 mein Abitur auf dem Kaiser-Wilhelm- und Ratsgymnasium ab.

Zum Wintersemester 2008/2009 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität Göttingen für das Studienfach Humanmedizin. Im Jahr 2015 konnte ich das Studium erfolgreich mit der Gesamtnote 1,5 beenden und erhielt die Approbation.

Bereits während des Studiums begann ich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. L. S. Maier in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie an meiner Promotion zu arbeiten. Im Jahr 2011 führte ich einen Großteil meiner Experimente durch. Während dieser Zeit wurde ich durch das UMG-interne Promotionsstipendium „Gö4med“ unterstützt. Im Jahr 2013 stellte ich die Ergebnisse meiner Arbeit als Poster auf der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie vor.

Nach Erhalt der Approbation begann ich am 01.09.2015 als Assistenzärztin der Abteilung Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. Ghadimi zu arbeiten. Dort habe ich mich der Arbeitsgruppe von PD. Dr. med. M. Grade angeschlossen. Hier erforschen wir die Resistenzentwicklung solider Tumore gegenüber einer Radio-/Chemotherapie.