

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE BEDEUTUNG DER KALZIUM/CALMODULIN-ABHÄNGIGEN KINASE II FÜR
KONTRAKTILE DYSFUNKTION UND ARRHYTHMIEN IN ATRIALEN
HERZMUSKELZELLEN VON PATIENTEN MIT VORHOFFLIMMERN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
ALEXANDER BIEDERMANN

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE BEDEUTUNG DER KALZIUM/CALMODULIN-ABHÄNGIGEN KINASE II FÜR
KONTRAKTILE DYSFUNKTION UND ARRHYTHMIEN IN ATRIALEN
HERZMUSKELZELLEN VON PATIENTEN MIT VORHOFFLIMMERN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
ALEXANDER BIEDERMANN

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med Stefan Wagner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med Stephan Hirt
Tag der mündlichen Prüfung:	23.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1. Anatomie des Herzens	8
1.2. Histologie und Ultrastruktur des Herzens	10
1.3. Elektromechanische Kopplung	12
1.4. Herzrhythmus und Elektrokardiogramm	14
1.5. Vorhofflimmern	15
1.6. Kalzium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II	19
1.7. Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	25
2.1. Operation und Gewebeentnahme.....	25
2.2. Isolation der Kardiomyozyten	26
2.3. Fluoreszenztechnische Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Fluo-4.....	32
2.4. Konfokales Lasermikroskop.....	35
2.5. Kalziumsparks und Bestimmung des SR-Kalziumgehaltes	38
2.6. Inhibition der Kalzium-Calmodulin-abhängige Protein Kinase II	42
2.7. Auswertung.....	43
3. Ergebnisse.....	45
3.1. Die Sparkfrequenz sinkt unter Einfluss der CaMKII-Inhibition	46
3.2. Die Kalziumsparkfrequenz ist beim Vorhofflimmern erhöht	48
3.3. Klinische Daten der Patienten, bei denen die Zellen auf Sparks untersucht wurden.....	49
3.4. Die Sparkfrequenz sinkt unter Einfluss der CaMKII-Inhibition im Vorhofflimmern stärker als im Sinusrhythmus.....	52
3.5. Der Inhibitor hat keine Auswirkung auf die Amplitude der Sparks	54
3.6. Die Sparkamplitude ist beim Vorhofflimmern erniedrigt	56

3.7. Die Auswirkung des Inhibitors auf die Sparkamplitude im Vergleich zwischen Vorhofflimmern und Sinusrhythmus ist gering	57
3.8. Die Breite der Sparks nimmt unter Einfluss des CaMKII-Inhibitors RA123456 ab 59	
3.9. Es besteht kein Unterschied zwischen der Breite der Sparks im Vorhofflimmern im Vergleich zum Sinusrhythmus	61
3.10. Die CaMKII-Inhibition hat auf die Breite der Sparks im Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern keinen signifikanten Unterschied	62
3.11. Die Dauer der Sparks nimmt unter Einfluss der CaMKII-Inhibition ab	64
3.12. Die Dauer der Sparks ist im Vorhofflimmern signifikant länger als im Sinusrhythmus.....	66
3.13. Die Inhibition der CaMKII zeigt einen signifikanten Rückgang der Dauer der Sparks im Vorhofflimmern	67
3.14. Die Inhibition der CaMKII verringert das Kalziumleck signifikant	69
3.15. Das Kalziumleck aus dem SR ist beim Vorhofflimmern größer als im Sinusrhythmus.....	71
3.16. Das Kalziumleck aus dem SR nimmt im Vorhofflimmern stärker ab als im Sinusrhythmus.....	72
3.17. Der Kalziumgehalt des SR steigt unter Wirkung des Inhibitors an.....	74
3.18. Im Vorhofflimmern ist die Caffein-Amplitude niedriger als im Sinusrhythmus	76
3.19. Klinische Daten der Patienten, bei deren Zellen Untersuchungen mit Caffein durchgeführt wurden.....	77
3.20. Der SR-Kalziumgehalt steigt im Vorhofflimmern unter Einfluss der Inhibitoren stärker als im Sinusrhythmus.....	80
4. Diskussion	82
4.1. Limitationen und Ausblick	89
5. Zusammenfassung	94
6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	96
7. Literaturverzeichnis.....	99
8. Abkürzungsverzeichnis.....	110

9. Danksagung	111
10. Lebenslauf	112
11. Eidesstattliche Erklärung	113

1. Einleitung

In der nachfolgenden Arbeit wird ein neuartiges Therapieprinzip untersucht, mithilfe dessen die kardiale Kontraktilität verbessert und Arrhythmien verringert werden sollen bei Patienten mit Vorhofflimmern.

Um die Zielsetzung im weiteren Verlauf der Arbeit besser fundieren zu können, gilt es in einem ersten Schritt sowohl die Anatomie und Funktionalität des Herzens sowie dessen Histologie und Ultrastruktur darzustellen.

1.1. Anatomie des Herzens

Das Herz ist das zentrale Organ des Blutkreislaufs. Es besteht aus zwei Hälften, die sich in jeweils einen Vorhof, das Atrium, und eine Kammer, den Ventrikel, zusammensetzen. Die verschiedenen Herzhöhlen sind durch Bindegewebe unterteilt, das man auch als Herzskelett bezeichnet. Hier liegen die Herzklappen, die ventilartig das Blut physiologisch streng unidirektional fließen lassen. Insgesamt gibt es vier Herzklappen: die Trikuspidalklappe zwischen den rechten und die Mitralklappe zwischen den linken Herzhöhlen. Entsprechend ihrer Namen liegen die Pulmonalklappe zwischen dem rechten Ventrikel und der Pulmonalarterie und die Aortenklappe zwischen linken Ventrikel und der Aorta. Die Fixierung des Herzens, das umhüllt von Perikard im mittleren Mediastinum liegt, erfolgt durch die Ab- bzw. Zugänge der großen Gefäße (1).

Das Myokard setzt sich aus den eigentlichen Herzmuskelzellen zusammen. Hier lassen sich die Kardiomyozyten, die für die Kontraktion verantwortlich sind, von den Kardiomyozyten des Erregungssystems unterscheiden. Entsprechend der mechanischen Anforderungen findet man typischerweise in den Vorhöfen und im rechten Ventrikel dünneres und im linken Ventrikel dickeres Myokard. Die Arbeitsmuskulatur des Herzens ist hierbei dreischichtig aufgebaut und verläuft in sich spiralförmig. Dieser Umstand ist für eine effektive Kontraktion und somit für den Auswurf des Blutes von besonderer Bedeutung (1, 2).

Im Unterschied zur Skelettmuskulatur hat das Herz ein eigenes Erregungssystem, das aus spezialisierten Kardiomyozyten besteht und hierarchisch aufgebaut ist. Hierbei ist physiologisch der Sinusknoten, der sich im rechten Vorhof befindet, der oberste natürliche Schrittmacher (3). Hier werden Aktionspotentiale generiert, die über ein instabiles Ruhemembranpotential entstehen. Grund dafür sind sogenannte funny

currents I_r , wodurch die Zellen des Sinusknoten immer wieder spontan depolarisieren (4). In Abbildung 1 ist der makroskopische Aufbau und das Erregungssystem des Herzens schematisch dargestellt.

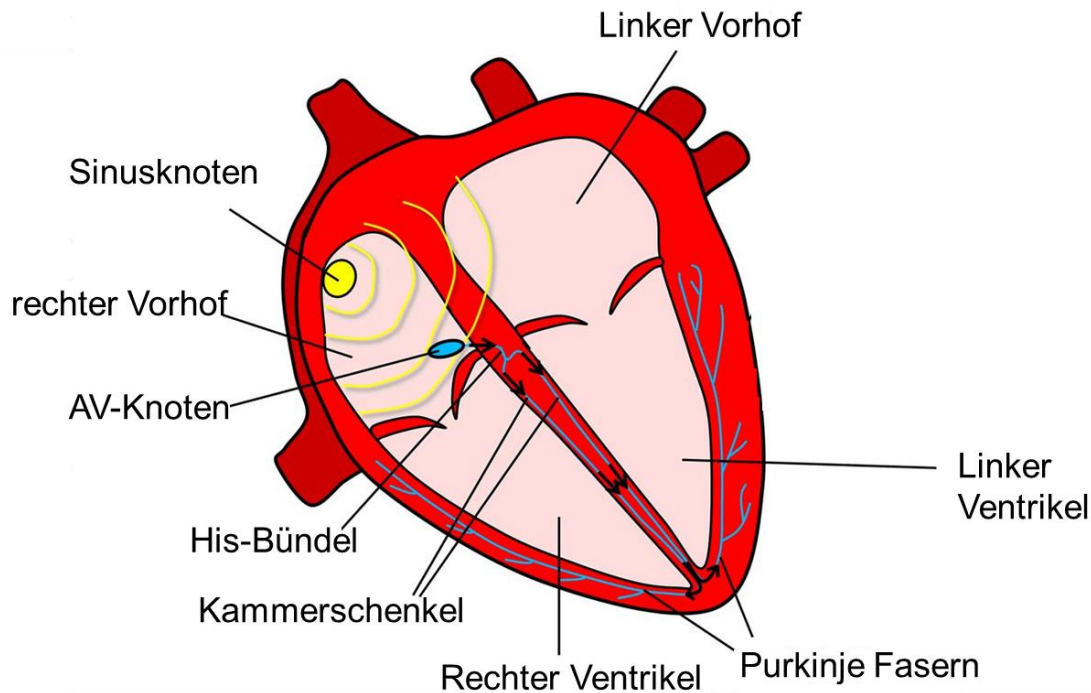


Abbildung 1: Anatomie des Herzens mit dem Reizleitungssystem

Modifiziert aus (5)

Das Aktionspotential wird in den Vorhöfen unmittelbar über das Myokard fortgeleitet, bis es auf den AV-Knoten zwischen Atrium und Ventrikel trifft. Hier verzögert sich die Weiterleitung und wird anschließend auf das His-Bündel übertragen. Der AV-Knoten selbst kann ebenfalls eine Schrittmacherfunktion ausüben, dessen Frequenz aber deutlich unterhalb der des Sinusknotens liegt und nur zum Einsatz kommt, wenn dieser ausfällt. Auch das His-Bündel kann Aktionspotentiale generieren, die aber wiederum langsamer sind. Von hier gelangt das Aktionspotential zu den Tawaraschenkeln (Kammerschenkel) und den Purkinjefasern. Dort erreicht die Erregung das Ventrikelmyokard, das daraufhin kontrahiert (3).

1.2. Histologie und Ultrastruktur des Herzens

Die Herzmuskulatur stellt sich ähnlich wie die Skelettmuskulatur quergestreift dar und besteht aus etwa bis zu 120 µm langen Zellen. Die Breite kann etwa bis zu 20 µm betragen. Hier lassen sich die Zellen des Atriums von Ventrikelzellen unterscheiden. Sie sind mit ungefähr 8 µm Breite dünner und auch etwas länger. Außerdem weisen sie weniger bzw. keine T-Tubuli auf; auch das sarkoplasmatische Retikulum ist geringer ausgeprägt (6, 7).

Die charakteristischen Querstreifen der Zellen werden durch die Myofilamente Aktin und Myosin gebildet, die zusammen für die Kontraktion verantwortlich sind.

Besonders auffällig sind die zahlreichen sehr langen Mitochondrien, die sich ubiquitär in der ganze Zelle verteilen. Hierbei finden sich vor allem Mitochondrien, die viele sogenannten Cristae aufweisen. Dies spricht für eine große ATP-Produktion. Gut zu erkennen ist dies auch in Abbildung 2, die zur Veranschaulichung der Histologie die Ultrastruktur einer Kardiomyozyte zeigt. Um den hohen Energiebedarf der Zellen zu decken, kommen Glykogen- und Lipidtröpfchen im Zytosol vor (6).

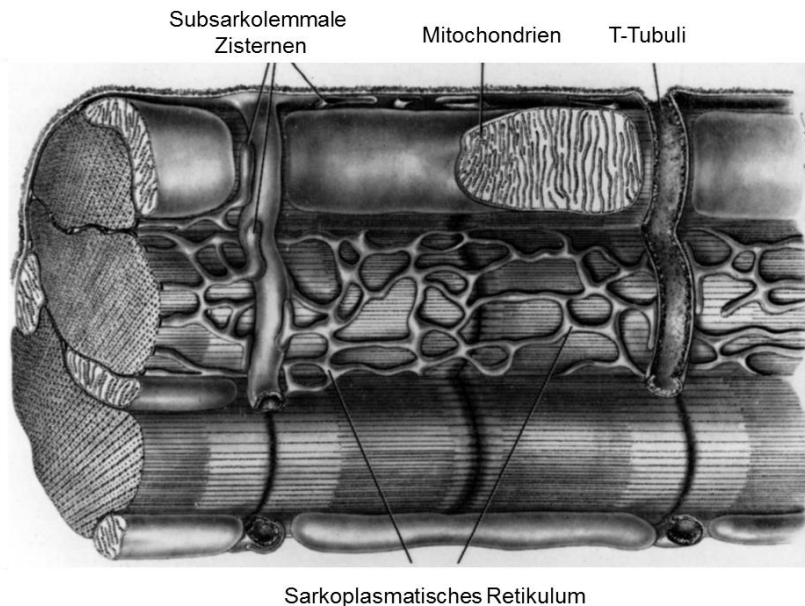


Abbildung 2: Ultrastruktur einer Kardiomyozyte

Modifiziert aus (8)

Es gibt sogenannte T-Tubuli, die durch Einstülpungen der Zellmembran entstehen (siehe Abbildung 2). An jedem Sarkomer gibt es einen T-Tubulus, in dessen Nähe

Ausläufer des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) zu finden sind, was als Diade bezeichnet wird. Beide Strukturen sind über den Dihydropyridin-Rezeptor (DHPR) funktionell gekoppelt. Diese Art von Rezeptoren wird auch als L-Typ-Kalziumkanal bezeichnet, der bei der Kontraktion von großer Bedeutung ist (siehe unten) (8).

Das SR fungiert der Kalziumspeicher der Zellen; es stellt eine spezialisierte Form des endoplasmatischen Retikulums dar.

Die Kardiomyozyten sind über die sogenannten Disci intercalares, die auch Glanzstreifen genannt werden, miteinander verbunden. Hier liegen die für den mechanischen Zusammenhalt wichtigen Desmosomen. Es lassen sich aber auch Gap Junctions finden, die für die elektrische Kopplung der Zellen zuständig sind. Diese Zellverbindungen bestehen aus den Connexinen, wobei im Herzen vor allem die Connexine 40, 43 und 45 vorhanden sind. Ein Connexon wird von sechs Connexinen gebildet und zwei Connexone, die jeweils in nebeneinander befindlichen Zellen sind, formen auf diese Art und Weise eine Gap Junction. Je nach benötigter Geschwindigkeit der Ausbreitung des elektrischen Signals sind die Connexine verschieden kombiniert. So lässt sich zum Beispiel in den schnell leitenden Purkinjefasern besonders viel Connexin 40 finden (9).

Durch die Disci intercalares erfolgt die Erregung des gesamten Herzens bei jedem Schlag fast gleichzeitig und alle Kardiomyozyten werden depolarisiert.

Nach der Erläuterung der strukturellen Eigenschaften des Herzens folgen nun elektromechanische Grundlagen, gefolgt von den elektrischen Eigenschaften, um dann das Vorhofflimmern genauer zu erläutern.

1.3. Elektromechanische Kopplung

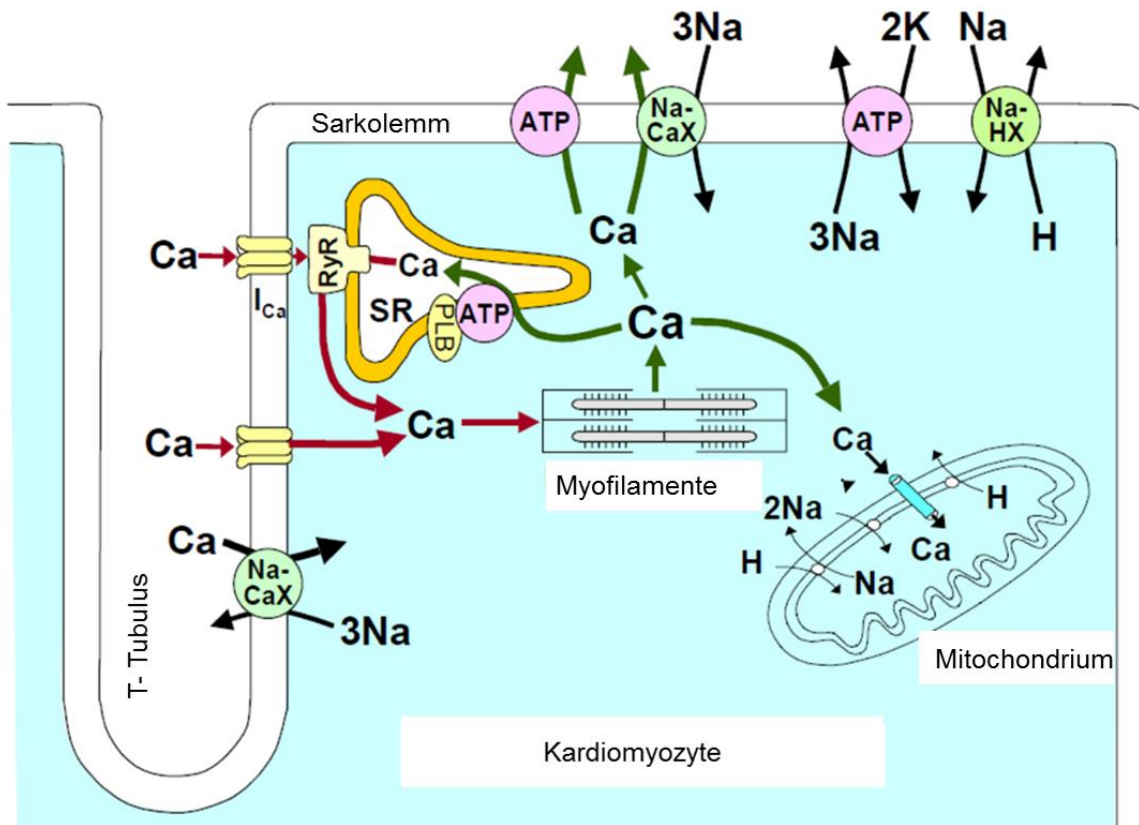


Abbildung 3: elektromechanische Kopplung und die daran beteiligten Proteine und Ionen

Modifiziert aus (8)

Als elektromechanische Kopplung wird das Zusammenspiel der Aktionspotentiale und der mechanischen Herzaktion bezeichnet (siehe Abbildung 3).

Zuerst kommt es zu einem Einstrom von Kalziumionen durch die L-Typ-Kalziumkanäle. Dieses Kalzium wiederum aktiviert den Ryanodinrezeptor vom Typ 2 (RyR2) des SR, woher auch der größte Teil des Kalziums, das für die Kontraktion von Nöten ist, gespeichert ist. So kommt es zu einem starken Kalziumstrom aus dem SR in das Zytosol. Dieser Vorgang wird als Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung bezeichnet. Infolge der schnell steigenden zytosolischen Kalziumkonzentration kommt es durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus zum Schluss der L-Typ-Kalziumkanäle. Durch die intrazellulär erhöhte Kalziumkonzentration erfolgt die Bindung von Kalziumionen an die Myofilamente. Auf diese Art und Weise kann der Muskel kontrahieren (10).

Eine elementare SR-Kalziumentladung bzw. ein Kalziumblitz aus wenigen benachbarten RyR2 wird als Spark bezeichnet. Dies gilt als kleinste, funktionell

einheitliche Kalziumentladung. Es kommen sowohl durch die elektromechanische Kopplung ausgelöste, als auch spontane, diastolische Sparks vor, die allerdings deutlich seltener auftreten. Bei der Kontraktion kommt es zur synchronisierten Öffnung vieler RyR2, wodurch schließlich sehr viele Sparks auftreten, die sich verbinden und so die Kontraktion durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration auslösen können. Dabei werden benachbarte RyR2 durch die jeweils davor entstandenen Sparks aktiviert (10). Hierbei steigt die Kalziumkonzentration von ca. 100 nM auf bis zu 1 μ M an (11).

1993 wurden das erste Mal Sparks mit dem konfokalen Lasermikroskop detektiert. Der entsprechenden Arbeitsgruppe gelang es die elementaren Kalziumentladungen aus dem SR in Kardiomyozyten, die mit Fluo-3 beladen waren, zu messen. Die Autoren stellten fest, dass Sparks lokal auftreten und unter anderem vom Kalziumgehalt des SR abhängig sind (12).

Am Ende der Kontraktion muss der erhöhte Kalziumspiegel in den Kardiomyozyten wieder sinken, damit der Muskel sich wieder relaxieren kann. Hierfür gibt es mehrere Mechanismen. Den größten Anteil trägt die sarkoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), danach folgt der Na^{+} - Ca^{2+} -Austauscher (NCX). Die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und der Kalziumtransport in die Mitochondrien haben nur einen sehr geringen Anteil an der Senkung der Kalziumkonzentration (10). Das überschüssige Natrium, das durch den NCX in die Zelle kommt, wird durch die Na^{+} - K^{+} -ATPase wieder aus der Zelle herausgeschleust (13).

Die synchronisierte Aktivität der Einzelzellen kann man durch das Oberflächenelektrokardiogramm sichtbar machen, was im nächsten Abschnitt besprochen wird.

1.4. Herzrhythmus und Elektrokardiogramm

Der Herzrhythmus wird durch den Sinusknoten vorgegeben, der als oberster Schrittmacher agiert. Sichtbar machen lässt er sich mithilfe eines Elektrokardiogramms (EKG).

Mithilfe des EKGs werden Ladungsunterschiede innerhalb des Herzens auf der Hautoberfläche abgeleitet. Hierbei ergeben sich durch die Anatomie des Herzens verschiedene Abschnitte (siehe Abbildung 4): Die P-Welle entspricht der Depolarisation der Vorhöfe. Daraufhin erfolgt die Überleitung der Erregung auf die Ventrikel. Die dazwischen liegende Pause, die der verzögerten Überleitung im AV-Knoten entspricht, ist das PR-Intervall. Diese zeigt sich als isoelektrische Linie. Darauf folgt die Depolarisation der Ventrikel, was man im EKG als QRS-Komplex sieht. Die folgende Pause, die sich ebenfalls als eine isoelektrische Linie darstellt, nennt sich ST-Strecke mit anschließender T-Welle, die der Repolarisation der Ventrikel entspricht (3).

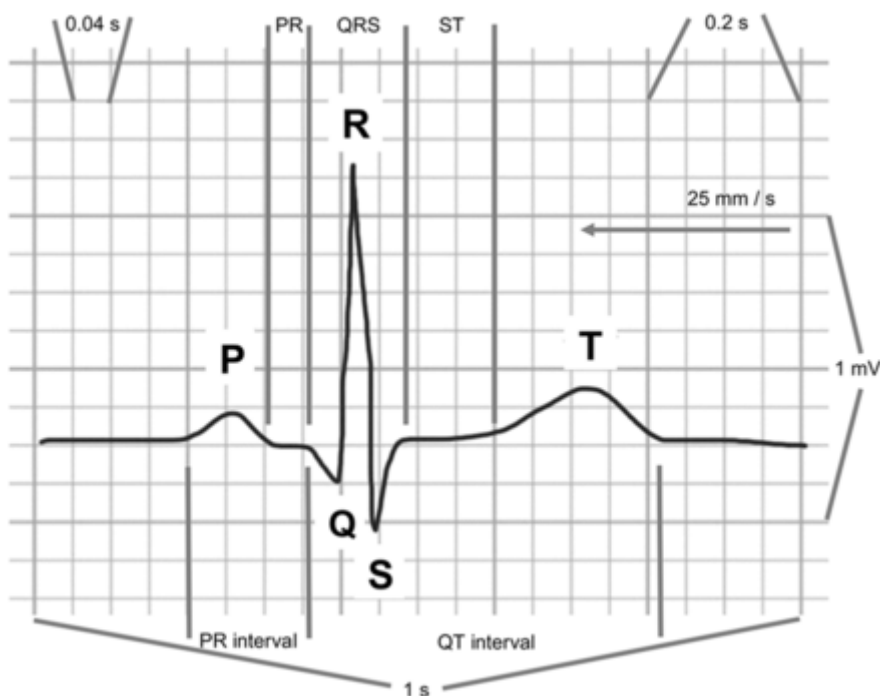


Abbildung 4: schematische Darstellung eines Sinusrhythmus-EKG

Aus (3)

Der gesunde Herzrhythmus läuft wiederholend und regelmäßig nach diesem Schema ab und wird dann als Sinusrhythmus bezeichnet. Weicht er davon ab, spricht man von einer Arrhythmie.

1.5. Vorhofflimmern

Das Vorhofflimmern ist die häufigste supraventrikuläre Arrhythmie, die mit dem Alter der Patienten häufiger vorkommt. Weltweit litten im Jahr 2010 mindestens 33,5 Millionen Menschen an Vorhofflimmern und geschätzt gibt es jährlich fünf Millionen Neuerkrankte. Prävalenz und Inzidenz sind hierbei steigend. Vor allem in den Industriestaaten nimmt Vorhofflimmern immer weiter zu. Besonders gefährdet sind ältere Menschen. So haben 75- bis 79-jährige Männer ein ungefähr doppelt erhöhtes Risiko an Vorhofflimmern zu erkranken als zehn Jahre jüngere Patienten (14).

In Deutschland liegt die Prävalenz bei Erwachsenen insgesamt bei 2,3% (15). Das Lebenszeitrisiko an Vorhofflimmern zu erkranken, lag in einer großen europäischen Studie im Alter von 55 Jahren für Männer bei etwa 23,8% und für Frauen bei 22,2% (16).

Diese Erkrankung ist mit ernsten Folgen für die Patienten verbunden. An erster Stelle steht die Gefahr eines Apoplex. Ungefähr 20% der Schlaganfälle werden durch Vorhofflimmern ausgelöst (17). Es spielt hierbei allerdings keine Rolle, ob eine chronische oder eine nichtchronische Form des Vorhofflimmerns vorliegt (18). Zusätzlich kommt es auch zu gehäuften kognitiven Einschränkungen, die durch nicht erkannte oder kleine thrombembolische Ereignisse entstehen (19). Patienten mit Vorhofflimmern haben infolgedessen mehr sogenannte stille zerebrale Ischämien und damit kognitive Beeinträchtigungen (20). Eine weitere gravierende Folge des Vorhofflimmerns ist eine Tachymyopathie und eine kontraktile Dysfunktion des linken Ventrikels (21). Außerdem kann es zur Verschlechterung einer bestehenden Herzinsuffizienz kommen, was sich oft als kardiale Dekompensation äußert. Man kann daher insgesamt von einer höheren Hospitalisationsrate bei Patienten, die unter Vorhofflimmern leiden, ausgehen (17).

Es ist besonders hervorzuheben, dass die allgemeine Lebensqualität der Patienten im Vergleich zu Gleichaltrigen oder auch zu Menschen mit einer Herzerkrankung ohne Vorhofflimmern wesentlich schlechter ist (22).. Außerdem ist nach einem Herzinfarkt die Prognose bei Vorhofflimmerpatienten ebenfalls schlechter. So ist die Mortalität bei Patienten mit tachykardem Vorhofflimmern bis zu fünffach erhöht (23). Zudem ist das Risiko einen erneuten Herzinfarkt zu erleiden ungefähr 14 % höher, wenn man an Vorhofflimmern leidet (24).

Weitere assoziierte Erkrankungen sind unter anderem Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, Klappenvitien, Kardiomyopathien, Diabetes Mellitus, Adipositas und Hyperlipidämie (25).

Das Vorhofflimmern ist durch eine atriale Tachykardie mit Frequenzen von über 300 Schlägen pro Minute gekennzeichnet (17).

Klinisch lässt sich das Vorhofflimmern anhand charakteristischer Symptome diagnostizieren. Die meisten der betroffenen Patienten klagen über Palpitationen. Aber auch relativ unspezifische Symptome wie Schwindel, allgemeines Unwohlsein und Müdigkeit können auftreten. Selten berichten Patienten von Brustschmerz oder Angstgefühlen (26).

Bei der körperlichen Untersuchung fällt vor allem der unregelmäßige Puls auf. Um das Vorhofflimmern sicher diagnostizieren zu können, muss ein EKG geschrieben werden. Typisch ist hier, dass der Abstand zwischen zwei R-Zacken absolut unregelmäßig ist. Ein weiteres entscheidendes Kriterium ist die fehlende P-Welle. In Abbildung 5 sind typische EKG-Ableitungen bei Sinusrhythmus und Vorhofflimmern zu sehen.



Abbildung 5: Sinusrhythmus -EKGs (A) und Vorhofflimmer-EKG (B)

Modifiziert aus (27)

Man unterscheidet verschiedene Formen des Vorhofflimmerns. Es gibt das sogenannte paroxysmale Vorhofflimmern. Es dauert bis zu sieben Tage, allerdings konvertiert es meist innerhalb von 48 Stunden wieder spontan in den Sinusrhythmus. Als persistierend wird es bezeichnet, wenn die Episode länger als sieben Tage dauert oder beim Patient eine elektrische Kardioversion durchgeführt wurde. Erst wenn das Vorhofflimmern auf keine therapeutischen Maßnahme anspricht und sowohl Arzt als auch Patient dies akzeptieren, spricht man von der permanenten Form (17).

Die symptomatische Behandlung des Vorhofflimmerns enthält sowohl die Antikoagulation als auch die Frequenz- und die Rhythmuskontrolle. Es werden hierbei nicht nur Medikamente sondern auch apparative Anwendungen verwendet (28).

Der Einsatz einer oralen Antikoagulation mit entweder Marcumar oder den neuen oralen Antikoagulantia wie zum Beispiel Rivaroxaban, Edoxaban, Apixaban oder Dabigatran kann sich nach dem Schlaganfallrisiko richten. Hierfür wird in der Praxis oftmals der CHAD-Score verwendet. Er berücksichtigt Faktoren wie eine bestehende Herzinsuffizienz, arterielle Hypertonie, Alter, Diabetes Mellitus und ein bereits stattgefundener Schlaganfall. Eine sinnvolle Erweiterung des CHAD-Scores ist der CHAD-VASc-Score, der zusätzlich noch Gefäßerkrankungen, das Geschlecht und eine genauere Differenzierung des Alters mit einbezieht (29).

Man geht davon aus, dass Vorhofflimmern im linken Vorhof entsteht. Am Übergang des linken Vorhofs in die Pulmonalvenen befinden sich Herzmuskelzellen, die eine gesteigerte Neigung zu getriggelter Aktivität aufweisen (siehe unten). Grund dafür kann unter anderem eine kürzere effektive Refraktärzeit sein (siehe unten). Auch der abrupte Wechsel zwischen Herzgewebe und glatter Muskulatur der Gefäße spielt hierbei eine Rolle (30, 31).

Solche arrhythmogenen Trigger können, wenn sie auf ein durch kardiales Remodelling verändertes und vorbelastetes Vorhofmyokard treffen, anhaltende atriale Arrhythmien auslösen, die vor allem durch Reentry-Mechanismen stabilisiert werden. Das veränderte und für Trigger vulnerable Vorhofgewebe wird auch als Substrat bezeichnet. Hierbei enthält das Remodelling Faktoren wie Ischämie, Fibrose, Entzündungen oder die Dilatation des Vorhofgewebes (31).

Pathophysiologisch kommt es beim Vorhofflimmern im atrialen Myokard zu einem strukturellen und elektrischen Remodelling, wodurch sich die Refraktionszeit weiter verkürzt (32).

Elektrophysiologisch kommt es also zu Veränderungen, die auf die Arrhythmie stabilisierend wirken können. Die Expression von L-Typ Kalziumkanäle ist zum Beispiel herunterreguliert (siehe unten), während der Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal jedoch vermehrt exprimiert wird. Die Folge ist eine deutliche Verkürzung der Aktionspotentialdauer und effektiven Refraktärzeit, was wiederum Reentry-Mechanismen begünstigt (33). Außerdem kommt es zu vermehrter Fibrose, was die elektrische Leitfähigkeit und Eigenschaften der Vorhöfe zusätzlich negativ verändert (31).

Durch die gesteigerte Frequenz der laufenden Arrhythmie erhöht sich über den L-typ-Kalziumkanal die intrazelluläre Kalziumkonzentration (34). Dadurch werden die L-Typ-Kalziumkanäle vermehrt inaktiviert und schließlich auch auf genregulatorischer Ebene herunterreguliert (35). Dieser Kompensationsversuch hat allerdings weitere Auswirkungen. So verkürzt sich nämlich wie schon erwähnt das Aktionspotential und die Vorhöfe sind zusätzlich kürzer refraktär.

Darüber hinaus führt die gesteigerte intrazelluläre Kalziumkonzentration zur Aktivierung kalziumabhängiger Serin/Threoninkinasen, welche wichtige Ionenkanäle und Transporter regulieren (siehe unten) (36).

Hierdurch kommt es durch Hyperphosphorylierung des RyR2 zu einer gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit in der Diastole, was zu einem erhöhtem SR-Kalziumleck mit erhöhter diastolischer Kalziumkonzentration im Zytosol führt (37). Diese Kalziumfreisetzung aus dem SR ist durch die Öffnung von synchronisierten benachbarten RyR2 ausgelöst, sogenannte Ryanodinrezeptorcluster. Die daraus folgende Kalziumfreisetzung, die sowohl örtlich als auch zeitlich begrenzt ist, wird wie schon beschrieben als Kalziumblitz oder Spark bezeichnet (38).

Durch diese erhöhte diastolische Kalziumkonzentration kann es wiederum zu Arrhythmien kommen. Ein Grund dafür ist der NCX. Bei hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen transportiert er ein Kalziumion aus der Zelle und dafür drei Natriumionen in die Zelle hinein. Der Ionentransport ist daher elektrogen und so kann es zu späten Nachdepolarisationen kommen, die sich als Arrhythmie äußern können (39).

Es erfolgen aber auch noch andere Veränderungen, die unabhängig vom Kalzium sind. Der auswärts gerichtete Kaliumstrom I_{to} wird reduziert und gleichzeitig der schnelle Natriumstrom I_{Na} inaktiviert, was schließlich zu höheren Spannungen im Membranpotential führt. Auch hierdurch wird das Aktionspotential verkürzt (33). Zusätzlich zu den Veränderungen im Ionenhaushalt lassen sich auch strukturelle Veränderungen der Zellen feststellen: Myofibrillen werden weniger ausgeprägt, es kommt zu einer vermehrten Glykogenspeicherung und die Mitochondrien verlängern sich. Auch die Zellen selbst werden größer (40). Passend zu diesem Befund erweitern sich die Vorhöfe schließlich makroskopisch (41).

Eine besonders wichtige Rolle bei der Pathologie des Vorhofflimmerns spielt die Kalzium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II, die im nächsten Abschnitt erläutert wird.

1.6. Kalzium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II

Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII) ist eine Serin/Threonin Kinase, die unter anderem zahlreiche kalziumregulatorische Proteine phosphorylieren und damit einen großen Einfluss auf den intrazellulären Kalziumhaushalt nehmen kann (42).

Das Enzym wird durch mehrere Gene kodiert und so hat die Kinase vier verschiedene Isoformen, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Die α - und β -Isoformen kommen vor allem im Nervengewebe vor, wo die CaMKII auch zuerst nachgewiesen wurde (43, 44). Hier ist sie von besonderer Bedeutung für viele neurologische Prozesse wie das Lernen und die Gedächtnisfunktion (45).

Die anderen beiden Isoformen des Enzyms, γ und δ , sind ubiquitär im Organismus zu finden. Dabei wird im Herzen am stärksten die δ -Form exprimiert (42, 44).

Die CaMKII besitzt eine Radstruktur und besteht aus mehreren Multimereinheiten, die jeweils bis zu zwölf Kinaseuntereinheiten aufweisen können. Dabei hat jede dieser Untereinheiten drei Domänen (siehe Abbildung 6). Es gibt sowohl eine katalytische Domäne als auch eine regulatorische Domäne, die autoinhibitorisch wirken kann. Diese verhindert, dass das Substrat an das Enzym binden kann. Dadurch verbleibt die Kinase in einem inaktiven Zustand. Zudem kommt eine Assoziationsdomäne vor, die für die Oligomerisierung der Kinase zuständig ist (46).

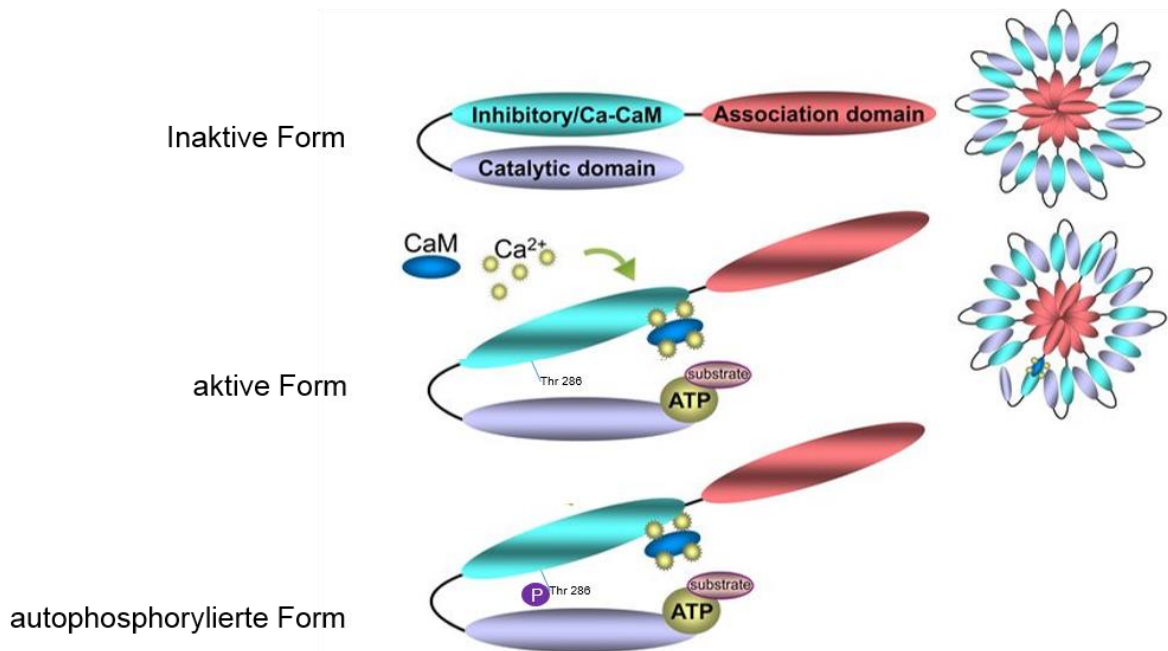


Abbildung 6: Struktur der CaMKII als Monomer (links) und Oligomer (rechts)

Modifiziert aus (47)

Calmodulin ist ein Protein aus 148 Aminosäuren, das als second messenger fungiert und Kalziumionen binden kann (48). Als Aktivator der CaMKII bindet es bei steigender Kalziumkonzentration zuerst vier Kalziumionen, um dann anschließend mit der regulatorischen Domäne zu interagieren. Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die CaMKII aktiviert wird (siehe Abbildung 6). In Folge dessen ist die Kinase im Stande, ihre Aktivierung mithilfe einer Autophosphorylierung an Threonin an der Stelle 286 aufrecht zu erhalten, auch wenn die Kalziumkonzentration in der Zelle wieder absinkt. Die Affinität zum Calmodulin-Kalzium-Komplex steigt spannenweise infolge der Autophosphorylierung, wodurch die aktive Form des Enzyms stabilisiert wird. Sogar nach der Abspaltung des Calmodulin-Kalzium-Komplexes erhält sich das Enzym durch die Autophosphorylierung einen Teil seiner Aktivität (42).

Andere Aktivierungsmöglichkeiten der CaMKII stellen die Oxidation, Glykosylierung und Nitrosylierung dar (36).

Physiologisch betrachtet hat die CaMKII eine wichtige Funktion bei der sogenannten frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation des Herzens. Dieser Mechanismus führt dazu, dass sich das Myokard bei hohen Herzfrequenzen schneller entspannt, was wiederum für eine zügigere Füllung der Ventrikel sorgt. Dabei spielt der physiologische Inhibitor der SERCA Phospholamban (PLN) eine wichtige Rolle.

Durch dessen Phosphorylierung durch die CaMKII kommt es zu einer verminderten Interaktion zwischen SERCA und PLN. Daraus resultiert die Enthemmung der SERCA und somit eine verstärkte Kalziumaufnahme in das SR. Insbesondere bei hohen Herzfrequenzen wirkt dieser Mechanismus einer Kalziumüberladung der Zelle entgegen und verbessert zudem die diastolische Funktion des Myokards (49).

Eine permanente Aktivierung und gesteigerte Expression der CaMKII, wie sie beispielsweise bei Vorhofflimmern oder Herzinsuffizienz gefunden wird (50–52), kann allerdings zu zahlreichen, sehr nachteiligen Effekten auf die Kontraktilität und sogar zu Arrhythmie neigen führen.

So phosphoryliert die CaMKII den L-Typ-Kalzium-Kanal sowohl an der $\alpha 1C$ - als auch an der $\beta 2a$ -Untereinheit. Hierbei nimmt die $\beta 2a$ -Untereinheit die Rolle der regulatorischen Untereinheit ein und die $\alpha 1C$ -Untereinheit entspricht dem Kanalprotein selbst. Durch diese Phosphorylierung kommt es zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals, was dazu führt, dass mehr Kalziumionen in die Zelle einströmen können (53, 54). Dieser Kalziumeinstrom kann allerdings eine zelluläre Kalziumüberladung vermitteln. Überdies führte im Tiermodell der gesteigerte Kalziumeinstrom insbesondere während der Plateauphase des Aktionspotentials zu vermehrten Arrhythmien durch frühe Nachdepolarisationen (55).

Ein weiteres entscheidendes Zielprotein ist der RyR2. Die Phosphorylierung findet hier am Serin 2815 statt (56). Dadurch kommt es ebenfalls zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit (57). Als Folge einer Hyperphosphorylierung ist das SR-Kalziumleck erhöht, was zu einem erniedrigten Kalziumgehalt des SR führt. Das erhöhte Leck spiegelt sich auch in der erhöhten Sparkfrequenz mit ebenfalls erhöhter Dauer und Breite der Sparks wieder (siehe unten) (58).

Unter physiologischen Bedingungen kann die Phosphorylierung des RyR2 allerdings auch positive Effekte haben. Die Kraft-Frequenz-Beziehung beschreibt den Mechanismus, dass bei hohen Herzfrequenzen sich die Inotropie des Herzens steigert. Bei diesem Mechanismus spielt die Phosphorylierung des RyR2 durch die akute Aktivierung CaMKII eine entscheidende und positive Rolle. So kann das Herz durch den vermehrten Kalziumaustrom aus dem SR in das Zytosol stärker kontrahieren (59). Gleichzeitig kommt es durch die diastolische Kalziumfreisetzung zur Aktivierung des NCX, der für einen Kalziumauswärts- und Natriumeinwärtsstrom sorgt. Aufgrund der Elektrogenität des Ionentransports kommt es durch den Ausstrom von einem Kalziumion und Einstrom von drei Natriumionen pro Transportzyklus zu einem

positiverem Membranpotential, das sich als späte Depolarisation äußern kann. Daraus können Arrhythmien resultieren.

Außerdem kann die CaMKII auch die Genregulation beeinflussen, was unter anderem zu ventrikulärem Remodelling und Herzinsuffizienz führen kann (60).

Die CaMKII ist zudem in der Lage, zusätzlich Natrium- und Kaliumkanäle zu phosphorylieren. Beides kann ebenfalls zu Arrhythmien führen (61, 62).

Es gibt einen starken Zusammenhang zwischen der Überexpression der CaMKII und Vorhofflimmern. Die Expression der Kinase im Vorhofgewebe ist im Vergleich mit Sinusrhythmuspatienten bei Vorhofflimmern erhöht. Auch zeigt sich eine Hyperphosphorylierung des RyR2 am Serin 2815, was zu einer erhöhten Sparkfrequenz führt (63, 64).

Außerdem konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass das durch die CaMKII erhöhte Kalziumleck mitverantwortlich ist für die Entwicklung und das Fortschreiten des Vorhofflimmerns. Nebenbefundlich zeigte sich interessanter Weise ein Zusammenhang zwischen Kalziumleck und der Hypertrophie der Herzen (65).

Für die Aktivierung der CaMKII spielt oxidativer Stress, der bei Vorhofflimmern verstärkt entsteht, eine wichtige Rolle. Es kommt auf diese Art und Weise zu Oxidationen an verschiedenen Proteinen; so auch an der CaMKII. Hierdurch wird das Enzym schließlich aktiviert (66). Aber auch die oben erwähnte Dysregulation des Kalziumhaushaltes bei Vorhofflimmern führt zur Aktivierung der CaMKII (36).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhöhte CaMKII-Aktivität im Vorhofflimmern im Vergleich zum Sinusrhythmus zu einem vor allem durch eine erhöhte Sparkfrequenz gesteigerten Kalziumleck aus dem SR führt, somit den SR-Kalziumgehalt erniedrigt und die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Vorhofflimmern gesteigert ist.

Eine Hemmung der CaMKII durch pharmakologische Inhibitoren z.B. durch N-[2-[N-(4-Chlorocinnamyl)-N-methylaminomethyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzenesulfonamidphosphatsalz (KN-93) oder auch inhibitorische Peptide wie Autocamtide-2-Related Inhibitory Peptide (AIP) (siehe unten) zeigte, dass sich die erhöhte Sparkfrequenz und daher auch das Kalziumleck signifikant verringern lassen (63). Daraus ergibt sich ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt für Patienten mit Arrhythmien wie Vorhofflimmern (67).

1.7. Zielsetzung

Die Serin/Threonin Kinase CaMKII, deren δ -Form im Herzen am stärksten exprimiert wird, spielt unter anderem im Kalziumhaushalt der Kardiomyozyten eine wichtige Rolle. Besonders bei Herzinsuffizienz und Arrhythmien wie Vorhofflimmern ist sie verstärkt exprimiert und somit in einige pathologische Prozesse involviert, die den Krankheitszustand der Patienten stark beeinflussen. Bei Vorhofflimmern ist sie anscheinend sowohl an dessen Entstehung und Progression beteiligt.

Daraus könnte sich ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt auf pharmakologischer Ebene ergeben. Allerdings gibt es bis heute noch kein marktreifes Medikament mit entsprechender und vor allem selektiver Wirkung auf das Enzym.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den neuartigen CaMKII-Inhibitor RA123456, der möglicherweise klinisch angewendet werden könnte, zu testen. Dabei erfolgten die Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen aus menschlichem rechtsatrialem Gewebe, das bei Operationen mit einer Herzlungenmaschine gewonnen werden konnte.

Insbesondere sollten die Auswirkungen auf das diastolische Kalziumleck aus dem SR und dessen Kalziumgehalt beobachtet werden, da hier der pathologische Haupteffekt der CaMKII liegt. Eingesetzt wurde hierfür die Technik der konfokalen Lasermikroskopie, um Sparks zu detektieren, mithilfe derer das Kalziumleck aus dem SR berechnet werden kann. Für die Bestimmung des SR-Kalziumgehaltes wurden Untersuchungen mit Caffein durchgeführt. Zum Einsatz kam der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 (siehe unten).

Es war zu erwarten, dass das diastolische Kalziumleck aus dem SR unter Einfluss des neuartigen Inhibitors signifikant niedriger wird und der Kalziumgehalt entsprechend ansteigt im Vergleich zu einer Negativkontrolle.

Dabei sollten vor allem die CaMKII-Effekte auf den Kalziumhaushalt in Herzmuskelzellen von Patienten mit Vorhofflimmern mit der von Patienten mit Sinusrhythmus verglichen werden.

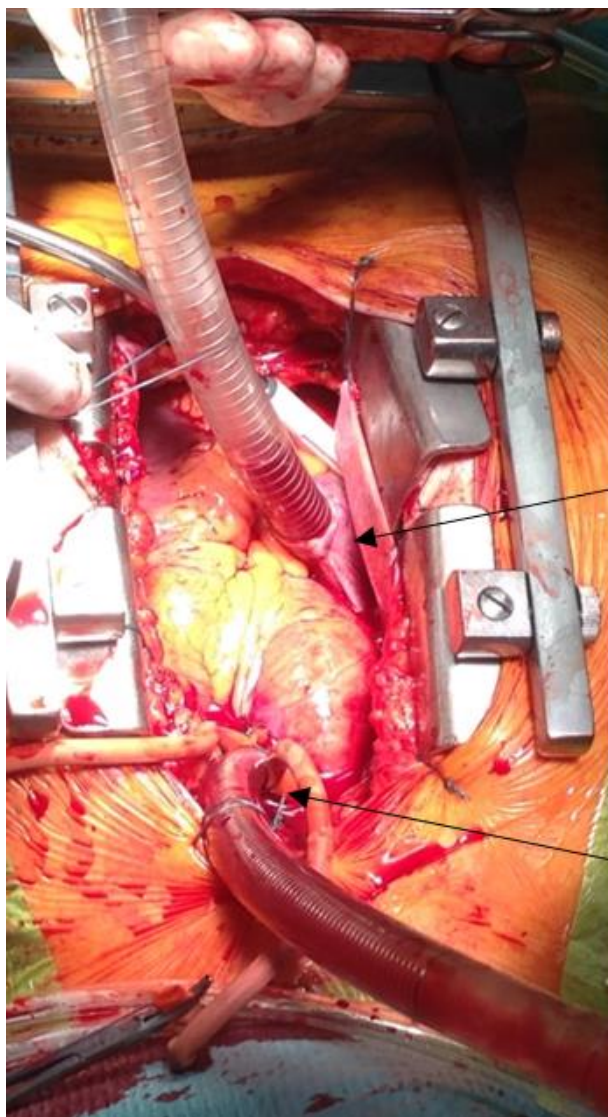
Gleichzeitig sollte die optimale Dosis gefunden werden, bei der maximale Auswirkungen auf das diastolische Kalziumleck und den Kalziumgehalt im Kalziumspeicher der Kardiomyozyten auftreten.

Die für die Umsetzung der vorliegenden Arbeit nötigen Materialien und Methoden werden nun Schritt für Schritt näher betrachtet. Dabei entspricht die Reihenfolge auch dem Ablauf der durchgeführten Untersuchungen.

2. Material und Methoden

2.1. Operation und Gewebeentnahme

In Kooperation mit der Abteilung der Herz-Thorax-Chirurgie am Universitätsklinikum Regensburg war es möglich, Untersuchungen an rechtsatrialen Kardiomyozyten durchzuführen. Die Patienten wurden zuvor ausführlich aufgeklärt und die Entnahme und Untersuchung des Gewebes fand erst nach Zustimmung der Patienten im Sinne des informed Consents statt. Die Arbeit ist in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki erstellt worden und wurde zuvor von der örtlichen Ethikkommission geprüft und genehmigt.



Kanüle im rechten Vorhofohr

Kanüle in der Aorta

Abbildung 7: OP-Situs mit den Kanülen der Herz-Lungen-Maschine

Privatarchiv des Verfassers

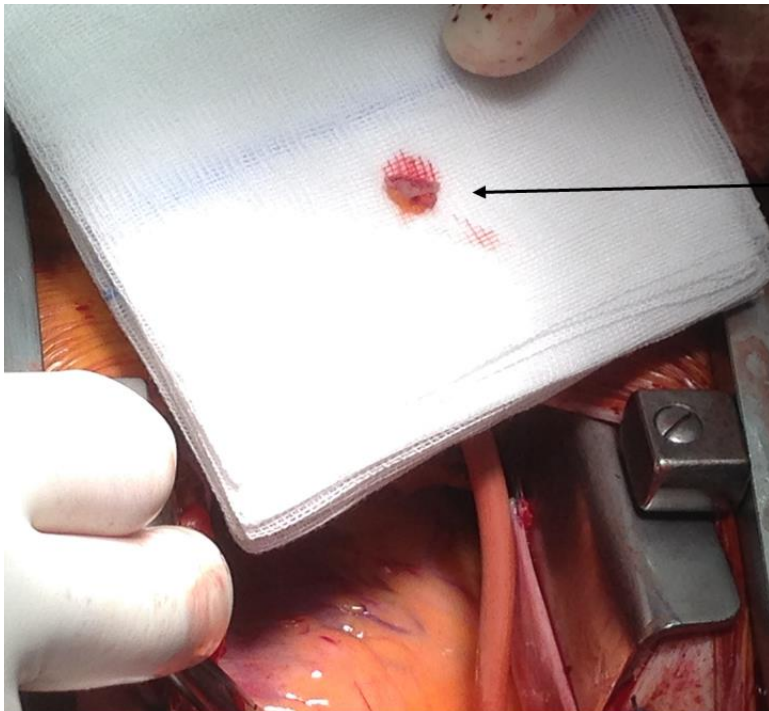
Im Rahmen einer Bypass- oder einer Herzklappenersatz- bzw. Rekonstruktionsoperation werden die Patienten an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Auf diese Art und Weise ist es möglich am nicht schlagenden Herzen zu operieren, während der restliche Körper dennoch mit sauerstoffreichem Blut versorgt wird.

Eine Kanüle der Herz-Lungen-Maschine wird in die Aorta eingebracht und die andere in den rechten Vorhof (siehe Abbildung 7). Dabei wurde aus operationstechnischen Gründen aus dem rechten Vorhof ein kleines Stück Gewebe entfernt, sodass die Kanüle im Vorhof platziert werden kann. Je nach Zugänglichkeit und patientenspezifischen anatomischen Begebenheiten ist es auf diese Art möglich ein Gewebestück von durchschnittlich etwa 120 mg zu entnehmen (siehe Abbildung 8).

2.2. Isolation der Kardiomyozyten

In Abbildung 8 ist ein Gewebestück aus dem rechten Vorhof direkt nach der Exzision zu erkennen. Die Isolation der Kardiomyozyten erfolgte direkt im Anschluss an die Gewebeentnahme. Die für die Isolation verwendeten Chemikalien wurden nach den Vorgaben der Hersteller gelagert. Zum Lösen der Substanzen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

Vor der eigentlichen Isolation wurden zuerst Fett- und Bindegewebsreste entfernt, um möglichst nur Muskelgewebe in die Isolation einzubringen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zerkleinerung des Gewebestücks mit einer Schere in ein bis zwei Millimeter große Stücke, wodurch die später hinzugegebenen Enzyme, eine größere Angriffsfläche hatten. Dies geschah in der Isolationstyrode, die während der Isolation in einem Wasserbad kontinuierlich bei 37,5°C gelagert wurde. Die Zusammensetzung der Isolationstyrode ist der Tabelle 1 zu entnehmen.



explantiertes
Gewebestück aus dem
rechten Vorhof

Abbildung 8: explantiertes Gewebestück des rechten Vorhofs

Privatarchiv des Verfassers

Chemikalie	Firma/Produktnummer	Konzentration
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich S7653	100 mM
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth 6781.1	10 mM
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth KK36.1	5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich P9791	1,2 mM
Taurin (C ₂ H ₇ NO ₃ S)	Sigma-Aldrich T0625	50 mM
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich M1254	5 mM
2,3-Butandionmonoxim BDM (C ₄ H ₇ NO ₂)	Sigma-Aldrich B0753	10 mM
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Carl Roth X997.2	20 mM
Natriumhydroxid NaOH	Carl Roth 6771.3	Pufferung bis pH 7,20 bei 37°C

Tabelle 1: Isolationstyrode

Die Gewebestückchen wurden vor der eigentlichen Isolation drei- bis fünfmal für jeweils mindestens drei Minuten mit der Isolationstyrode gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde die Lösung durch ein Zellsieb gefiltert und das Gewebe immer wieder mit einer Pinzette zurück in das Isolationsgefäß gegeben.

Dies hatte die erwünschte Reduktion von Erythrozyten und Fettresten zu Gunsten der Messgenauigkeit zur Folge. Besonders die Erythrozyten nehmen den verwendeten Kalziumindikator und Fluoreszenzfarbstoff stark auf und würden zu Störungen der Messungen führen.

Danach begann der erste sogenannte Verdauschritt der Isolation. Hierfür wurden die Kollagenase und die Protease in der Isolationstyrode gelöst (siehe Tabelle 2).

Die Gewebestückchen wurden in dieser Lösung nun für insgesamt genau 45 Minuten bei 37,5°C bei kontinuierlicher Sauerstoffzugabe inkubiert. Nach den ersten zehn Minuten wurde die Kalziumkonzentration auf 20 µM gesteigert.

Chemikalie	Firma / Produktnummer	Menge bzw. Volumen
Kollagenase Type I	Worthington M2C13334	0,0154 g
Protease	Sigma-Aldrich P8038	0,0080 g
Isolationstyrode		20 ml

Tabelle 2: Enzymlösung für die Isolation

Innerhalb der Verdauschritte wurde die Reaktionslösung mithilfe eines Magnetrührstäbchens kontinuierlich vorsichtig durchmischt.

Am Ende des ersten Verdauschritts wurde die erste Enzymlösung für die Isolation verworfen und die bereits angedauten Gewebestückchen in einer neuen Enzymlösung inkubiert. Diese enthielt in diesem Verdauschritt nur noch die Kollagenase mit der gleichen Konzentration wie bei der ersten Enzymlösung. Im Gegensatz zum ersten Verdauschritt wurde beim zweiten von Beginn an mit einer Kalziumkonzentration von 20 µM gearbeitet.

Innerhalb des zweiten Verdauschritts erfuhren die Gewebestückchen nun immer wieder in einem Intervall von fünf Minuten innerhalb des Inkubationsgefäßes mit einer sehr scharfen Schere eine weitere Zerkleinerung. Daraufhin wurde mit einer

abgeschnittenen Pasteurpipette die Lösung vorsichtig auf und ab pipettiert, um durch Scherkräfte die Zellen aus dem Gewebeverbund mechanisch zu lösen. Zeitgleich erfolgte in immer kürzer werdenden Abständen auch eine Kontrolle, ob sich schon Kardiomyozyten in der Lösung befanden.

Der zweite Verdauschritt dauerte durchschnittlich zwischen 20 bis 45 Minuten. In dieser Zeit sollte sich die Zellzahl bei gleichbleibender optischer Qualität der Kardiomyozyten langsam erhöhen.

Chemikalie	Firma / Produktnummer	Konzentration bzw. Volumen
2,3-Butandionmonoxim BDM (C ₄ H ₇ NO ₂)	Sigma-Aldrich B0753	20 mM
Rinderkalbserum BCS	Sigma-Aldrich 12133C	0,5 ml
Isolationstyrode		4,5 ml

Tabelle 3: Lösung zum Abstoppen der Enzymlösung

Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion fand eine 2%-Rinderkalbserum-Lösung (BCS) zusammen mit 20 mM 2,3-Butandionmonoxim (BDM) Verwendung (siehe Tabelle 3). Nach Filtrierung der abgestoppten Isolutionslösung durch ein Zellsieb, konnten restliche makroskopische Gewebestücke abgefangen werden und eine Lösung, die nur die isolierten Kardiomyozyten enthielt, entstand.

Die Gewebestückchen wurden in das Isolationsgefäß zurückgeführt und mit der Storage-Lösung gewaschen, um noch etwaige restliche Zellen aus dem Gewebe aufzufangen (siehe Tabelle 4). Durch das ebenfalls in der Storage-Lösung enthaltene BDM sollten die Zellen davon abgehalten werden zu kontrahieren, wodurch sie weniger Energie verbrauchten und so länger vital waren.

Danach kamen wieder die Schere und die gekürzte Pasteurpipette zum Einsatz. Auch diese Lösung wurde nun durch das Zellsieb vorsichtig filtriert.

Chemikalie	Firma / Produktnummer	Konzentration
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth 6781.1	30 mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich P9791	10 mM
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth KK36.1	1 mM
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Carl Roth 9105.3	10 mM
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Carl Roth X997.2	11 mM
Taurin (C ₂ H ₇ NO ₃ S)	Sigma-Aldrich T0625	20 mM
Glutaminsäure (C ₅ H ₉ NO ₄)	Carl Roth 1743.2	70 mM
2,3-Butandionmonoxim BDM (C ₄ H ₇ NO ₂)	Sigma-Aldrich B0753	10 mM
Rinderserum BCS	Sigma-Aldrich 12133C	2 %
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth 6751.1	Pufferung bis pH 7,4 bei Raumtemperatur

Tabelle 4: Storage-Lösung

Beide Filtrate wurden bei 95 G (780 rpm mit 140 mm Radius) zehn Minuten lang zentrifugiert. Das Abstoppen erfolgte sehr behutsam ohne Bremse. Danach war ein kleines Pellet zu sehen. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes konnte dieser verworfen werden. Anschließend wurde weitere Storage-Lösung auf die Pellets gegeben, um sie darin zu suspendieren (68).

Nun erfolgten sowohl eine weitere Kontrolle der Zelldichte, als auch die Beurteilung, wie viele Zellen isoliert wurden und die Bestimmung der optischen Qualität. Diese hängt davon ab, wie viele vitale Zellen und wie viel Zellschrott vorhanden waren (siehe Abbildung 9). Die Kardiomyozyten sollten nach der Isolation eine möglichst scharf abgrenzbare Zellmembran und eine deutlich sichtbare Querstreifen aufweisen (siehe Abbildung 10). Das Vorkommen vieler Erythrozyten schmälerte die Qualität. Die Bestimmung der optischen Qualität fand mithilfe des Mikroskops Leitz dmil (Typ 090-131.002) der Firma Leica Microsystems GmbH statt.



Abbildung 9: Zellen und Zellschrott nach der Isolation und Zentrifugation
zur Verfügung gestellt von Felicia Steuer (Universitätsklinikum Regensburg)

Danach schloss sich der sogenannte Kalziumaufbau an. Hierfür wurde die Kalziumkonzentration zuerst auf 0,2 mM CaCl_2 erhöht. Nach 10 Minuten erfolgte dann der zweite Schritt mit einer Endkonzentration von 0,3 mM CaCl_2 .

Anschließend waren die Zellen bereit zum Ausplattieren. Hierfür kam zum Bestreichen der Messkammern 4 μl Laminin (Sigma-Aldrich L2020) zum Einsatz. Die Konzentration des Laminins lag bei 1-2 mg/ml. Anschließend wurde die Zellsuspension langsam und vorsichtig aufgetragen. Bis die Zellen am Laminin hafteten, musste eine halbe Stunde gewartet werden. Dieser Vorgang wird als Settlement bezeichnet. Die Polymerböden (ibidi GmbH 10814) der Messkammern waren speziell mit sogenanntem ibiTreat beschichtet, damit die Zellen zusätzlicher besser anhafteten.



Abbildung 10: einzelne atriale Kardiomyozyte nach der Isolation
zur Verfügung gestellt von Felicia Steuer (Universitätsklinikum Regensburg)

Die Untersuchungen der Zellen erforderten den Einsatz eines Reagenz mithilfe dessen das intrazelluläre Kalzium sichtbar gemacht werden konnte. Dies gelang mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der im nächsten Abschnitt näher betrachtet wird.

2.3. Fluoreszenztechnische Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Fluo-4

Als Kalziumindikator und Fluoreszenzfarbstoff wurde Fluo-4 eingesetzt (siehe Abbildung 11). Dieser Farbstoff ist sehr kalziumsensitiv mit einer K_d für Kalzium von etwa 345 nM. Das bedeutet, dass er an Kalziumionen bindet und danach seine Fluoreszenzeigenschaften ändert. Die optimale Anregungswellenlänge liegt hierbei bei 488 nm. Das gesamte Fluoreszenzspektrum von Fluo-4 ist in Abbildung 12 zu sehen. Die Kalziumkonzentration, bei der man diesen Farbstoff verwendet, liegt zwischen 100 nM und 1 μ M (69) und damit genau im physiologischen Bereich der Herzmuskelzellen.

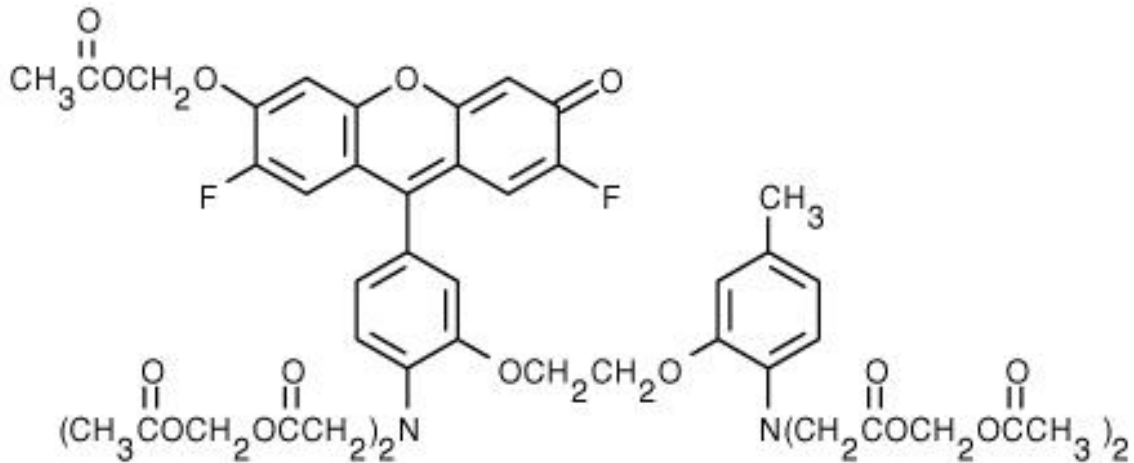


Abbildung 11: Strukturformel von Fluo-4

Aus (70)

Fluo-4 ist dem bereits länger verwendeten Fluo-3 sehr ähnlich, allerdings besitzt der neuere Farbstoff eine deutlich hellere Fluoreszenz. Deshalb ist es möglich auch bei sehr niedrigen Kalziumkonzentrationen ein gutes Signal zu erhalten (69).

Fluo-4 liegt als Azetoxymethylester vor, der so die Zellmembran durchdringen kann (70). In der Zelle wird die Estergruppe durch unspezifische zytosolische Esterasen abgebaut, wodurch der Farbstoff schließlich an die Kalziumionen binden und fluoreszieren kann (71).

Mithilfe von Fluo-4 lassen sich allerdings keine ratiometrischen Messungen zellulärer Kalziumkonzentrationen vornehmen. Wie bei nicht ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffen üblich verändert sich bei Fluo-4 nämlich die Wellenlänge des Exzitations- oder Emissionslichts durch das Zielion nicht (72).

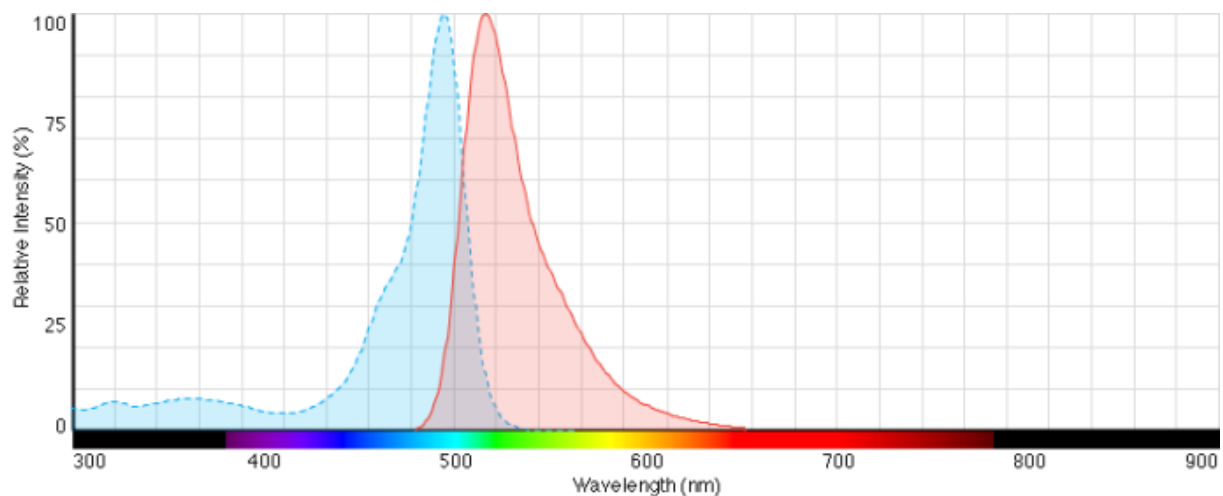


Abbildung 12: Exzitations- (blau) und Emissionsspektrum (rot) von Fluo-4

Aus (70)

Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Hierfür wurden 50 µg Fluo-4 (Life Technologies F14201) in 46 µl DMSO gelöst. Aus diesem Stock wurden 5 µl mit 1 µl Pluronic® F-127 (LifeTechnologies P3000MP) gemischt, um so Mizellen zu erzeugen und die Zellmembranpermeabilität zu erhöhen.

Zu der Fluo-4-Pluronic® F127-Suspension wurde danach die 500 µl der Messtyrode (siehe Tabelle 5) mit 0,5 mM Kalziumkonzentration hinzugegeben. Es wurden fünf verschiedene Lösungen hergestellt, wobei sich nur die Zusätze der Messtyrode unterschieden. Diese enthielten jeweils 0,1 % Dimethylsulfoxid DMSO ((CH₃)₂SO) (Sigma-Aldrich D8418), 2 µM des CaMKII-Inhibitors AIP (AnaSpec Inc. AS-64929) und RA123456 in den Konzentrationen 1 µM, 3 µM und 10 µM.

Chemikalie	Firma / Produktnummer	beinhaltet
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth 6781.1	4 mM
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich S7653	140 mM
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth KK36.1	1 mM
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Carl Roth 9105.3	5 mM
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Carl Roth X997.2	10 mM
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich 21115	1 mM
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth 6771.3	Pufferung bis pH 7,40 bei Raumtemperatur

Tabelle 5: Messtyrode ohne Inhibitoren (Normaltyrode)

Nach dem Settlement der Zellen wurde der Überstand der Messkammer verworfen und 250 ml der fertigen Fluoreszenzfarbstoff-Indikator-Lösung hinzugefügt. Diese Inkubation dauerte eine weitere halbe Stunde. Danach konnten die Zellen mit dem konfokalen Lasermikroskop untersucht werden.

2.4. Konfokales Lasermikroskop



Abbildung 13: konfokales Lasermikroskop von Zeiss mit der Scansoftware ZEN
aus (73)

Die konfokale Lasermikroskopie stellt eine besondere Variante der Lichtmikroskopie dar. Bei einem normalen Lichtmikroskop wird das gesamte Objekt sofort komplett dargestellt. Die konfokale Lasermikroskopie hingegen detektiert anstatt des ganzen Objekts immer nur einen Punkt. So ist es notwendig, dass der Laser das ganze Objekt Punkt für Punkt abtastet und auf diese Weise scannt. Später werden diese Punkte schließlich zu einem gemeinsamen Bild wieder zusammengesetzt (74). Es wurde das konfokale Lasermikroskop LSM 700 der Carl Zeiss AG mit Sitz in Oberkochen verwendet, worauf sich auch alle folgenden technischen Daten beziehen. Als Lichtquelle diente ein Feststofflaser mit polarisationserhaltender Einmodenfaser. Es wurde entsprechend der Anregungswellenlänge des Fluo-4 mit einem monochromatischen Laser mit der Wellenlänge von 488 nm verwendet.

Die Lichtstrahlen werden über die sogenannte Strahlenvereinigungsspiegeltreppe fokussiert. Durch galvanometrische Spiegel, durch die das punktweise Scannen ermöglicht wird, gelangt der Laser schließlich zum Objekt. Hier trifft der Laser auf den Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4, der durch dieses Exzitationslicht angeregt wird selbst Licht zu emittieren. Dieses Emissionslicht beinhaltet allerdings nicht nur das gewünschte Fluoreszenzlicht sondern auch Teile des ursprünglichen Lasers. Dieses unerwünschte Licht wird vom sogenannten Farbteiler herausgefiltert. Das

Fluoreszenzlicht gelangt im daraufhin über die Lochblende und einen Emissionsfilter auf den Photomultiplier, der als Detektoren fungiert. Aus den daraus gewonnenen Informationen erstellt die Software dann das Bild (73).

Ein besonderes Merkmal der konfokalen Lasermikroskopie ergibt sich aus dem Zusammenspiel zwischen Farbteiler und Lochblende. Der Farbteiler funktioniert als dichroischer Spiegel, d.h. er trennt das Exzitations- vom Emissionslicht, da diese unterschiedliche Wellenlängen aufweisen. Auf diese Art und Weise trifft nur das Emissionslicht auf die Lochblende. Je nach Lochblende gelangen zwar weniger Photonen zum Detektor. Es lassen sich aber hierdurch Photonen bzw. Informationen von nicht fokussierten Bereichen des Objekts ausblenden. Folglich wird der Kontrast erheblich erhöht und unerwünschtes Streulicht minimiert (75). Die Größe der Lochblende reguliert schließlich, wie viel Licht zum Detektor gelangt. Dabei gilt die Regel: Je kleiner die Lochblende, desto höher ist auch die Auflösung (74).

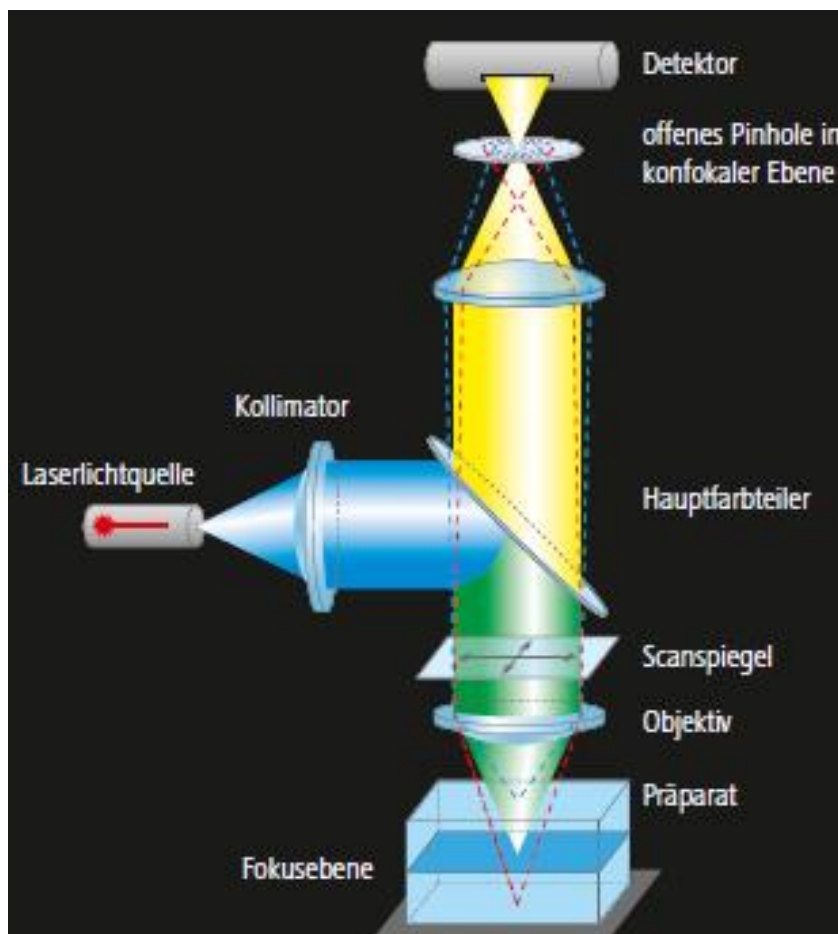


Abbildung 14: Schema des Strahlengangs des konfokalen Mikroskops

Aus (73)

Das gesamte System wird mithilfe eines Computers gesteuert, der das Signal schließlich verarbeitet und als Bild darstellt. Das Mikroskop selbst wird dazu benutzt, die einzelnen Zellen in der Messkammer einzustellen. Diese werden dann mithilfe der Software ZEN der Carl Zeiss AG gescannt (Punktscanner). Durch die Methode entstehen Bilder mit einer Raumdimension und einer Zeitdimension, die die punktgenauen Informationen des Scans enthalten (Linescan). Die so erstellten Linescans wurden als lsm-Datei gespeichert.

Die Scangeschwindigkeit lag bei 1309,65 Bildzeilen pro Sekunde und die Pixelgröße bei 0,0695 μm . Für die Detektion der Sparks wurde mit 10000 Bildzeilen und für die Messung mit Caffein (siehe unten) mit 30000 Bildzeilen mit je 512 Pixeln gemessen. Die Breite pro Linescan liegt somit bei 35,57 μm mit einer Scanzeit von 7636 ms bei der Sparkmessung und entsprechend 22908 ms bei den Caffeinmessungen. Dabei wurde immer unidirektional gemessen.

Die Messkammern wurden in eine Halterung eingespannt, damit das 40x-Immersionsölobjektiv herangefahren werden kann. Während der Messung fand kontinuierlich eine Superfusion mit der Messtyrode unter Raumtemperatur statt, die jeweils den inkubierten Inhibitor in der gleichen Konzentration enthielt. Pro Messkammer gab es also eine eigene Superfusionslösung bzw. Messlösung, die entweder 1 μM , 3 μM , 10 μM des neuartigen CaMKII-Inhibitors RA123456, AIP oder die Messtyrode mit DMSO beinhaltete.

Die Zellen in der Messkammer wurden mithilfe elektrischer Feldstimulation über zwei Elektroden an den Kammerwänden mit 1 Hz zum Schlagen gebracht. Diese Stimulation wurde allerdings während des Scanvorgangs abgeschaltet, um die diastolischen Kalziumfreisetzungseignisse aus dem SR zu detektieren. Die gesamte Messung fand in einem abgedunkelten Raum statt, in der nur eine Rotlichtlampe brannte.

Um etwaige systematische Fehler zu vermeiden, wurde bei jeder Messung die Reihenfolge der verwendeten Inhibitorkonzentrationen variiert.

2.5. Kalziumsparks und Bestimmung des SR-Kalziumgehaltes

Wie oben schon erwähnt sind die kleinen Kalziumentladungen der Sparks aus dem SR wichtiger Bestandteil der Zellphysiologie und von entscheidender Wichtigkeit bei der elektromechanischen Kopplung. Es gibt sowohl die physiologisch ausgelösten Sparks in der Systole, die für die Kontraktion essentiell sind, als auch die spontanen Entladungen in der Diastole (10).

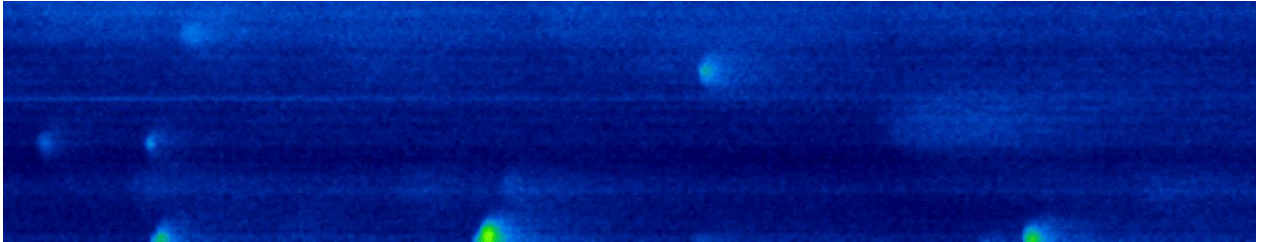


Abbildung 15: Original Linescan einer Zelle ohne Inhibitoreinfluss

Kalziumsparks lassen sich durch spezifische Eigenschaften charakterisieren. Sie haben einen sowohl steilen als auch schnellen Anstieg und einen vergleichsweise verzögerten Abfall in der Amplitude. Sie finden auf einem kleinen Bereich innerhalb der Zelle statt und besitzen nur eine geringe Breite und Dauer. Es gelang Sparks auch in glatter Muskulatur, Skelettmuskulatur, in Nervenzellen und in Fibroblasten zu detektieren. (76). In Abbildung 15 ist ein Originallinescan einer Zelle ohne Inhibitoreinfluss zu sehen. Man erkennt deutlich die Sparks, die sich als helle Blitze vom Hintergrund deutlich abheben.

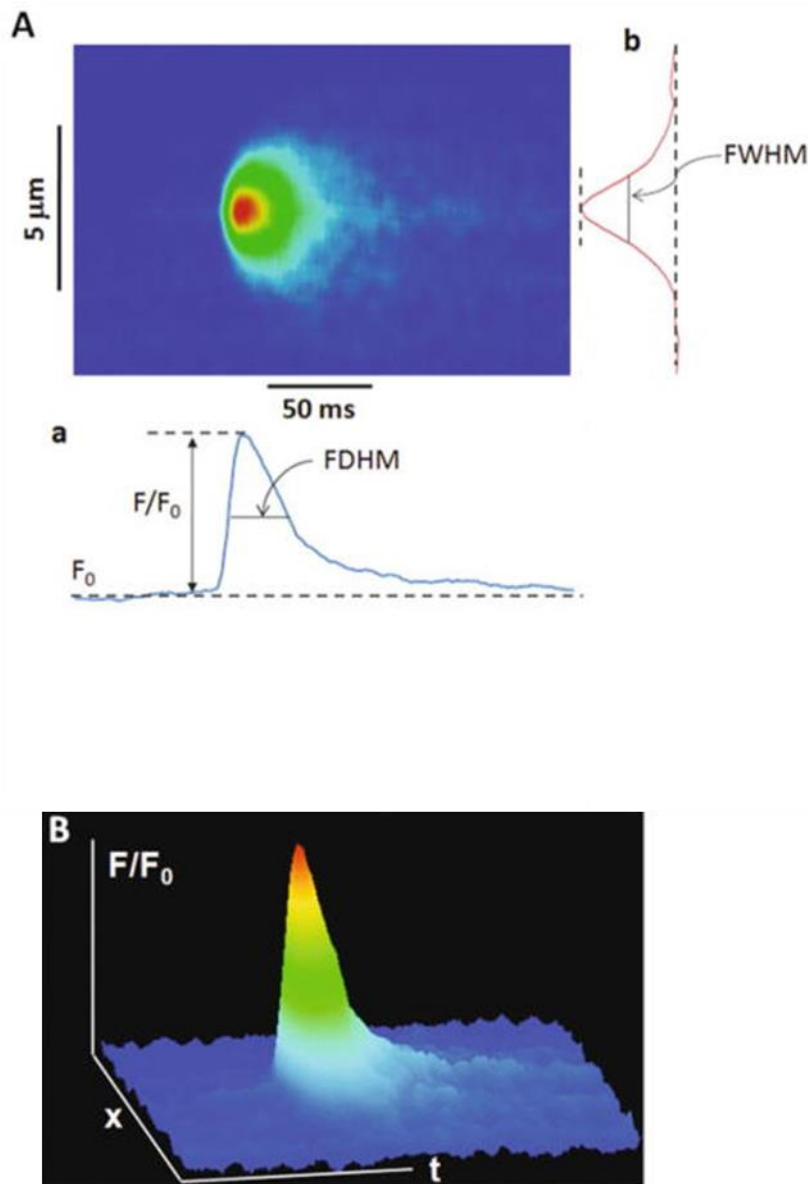


Abbildung 16: zweidimensionaler Spark (A) und die entsprechende dreidimensionale Darstellung (B)

Modifiziert aus (76)

Bei der Messung der Sparks wurden sowohl die Frequenz, als auch die Amplitude sowie die Dauer und die Breite untersucht. Bei der Breite wurde die Breite bei halbmaximaler Amplitude (FWHM) gemessen und bei der Dauer die Dauer bei halbmaximaler Amplitude (FDHM). Dies ist beispielhaft an der Abbildung 16 zu erkennen. Hier wird sehr anschaulich auch die Amplitude gezeigt. Sie ist das Signal F/F_0 als Quotient des Peaks und der Baseline. Es werden auch die beiden Dimensionen des Linescans gezeigt. Die x-Achse stellt die räumliche und die t-Achse die zeitliche Dimension dar.

Es wurden von insgesamt 19 Patienten die Zellen auf Sparks untersucht.

Einen weiteren Teil stellten die Untersuchungen der Zellen mit Caffeinexposition dar, um den SR-Kalziumgehalt zu bestimmen.

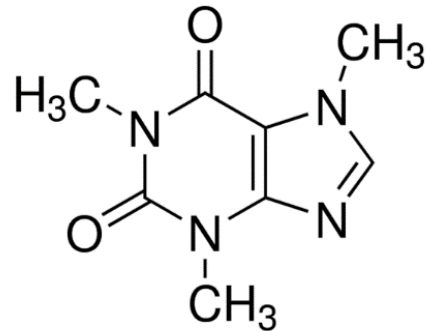


Abbildung 17: Strukturformel von Caffein
aus (77)

Caffein ist ein Alkaloid mit der Summenformel $C_8H_{10}N_4O_2$ und wirkt vor allem stimulierend auf das zentrale Nervensystem. Die Strukturformel ist in Abbildung 17 dargestellt. Es hat allerdings noch viele weitere Wirkungen, die vermutlich unter anderem durch die Hemmung von sowohl Adenosinrezeptoren als auch den Abbau von cyclischem Adenosinmonophosphat vermittelt werden. Es spielt aber auch eine Rolle im Kalziumhaushalt (77). Durch gezielte Applikation einer Caffeinlösung in die unmittelbare Umgebung einer Zelle kommt es nämlich zur sofortigen und vollständigen Entleerung des SR durch gleichzeitige Öffnung aller verfügbaren Ryanodinrezeptoren. Dadurch tritt eine Schwankung der zytosolischen Kalziumkonzentration auf: Ein sogenannter Kalziumtransient entsteht, dessen Amplitude ein Maß für die freigesetzte Kalziummenge ist. Diese korreliert direkt mit dem Kalziumgehalt im SR (78). In Abbildung 18 ist ein Originallinescan einer Messung mit Caffein zu erkennen. Die plötzliche Entleerung des SR ist deutlich als starke Signalanhebung zu erkennen.



Abbildung 18: Original Linescan eines Caffeintransienten
Das Caffein wurde direkt vor dem verstärkten Signal appliziert

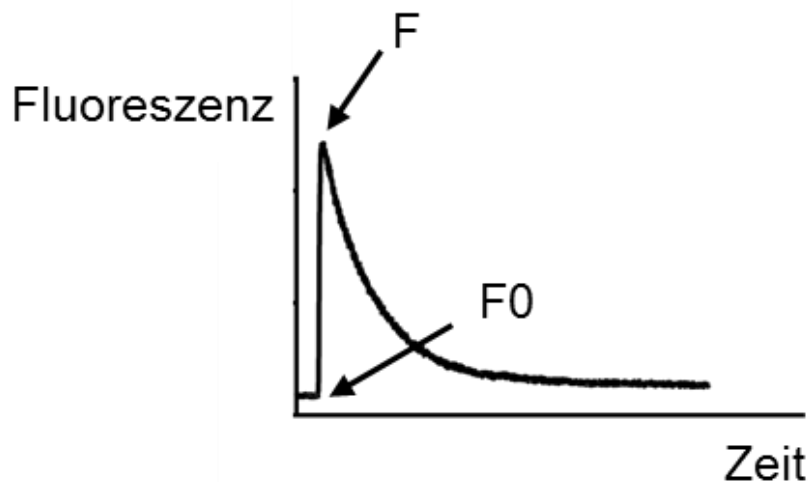


Abbildung 19: Darstellung eines Original Linescan eines Caffeintransienten als Funktion

Diagramm aus Prism Graph Pad 6

Die wichtigste Information für den Kalziumgehalt im SR ergibt sich hier aus der Darstellung als Fluoreszenzamplitude als Funktion der Zeit (siehe Abbildung 19). So erhält man eine Kurve, bei der es eine Baseline gibt. Der steile Anstieg ist dann gefolgt von einem exponentiellen Abfall, der sich wieder asymptotisch der Baseline nähert. Dabei wird der Peak der Amplitude als F und die Baseline als F0 bezeichnet. Dieser Quotient F/F_0 wurde als Maß für den SR-Kalziumgehalt genommen.

Für Caffeinlösung enthielt 10 mM Caffein (Sigma-Aldrich C0750) und war in der Normaltyrode (Tabelle 5) gelöst.

Die Experimente mit Caffein erfuhren Zellen von 18 Patienten. Sowohl die Messung von Sparks als auch die Untersuchungen mit Caffein standen bei den meisten Patienten im Vordergrund, wobei vereinzelt nur eine der genannten Messungen Umsetzung fand. So wurden insgesamt 22 Patienten untersucht.

2.6. Inhibition der Kalzium-Calmodulin-abhängige Protein Kinase II

Die Hemmung der CaMKII erfolgte durch zwei verschiedene Wirkstoffe. Zum einen wurde der bereits bekannte Inhibitor des Enzyms AIP und zum anderen der neue Inhibitor RA123456 verwendet.

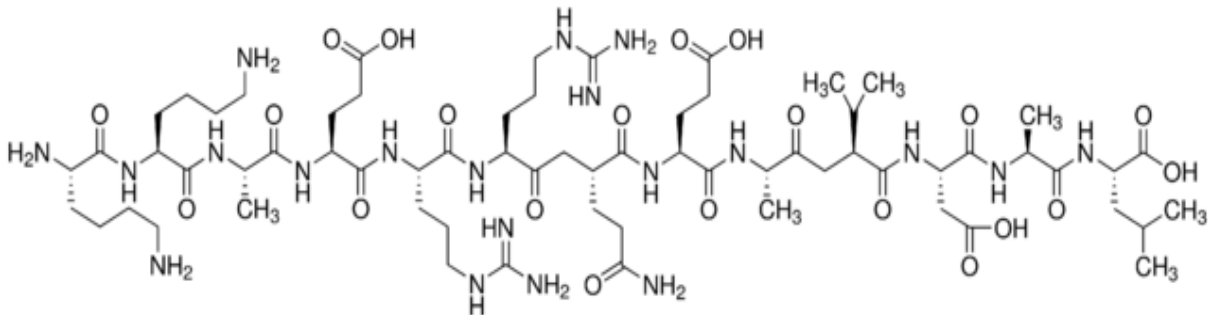


Abbildung 20: Strukturformel von AIP

Aus (79)

Als synthetisches Peptid ahmt AIP ein Substrat nach und bindet so an die katalytische Untereinheit der CaMKII. Dadurch kommt es zur kompetitiven Hemmung des Enzyms. Die Inhibition der CaMKII ist hierbei wesentlich stärker als anderen Kinasen gegenüber und somit relativ spezifisch. Außerdem zeigte AIP eine vielfach stärkere Hemmung auf die CaMKII als KN-93, der ein allosterischer Hemmstoff der CaMKII ist (80). In Abbildung 20 ist die Strukturformel von AIP zu sehen.

Verwendet wurde AIP in einer Konzentration von 2 μM mit einer halbstündigen Inkubationszeit der Zellen. In Abbildung 20 ist die Strukturformel von AIP dargestellt.

RA123456 wurde von einer bekannten pharmazeutischen Firma zu Verfügung gestellt. Es handelt sich ebenfalls um einen kompetitiven Hemmstoff des katalytischen Zentrums an der ATP-Bindestelle. Um die beste Dosis-Wirkungsbeziehung herauszufinden, wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors verwendet. So erfuhren die Zellen eine halbstündige Inkubation mit je 1 μM , 3 μM und 10 μM des RA123456 für.

2.7. Auswertung

Zur Auswertung der Linescans wurde das gemeinfreie Programm ImageJ mit dem Plug-In Sparkmaster verwendet (81). Dieses erkennt die Sparks auf dem Scan anhand ihrer Abweichung von der basalen Fluoreszenz und gibt für jeden Spark seine Amplitude, die Breite und die Dauer an.

Daraus errechnet sich dann das Kalziumleck, indem man die Sparkfrequenz, die in $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ angegeben ist, mit der Amplitude, der Breite und der Dauer multipliziert. Die von ImageJ und Sparkmaster erkannten Sparks wurden alle nochmals überprüft, da das Programm auch einige falschpositive Treffer vorgibt. Kriterien für einen Spark sind seine rundovale Form, seine Größe und der Unterschied zum Hintergrund. Nicht mit in die Statistik sind die Daten von Zellen eingeflossen, die entweder eine Wave oder ein sogenanntes Sparkgewitter zeigten. Das ist ein Phänomen, wenn mehr als 30 Sparks in einer Zelle zu sehen sind. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Zellen, die morphologisch nicht intakt wirkten.

Neben der visuellen Selektion kam zusätzlich noch ein statistischer Ausreiserstest für die verschiedenen Darstellungen der Ergebnisse zum Einsatz.

Durch die Software Microsoft Excel erfolgte die Auswertung der Caffein-Transienten. Hier wurde der Quotient F/F_0 ausgerechnet, der sich aus der Baseline (F_0) und dem Peak der Amplitude (F) zusammensetzt. Dargestellt wird dann $\Delta F/F_0$, das entsteht, wenn man von F/F_0 1 subtrahiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism Graph Pad 6 und IBM SPSS Statistics 22.0 von Microsoft. Es wurde für den Vergleich zwischen Vorhofflimmern und Sinusrhythmus unter Baselinebedingungen und für die klinischen Daten der Patienten der T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Außerdem wurde der Chi²-Test durchgeführt.

Für den Vergleich der verschiedenen Gruppen der Inhibitoren fand der ANOVA-Test Anwendung.

Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert von kleiner als 0,05 angesehen. In den Diagrammen werden alle Ergebnisse als Mittelwert dargestellt. Der Fehlerbalken entspricht dem standard error of the mean (SEM). Die schriftliche Darstellung der Daten der konfokalen Mikroskopie verwendet ebenfalls den Mittelwert mit Angabe des SEM. Für die Darstellung der Patientendaten wurde der Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung verwendet.

Die klinischen Daten der Patienten wurden den Arztbriefen der Patienten entnommen. Abweichungen der Gesamtsumme liegen an der Unvollständigkeit bzw. der Ungenauigkeit der Informationen der Arztbriefe. Die Grenzwerte der klinischen Daten der Patienten ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Für die klinischen Daten erfolgte folgende Festsetzung der Grenzwerte:

Kriterium	zutreffend wenn	nicht zutreffend wenn
Herzinsuffizienz	Ejektionsfraktion < 55 %	Ejektionsfraktion ≥ 55 %
Vorhof vergrößert	Volumen ≥ 20 cm ² oder Durchmesser ≥ 40 mm	Volumen < 20 cm ² oder Durchmesser < 40 mm
Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser vergrößert (LVEDD)	≥ 56 mm	< 56 mm
Intraventrikuläres Septum Vergrößert (IVS)	≥ 12 mm	< 12 mm
Klappenstenose	Grad 1 oder größer	Keine Stenose
Klappeninsuffizienz	Grad 1 oder größer	Keine Insuffizienz

Tabelle 6: Patientendatengrenzwerte

Der Wert des N-terminalen Propeptids des natriuretischen Peptids vom Typ B (NTproBNP), das bei Herzinsuffizienz erhöht sein kann, wurde zusätzlich als natürlichen Logarithmus dargestellt, da dieser Laborwert in dieser Kohorte nicht der Normalverteilung unterlag. Der hierfür durchgeführte T-Test bezieht sich auf die logarithmierte Form.

Die Ethikkommission der Universität Regensburg hat die Studie der vorliegenden Arbeit geprüft und genehmigt.

3. Ergebnisse

Es folgen nun die Ergebnisse der Experimente. Zuerst wird die Sparkfrequenz dargestellt und anschließend erfolgt die Betrachtung der einzelnen Charakteristika der Sparks. Diese beinhalten die Amplitude, die Breite und die Dauer der Spark. Schließlich folgt die Gesamtbetrachtung als Kalziumleck aus dem SR, das alle Eigenschaften der Sparks enthält.

Danach erfolgt die Analyse der Ergebnisse der Untersuchungen Caffein für Rückschlüsse auf dem SR-Kalziumgehalt. Anschließend an die jeweiligen Messungen werden die relevanten klinischen Daten der Patienten vorgestellt.

Daraufhin folgt die Diskussion mit der Betrachtung der Ergebnisse, deren Einordnung in die vorhandene Literatur sowie die Bedeutung der Untersuchungen. Außerdem werden Limitationen und ein Ausblick der Thematik aufgezeigt.

3.1. Die Sparkfrequenz sinkt unter Einfluss der CaMKII-Inhibition

Da bei erhöhter CaMKII-Aktivität die Sparkfrequenz erhöht ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Die Sparkfrequenz ist nämlich entscheidend bei der Erhöhung des diastolischen intrazellulären Kalziumgehalts und des Kalziumlecks aus dem SR bei erhöhter CaMKII-Aktivität beteiligt.

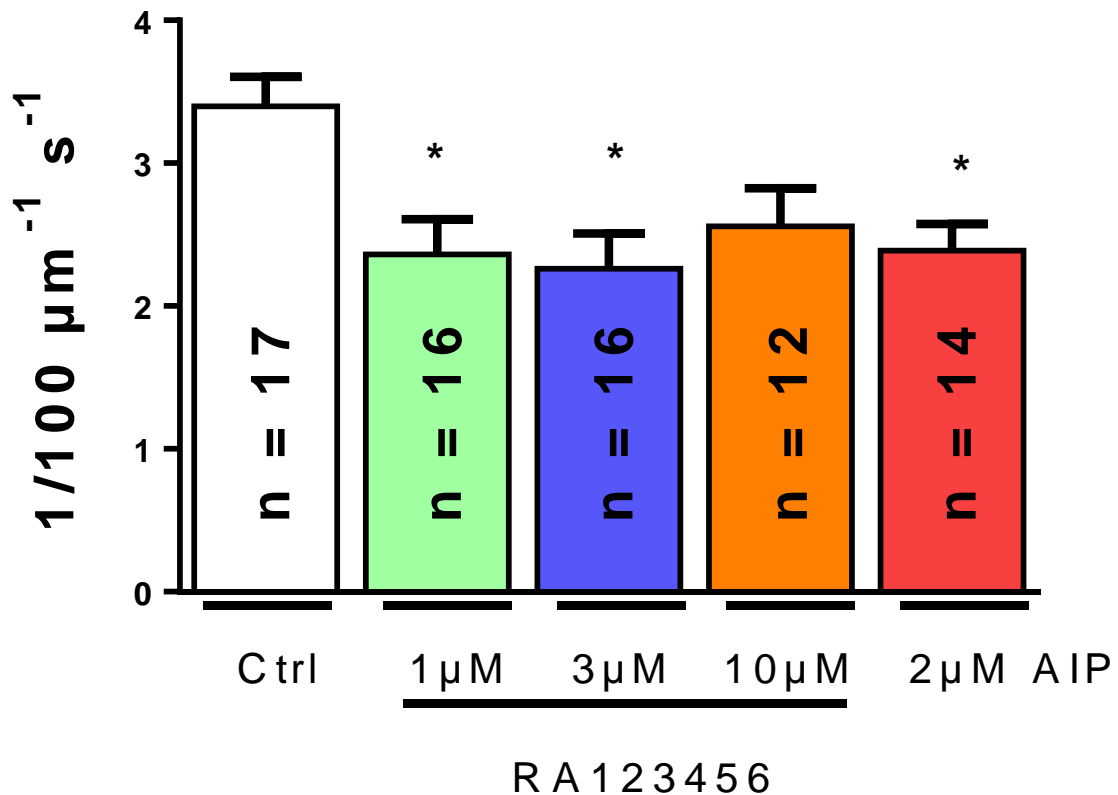


Abbildung 21: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkfrequenz

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 μM, blau für 3 μM und orange für 10 μM von RA123456, rot steht für AIP; * ist signifikant zur Kontrollgruppe

Die Kalziumsparkfrequenz lag unter basalen Bedingungen, also ohne Einfluss von Inhibitoren bei $3,399 \pm 0,2051$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$. Nach halbstündiger Inkubation mit dem CaMKII-Inhibitor RA123456 sank sie erfreulicher Weise auf einen Wert von $2,361 \pm 0,2472$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ bei der 1 μM Konzentration, auf $2,260 \pm 0,2479$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ bei 3 μM und auf $2,559 \pm 0,2645$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ bei 10 μM. Unter Einfluss des

bekanntes CaMKII-Inhibitor AIP verringerte sich die Sparkfrequenz konsequenter Weise auf $2,387 \pm 0,1888 \text{ 1/100 } \mu\text{m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (siehe Abbildung 21).

Der durchgeführte ANOVA-Test ergab für den Abfall außer bei der $10 \mu\text{M}$ Konzentration von RA123456 in allen Inhibitorgruppen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (P-Wert $> 0,05$). Die P-Werte stellten sich wie in Tabelle 7 zu sehen dar:

Dunnetts multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl vs. $1 \mu\text{M}$	0.0054
Ctrl vs. $3 \mu\text{M}$	0.0020
Ctrl vs. $10 \mu\text{M}$	0.0525
Ctrl vs. AIP	0.0096

Tabelle 7: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Einfluss eines CaMKII-Inhibitors. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Der neuartige Inhibitor zeigt also eine deutliche Wirkung auf die Sparkfrequenz und senkt diese signifikant.

3.2. Die Kalziumsparkfrequenz ist beim Vorhofflimmern erhöht

Um zu überprüfen, ob die CaMKII-Aktivität und damit die Kalziumsparkfrequenz bei Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus erhöht ist, wurde die Untersuchung unter Basalbedingungen durchgeführt (siehe Abbildung 22).

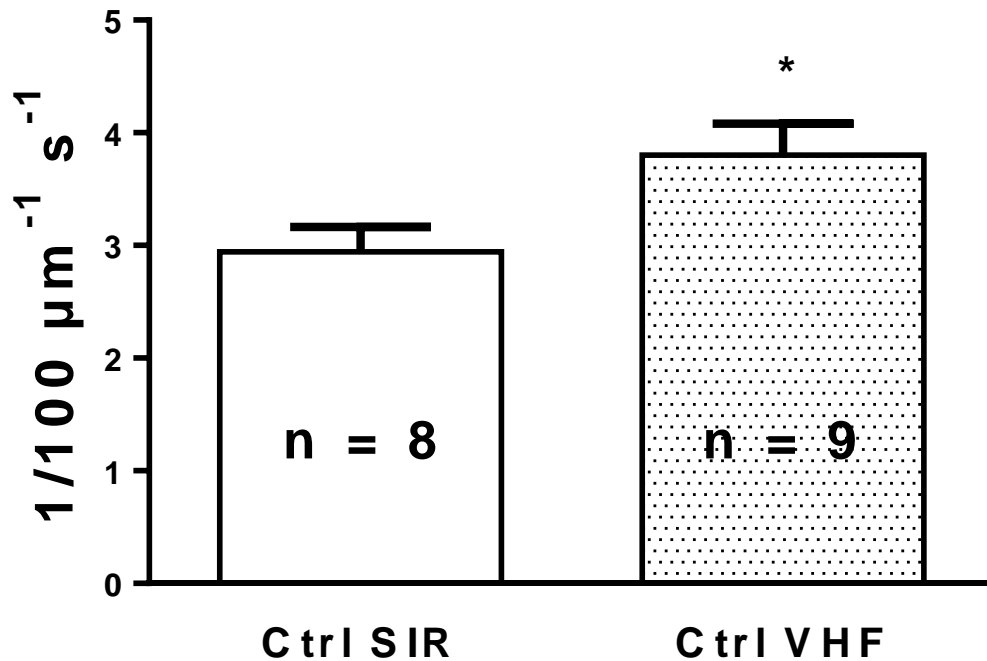


Abbildung 22: Sparkfrequenz Sinusrhythmus im Vergleich zu Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe; Ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus

Die Sparkfrequenz lag beim Sinusrhythmus unter Baselinebedingungen bei $2,944 \pm 0,2203$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$. Interessanterweise ergab sich bei Vorhofflimmern allerdings eine Sparkfrequenz von $3,804 \pm 0,2787$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$. Somit lag die Sparkfrequenz deutlich höher als im Sinusrhythmus

Der ungepaarte T-Test ergab hierbei schließlich einen P-Wert von 0,0311, was einem signifikanten Unterschied entspricht.

Somit lässt sich eindeutig feststellen, dass es in Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern signifikant mehr Sparks gibt, als in Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus.

3.3. Klinische Daten der Patienten, bei denen die Zellen auf Sparks untersucht wurden

Es wurden die klinischen Daten erhoben, um Unterschiede und Parallelen zwischen den Patienten mit Sinusrhythmus und Vorhofflimmern darzustellen. Die Informationen stammen alle aus den Arztbriefen der Patienten. Unter den Vorhofflimmerpatienten waren drei mit der paroxysmalen, sechs permanenten und einer mit der persistierenden Form. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung:

Allgemeine Informationen und relevante Vorerkrankungen:

Kategorie	SIR N = 9 N in Klammern falls abweichend	VHF N = 10 N in Klammern falls abweichend	Chi ² - Test P-Wert	Exakter Test nach Fisher P-Wert	T- Test P- Wert
Alter (Jahre)	60,67±7,45	77,20±4,541			0,000 017
BMI (kg/m ²)	27,46±3,99	29,39±5,31 (9)			0,396
Männliches Geschlecht	7	8	0,906	1	
Koronare Herzkrankheit	9	9	0,330	1	
Z.n. Myokardinfarkt	4	1	0,089	0,141	
Herzinsuffizienz	4	4	0,845	1	
Hyperlipoproteinämie	4	5	0,809	1	
arterielle Hypertonie	7	10	0,115	0,211	
Diabetes Mellitus	2	4	0,405	0,628	
Z.n. Apoplex	0	3	0,073	0,211	
Diastolische Dysfunktion	3 (8)	4 (8)	0,614	1	
HbA1c	6,54±0,36 (2)	7,46±0,99 (5)			0,274
NTproBNP	1439± 3013,44	2649,44±321 2,60 (9)			
In (NTproBNP)	5,77±1,77	7,25±1,24 (9)			0,057

Tabelle 8: Patientendaten zu allgemeinen Informationen und relevanten Vorerkrankungen
SIR steht für Sinusrhythmus und VHF steht für Vorhofflimmern

Es lässt sich somit feststellen, dass Patienten mit Vorhofflimmern in dieser Untersuchung interessanterweise höchst signifikant älter waren, als Patienten mit Sinusrhythmus (siehe Tabelle 8). Das könnte ein möglicher Störfaktor sein. Sonst lassen sich hier keine weiteren signifikanten Unterschiede feststellen. Beachtenswert ist aber, dass Patienten mit Vorhofflimmern tendenziell einen höheren BMI, mehr Schlaganfälle und ein erhöhtes NTproBNP aufwiesen und damit auch tendenziell kränker waren.

Echokardiographie:

Kategorie	SIR N = 9 N in Klammern falls abweichend	VHF N = 10 N in Klammern falls abweichend	Chi²- Test P-Wert	Exakter Test nach Fisher P-Wert	T- Test P- Wert
Linker Vorhof vergrößert	1 (6)	7 (8)	0,008	0,026	
LVEDD vergrößert	1 (7)	2 (9)	0,687	1	
IVS vergrößert	1 (6)	6 (8)	0,031	0,103	
Aortenklappenstenose	0 (8)	3 (9)	0,072	0,206	
Aortenklappeninsuffizienz	2 (8)	2 (7)	0,876	1	
Mitralklappenstenose	0	0			
Mitralklappeninsuffizienz	4 (8)	6 (8)	0,302	0,608	
Trikuspidalklappen- insuffizienz	2 (8)	5 (8)	0,131	0,315	
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	54.25 ±12.27 (8)	48.38±15.829 (8)			0,421

Tabelle 9: Patientendaten zu Echographie
SIR steht für Sinusrhythmus und VHF für Vorhofflimmern

In der Echokardiographie zeigt sich, dass der linke Vorhof bei Patienten mit Vorhofflimmern signifikant größer war, als in der Gruppe mit gesunden Herzrhythmus (siehe Tabelle 9). Auch das interventrikuläre Septum war bei Vorhofflimmerpatienten vergrößert, was einen Hinweis auf die mögliche Ursache (arterielle Hypertonie) liefert. Interessanter Weise war der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser in beiden Gruppen nicht signifikant erhöht, was eine Herzinsuffizienz als Ursache ausschließt. Die Ejektionsfraktion war dementsprechend nicht signifikant vermindert.

Relevante Medikation:

Einnahme von	Sinusrhythmus N = 9 N in Klammern falls abweichend	Vorhofflimmern N = 10 N in Klammern falls abweichend	Chi²- Test P-Wert	Exakter Test nach Fisher P-Wert
Betablockern	7	9	0,466	0,582
Kalziumantagonisten	2	2	0,906	1
ACE-Hemmer/AT1- Blocker	8	9	0,937	1
Statin	6	7	0,876	1
Antiarrhythmikum	0	1	0,33	1
Digitalis	0	1	0,33	1
orale Antikoagulation	0	5	0,013	0,033
ASS 100	9	5	0,013	0,033

Tabelle 10: Patientendaten zur Medikation

Bei der relevanten Medikation der Patienten zeigen sich nur in der Einnahme der oralen Antikoagulation bzw. der Einnahme von ASS signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 10). Vorhofflimmerpatienten nahmen eine orale Antikoagulation ein, während Patienten mit Sinusrhythmus in diesem Kollektiv alle ASS 100 einnahmen. Es bestehen in diesen Kategorien signifikante Unterschiede.

3.4. Die Sparkfrequenz sinkt unter Einfluss der CaMKII-Inhibition im Vorhofflimmern stärker als im Sinusrhythmus

Teilt man nun die bereits beobachteten Sparkfrequenzen nach den beiden Rhythmen auf, ergibt sich folgende Wirkungsverteilung (siehe Abbildung 23):

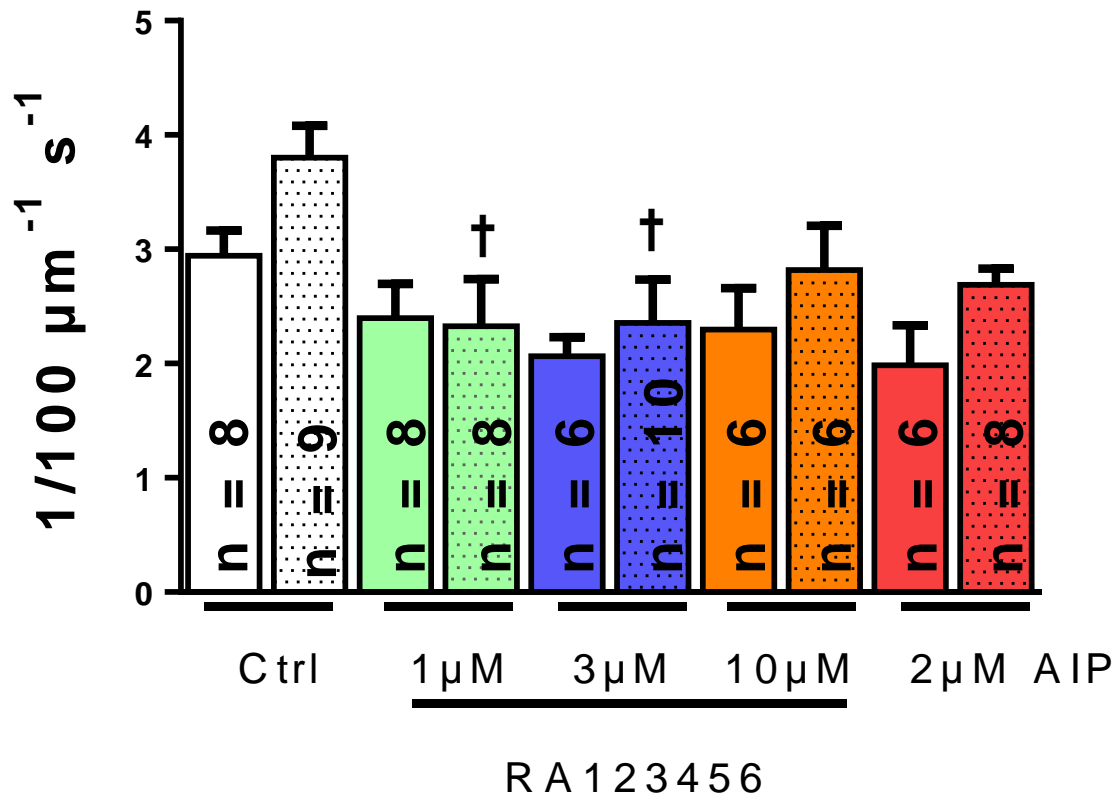


Abbildung 23: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkfrequenz; Sinusrhythmus im Vergleich zu Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 μM, blau für 3 μM und orange für 10 μM von RA123456, rot steht für AIP; ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus und † ist signifikant zur Kontrolle des Vorhofflimmerns

Wie bereits erwähnt lag die basale Sparkfrequenz in der Kontrollgruppe im Sinusrhythmus bei $2,944 \pm 0,2203 \text{ 1/100 } \mu\text{m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und im Vorhofflimmern bei $3,804 \pm 0,2787 \text{ 1/100 } \mu\text{m}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

In Anwesenheit von RA123456 kommt es zu einer wünschenswerten und erfreulichen Reduktion der Kalziumsparkfrequenz, die dosisabhängig ist.

Die 1 μM Konzentration hatte beim Sinusrhythmus einen Wert von $2,396 \pm 0,3025$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ und beim Vorhofflimmern $2,326 \pm 0,4123$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$. Bei 3 μM lag die Sparkfrequenz im normalen Herzrhythmus nur noch bei $2,066 \pm 0,1662$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ und bei der kranken Vergleichsgruppe etwas höher bei $2,357 \pm 0,3771$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$. Die 10 μM Konzentration des neuen CaMKII-Inhibitors wiederum zeigte Werte von $2,299 \pm 0,3624$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ im Sinusrhythmus und $2,819 \pm 0,3865$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ im Vorhofflimmern. Unter Einfluss des Inhibitors AIP sank die Sparkfrequenz sogar auf $1,985 \pm 0,3498$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ bei Sinusrhythmuspatienten im Vergleich zu einem Wert von $2,689 \pm 0,1409$ $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ in der anderen Gruppe.

Es zeigt sich überraschend, dass die basalen Unterschiede zwischen Herzmuskelzellen von Patienten mit Sinusrhythmus und Vorhofflimmern in Anwesenheit von RA123456 ab einer Konzentration von 1 μM nicht mehr nachweisbar sind. Vergleicht man nun mit einem ANOVA-Test alle Gruppe miteinander, ergibt sich folgende Statistik:

Tukeys multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl SIR vs. Ctrl VHF	0.5865
Ctrl SIR vs. 1 μM SIR	0.9607
Ctrl SIR vs. 3 μM SIR	0.6965
Ctrl SIR vs. 10 μM SIR	0.9335
Ctrl SIR vs. AIP SIR	0.5825
Ctrl VHF vs. 1 μM VHF	0.0289
Ctrl VHF vs. 3 μM VHF	0.0203
Ctrl VHF vs. 10 μM VHF	0.5105
Ctrl VHF vs. AIP VHF	0.2293

Tabelle 11: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Inhibitoreinfluss; SIR steht für Sinusrhythmus, VHF für Vorhofflimmern; die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Es kommt zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe des Vorhofflimmerns bei 1 μM und 3 μM in Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern (siehe Tabelle 11). Dennoch zeigt die CaMKII-Inhibition auch im SR eine tendenzielle Wirkung.

Es wird spannender Weise deutlich, dass der Effekt des Inhibitors bei Patienten mit Vorhofflimmern deutlich ausgeprägter ist als bei Menschen mit Sinusrhythmus.

3.5. Der Inhibitor hat keine Auswirkung auf die Amplitude der Sparks

Die Amplitude ist ein charakteristisches Merkmal der Sparks und spiegelt Kalziumkonzentrationsgradienten zwischen SR und Zytosol wider.

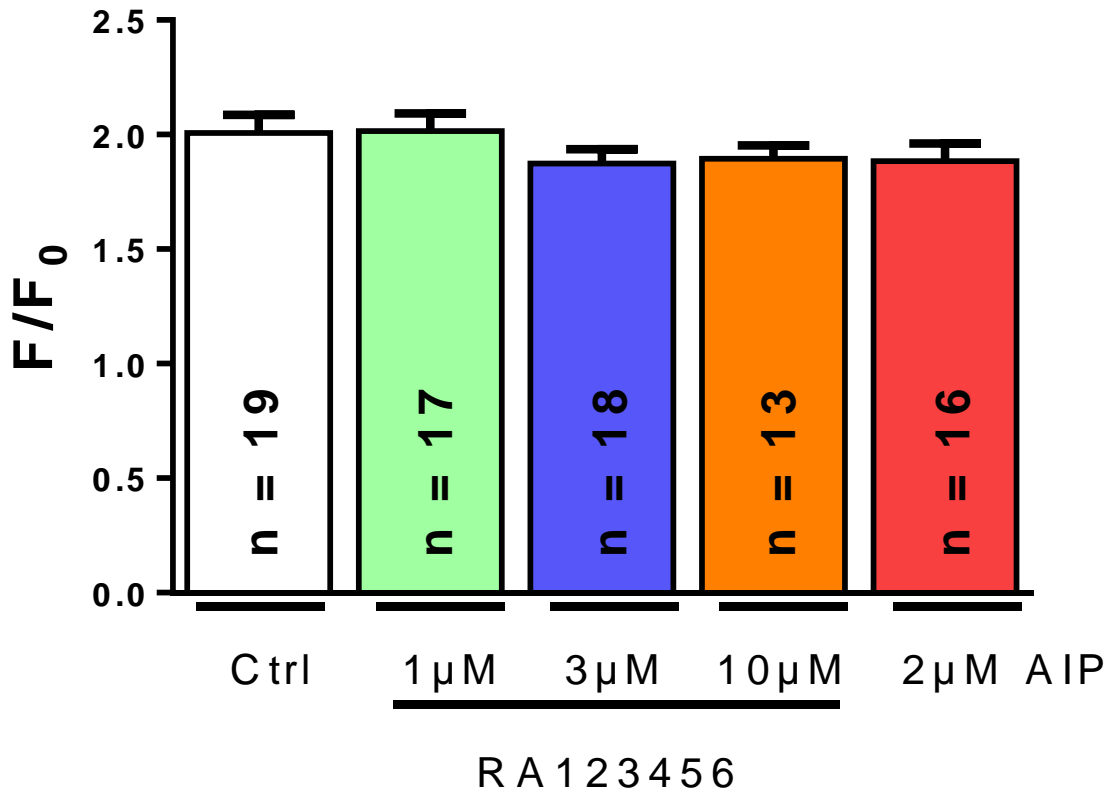


Abbildung 24: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkamplitude

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 μM , blau für 3 μM und orange für 10 μM von RA123456, rot steht für AIP; * ist signifikant zur Kontrollgruppe

Die Amplitude der Sparks ergab bei der Kontrolle ohne Einfluss eines Inhibitors einen Ausgangswert von $2,007 \pm 0,07909$. Unter Einfluss der CaMKII-Inhibition durch RA123456 nach halbstündiger Inkubation zeigte sich ein Wert bei 1 μM von $2,016 \pm 0,07763$, bei 3 μM sogar nur $1,874 \pm 0,06217$ und bei 10 μM wiederum $1,894 \pm 0,05906$. Unter Einfluss von AIP wurde ein Wert von $1,884 \pm 0,07722$ gemessen. Keiner der P-Werte liegt annähernd im Bereich einer Signifikanz (siehe Abbildung 24).

Der durchgeführte ANOVA-Test ergab Folgendes:

Dunnetts multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl vs. 1 μM	0.9999
Ctrl vs. 3 μM	0.4700
Ctrl vs. 10 μM	0.6792
Ctrl vs. AIP	0.5591

Tabelle 12: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Einfluss eines CaMKII-Inhibitors. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Somit hat der Inhibitor interessanter Weise keine signifikante Auswirkung auf die Amplitude der Sparks (siehe Tabelle 12).

3.6. Die Sparkamplitude ist beim Vorhofflimmern erniedrigt

Bei der Amplitude, die ein Maß für die Menge des Kalziumgehaltes eines Sparks ist, ist es besonders spannend, sich die Unterschiede in den beiden Rhythmusgruppen anzusehen:

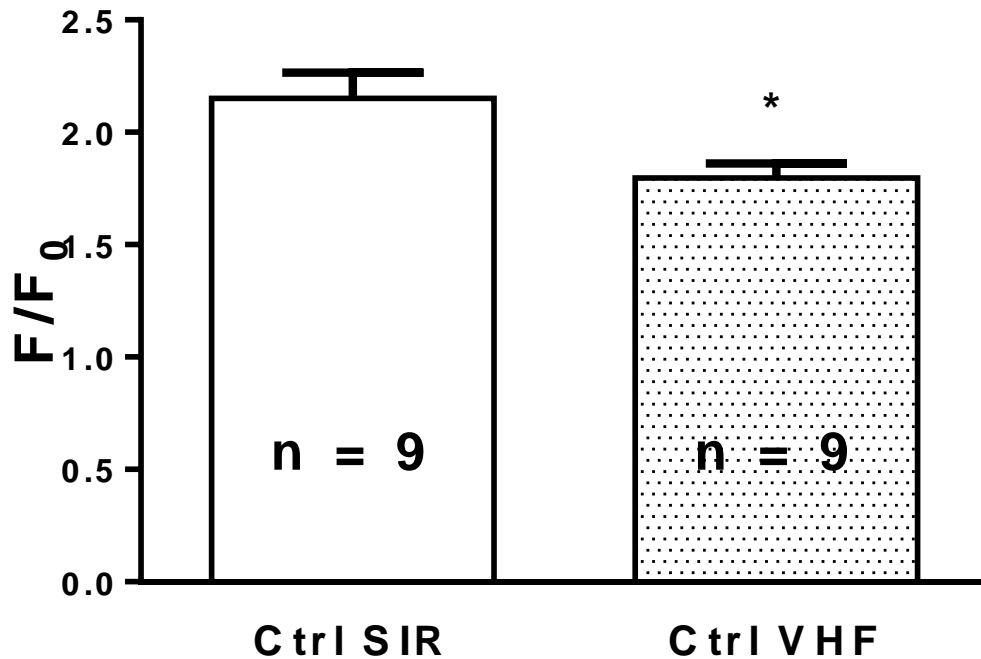


Abbildung 25: Vergleich der Sparkamplitude zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe; Ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus

Teilt man die Werte für die Sparkamplitude in der Kontrollgruppe zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern auf, ergibt sich Folgendes (siehe Abbildung 25): F/F_0 bei Sinusrhythmuspatienten betrug $2,152 \pm 0,1138$, während bei Vorhofflimmerpatienten ein interessanter Wert von $1,798 \pm 0,06392$ gemessen wurde. Dies entspricht im ungepaarten T-Test einem signifikanten Unterschied in den Gruppen bei einem P-Wert von 0,0154.

Somit lässt sich deutlich feststellen, dass Sparks von Patienten mit Vorhofflimmern eine signifikant geringere Amplitude haben.

3.7. Die Auswirkung des Inhibitors auf die Sparkamplitude im Vergleich zwischen Vorhofflimmern und Sinusrhythmus ist gering

Die Aufteilung der bereits bekannten Werte für die Amplitude der Sparks lässt Folgendes erkennen:

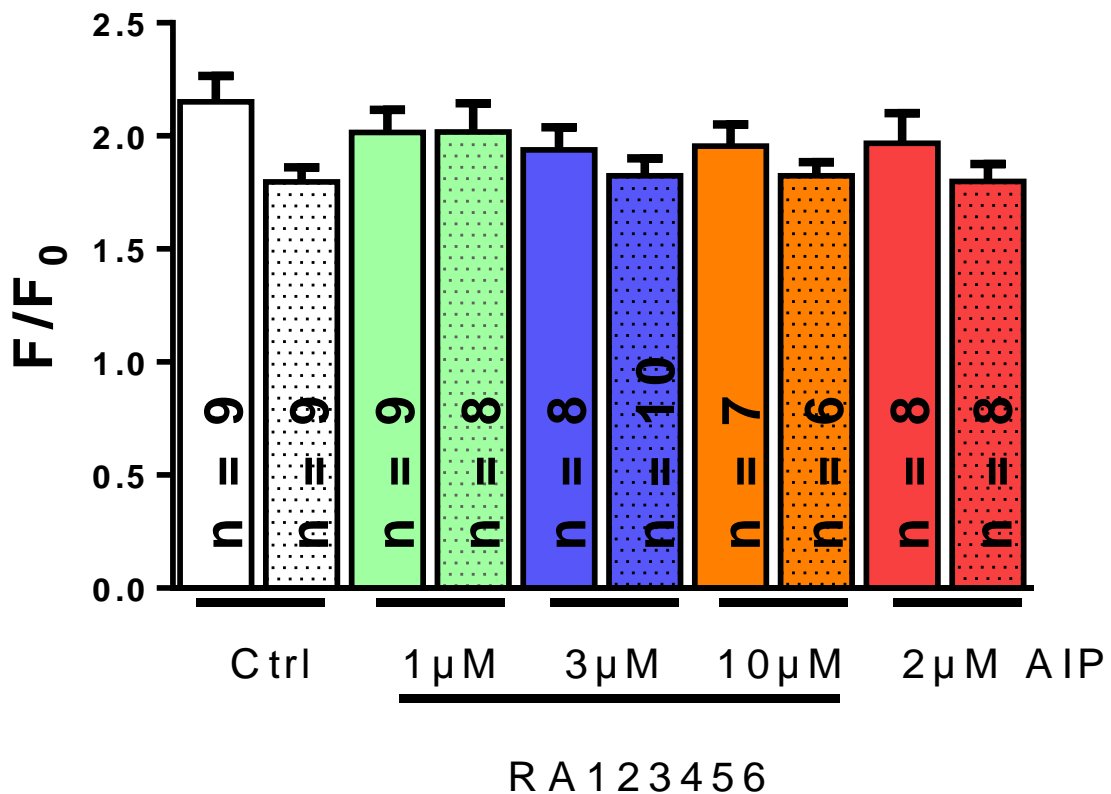


Abbildung 26: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Amplitude der Sparks; Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 µM, blau für 3 µM und orange für 10 µM von RA123456, rot steht für AIP; ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus und † ist signifikant zur Kontrolle des Vorhofflimmerns

Vergleicht man nun die Werte für die Amplitude, aufgeteilt nach dem Rhythmus der Patienten, erhält man dieses Diagramm (siehe Abbildung 26). Wie schon erwähnt hatte die Amplitude in der Sinusrhythmuskontrollgruppe den Wert $2,152 \pm 0,1138$ und im Vorhofflimmern $1,798 \pm 0,06392$.

Nach der Inkubation mit den CaMKII-Inhibitoren lagen die Werte bei der 1 µM Konzentration nun nur noch bei $2,015 \pm 0,1008$ im Sinusrhythmus und beim

Vorhofflimmern bei $2,017 \pm 0,1273$. Die gemessenen Werte bei $3 \mu\text{M}$ des neuartigen Inhibitors waren bei $1,939 \pm 0,1001$ im normalen Herzrhythmus und beim Vorhofflimmern sogar bei $1,823 \pm 0,07899$. Für die $10 \mu\text{M}$ Konzentration stellten sich Werte im Sinusrhythmus von $1,955 \pm 0,09479$ und $1,823 \pm 0,06958$ in der Partnergruppe ein. Die Messung mit AIP führte zu Werten von $1,968 \pm 0,1330$ für die Patienten mit Sinusrhythmus und bei den Patienten mit Vorhofflimmern lag der Wert nur bei $1,799 \pm 0,07636$.

Für die P-Werte ergab sich in diesem ANOVA-test, der alle Gruppen miteinander vergleicht, keine Signifikanz:

Tukeys multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl SIR vs. Ctrl VHF	0.2158
Ctrl SIR vs. $1 \mu\text{M}$ SIR	0.9899
Ctrl SIR vs. $3 \mu\text{M}$ SIR	0.8695
Ctrl SIR vs. $10 \mu\text{M}$ SIR	0.9315
Ctrl SIR vs. AIP SIR	0.9423
Ctrl VHF vs. $1 \mu\text{M}$ VHF	0.8486
Ctrl VHF vs. $3 \mu\text{M}$ VHF	> 0.9999
Ctrl VHF vs. $10 \mu\text{M}$ VHF	> 0.9999
Ctrl VHF vs. AIP VHF	> 0.9999

Tabelle 13: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Inhibitoreinfluss; SIR steht für Sinusrhythmus, VHF für Vorhofflimmern; die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Es lässt sich wie schon in der Gesamtbetrachtung sagen, dass die Inhibition der CaMKII nur einen sehr geringen, tendenziellen Einfluss auf die Amplitude der Sparks hat (siehe Tabelle 13).

3.8. Die Breite der Sparks nimmt unter Einfluss des CaMKII-Inhibitors RA123456 ab

Wie schon die Amplitude ist auch die Breite der Sparks ein wichtiges Charakteristikum der Kalziumblitze und damit für das Kalziumleck bedeutend. Sie zeigt an, wie breit ein gerade offener Ryanodinrezeptorcluster ist. Dargestellt ist die FWHM.

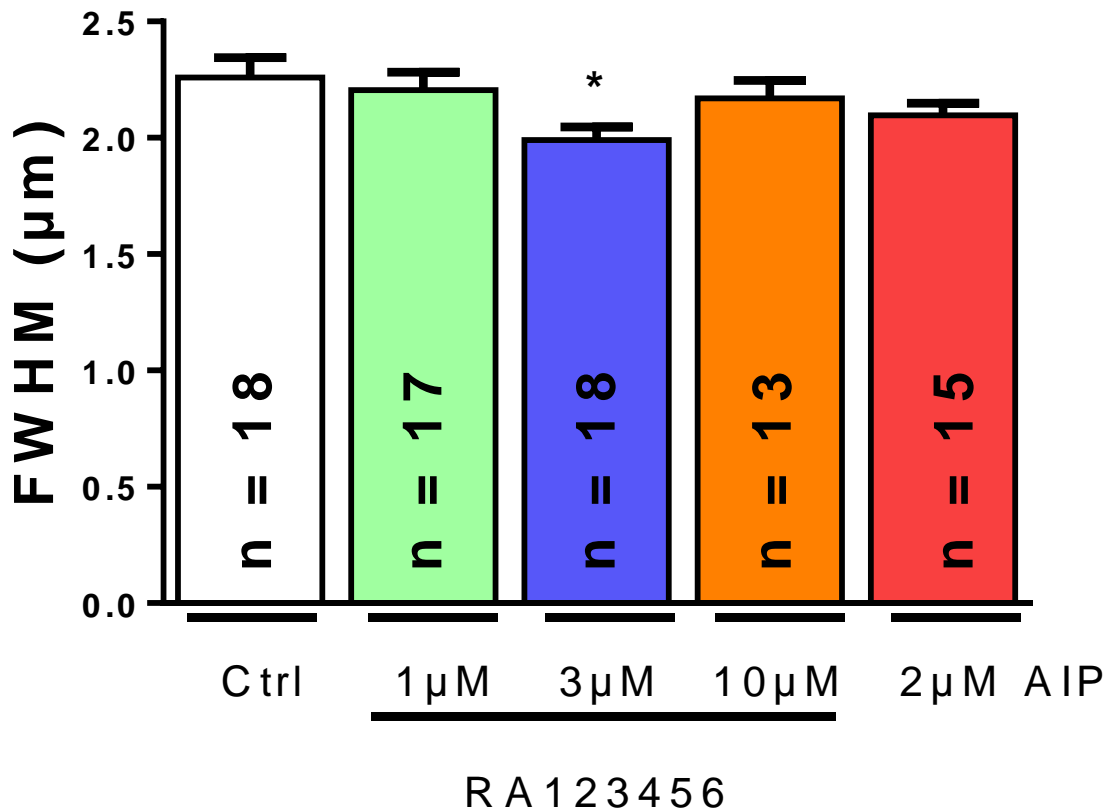


Abbildung 27: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkbreite

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 µM, blau für 3 µM und orange für 10 µM von RA123456, rot steht für AIP; * ist signifikant zur Kontrollgruppe

Die Breite der Sparks lag in der Kontrollgruppe ohne jeglichen Einfluss eines Inhibitors insgesamt bei $2,259 \pm 0,08726$ µm. Es kam unter Einfluss von RA123456 zu einem Abfall in der 1 µM Konzentration zu $2,205 \pm 0,07669$ µm. Der Unterschied in der 3 µM Konzentration war sogar noch größer. Hier lag der Wert nur bei $1,992 \pm 0,05615$ µm. Bei 10 µM lag die Breite der Sparks wieder höher, nämlich bei $2,169 \pm 0,07818$ während der Einfluss von AIP zu einer Breite von $2,096 \pm 0,05229$ µm führte.

Es zeigt sich, dass die 3 μM Konzentration des neuartigen CaMKII-Inhibitors RA123456 die größte Wirkung zeigt. Es besteht hier ein signifikanter Rückgang der Breite im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 27).

Dunnetts multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl vs. 1 μM	0.9536
Ctrl vs. 3 μM	0.0256
Ctrl vs. 10 μM	0.8112
Ctrl vs. AIP	0.3196

Tabelle 14: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Einfluss eines CaMKII-Inhibitors. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Der Rückgang der Breite der Sparks konnte nur bei einer Konzentration von 3 μM des neuen Inhibitors festgestellt werden (siehe Tabelle 14). Dennoch ist ein Effekt sichtbar und zeigt, dass die Hemmung der CaMKII durchaus auch bei der Breite der Sparks eine Bedeutung hat.

3.9. Es besteht kein Unterschied zwischen der Breite der Sparks im Vorhofflimmern im Vergleich zum Sinusrhythmus

Auch bei der Sparkbreite ist es sinnvoll, die beiden Rhythmen ohne Inhibitoreinfluss zu betrachten:

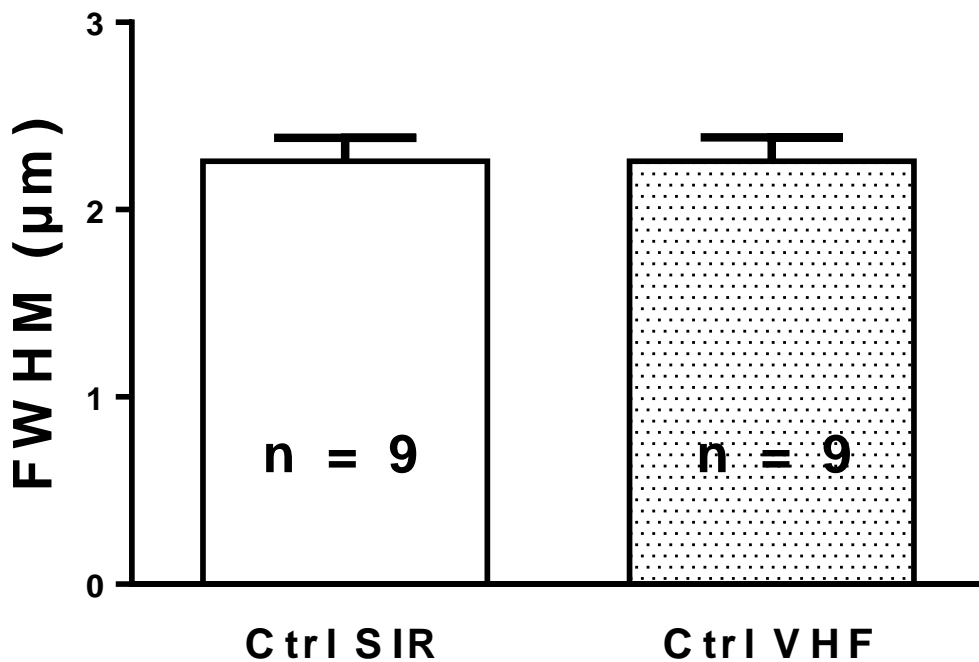


Abbildung 28: Vergleich der Sparkbreite zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe; Ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus

Betrachtet man nämlich die Breite der Sparks, die mit keinem CaMKII-Inhibitor behandelt wurden, erkennt man, dass es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen gibt (siehe Abbildung 28).

Sparks im Sinusrhythmus waren $2,258 \pm 0,1260$ μm breit, während die Vorhofflimmersparks eine sehr ähnliche Breite von $2,259 \pm 0,1284$ μm auswiesen.

Der ungepaarte T-Test ergab somit einen P-Wert von 0,9992 und daher sind die Werte statistisch gesehen absolut nicht unterschiedlich.

Die Sparks der beiden Rhythmusgruppen haben somit hier etwa die gleiche Breite.

3.10. Die CaMKII-Inhibition hat auf die Breite der Sparks im Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern keinen signifikanten Unterschied

Auch bei der Breite der Sparks wird nun auch die Wirkung der einzelnen Inhibitorkonzentrationen in den jeweiligen Rhythmusgruppen verglichen.

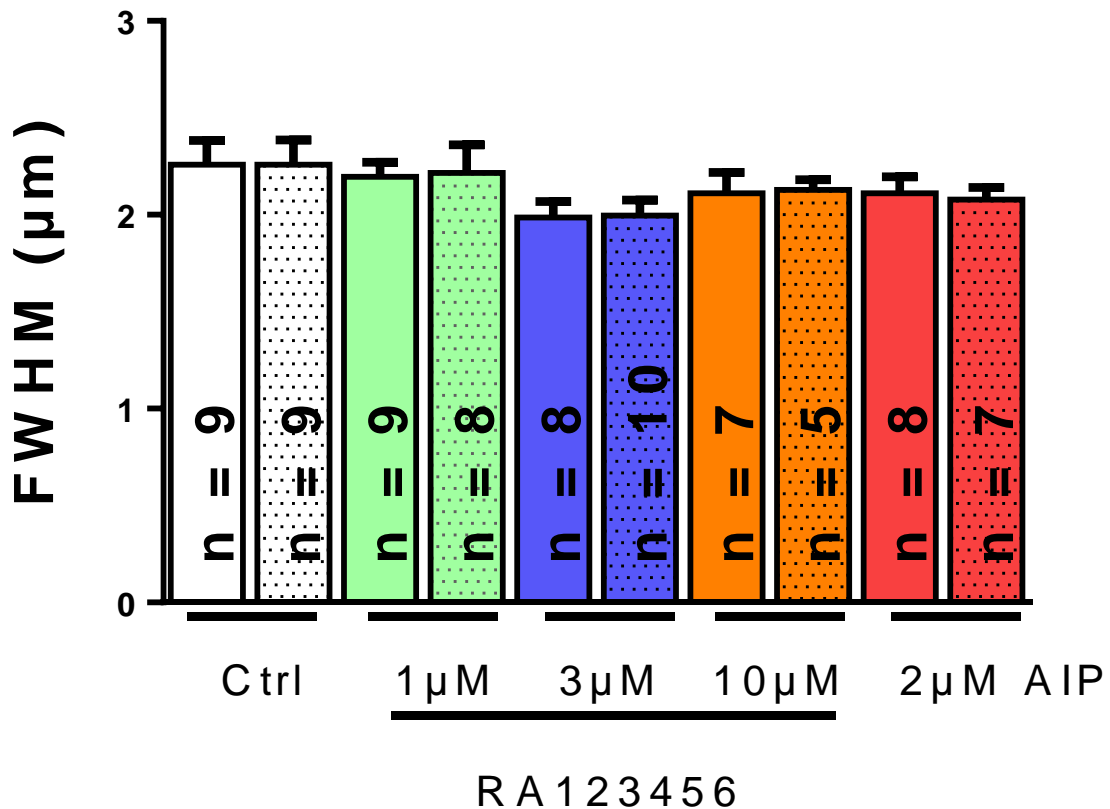


Abbildung 29: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkbreite; Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 µM, blau für 3 µM und orange für 10 µM von RA123456, rot steht für AIP; ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus und † ist signifikant zur Kontrolle des Vorhofflimmerns

Die Aufteilung der Werte für die Breite nach dem Rhythmus der Patienten zeigte nur eine geringe Wirkung der CaMKII-Inhibition (siehe Abbildung 29). Vom Ausgangswert im Sinusrhythmus von $2,258 \pm 0,1260$ µm sank die Breite bei 1 µM nur auf $2,196 \pm 0,07580$ µm und bei der 3 µM Konzentration auf $1,987 \pm 0,08086$ µm. Bei 10 µM

wurde ein Wert von $2,110 \pm 0,1092 \mu\text{m}$ gemessen. Die Wirkung des AIP verursachte einen nur geringen Rückgang der Sparkbreite auf $2,111 \pm 0,08553 \mu\text{m}$.

Im Vergleich hierzu ergaben sich im Vorhofflimmern Folgendes: Vom Ausgangswert in der Kontrolle von $2,259 \pm 0,1284 \mu\text{m}$ ging die Breite der Sparks unter Einfluss von $1 \mu\text{M}$ RA123456 auf nur $2,216 \pm 0,1454 \mu\text{m}$ und bei $3 \mu\text{M}$ auf immerhin $1,995 \pm 0,08153 \mu\text{m}$ zurück. Die $10 \mu\text{M}$ Konzentration erreichte im Vorhofflimmern einen Wert von $2,129 \pm 0,05086 \mu\text{m}$ für die Breite. Der bekannte CaMKII-Inhibitor AIP sorgte nach der halbstündigen Inkubation für eine Sparkbreite von durchschnittlich $2,079 \pm 0,06185 \mu\text{m}$. Statistisch signifikant war hier im Vergleich aller Gruppen mit einem ANOVA-Test kein Wert.

Tukeys multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl SIR vs. Ctrl VHF	> 0.9999
Ctrl SIR vs. 1 μM SIR	> 0.9999
Ctrl SIR vs. 3 μM SIR	0.6649
Ctrl SIR vs. 10 μM SIR	0.9912
Ctrl SIR vs. AIP SIR	0.9889
Ctrl VHF vs. 1 μM VHF	> 0.9999
Ctrl VHF vs. 3 μM VHF	0.6315
Ctrl VHF vs. 10 μM VHF	0.9985
Ctrl VHF vs. AIP VHF	0.9675

Tabelle 15: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Inhibitoreinfluss; SIR steht für Sinusrhythmus, VHF für Vorhofflimmern; die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Die Breite der Sparks ist also unabhängig von der CaMKII-Inhibition und lässt sich davon nicht beeinflussen. Es kommt lediglich zu einem sehr geringen, nicht signifikanten Abfall der Breite (siehe Tabelle 15).

3.11. Die Dauer der Sparks nimmt unter Einfluss der CaMKII-Inhibition ab

Wie schon zuvor die Amplitude und die Breite ist auch die Dauer charakteristisch für Sparks und entsprechend wichtig für das Kalziumleck aus dem SR. Sie zeigt an, wie lange ein RyR2 offen ist. Es wird die FDHM dargestellt (siehe Abbildung 30).

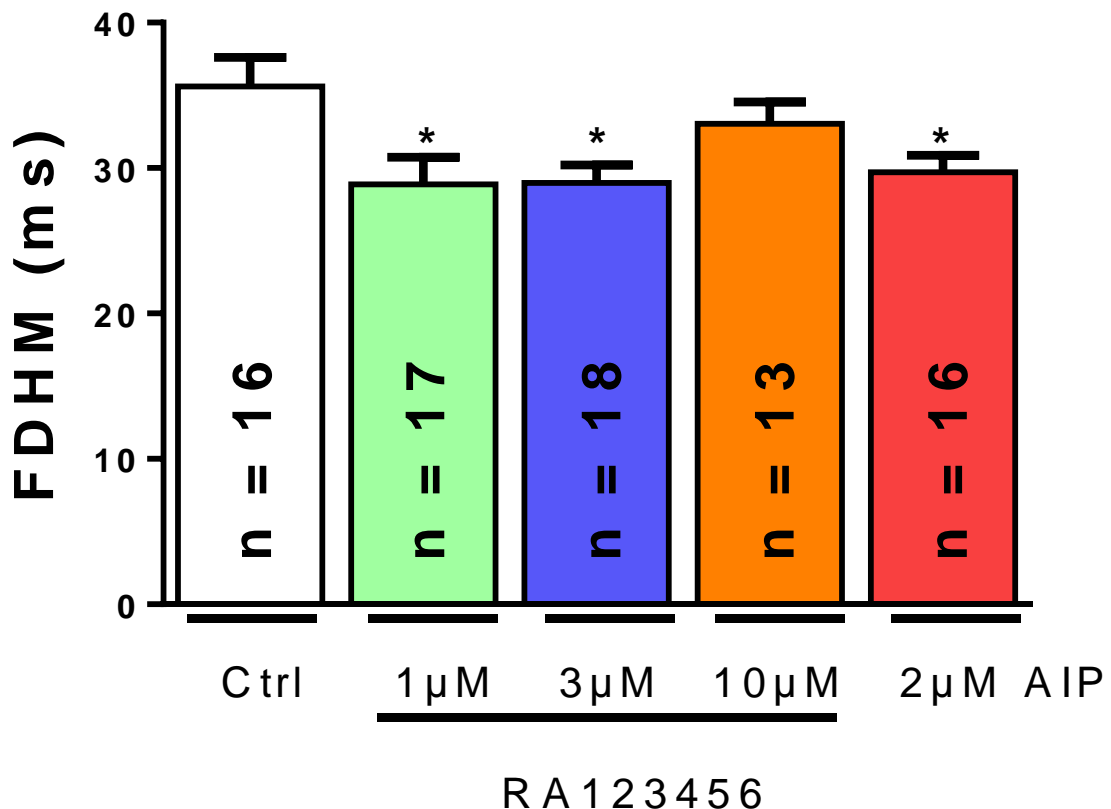


Abbildung 30: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkdauer

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 μM , blau für 3 μM und orange für 10 μM von RA123456, rot steht für AIP; * ist signifikant zur Kontrollgruppe

Die Dauer der Sparks betrug in der Kontrolle $35,62 \pm 1,991$ ms. Diese verringerte sich nach Inkubation mit RA123456 auf $28,87 \pm 1,868$ ms in der 1 μM Konzentration. Bei 3 μM konnte ein Wert von $28,99 \pm 1,211$ ms gemessen werden. Die 10 μM Konzentration des neuartigen CaMKII-Inhibitors hingegen fiel vollkommen aus dem Raster. Mit einem Wert von $33,05 \pm 1,491$ ms ergab sich hier kaum ein Effekt. Dazu kam es unter AIP wieder zu einem etwas stärkeren Abfall auf $29,71 \pm 1,189$ ms.

Laut des ANOVA, der die Gruppen miteinander statistisch verglich, ergibt sich ein signifikanten Unterschied in der 1 μM , 3 μM Konzentration von RA123456 und AIP im Vergleich zur Kontrolle.

Dunnetts multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl vs. 1 μM	0.0116
Ctrl vs. 3 μM	0.0121
Ctrl vs. 10 μM	0.6552
Ctrl vs. AIP	0.0359

Tabelle 16: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Einfluss eines CaMKII-Inhibitors. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

RA123456 und AIP haben beide also einen signifikanten Einfluss auf die Dauer der Sparks. Hierbei haben die 1 μM und die 3 μM Konzentration etwa den gleichen Effekt, während die 10 μM keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle erzielen können. Der Einfluss von AIP wiederum senkt die Sparkdauer (siehe Tabelle 16).

3.12. Die Dauer der Sparks ist im Vorhofflimmern signifikant länger als im Sinusrhythmus

Wie schon bei den anderen vorangegangenen Parametern ist es auch bei der Dauer interessant, den basalen Unterschied ohne Inhibitor zwischen den Sinusrhythmus- und Vorhofflimmerpatienten näher zu beleuchten.

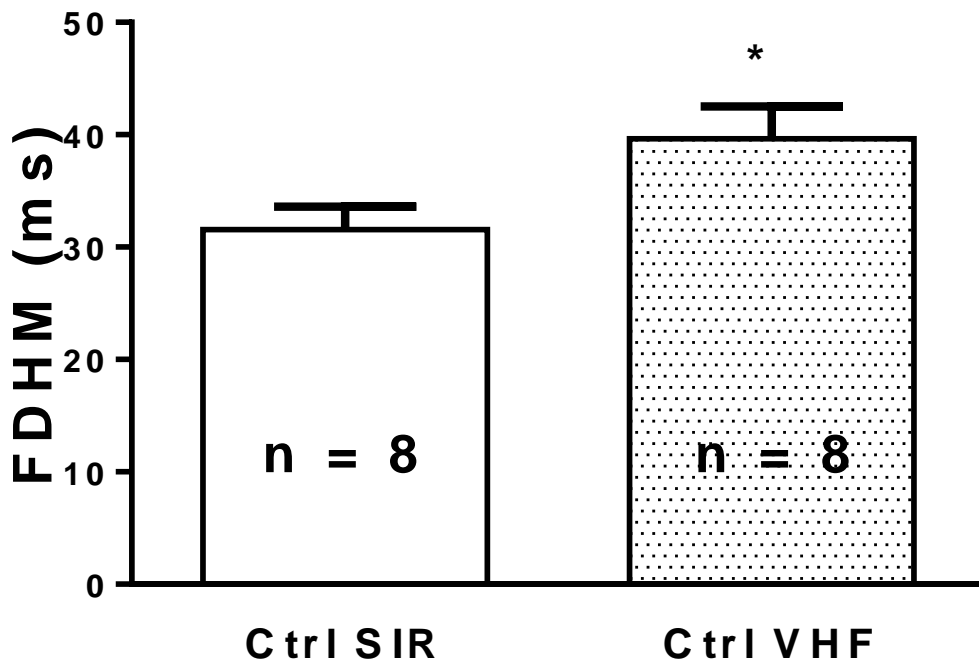


Abbildung 31: Vergleich der Dauer der Sparks zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe; Ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus

Betrachtet man auch hier wieder nur die Kontrollgruppen ohne Einfluss eines CaMKII-Inhibitors zeigt, sich ein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 31). Die Dauer der Sparks im Sinusrhythmus lag bei $31,58 \pm 2,013$ ms, während im Vorhofflimmern $39,65 \pm 2,878$ ms gemessen wurde.

Statistisch entspricht dies laut ungepaartem T-Test einem P-Wert von 0,0374. Somit lässt sich sagen, dass die Sparks im Vorhofflimmern signifikant länger sind, als im Sinusrhythmus.

3.13. Die Inhibition der CaMKII zeigt einen signifikanten Rückgang der Dauer der Sparks im Vorhofflimmern

Die Sparkdauer ist maßgeblich eine Funktion der Öffnungsdauer der RyR-Cluster. Auch hier ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern, was die Wirkung der CaMKII-Inhibition betrifft (siehe Abbildung 32):

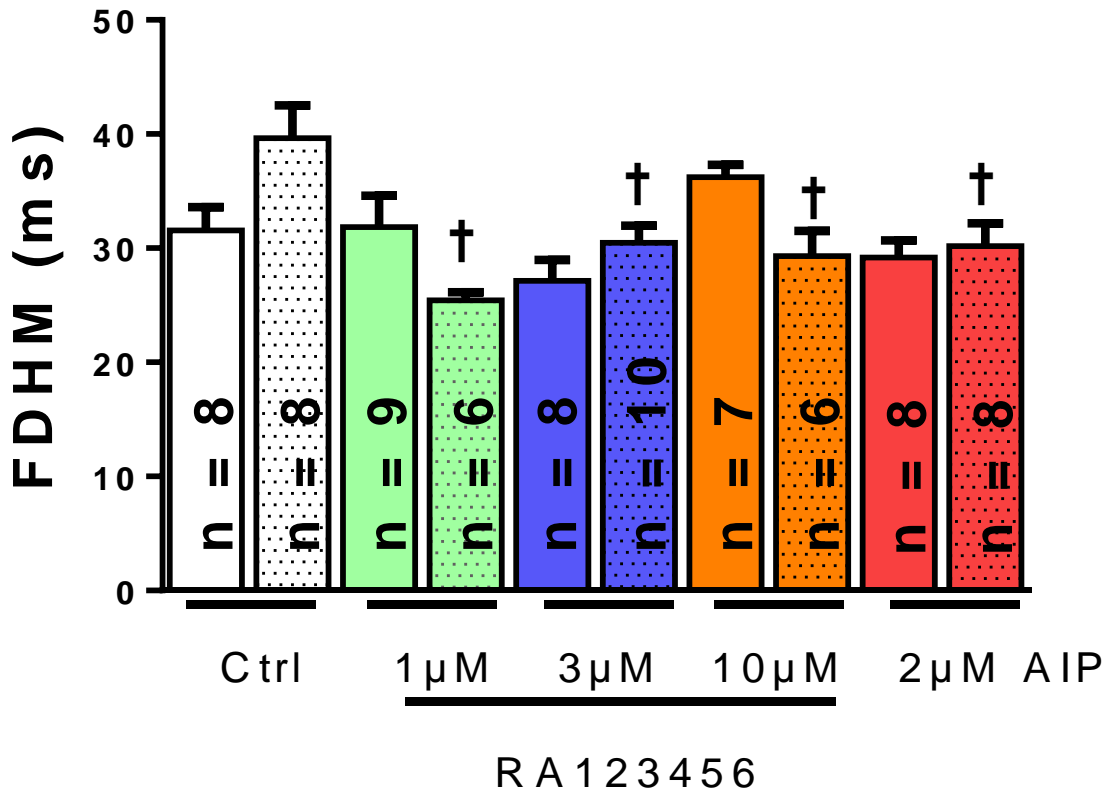


Abbildung 32: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkdauer; Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 μM, blau für 3 μM und orange für 10 μM von RA123456, rot steht für AIP; ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus und † ist signifikant zur Kontrolle des Vorhofflimmerns

Im Sinusrhythmus beträgt der Wert der Kontrolle wie schon erwähnt $31,58 \pm 2,013$ ms. Unter Einfluss des Inhibitors RA123456 wurde ein Wert bei 1 μM von $31,87 \pm 2,743$ ms gemessen. Bei 3 μM betrug die Dauer der Sparks dann nur noch $27,15 \pm 1,851$ ms und unter 10 μM $36,24 \pm 1,091$ ms, was einem erheblichen Anstieg der Dauer entspricht. Unter Einwirkung von AIP ergab sich ein Wert von $29,21 \pm 1,464$ ms.

Im Vorhofflimmern hingegen verringerte sich die Sparkdauer bei einem Kontrollwert von $39,65 \pm 2,878$ ms auf $25,42 \pm 0,7472$ ms bei 1 μM , auf $30,47 \pm 1,521$ ms bei 3 μM und auf $29,32 \pm 2,178$ ms bei 10 μM . Unter AIP wurde ein Wert von $30,21 \pm 1,961$ ms gemessen.

Die Durchführung eines ANOVA-Tests, der wiederum alle Gruppen miteinander vergleicht, ergab, dass die Kontrolle des Vorhofflimmerns zu den 1 μM , 3 μM und 10 μM CaMKII-Inhibitor-Konzentrationen durch RA123456 und AIP in der Vorhofflimmergruppe signifikant unterschiedlich ist.

Tukeys multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl SIR vs. Ctrl VHF	0.1396
Ctrl SIR vs. 1 μM SIR	> 0.9999
Ctrl SIR vs. 3 μM SIR	0.8589
Ctrl SIR vs. 10 μM SIR	0.8473
Ctrl SIR vs. AIP SIR	0.9976
Ctrl VHF vs. 1 μM VHF	0.0006
Ctrl VHF vs. 3 μM VHF	0.0331
Ctrl VHF vs. 10 μM VHF	0.0371
Ctrl VHF vs. AIP VHF	0.0416

Tabelle 17: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Inhibitoreinfluss; SIR steht für Sinusrhythmus, VHF für Vorhofflimmern; die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Durch die CaMKII-Inhibition werden die Sparks also deutlich kürzer. Der Effekt ist im Vorhofflimmern weitaus deutlicher ausgeprägt als im Sinusrhythmus. Hier ist es spannend zu beobachten, dass es unter 10 μM von RA123456 sogar zu einer deutlichen Zunahme der Sparkdauer kommt. Allerdings ergibt sich hierbei keine Signifikanz.

3.14. Die Inhibition der CaMKII verringert das Kalziumleck signifikant

Neben der Kalziumsparkfrequenz ist das gesamte diastolische Kalziumleck aus dem SR der wichtigste und aussagekräftigste Parameter. Er hat physiologisch die größte Aussagekraft, da die zellulären Veränderungen einen großen Zusammenhang mit dem Kalziumleck haben. Er bestimmt maßgeblich den SR-Kalziumgehalt und die diastolische Kalziumkonzentration.

Das Kalziumleck wurde aus den zuvor erläuterten Parametern der Sparks errechnet. Es erfolgte eine Multiplikation der Sparkfrequenz mit der Sparkamplitude, der Sparkbreite und Sparkdauer. Daraus ergibt sich ein Maß für das Kalziumleck.

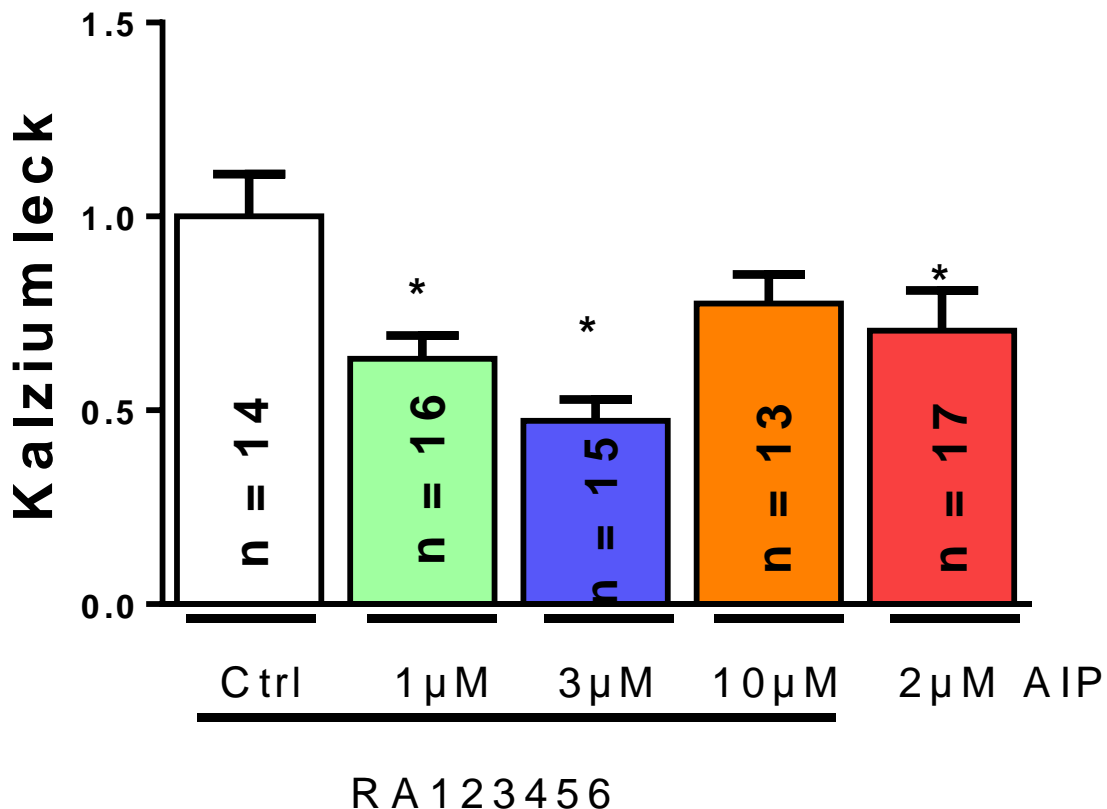


Abbildung 33: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf das Kalziumleck aus dem SR

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 μM, blau für 3 μM und orange für 10 μM von RA123456, rot steht für AIP; * ist signifikant zur Kontrollgruppe

Der Übersichtlichkeit halber wurden die Werte auf die Kontrollgruppe des Sinusrhythmus normalisiert (siehe Abbildung 33). Somit hat diese den Ausgangswert $1 \pm 0,1089$.

Unter Einfluss von RA123456 ergab sich so nur noch ein Wert von $0,6329 \pm 0,06013$ bei 1 μM . Unter der 3 μM Konzentration lag der Wert sogar nur noch bei $0,4736 \pm 0,05432$ und bei 10 μM immerhin bei $0,7753 \pm 0,07591$. Unter AIP zeigte sich ein Wert von $0,7057 \pm 0,1033$.

Statistisch ergab sich so nach Durchführung eines ANOVA-Tests einen signifikanten und erfreulichen Rückgang des Kalziumlecks aus dem SR unter 1 μM , 3 μM RA123456 und unter AIP.

Dunnetts multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl vs. 1 μM	0.0108
Ctrl vs. 3 μM	0.0002
Ctrl vs. 10 μM	0.2297
Ctrl vs. AIP	0.0499

Tabelle 18: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Einfluss eines CaMKII-Inhibitors. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Durch Inhibition der CaMKII kommt es also zu einem interessanten signifikant geringeren Verlust an Kalzium aus dem SR. Der Rückgang des Kalziumlecks ist unter Einfluss des neuen CaMKII-Inhibitors RA123456 sogar noch größer als unter AIP, dem bereits bekannten Inhibitor des Enzyms (siehe Tabelle 18).

3.15. Das Kalziumleck aus dem SR ist beim Vorhofflimmern größer als im Sinusrhythmus

Betrachtet man nun das Kalziumleck unter basalen Bedingungen aufgeteilt nach den beiden Rhythmen, kann folgende Differenz dokumentiert werden:

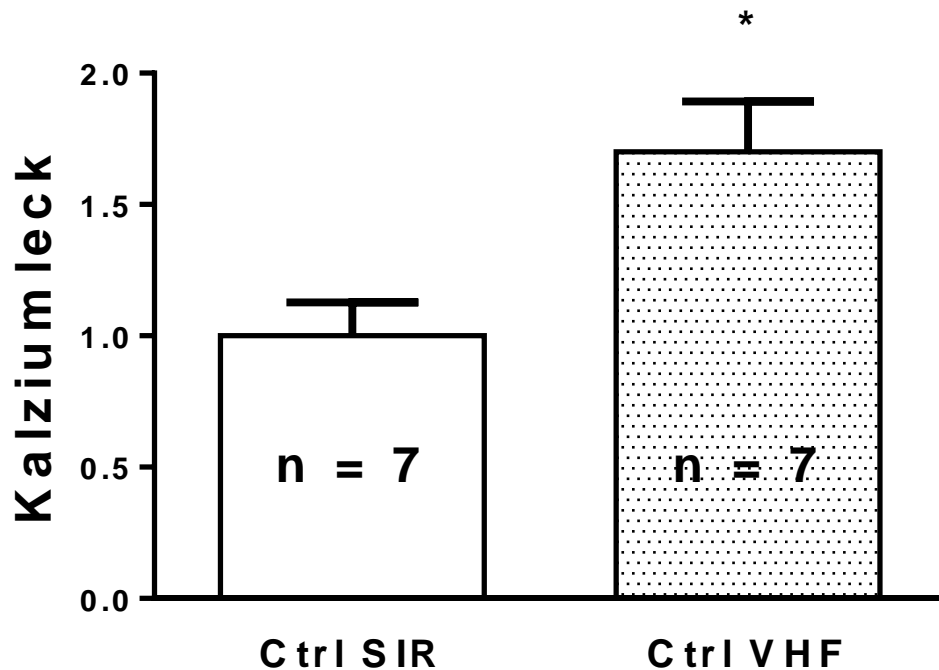


Abbildung 34: Das Kalziumleck aus dem SR im Vergleich zwischen Vorhofflimmer und Sinusrhythmus

Weiß steht für die Kontrollgruppe; Ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus

Der Vergleich der beiden Rhythmusgruppen zeigt, dass es nämlich einen erheblichen Unterschied gibt (Abbildung 34). Normalisiert auf die Kontrollgruppe des Sinusrhythmus betrug dessen Wert $1 \pm 0,1272$. In Opposition dazu ergab die Messung beim Vorhofflimmern $1,701 \pm 0,1912$.

Der durchgeführte ungepaarte T-Test ergab einen signifikanten Unterschied mit einem P-Wert von 0,0100.

Es gilt infolgedessen festzuhalten, dass das Kalziumleck aus dem SR in Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern signifikant erhöht ist im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus.

3.16. Das Kalziumleck aus dem SR nimmt im Vorhofflimmern stärker ab als im Sinusrhythmus

Teilt man nun die Messwerte nach den beiden Rhythmen auf, lassen sich wichtige Rückschlüsse auf die Wirkung der CaMKII-Inhibition ziehen. Ein Blick auf die Aufteilung zeigt den Unterschied der beiden Rhythmen (siehe Abbildung 35):

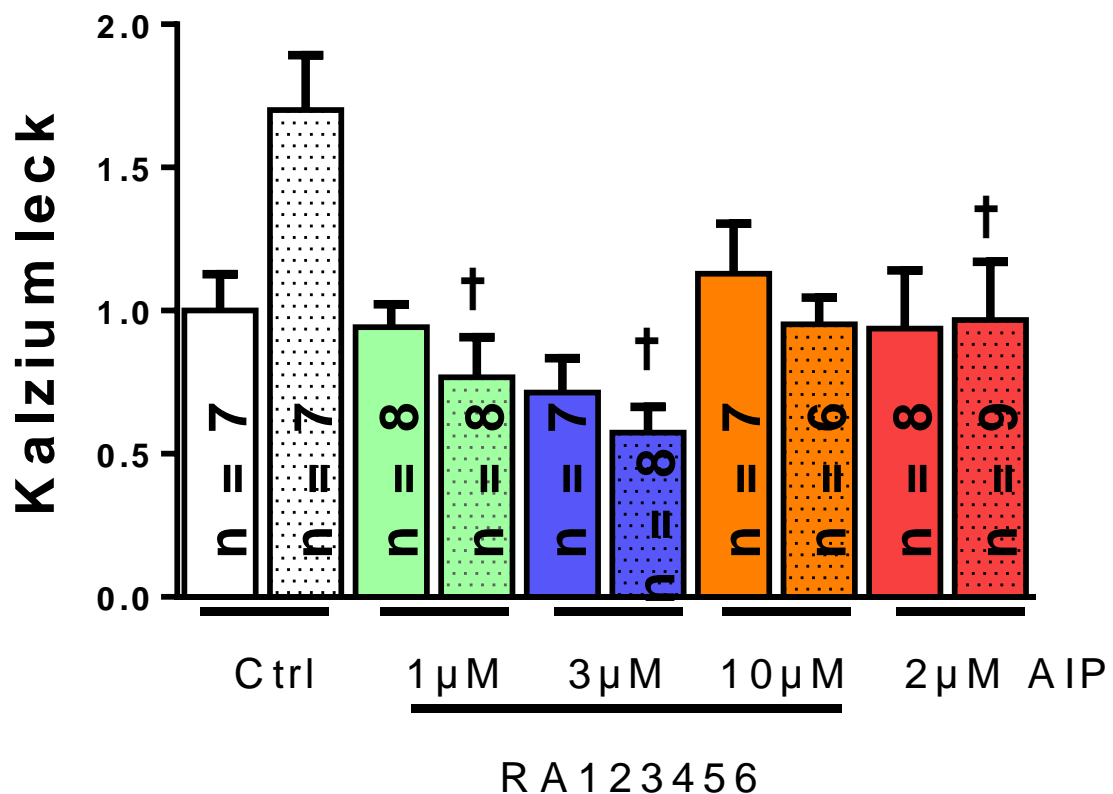


Abbildung 35: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf das Kalziumleck Sinusrhythmus im Vergleich zu Vorhofflimmern
 Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 μM, blau für 3 μM und orange für 10 μM von RA123456, rot steht für AIP; ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus und † ist signifikant zur Kontrolle des Vorhofflimmerns

Auch hier sind die Werte wieder auf die Kontrollgruppe im Sinusrhythmus normalisiert, was einem Wert von $1 \pm 0,1272$ entspricht. Davon ausgehend ergab sich im Sinusrhythmus für RA123456 bei 1 μM ein Rückgang des Kalziumlecks auf $0,9427 \pm 0,07920$, für 3 μM sogar $0,7147 \pm 0,1207$ und für 10 μM überraschenderweise $1,129 \pm 0,1744$. Der Wert für den Einfluss von AIP lag bei $0,9378 \pm 0,2033$.

Für das Kalziumleck im Vorhofflimmern lag der Ausgangswert wie schon bekannt bei $1,701 \pm 0,1912$. Davon ausgehend kam es unter Einfluss von RA123456 bei $1 \mu\text{M}$ zu einem Rückgang auf $0,7670 \pm 0,1407$, bei $3 \mu\text{M}$ sogar auf $0,5746 \pm 0,08924$ und bei $10 \mu\text{M}$ immerhin auf $0,9517 \pm 0,09332$. Unter AIP-Einfluss kam im Vorhofflimmern einen Wert von $0,9669 \pm 0,2034$ zustande.

Der Vergleich aller Gruppen mithilfe eines ANOVA-Tests ergab einen signifikanten Rückgang des Kalziumlecks aus dem SR bei $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ und AIP in der Vorhofflimmergruppe im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollgruppe.

Folgende statistische Werte wurden ermittelt:

Tukeys multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl SIR vs. Ctrl VHF	0.0765
Ctrl SIR vs. $1 \mu\text{M}$ SIR	> 0.9999
Ctrl SIR vs. $3 \mu\text{M}$ SIR	0.9572
Ctrl SIR vs. $10 \mu\text{M}$ SIR	0.9999
Ctrl SIR vs. AIP SIR	> 0.9999
Ctrl VHF vs. $1 \mu\text{M}$ VHF	0.0024
Ctrl VHF vs. $3 \mu\text{M}$ VHF	0.0001
Ctrl VHF vs. $10 \mu\text{M}$ VHF	0.0619
Ctrl VHF vs. AIP VHF	0.0307

Tabelle 19: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Inhibitoreinfluss; SIR steht für Sinusrhythmus, VHF für Vorhofflimmern; die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Der Inhibition der CaMKII bewirkt in beiden Gruppen ein sehr erfreulicher Rückgang des Kalziumlecks (siehe Tabelle 19).

Beim Vorhofflimmern ist der Effekt allerdings sehr viel deutlicher ausgeprägt, als bei Patienten mit Sinusrhythmus. Hier zeigt sich sogar ein Anstieg des Kalziumlecks unter der $10 \mu\text{M}$ Konzentration von RA123456. Zwar steigt das Kalziumleck unter $10 \mu\text{M}$ auch im Vorhofflimmern im Vergleich zu den anderen Gruppen an, aber der Effekt ist nicht so stark ausgeprägt. Dennoch ist auch hier das Kalziumleck tendenziell niedriger als in der entsprechenden Vergleichsgruppe.

3.17. Der Kalziumgehalt des SR steigt unter Wirkung des Inhibitors an

Um zu testen, ob eine Reduktion des Kalziumlecks den Kalziumgehalt im SR signifikant beeinflusst, wurde die Untersuchung der Herzmuskelzellen mit Caffein durchgeführt. Konsequenterweise wurde erwartet, dass der Kalziumgehalt mit sinkendem Kalziumleck unter Einfluss der Inhibitoren steigen würde, was auch tatsächlich der Fall war (siehe Abbildung 36).

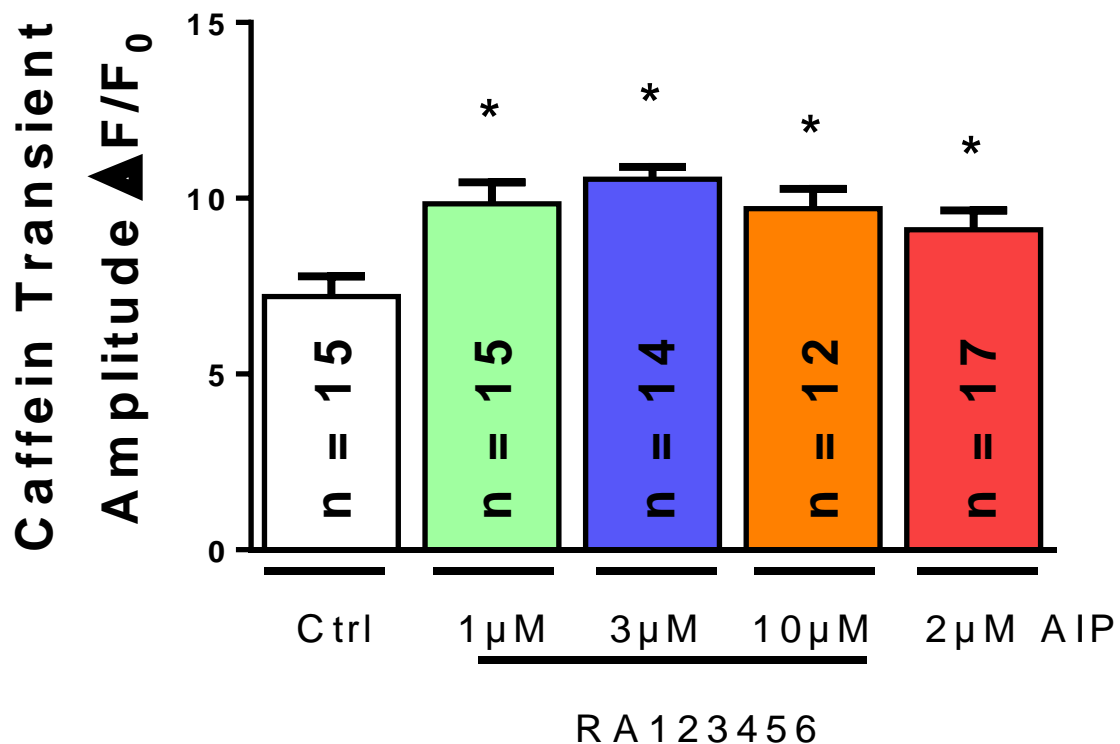


Abbildung 36: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf den Kalziumgehalt des SR

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 μ M, blau für 3 μ M und orange für 10 μ M von RA123456, rot steht für AIP; * ist signifikant zur Kontrollgruppe

Der Quotient aus der Amplitude der Caffeintransienten und der Baseline entspricht dem Kalziumgehalt des SR. Je höher der Quotient, desto mehr Kalzium befindet sich im sarkoplasmatischen Retikulum.

Der Ausgangswert für $\Delta F/F_0$ in der Kontrollgruppe lag bei $7,212 \pm 0,5676$. Nach halbstündiger Inkubation mit den CaMKII-Inhibitoren ergab sich für RA123456 bei der 1 μ M Konzentration schon einen Wert von $9,849 \pm 0,6123$. Bei 3 μ M stieg dieser weiter

auf $10,54 \pm 0,3509$ und bei $10 \mu\text{M}$ lag er immerhin bei $9,702 \pm 0,5671$. Die Wirkung von AIP führte zu einem Wert von $9,106 \pm 0,5514$.

Der statistische Vergleich der Gruppen durch einen ANOVA-Test ergab, dass es in allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle kommt (siehe Tabelle 20).

Dunnetts multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl vs. $1 \mu\text{M}$	0.0033
Ctrl vs. $3 \mu\text{M}$	0.0002
Ctrl vs. $10 \mu\text{M}$	0.0104
Ctrl vs. AIP	0.0419

Tabelle 20: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Einfluss eines CaMKII-Inhibitors. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Durch die CaMKII-Inhibition kommt es zu einem sehr erfreulichen signifikanten Anstieg des Kalziumgehalts im SR. Besonders ausgeprägt ist der Effekt bei $3 \mu\text{M}$ Konzentration von RA123456.

3.18. Im Vorhofflimmern ist die Caffein-Amplitude niedriger als im Sinusrhythmus

Wie schon bei den Sparkmessungen ist es wichtig, dass man sich auch bei den Caffeinmessungen die basalen Unterschiede zwischen den beiden Rhythmusgruppen ansieht (siehe Abbildung 37).

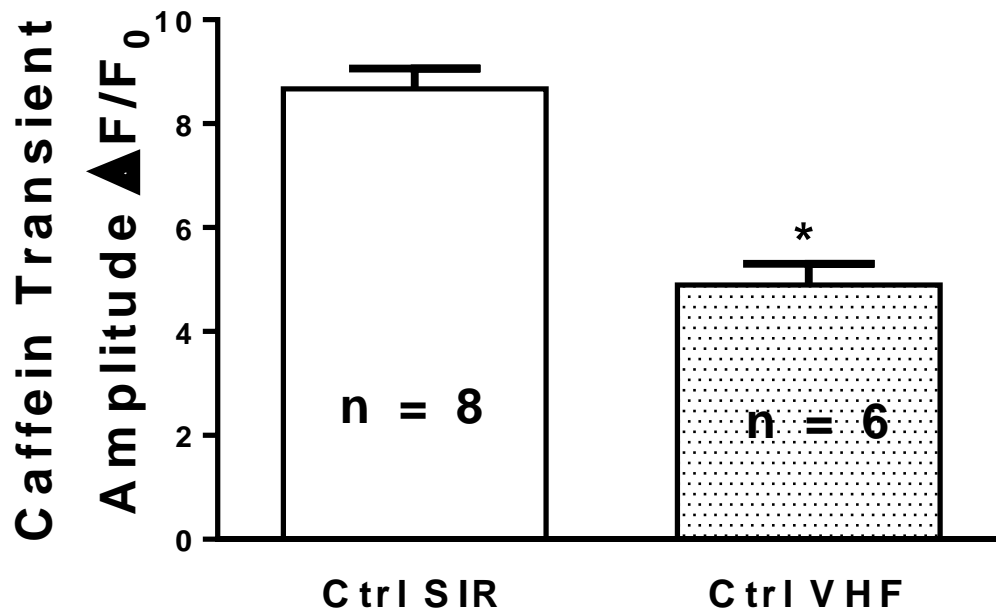


Abbildung 37: Vergleich der Caffein-Transienten-Amplitude im Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe; Ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus

$\Delta F/F_0$ der Caffein-Transienten betrug bei Zellen von Patienten im Sinusrhythmus $8,669 \pm 0,3912$. Im Vergleich dazu lag sie bei Vorhofflimmerpatienten bei $4,897 \pm 0,4068$. Dies entspricht laut dem durchgeführten ungepaarten T-Test einem signifikanten Unterschied mit einem P-Wert von weniger als 0.0001. Die Differenz ist somit höchst signifikant.

Man kann also sagen, dass der Kalziumgehalt bei Menschen mit Sinusrhythmus höher ist, als bei Vorhofflimmerpatienten. Hieraus ergeben sich möglicherweise Konsequenzen für die systolische Kontraktionskraft der Vorhofmuskulatur (siehe Diskussion), was das Remodelling weiter verstärkt.

3.19. Klinische Daten der Patienten, bei deren Zellen Untersuchungen mit Caffein durchgeführt wurden

Im Folgenden werden nun die klinischen Daten der Patienten aufgeführt, bei denen Zellen unter Einfluss von Caffein untersucht worden sind. Auch hier ist es interessant, die beiden Rhythmen Vorhofflimmern und Sinusrhythmus miteinander zu vergleichen. Unter den Patienten mit Vorhofflimmern waren zwei mit der paroxysmalen, vier mit der permanenten und zwei mit der persistierenden Form.

Allgemeine Informationen und relevante Vorerkrankungen:

Kategorie	SIR N = 10 N in Klammern falls abweichend	VHF N = 8 N in Klammern falls abweichend	Chi ² - Test P-Wert	Exakter Test nach Fisher P-Wert	T-Test P-Wert
Alter (Jahre)	58.80±8.26	77.38±4.84			0,0000 39
BMI (kg/m ²)	27.13±3.86	29.10±5.51			0,385
Männliches Geschlecht	8	6	0,800	1	
Koronare Herzkrankheit	9	7	0,876	1	
Z.n. Myokardinfarkt	4	1	0,196	0,314	
Herzinsuffizienz	6	4	0,671	1	
Hyperlipoproteinämie	3	4	0,387	0,630	
arterielle Hypertonie	6	8	0,043	0,092	
Diabetes Mellitus	2	2	0,800	1	
Z.n. Apoplex	0	1	0,250	0,444	
Diastolische Dysfunktion	3 (9)	4	0,486	0,637	
HbA1c	6.54±0.36 (2)	7.18±1.34 (4)			0,560
NTproBNP	1937.70±31 18.09	2856.50±3360. 73			
In (NTproBNP)	6,29±1,80	7,34±1,22			0,175

Tabelle 21: Patientendaten zu allgemeinen Informationen und relevanten Vorerkrankungen
SIR steht für Sinusrhythmus und VHF steht für Vorhofflimmern

Auch hier bei den Untersuchungen mit Caffein zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Alter der Patienten zwischen den beiden Herzrhythmen (siehe Tabelle 21). Die Patienten mit Vorhofflimmern waren deutlich älter. Außerdem hatten in dieser Gruppe auch mehrere eine arterielle Hypertonie als im Sinusrhythmus.

Echokardiographie:

Kategorie	SIR N = 10 N in Klammern falls abweichend	VHF N = 8 N in Klammern falls abweichend	Chi²- Test P- Wert	Exakter Test nach Fisher P-Wert	T- Test P- Wert
Linker Vorhof vergrößert	3 (7)	5 (6)	0,135	0,266	
LVEDD vergrößert	3 (8)	2	0,590	1	
IVS vergrößert	2 (7)	4 (6)	0,170	0,286	
Aortenklappenstenose	0 (9)	3	0,043	0,082	
Aortenklappeninsuffizienz	3 (9)	2 (6)	1	1	
Mitralklappenstenose	0	0			
Mitralklappeninsuffizienz	5 (9)	5 (7)	0,515	0,633	
Trikuspidalklappen- insuffizienz	3 (9)	4 (7)	0,341	0,615	
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	51.78±10.73 (9)	49.14±13.17 (7)			0,666

Tabelle 22: Patientendaten zu Echokardiographie
SIR steht für Sinusrhythmus und VHF steht für Vorhofflimmern

In der Echokardiographie in diesem Patientenkollektiv zeigt sich, dass die Patienten mit Vorhofflimmern signifikant mehr Aortenklappenstenosen hatten, als jene, die einen Sinusrhythmus aufwiesen. Außerdem zeigt sich auch hier, allerdings nur tendenziell, dass der linke Vorhof bei Menschen mit Vorhofflimmern vergrößert ist. Einen Unterschied in der Ejektionsfraktion lässt sich hier ebenfalls nicht feststellen (siehe Tabelle 22).

Relevante Medikation:

Einnahme von	Sinusrhythmus N = 10 N in Klammern falls abweichend	Vorhofflimmern N = 8 N in Klammern falls abweichend	Chi²- Test P-Wert	Exakter Test nach Fisher P-Wert
Betablockern	8	8	0,180	0,477
Kalziumantagonisten	2	2	0,800	1
ACE-Hemmer/AT1- Blocker	9	6	0,396	0,559
Statin	7	6	0,814	1
Antiarrhythmikum	0	0		
Digitalis	0	1	0,250	0,444
orale Antikoagulation	0	3	0,034	0,069
ASS 100	9	5	0,163	0,275

Tabelle 23: Patientendaten zu relevanter Medikation

Bei der Medikation wird deutlich, dass es auch hier nur Unterschiede bei der oralen Antikoagulation gibt. Hier nahmen logischerweise Patienten, die Vorhofflimmern haben, nämlich eine solche Medikation ein, während diese bei Patienten im Sinusrhythmus keine Anwendung fand (siehe Tabelle 23).

3.20. Der SR-Kalziumgehalt steigt im Vorhofflimmern unter Einfluss der Inhibitoren stärker als im Sinusrhythmus

Besonders interessant wird es, wenn man sich die Wirkung der CaMKII-Inhibition betrachtet, wenn man die Daten wiederum nach Sinusrhythmus und Vorhofflimmern aufteilt (siehe Abbildung 38).

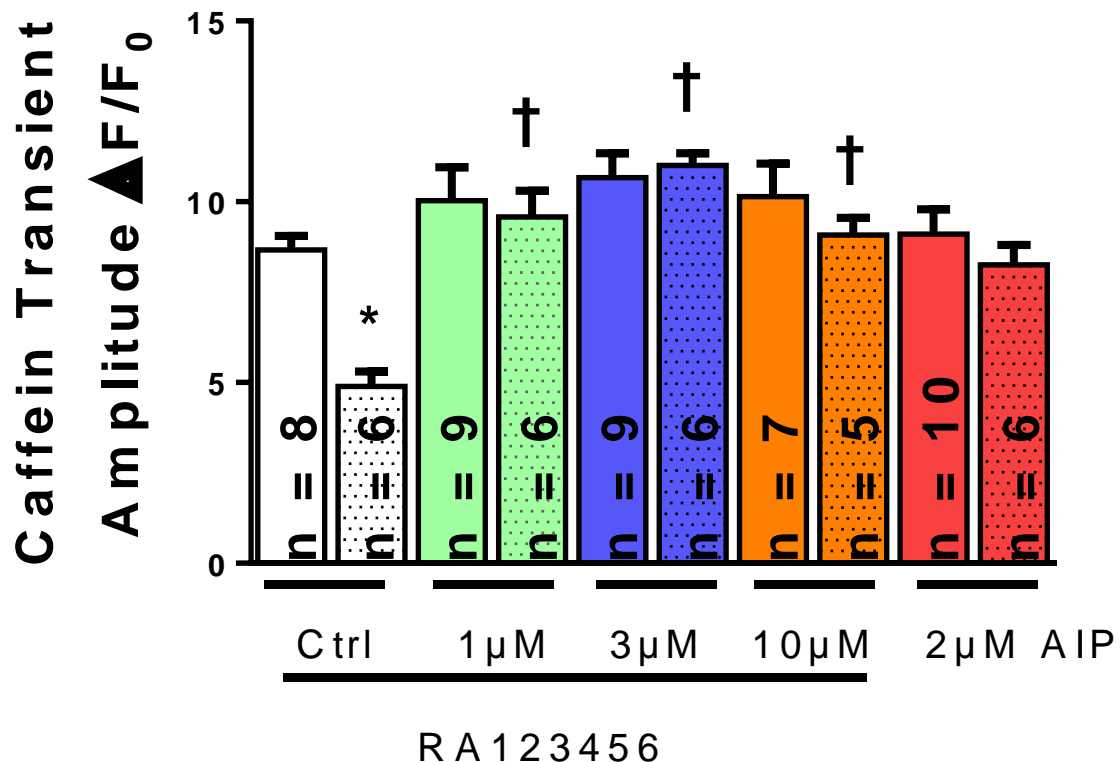


Abbildung 38: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf den SR-Kalziumgehalt; Sinusrhythmus im Vergleich zu Vorhofflimmern

Weiß steht für die Kontrollgruppe, grün für 1 μ M, blau für 3 μ M und orange für 10 μ M von RA123456, rot steht für AIP; ohne Muster steht für Sinusrhythmus, mit Muster für Vorhofflimmern; * ist signifikant zur Kontrolle des Sinusrhythmus und † ist signifikant zur Kontrolle des Vorhofflimmerns

Der Kontrollwert im Sinusrhythmus lag bei $8,669 \pm 0,3912$. Unter Einfluss von RA123456 kam es zu einem Anstieg des Quotienten $\Delta F/F_0$ auf $10,03 \pm 0,9289$ bei 1 μ M Konzentration und sogar auf $10,67 \pm 0,6719$ bei 3 μ M. Bei der 10 μ M Konzentration wurde ein Wert von $10,15 \pm 0,9066$ gemessen. Die Wirkung von AIP im Sinusrhythmus ergab einen Wert von $9,104 \pm 0,6883$.

Entsprechend zum Ausgangswert von $4,897 \pm 0,4068$ in der Kontrolle des Vorhofflimmerns stieg das Resultat durch RA123456 auf $9,578 \pm 0,7273$ bei 1 μM , sogar auf $11,00 \pm 0,3411$ bei 3 μM und auf $9,078 \pm 0,4791$ bei 10 μM Konzentration. AIP ergab einen Wert von $8,253 \pm 0,5561$.

Der durchgeführte ANOVA-Test zeigt den statistischen Vergleich der beiden Gruppierungen. Es wurde deutlich, dass die beiden Kontrollgruppen signifikant unterschiedlich waren. Aber auch die 1 μM , 3 μM und 10 μM Konzentration im Vorhofflimmern war im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle signifikant unterschiedlich.

Tukeys multipler Vergleichstest (ANOVA)	P-Wert
Ctrl SIR vs. Ctrl VHF	0.0146
Ctrl SIR vs. 1 μM SIR	0.8901
Ctrl SIR vs. 3 μM SIR	0.4741
Ctrl SIR vs. 10 μM SIR	0.8779
Ctrl SIR vs. AIP SIR	> 0.9999
Ctrl VHF vs. 1 μM VHF	0.0022
Ctrl VHF vs. 3 μM VHF	< 0.0001
Ctrl VHF vs. 10 μM VHF	0.0165
Ctrl VHF vs. AIP VHF	0.0802

Tabelle 24: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6

Ctrl ist die Kontrollgruppe ohne Inhibitoreinfluss; SIR steht für Sinusrhythmus, VHF für Vorhofflimmern; die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf RA123456

Das Schaubild zeigt, dass es durch die CaMKII-Inhibition zu einem interessanten Anstieg des SR-Kalziumgehalts in allen Gruppen kommt. Signifikante Unterschiede lassen sich aber nur bei RA123456 im Vorhofflimmern finden (siehe Tabelle 24). Somit steigt der Kalziumgehalt im SR erfreulicherweise unter Einfluss des neuartigen Inhibitors an.

4. Diskussion

Die Untersuchungen der humanen Herzmuskelzellen aus dem rechten Vorhof mit dem konfokalen Lasermikroskop ergaben sehr interessante Ergebnisse. Besonders der Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern zeigte nicht nur schon Bekanntes, sondern auch relevante, innovative Ergebnisse.

Betrachtet man Schritt für Schritt die einzelnen Ergebnisse, so wird bei der Sparkfrequenz schnell deutlich, dass sie beim Vorhofflimmern unter basalen Bedingungen ohne Inhibitor stark erhöht ist. Dies deckt sich mit bereits publizierten Untersuchungen, sowohl bei tierischen, als auch bei humanen Zellen. So konnte in einem Tiermodell, bei dem Mäuse bei denen Vorhofflimmern induziert wurde, deutlich gezeigt werden, dass durch die Hemmung der CaMKII die Sparkfrequenz sich signifikant reduziert. Dies konnte nicht nur mit AIP, sondern auch mit KN-93, ein anderer bekannter CaMKII-Inhibitor, gezeigt werden (65).

Aber auch bei menschlichen Zellen, die ebenfalls aus dem rechten Vorhof stammten, wurde eindrücklich verdeutlicht, dass es bei Patienten mit Vorhofflimmern zu wesentlich mehr spontanen diastolischen Sparks kommt, als bei Patienten, deren Herzen einen Sinusrhythmus auswiesen. Auch gelang es hier wiederum mit KN-93 die CaMKII zu hemmen und so die Sparkfrequenz signifikant zu senken (63). Das erste Mal gelang es 2004 nachzuweisen, dass bei Vorhofflimmerpatienten die Sparkfrequenz höher ist (38).

Es ist besonders interessant zu sehen, dass in der vorliegenden Arbeit unter Einfluss des neuartigen CaMKII-Inhibitors RA123456 die Senkung der Sparkfrequenz noch ausgeprägter war als nach Inkubation mit AIP. Bei genauerer Betrachtung fällt allerdings auf, dass der Rückgang der Sparkfrequenz bei Sinusrhythmuspatienten nicht so stark ausfällt. Dies könnte daran liegen, dass hier die CaMKII nicht so stark exprimiert wird bzw. aktiv ist, wie im Vorhofflimmern (63)(82, 83). Folglich könnte beim kranken Herzrhythmus, bei dem die CaMKII maximal aktiv ist, deren Hemmung zu einem ausgeprägten Effekt führen.

Die erhöhten CaMKII-Aktivität bei Vorhofflimmerpatienten konnte ebenfalls sowohl im Tiermodell als auch an menschlichen Zellen mithilfe von Western-Blot-Experimenten gezeigt werden (63, 65), weshalb man davon ausgehen kann, dass das bei den für die vorliegende Arbeit untersuchten Patienten ebenfalls der Fall ist.

Die Sparkamplitude war bei Vorhofflimmerpatienten wesentlich und signifikant geringer als bei Patienten mit Sinusrhythmus. Dies zeigt, dass pro Spark weniger Kalzium aus dem Kalziumspeicher entweicht. Allerdings konnte durch die CaMKII-Inhibition nur ein tendenzieller Rückgang der Amplitude verzeichnet werden, weil möglicherweise der erhöhte SR-Kalziumgehalt gegensteuert. Auch bei der Breite der Sparks ergab sich nur in der Gesamtbetrachtung der Daten einen verringernden Effekt auf die Breite. Dies könnte daran liegen, dass die Menge an RyR-Cluster konstant bleibt. Interessant war hier zu beobachten, dass unter basalen Bedingungen die Sparks bei Vorhofflimmer- und Sinusrhythmuspatienten annähernd die gleiche Breite aufwiesen.

Bei der Sparkdauer hingegen wurde deutlich, dass diese beim Vorhofflimmern signifikant erhöht war. Durch die CaMKII-Inhibition durch sowohl RA123456 und AIP konnte diese in dieser Gruppe signifikant gesenkt werden und in der Sinusrhythmusgruppe immerhin tendenziell. Dies zeigt, dass die Sparkdauer erheblich von der CaMKII abhängt und durch deren Hemmung positiv beeinflusst werden kann. Ähnliches wurde auch in dem bereits genannten Tiermodell gezeigt (65).

In einer experimentellen Reihe mit Ventrikelzellen aus humanen Herzen mit Herzinsuffizienz bzw. Kardiomyopathie konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (84). So kam es bei der Sparkmessung mit Zellen aus Herzen mit einer dilatierten Kardiomyopathie ebenfalls durch die Hemmung der CaMKII mit AIP zu einer reduzierten Sparkfrequenz. Auch die Dauer wurde reduziert und sogar die Breite der Sparks konnte gesenkt werden. Nur auf die Amplitude hatte die CaMKII-Inhibition keinen Einfluss, wie auch in der vorliegenden Arbeit. Bei ähnlichen Versuchen der gleichen Arbeitsgruppe mit humane Herzen mit einer ischämischen Kardiomyopathie gelang es neben den anderen Parametern sogar die Amplitude durch die Hemmung der Kinase zu senken (84).

Neben all der verschiedenen Parameter der Sparks liegt ein besonderes Augenmerk natürlich auf dem Kalziumleck aus dem SR. Es gilt unter anderem als Hauptverursacher der Pathologien ausgelöst durch eine gesteigerte Aktivität der CaMKII. Die übermäßige Aktivität der CaMKII erhöht nicht nur das SR-Kalziumleck (58, 85) und erniedrigt den Kalziumgehalt im SR (58), sondern kann auch zu vermehrten Arrhythmien (65, 86) und Hypertrophie (85) führen. Die Berechnung des Kalziumlecks erfolgte durch die Multiplikation der verschiedenen Parameter der

Sparks, also die Frequenz, Amplitude, Breite und Dauer bei halbmaximaler Amplitude (84).

Es konnte hier deutlich gezeigt werden, dass das SR-Kalziumleck bei Patienten, die an Vorhofflimmern leiden, deutlich signifikant erhöht war im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus. Durch die Inhibition der CaMKII gelang es das Kalziumleck zu verringern. Sowohl bei AIP als auch bei RA123456 war dies der Fall. Auch hier zeigte sich, dass der Effekt beim Vorhofflimmern ausgeprägter war, als in der Sinusrhythmusgruppe.

Eng verbunden mit dem Kalziumverlust aus dem SR ist dessen Kalziumgehalt. Durch die Untersuchungen mit Caffein konnte eindrücklich gezeigt werden, dass der Kalziumgehalt im SR bei Vorhofflimmerpatienten deutlich erniedrigt ist im Vergleich zu Patienten, die einen gesunden Herzrhythmus aufweisen. Auch die Hemmung der CaMKII zeigte kongruent zu deren Effekt auf das Kalziumleck eine signifikante Wirkung. So stieg der Kalziumgehalt nämlich rasant an. Dies konnte auch hier sowohl beim bekannten AIP als auch bei RA123456 sehr schön gezeigt werden. Dies könnte auch der Grund sein, warum die Amplitude der Sparks nicht kleiner war.

Die Effekte des Kalziumlecks und dessen Reduktion sind ein viel beforschtes Thema. Es steht daher fest, dass ein erhöhtes SR-Kalziumleck viele verschiedene negative Effekte nach sich zieht. Ist es nämlich unter pathologischen Bedingungen erhöht, kann es zu einer verminderten Kontraktilität und zu Arrhythmien kommen (87). So könnte ein kleineres Kalziumleck durch die Inhibition der CaMKII, wie es in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, folglich zu einer verbesserten Kontraktilität und erhöhten Inotropie kommen.

Allerdings zeigte eine andere Arbeitsgruppe, dass die Kontraktilität im Vorhof bei Patienten mit Vorhofflimmern zwar signifikant geringer ist, führte dies aber vor allem auf die verminderte Expression des L-typ Kalziumkanals und die verstärkte Expression des NCX zurück (88).

Dennoch hätte ein geringeres Kalziumleck einen Effekt auch bei diesem Mechanismus. Schließlich würde ein geringeres Leck aus dem SR durch die Hemmung der CaMKII dazu führen, dass der NCX weniger Kalzium aus der Zelle in den Extrazellularraum bringen könnte.

Im Vergleich dazu stellte sich heraus, dass das Kalziumleck mitversuchsacht durch die CaMKII bei Herzinsuffizienz für eine schlechtere Kontraktilität und für Arrhythmien

verantwortlich war. Dies konnte in einer Untersuchung von humanem kardialen Gewebe herausgefunden werden (85).

Auf ventrikulärer Ebene könnte also die Inhibition des Enzyms sowohl die Inotropie steigern als auch die Arrhythmien verhindern oder zumindest verringern (85). Auch auf das Vorhofflimmern ergäbe sich einen positiven Effekt, da es ja mit der Herzinsuffizienz stark vergesellschaftet ist.

Eine andere Studie konnte an humanen, ventrikulärem Myokard von terminalen Herzinsuffizienzpatienten zeigen, dass eine schlechte Ejektionsfraktion, also eine schlechte systolische Funktion in Form einer verminderten Kontraktion mit einem verminderten Kalziumgehalt im SR korreliert (89).

Es gelang einer Arbeitsgruppe in Göttingen eine akute CaMKII-Überexpression mittels Gentransfer in Mäusen zu erreichen. In diesem Tiermodell zeigte sich, dass höchstwahrscheinlich durch die Phosphorylierung des RyR2 zwar die Sparkfrequenz erhöht und dadurch das Kalziumleck aus dem SR ebenfalls erhöht und dessen Kalziumgehalt erniedrigt war, aber es dennoch zu keiner relevanten Verminderung der Kontraktionskraft kam. Dennoch zeigte sich immerhin eine tendenzielle Verminderung der Kontraktion bei höheren Schlagfrequenzen. Wie zu erwarten war, war außerdem die Frequenzabhängige Beschleunigung der Relaxation erhöht (90). Diese Effekte beschreiben die akuten Folgen einer CaMKII-Überexpression, während ansonsten die chronischen Effekte beschrieben sind. Es stellt sich aber dennoch die Frage, ob die Hemmung der CaMKII tatsächlich zu einer erhöhten Kontraktionskraft führt oder ob nicht zusätzlich andere Mechanismen für eine verminderte Inotropie verantwortlich sind.

Allerdings könnte auch aus rein physiologischer Sicht ein verringertes Kalziumleck durch die CaMKII-Inhibition zu einer erhöhten Kontraktilität führen, da der dadurch erhöhte Kalziumgehalt im SR zu einer verstärkten Kalziumausschüttung während der elektromechanischen Kopplung führen könnte, was schließlich die Inotropie steigert. Zudem legen dies auch die Untersuchungen von humanem Gewebe im Vergleich zu den Tiermodellen sehr nahe. Außerdem könnte es zu einem reduzierten atrialen Remodelling kommen (91).

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte außerdem ebenfalls anhand von Gewebe von herzinsuffizienten Patienten zeigen, dass die Inhibition der CaMKII bei erhöhter Expression sehr wohl zu einer gesteigerten Kontraktionskraft und Inotropie führt.

Grundlage dieser Beobachtung scheint schließlich der gesteigerte Kalziumgehalt im SR durch ein sinkendes Kalziumleck zu sein (92).

Es ist also davon auszugehen, dass auch Vorhofflimmerpatienten durch die Inhibition der CaMKII von einer erhöhten atrialen Inotropie profitieren könnten. Um dies genau herauszufinden, sollten allerdings noch weitere Untersuchungen erfolgen. Ein geeigneter experimenteller Ansatz könnte die Verwendung einer Anlage sein, die direkt die Kraft eines Muskeltrabekels misst. Dabei könnte man direkt die Auswirkung der CaMKII-Inhibition z.B. durch RA123456 auf die Inotropie sehen.

Eine andere Pathologie, die kausal mit dem Kalziumleck und dem verminderten Kalziumgehalt in Verbindung steht, sind Arrhythmien, vor allem das Vorhofflimmern. So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass die gestörte Kontraktion durch das Kalziumleck eng verbunden ist mit Arrhythmien in einem Tierherzinsuffizienzmodell (93).

Eine große Studie, die Patienten mit Vorhofflimmern und Sinusrhythmus miteinander verglichen hat, konnte zeigen, dass das Kalziumleck wiederum größer war bei Patienten mit arrhythmischen Vorhof, was sich durch die Hemmung der CaMKII verringern ließ. Auch kam es zu häufigeren späten Nachdepolarisationen und einer erhöhten NCX-Aktivität, was als Grundlage der gesteigerten Ektopie angesehen wurde. Zudem war das Aktionspotential verkürzt. In der gleichen Studie konnte anhand eines Mausmodells gezeigt werden, dass die Überexpression der CaMKII auch hier zu einem erhöhten Leck aus dem SR führt und gleichzeitig die Entstehung von Vorhofflimmern durch hohe Herzfrequenzen begünstigt. Die Autoren postulieren, dass eine erhöhte CaMKII-Aktivität als Risikofaktor für Vorhofflimmern sowohl als Ursache als auch als Folge des pathologischen Rhythmus eine erhebliche Rolle spielen könnte (94).

Auch andere Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen Vorhofflimmern und dem Kalziumleck verursacht durch die CaMKII-Phosphorylierung des RyR2 zeigen. So erbrachte ein anderes Mausmodell ähnliche Ergebnisse: Durch schnelle Frequenzen gelang es zu zeigen, dass es für die Entstehung von Vorhofflimmern nötig ist, eine pathologische Veränderung innerhalb der Zelle zu haben, die als Grundlage die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigt, und die gesteigerte Aktivität der CaMKII. Die pathologische Veränderung stellte hier eine Mutation des RyR2 dar. So zeigte sich auch hier ein großer Kalziumverlust aus dem SR, was die Autoren auch hier auf die CaMKII zurück führen wie auch die erhöhte Auslösbarkeit von

Vorhofflimmern (95). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Arbeitsgruppe aus den USA, die mit gleich drei verschiedenen Mausmodellen den Zusammenhang zwischen dem Kalziumleck und der Entstehung von Vorhofflimmern zeigen konnte. Sie gehen davon aus, dass die Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII, ausgelöst durch schnelle Herzfrequenzen, zu Vorhofflimmern führt (96).

In die gleiche Richtung deutet wiederum ein anderes Mausmodell, in dem gezeigt wurde, dass Vorhofflimmern verhindert werden kann, wenn man durch CaMKII-Inhibition das Kalziumleck verringert und späte Nachdepolarisationen durch den NCX verhindert (97).

Aber nicht nur die Entstehung von Vorhofflimmern, sondern auch dessen Weiterentwicklung vom paroxysmalen zu persistierend oder gar der permanenten Form wird durch die CaMKII gefördert. Dies konnte zumindest in einem weiteren Tiermodell gezeigt werden (65).

Abseits von Tiermodellen konnte auch beim Menschen die Wichtigkeit des Kalziumlecks bei der Entstehung des Vorhofflimmerns beobachtet werden. Bei der Untersuchung von humanem Gewebe aus dem rechten Vorhof von Patienten, die bisher nur an paroxysmale Vorhofflimmern litten, zeigten sich eine unveränderte Aktivität des L-Typ-Kalziumkanals, des NCX und auch eine normale Aktionspotentialdauer. Die Autoren gehen davon aus, dass noch kein elektrisches Remodelling stattgefunden hat. Dennoch konnten sie ein erhöhtes SR-Kalziumleck, damit einhergehende vermehrte spontane Kalziumfreisetzungen, und vermehrte späte Nachdepolarisationen feststellen. Sie fanden überraschenderweise aber auch heraus, dass der SR-Kalziumgehalt erhöht war, was allerdings wiederum mit der ebenfalls gefundenen vermehrten Phosphorylierung von PLN erklärbar ist. Zwar zeigte sich die Offenwahrscheinlichkeit und die Expression des RyR erhöht, die Phosphorylierung war allerdings nicht erhöht (98). Es ist also davon auszugehen, dass die Entstehung und Entwicklung des Vorhofflimmerns ein schleichender Prozess ist, was durch eine Beobachtungsstudie in Japan belegt werden konnte (99), bei dem sich die mechanistischen Ursachen langsam verändern, weiterentwickeln und ineinander übergehen. Aber bei allen Formen steht offenbar das Kalziumleck im Mittelpunkt.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass das Kalziumleck aus dem SR im Vorhofflimmern durch die Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII verantwortlich ist (63). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, da das

Kalziumleck durch die Hemmung der CaMKII gesunken und der Kalziumgehalt im SR angestiegen ist.

Es lässt sich feststellen, dass für das Vorhofflimmern besonders die CaMKII in Verbindung mit dem NCX eine entscheidende Rolle spielt. Das erhöhte SR-Kalziumleck liefert für den NCX viel Substrat, was über den elektrogenen Ionenaustausch mit Natriumionen arrhythmogen wirkt. So könnte eine parallele Hemmung der CaMKII und des NCX ein erweiterter therapeutischer Ansatzpunkt für eine antiarrhythmische Therapie sein. Aber auch die alleinige Hemmung der CaMKII könnte durch die beschriebenen Effekte eventuell das Entstehen und Fortschreiten des Vorhofflimmerns verhindern oder zumindest verlangsamen. In jedem Fall hat sich die Hemmung der CaMKII als vielversprechendes mögliches Ziel einer antiarrhythmischen Therapie erwiesen (100).

Es stellt sich nun die Frage, welche Konzentration des neuen CaMKII-Inhibitors RA123456 die größte Wirkung erzielt hat. Bei der Sparkfrequenz zeigte sich bei der 1 μM Konzentration der größte Effekt, dicht gefolgt von der 3 μM . Der Effekt lag hier nur minimal auseinander. Die CaMKII-Inhibition zeigte bei der Amplitude zwar keinen signifikanten Effekt, aber dennoch ergab sich bei 3 μM von RA123456 ein ganz geringer stärkerer Effekt als bei den anderen Konzentrationen. Bei der Breite sieht es ähnlich wie bei der Amplitude aus. Zwar ergaben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede, aber dennoch kam es unter 3 μM Konzentration des neuen Inhibitors den größten Effekt. Bei der Sparkbreite zeigte sich bei der Gesamtbetrachtung ein signifikanter Rückgang bei 3 μM . Bei der Sparkdauer hingegen erbrachte die 1 μM Konzentration den größten Effekt, aber auch 3 μM erzielte signifikante Unterschiede. Beim Kalziumleck, dessen Berechnung alle Parameter in sich vereint, zeigte schließlich die 3 μM Konzentration von RA123456 den größten Unterschied. Auch der Kalziumgehalt im SR stieg unter 3 μM am stärksten an. Betrachtet man all diese Ergebnisse, kann man also den Schluss ziehen, dass die 3 μM Konzentration die größte Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigt und somit zu favorisieren ist.

Alles in allem sprechen diese Befunde dafür, dass die Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern viel besser auf die Inhibition der CaMKII ansprechen und hier ein wirklich deutlicher Effekt erzielt werden kann. Der Nutzen im Sinusrhythmus fällt leider nur gering aus. Dies könnte wie schon diskutiert daran liegen, dass die CaMKII in der

Gruppe der Sinusrhythmuspatienten eine niedrigere Aktivität und Expression aufweist, als bei Vorhofflimmerpatienten (63).

Die klinischen Daten der Patienten dokumentieren schon Bekanntes. Es zeigte sich nämlich, dass Patienten mit Vorhofflimmern deutlich älter waren, als Patienten mit Sinusrhythmus und auch der linke Vorhof war, zumindest bei der Gruppe, bei der Sparks gemessen wurden, signifikant vergrößert, genauso wie das Septum. Die relevante Medikation war typisch für kardiologische Patienten. Es gab keine großen Unterschiede außer logischerweise in der Antikoagulation, die bei Vorhofflimmerpatienten mit Marcumar oder den neuen Antikoagulantien erfolgte. Interessant ist allerdings, dass sich beim NTproBNP, das ein Marker für eine Herzinsuffizienz ist, für die Patienten, bei denen Sparks gemessen wurden, ein sehr starker Trend abzeichnet. Es ist annähernd signifikant erhöht im Vorhofflimmern, was auch schon in anderen Studien gezeigt werden konnte (101).

Insgesamt wird deutlich, dass die Patientengruppen vergleichbar waren, wenn auch Unterschiede aufwiesen, welche unabhängig von Vorhofflimmern als Ursache der Veränderungen in den Kalziumsparks und SR-Kalziumgehalt infrage kommen. Eine multivariate Analyse war aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht möglich.

4.1. Limitationen und Ausblick

Wie schon in der Einleitung beschrieben entsteht Vorhofflimmern im linken Vorhof und breitet sich von hier auf das restliche atriale Gewebe aus. Die untersuchten Zellen stammen allerdings aus dem rechten Vorhof. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass bei Anlage der Herzlungenmaschine bei der kardialen Bypassoperation unter normalen Umständen aus operationstechnischen Gründen nur der rechte Vorhof kanüliert wird und deswegen nur dieses Gewebe für die Untersuchungen genutzt werden kann.

Es ist aber davon auszugehen, dass die Veränderungen, die mit dem Vorhofflimmern einhergehen, bei Manifestation des krankhaften Rhythmus sich schon global auf beide Vorhöfe verteilt haben. Dennoch ist dies nicht mit vollkommener Gewissheit zu sagen. Allerdings sprechen hier die Ergebnisse für sich. Selbst wenn die Veränderungen noch nicht vollends im rechten Vorhof angelangt sind, so zeigt der deutliche Einfluss der Inhibitoren doch, dass die Inhibition der CaMKII einen großen Effekt hat. Es ist daher

davon auszugehen, dass die Inhibition des Enzyms auch im linken Vorhof eine Wirkung erzielen würde.

Außerdem konnte eine Studie zeigen, dass die CaMKII bei Patienten mit Vorhofflimmern auch im linken Vorhof sowohl vermehrt exprimiert, als auch vermehrt autophosphoryliert ist (102). Somit lässt sich sagen, dass die Hemmung des Enzyms auch am Entstehungsort des Vorhofflimmerns seine Wirkung zeigen müsste und so Effekte im gesamten Atrium haben sollte.

In der vorliegenden Arbeit wird davon ausgegangen, dass das SR-Kalziumleck allein durch Sparks entsteht. Aber eine Arbeitsgruppe aus den USA hat anhand eines Tiermodells mit Hasen herausgefunden, dass es auch einen Anteil am Kalziumleck gibt, der unabhängig von Sparks ist. Die Studie hat herausgefunden, dass das Kalziumleck vor allem bei niedrigem SR-Kalziumgehalt nicht von Sparks abhängt, da diese hier nicht mehr vorkamen (103). Auch eine andere amerikanische Arbeitsgruppe konnte ähnliche Ergebnisse präsentieren. Die Arbeitsgruppe kombinierte die Messung von Sparks mittels konfokaler Lasermikroskopie mit der direkten Messung des SR-Kalziumlecks. Sie fanden auf diese Art und Weise heraus, dass das Kalziumleck aus dem SR aus zwei Komponenten besteht, wobei eine abhängig von Sparks ist und die andere nicht (104). Es stellt sich nun die Frage, inwieweit und in welchem Maß dies auch auf das Kalziumleck bei Vorhofflimmerpatienten zutrifft. Schließlich wurde bereits durch eine deutsche Arbeitsgruppe festgestellt, dass das Kalziumleck unter pathologischen Bedingungen und vor allem bei Vorhofflimmern gerade nicht vom SR-Kalziumgehalt, sondern von der Aktivität der CaMKII abhängig ist (63).

Aber auch hier in der vorliegenden Arbeit zeigen die Ergebnisse, dass die Hemmung der CaMKII das Kalziumleck unter das Niveau der Kontrollgruppe der Patienten mit Sinusrhythmus sinken lassen. Ob dieses sparkunabhängige Kalziumleck aus dem SR dann noch eine wesentliche Rolle spielt und ob es überhaupt bei Menschen existiert, müsste durch weitere Untersuchungen gezeigt werden. Auch der Einfluss der CaMKII-Inhibition darauf stellt eine interessante Frage dar.

Um genauer über das Kalziumleck aus dem SR und seine Ausmaße Bescheid zu wissen, müsste man es experimentell direkt messen. In der vorliegenden Arbeit wurde es aus den Sparkparametern berechnet, wie es auch in anderen Veröffentlichungen zu finden ist (84). Um genaue und quantitative Zahlen zu bekommen, müsste man aber zum Beispiel Messungen am Epifluoreszenzmikroskop mit Tetracain durchführen (105).

Ein weiterer Parameter, der die gesamten Untersuchungen beeinflusst, ist die Isolation der Kardiomyozyten. Diese bedeutet für das Gewebe bzw. für die Zellen einen enormen, nicht physiologischen Stress. Niemand weiß, wie sich die Isolation genau auf die Zellen auswirkt. Außerdem ist die Qualität der Isolation schwankend. Besonders beim Vorhofflimmern gestaltet sie sich äußerst schwierig. Die Zellen wiesen oftmals bereits eine abnorme Struktur auf und man konnte unter dem Mikroskop deutlich sehen, wie anstrengend die Isolation für die bereits sehr kranken Zellen war. Zudem ist die Rate der erfolgreichen Isolationen beim Vorhofflimmern viel niedriger als beim Sinusrhythmus. Oftmals hat sie nicht funktioniert und es konnten keine Zellen oder nur sehr wenige mit schlechter Qualität isoliert werden, während beim Sinusrhythmus die Isolation im Allgemeinen kein Problem darstellte. Dennoch gab es selbstverständlich auch bei Vorhofflimmerpatienten einige qualitativ gute Isolationen.

Grund für die schlechteren Resultate bei Geweben von Patienten mit Vorhofflimmern könnte der vermehrte Fibrosegrad sein. So gibt es in den dilatierten Vorhöfen des kranken Herzrhythmus Stellen, die gar keine lebendigen Kardiomyozyten mehr enthalten (65).

Aber auch der mechanische Stress der Zellen während der Isolation hat sicherlich einen großen Einfluss auf deren Qualität. Möglicherweise haben Zellen so einen Schaden erhalten, der die Sparkfrequenz erhöhen kann oder Zellen so fragil macht, dass sie die Inkubationszeit nicht überstehen. Da allerdings die Isolationen immer unter gleichen Bedingungen abgelaufen sind, kann ein systematischer Fehler dadurch vernachlässigt oder ausgeschlossen werden.

Auch die Auswertung muss kritisch betrachtet werden. Besonders bei Sparks ist die Auswertung der Linescans recht individuell und vom Betrachter abhängig. Die meisten Sparks sind zwar eindeutig zu identifizieren, aber es kommen auch immer wieder Sparks vor, die nicht eindeutig zu erkennen sind. So stellt sich die Auswertung als recht subjektiv dar. Besonders wenn die Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff nicht gut ist, kann es recht schwierig werden, Sparks eindeutig zu erkennen. Auch eine geringe Amplitude, also die Helligkeit, spielt eine erhebliche Rolle. Es ist somit von bedeutender Wichtigkeit, dass die Auswertung der Sparks unter

immer gleichen Bedingungen erfolgt, was der Fall war. Dadurch konnte die Auswirkung eines möglichen systematischen Fehlers so klein wie möglich gehalten werden.

Der Einsatz des konfokalen Lasermikroskops für die Detektion von Sparks hat sich seit der ersten Entdeckung eines solchen Kalziumblitzes schnell weiter entwickelt und längst etabliert. Das Problem mit der Technologie, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist, dass es zu einer Art Informationsverlust kommt. Die Zellen wurden als dreidimensionales Objekt gescannt. Der entstehende Linescan ist allerdings selbstverständlich eine zweidimensionale Darstellung.

Es stellt sich nun die Frage, was der neuartige Inhibitor RA123456 für den einzelnen Patienten bedeutet. Es ist ganz klar, dass der Weg zum Medikament noch sehr weit ist, aber die grundlegenden Ergebnisse auf zellulärer Ebene sehr vielversprechend sind.

Durch die sinkende Sparkfrequenz und das damit einhergehende kleinere Kalziumleck und der steigende SR-Kalziumgehalt kann vermutlich die diastolische intrazelluläre Kalziumkonzentration gesenkt werden. Somit ließe sich die Arrhythmogenität eines erhöhten diastolischen intrazellulären Kalziumgehaltes, wie sie bereits oben beschrieben wurde, verringern und es ließen sich Arrhythmien eventuell vorbeugen. Vielleicht könnte man sogar die Entwicklung und das Fortschreiten von Vorhofflimmern verhindern oder zumindest verzögern (65).

Ein weiterer wünschenswerter Effekt ergäbe sich aus dem gesteigerten Kalziumgehalt aus dem SR. Es könnte pro Herzschlag mehr Kalzium ausgeschüttet werden, was mit einer gesteigerten Inotropie einherginge und für eine verbesserte Kontraktilität sorgen könnte. Gerade Patienten mit einer geringen Ejektionsfraktion könnten davon wahrscheinlich stark profitieren.

Es könnten sich allerdings auch Probleme aus der Inhibition der CaMKII ergeben. Das Enzym ist wie bereits erwähnt ubiquitär exprimiert. Niemand weiß, wie sich eine globale Hemmung der CaMKII auf den gesamten Organismus auswirkt.

Vor allem auch im Nervengewebe spielt die CaMKII eine wichtige Rolle. Hier ist vor allem die Gedächtnisbildung hervorzuheben (45). Sollte die Hemmung der CaMKII auch in Nervenzellen stattfinden, könnte dies schwere Folgen haben. So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass die Inhibition des Enzyms die Unterschiede zwischen einer Gruppe von Tieren, die etwas gelernt hatte, und eine Kontrollgruppe auf neuronaler Ebene aufhieb (106). Eine andere Studie kam zu dem Schluss, dass die CaMKII vor

allein für das Lernen aber weniger für das Langzeitgedächtnis zuständig ist. So verhinderte die Hemmung des Enzyms, dass Tiere etwas Neues lernen konnten (107). Aber nicht nur in der Neurologie spielt die CaMKII eine wichtige Rolle.

Sie ist auch zum Beispiel für die Funktion von Epithelien von Bedeutung. Eine japanische Studie hat herausgefunden, dass durch die Hemmung der CaMKII sich die Funktion von Epithelien verändert. So kam es zu einer Vergrößerung der Tight-Junction-Bereiche und einer erhöhten Barrierefunktion. Die Autoren gehen davon aus, dass dies zu einem möglichen Therapieansatz für entzündliche Erkrankungen sein könnte (108).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die CaMKII-Inhibition zu einer verminderten Apoptoserate von Pneumozyten vom Typ 2 und unter Bleomycineinwirkung zu einer verminderten Fibrose führte. Die Autoren gehen daher davon aus, dass man so Patienten, die an einer Lungenfibrose leiden, Erleichterung verschaffen kann (109). So zeigte sich die CaMKII auch im Herzen als Modulator der Apoptose (110).

Auch in der Onkologie ist die CaMKII von immer größerem Interesse. Es wird immer mehr klar, dass das Enzym in verschiedenen Tumorentitäten verstärkt exprimiert wird und die Hemmung einen sehr positiven Effekt auf das Tumorwachstum hat. So könnte die Inhibition der CaMKII auch in der Onkologie in der Zukunft zu einer erfolgreichen Krebstherapie führen (111).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die CaMKII ein sehr spannendes Enzym ist, das allerdings noch mehr erforscht werden muss. Besonders die Auswirkungen der Inhibition auf den gesamten Körper, nicht nur auf einzelne Zellen, muss unbedingt getestet werden.

Dennoch weisen die bisherigen Ergebnisse auf eine vielversprechende Möglichkeit hin, durch die Inhibition vielen verschiedenen Patientengruppen zu helfen. Besonders der Einsatz bei der Therapie von Vorhofflimmerpatienten erscheint vielversprechend. So könnte es nicht nur die Kontraktilität verbessern, sondern auch die Arrhythmien positiv beeinflussen. Dennoch ist es noch eine sehr weite Etappe, bis ein CaMKII-Inhibitor den Weg zu einem Medikament gefunden haben wird.

5. Zusammenfassung

Hintergrund:

Vorhofflimmern ist die häufigste Arrhythmie beim Erwachsenen und ist sowohl ein großes Problem in der klinischen Behandlung als auch für den Gesundheitszustand der Patienten. Die supraventrikuläre Arrhythmie tritt mit steigender Inzidenz und Prävalenz vor allem bei älteren Menschen auf. Die größte Gefahr dabei ist einen Schlaganfall zu erleiden.

Die mit dem Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz assoziierte CaMKII ist ein im Kalziumhaushalt wichtiges Protein, das bei Überexpression zu pathologischen Prozessen innerhalb der Zelle führt. Deshalb könnte es aus pharmakologischer Sicht sinnvoll sein, das Enzym zu hemmen. Ziel der Arbeit ist es einen neuartigen CaMKII-Inhibitor zu testen und seine Wirkung zwischen Patienten mit Vorhofflimmern und Patienten mit Sinusrhythmus zu vergleichen.

Material und Methoden:

Sobald ein Patient mit Vorhofflimmern für eine herzchirurgische Operation stationär aufgenommen wurde, wurden nach seiner Einwilligung die klinischen Daten erhoben und nach der Operation sein Gewebe für die Laboruntersuchungen verwendet. Gleichzeitig fanden entsprechend viele Patienten mit Sinusrhythmus in der Studie Berücksichtigung.

Die Herzmuskelzellen, die untersucht wurden, stammen von Patienten, die sich einer aortokoronaren Bypassoperation oder einer Klappenersatz- bzw. Klappenrekonstruktionsoperation unterzogen haben. Im Rahmen dieser Operationen kommt es zum Einsatz einer Herz-Lungenmaschine. Dabei wird aufgrund der Operationstechnik der rechte Vorhof kanüliert, wobei rechtsatriales Gewebe anfällt. Durch einen genehmigten Ethikantrag war es möglich, nach einer ausführlichen Aufklärung und Patienteneinwilligung dieses Gewebe im Labor zu untersuchen.

Es erfolgte die Isolation der einzelnen Kardiomyozyten mithilfe des Gewebeverdaus durch eine Kollagenase und eine Protease. Die so isolierten Herzmuskelzellen wurden mit dem Kalziumfluoreszenzfarbstoff Fluo-4 inkubiert und beladen, um sie am konfokalen Lasermikroskop untersuchen zu können. Dabei erfolgte die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs durch einen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Die daraufhin emittierte Fluoreszenz konnte dann gemessen werden. Auf diese Art und Weise konnten kleine spontane Entladungen aus dem Kalziumspeicher der Zellen, das

SR, detektiert werden. Diese Kalziumentladungen, die im Linescan als zeitlich und örtlich begrenzte kleine Blitze imponieren, werden Kalziumsparks genannt. Aus ihren charakteristischen Parametern lässt sich das diastolische Kalziumleck aus dem SR bestimmen, das bei Vorhofflimmern erhöht ist. In parallelen Untersuchungen wurden die mit Fluo-4 beladenen Zellen mit Caffein (10 mmol/L) in Berührung gebracht, um so das SR vollständig zu entleeren. Die entstehende Kalziumfreisetzung kann gemessen und als Maß für den SR-Kalziumgehalt ausgewertet werden.

Beide Experimente wurden sowohl mit verschiedenen Konzentrationen eines neuen CaMKII-Inhibitors als auch mit einem bereits bekannten Inhibitor des Enzyms durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen des neuen Inhibitors lagen bei 1 µM, 3 µM und 10 µM. Daneben wurde Autocamtide -2- Related Inhibitory Peptide in einer Konzentration von 2µM als bereits etablierten CaMKII-Inhibitor verwendet. Als Kontrolle fand eine entsprechende Menge von DMSO Verwendung, das auch als Vehikel für den neuartigen CaMKII-Inhibitor diente.

Ergebnisse:

Wie erwartet gab es in Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern signifikant mehr Sparks, sodass die Sparkfrequenz deutlich erhöht war. Auch die Amplitude der Sparks lag beim Vorhofflimmern deutlich über der der Sinusrhythmusgruppe. Außerdem war auch die Dauer der Sparks im Vorhofflimmern deutlich verlängert, während es bei ihrer Breite keine signifikanten Unterschiede gab. Das daraus berechnete Kalziumleck war deutlich erhöht bei Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu Patienten mit gesundem Herzrhythmus. Die Inhibition der CaMKII konnte die Sparkfrequenz, die Dauer und die Breite signifikant senken, während bei der Amplitude sich nur tendenzielle Effekte zeigen. Insgesamt konnte so das SR-Kalziumleck signifikant verkleinert werden.

Der Kalziumgehalt der Zellen war beim Vorhofflimmern deutlich niedriger und konnte durch die Hemmung der CaMKII signifikant erhöht werden.

Conclusio:

Aus diesen Ergebnissen leiten sich potentielle positive Effekte für die Patienten ab. So könnte es durch die CaMKII-Inhibition zu einer verbesserten Kontraktilität und zu verringerten Arrhythmien kommen. Es besteht sogar die Möglichkeit, dass dadurch die Entwicklung und das Fortschreiten des Vorhofflimmerns begrenzt werden.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Herzens mit dem Reizleitungssystem	9
Abbildung 2: Ultrastruktur einer Kardiomyozyte.....	10
Abbildung 3: elektromechanische Kopplung und die daran beteiligten Proteine und Ionen.....	12
Abbildung 4: schematische Darstellung eines Sinusrhythmus-EKG.....	14
Abbildung 5: Sinusrhythmus -EKGs (A) und Vorhofflimmer-EKG (B)	16
Abbildung 6: Struktur der CaMKII als Monomer (links) und Oligomer (rechts)	20
Abbildung 7: OP-Situs mit den Kanülen der Herz-Lungen-Maschine	25
Abbildung 8: explantiertes Gewebestück des rechten Vorhofs.....	27
Abbildung 9: Zellen und Zellschrott nach der Isolation und Zentrifugation.....	31
Abbildung 10: einzelne atriale Kardiomyozyte nach der Isolation.....	32
Abbildung 11: Strukturformel von Fluo-4	33
Abbildung 12: Exzitations- (blau) und Emissionsspektrum (rot) von Fluo-4.....	33
Abbildung 13: konfokales Lasermikroskop von Zeiss mit der Scansoftware ZEN	35
Abbildung 14: Schema des Strahlengangs des konfokalen Mikroskops.....	36
Abbildung 15: Original Linescan einer Zelle ohne Inhibitoreinfluss.....	38
Abbildung 16: zweidimensionaler Spark (A) und die entsprechende dreidimensionale Darstellung (B).....	39
Abbildung 17: Strukturformel von Caffein	40
Abbildung 18: Original Linescan eines Caffeintransienten	40
Abbildung 19: Darstellung eines Original Linescan eines Caffeintransienten als Funktion.....	41
Abbildung 20: Strukturformel von AIP.....	42
Abbildung 21: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkfrequenz	46
Abbildung 22: Sparkfrequenz Sinusrhythmus im Vergleich zu Vorhofflimmern	48
Abbildung 23: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkfrequenz; Sinusrhythmus im Vergleich zu Vorhofflimmern.....	52
Abbildung 24: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkamplitude	54
Abbildung 25: Vergleich der Sparkamplitude zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern	56
Abbildung 26: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Amplitude der Sparks; Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern	57
Abbildung 27: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkbreite	59

Abbildung 28: Vergleich der Sparkbreite zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern	61
Abbildung 29: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkbreite; Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern.....	62
Abbildung 30: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkdauer	64
Abbildung 31: Vergleich der Dauer der Sparks zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern	66
Abbildung 32: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf die Sparkdauer; Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern.....	67
Abbildung 33: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf das Kalziumleck aus dem SR.....	69
Abbildung 34: Das Kalziumleck aus dem SR im Vergleich zwischen Vorhofflimmer und Sinusrhythmus	71
Abbildung 35: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf das Kalziumleck Sinusrhythmus im Vergleich zu Vorhofflimmern.....	72
Abbildung 36: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf den Kalziumgehalt des SR	74
Abbildung 37: Vergleich der Caffein-Transienten-Amplitude im Vergleich zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern.....	76
Abbildung 38: Wirkung der CaMKII-Inhibition auf den SR-Kalziumgehalt; Sinusrhythmus im Vergleich zu Vorhofflimmern	80
Tabelle 1: Isolationstyrode.....	27
Tabelle 2: Enzymlösung für die Isolation	28
Tabelle 3: Lösung zum Abstoppen der Enzymlösung.....	29
Tabelle 4: Storage-Lösung	30
Tabelle 5: Messtyrode ohne Inhibitoren (Normaltyrode)	34
Tabelle 6: Patientendatengrenzwerte	44
Tabelle 7: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6...	47
Tabelle 8: Patientendaten zu allgemeinen Informationen und relevanten Vorerkrankungen SIR steht für Sinusrhythmus und VHF steht für Vorhofflimmern ..	49
Tabelle 9: Patientendaten zu Echographie SIR steht für Sinusrhythmus und VHF für Vorhofflimmern	50
Tabelle 10: Patientendaten zur Medikation.....	51
Tabelle 11: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	53
Tabelle 12: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	55

Tabelle 13: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	58
Tabelle 14: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	60
Tabelle 15: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	63
Tabelle 16: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	65
Tabelle 17: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	68
Tabelle 18: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	70
Tabelle 19: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	73
Tabelle 20: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	75
Tabelle 21: Patientendaten zu allgemeinen Informationen und relevanten Vorerkrankungen SIR steht für Sinusrhythmus und VHF steht für Vorhofflimmern .	77
Tabelle 22: Patientendaten zu Echokardiographie SIR steht für Sinusrhythmus und VHF steht für Vorhofflimmern	78
Tabelle 23: Patientendaten zu relevanter Medikation	79
Tabelle 24: Auszug aus der ANOVA-Test Ergebnistabelle aus Prism Graph Pad 6.	81

7. Literaturverzeichnis

1. Aumüller G, Schmitz F, Wolff W, et al. Duale Reihe Anatomie. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010. (DUALE REIHE Herausgegeben von Alexander Bob und Konstantin Bob).
2. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann, Rainer, Hoth, Markus, Wischmeyer, Erhard et al. Duale Reihe Physiologie. 2., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012. (DUALE REIHE Herausgegeben von Alexander Bob und Konstantin Bob).
3. Tso C, Currie GM, Gilmore D, Kiat H. Electrocardiography: A Technologists Guide to Interpretation. *Journal of Nuclear Medicine Technology* 2015; 43(4):247–52.
4. Scicchitano P, Carbonara S, Ricci G, Mandurino C, Locorotondo M, Bulzis G et al. HCN channels and heart rate. *Molecules* 2012; 17(4):4225–35.
5. McArthur L, Chilton L, Smith GL, Nicklin SA. Electrical consequences of cardiac myocyte: fibroblast coupling. *Biochem Soc Trans* 2015; 43(3):513–8.
6. Welsch U. Lehrbuch Histologie. 3. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010.
7. Huser J, Lipsius SL, Blatter LA. Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *The Journal of Physiology* 1996; 494 (Pt 3):641–51.
8. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2nd ed. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers; 2001. (Developments in cardiovascular medicine. 237).
9. Kleber AG, Saffitz JE. Role of the intercalated disc in cardiac propagation and arrhythmogenesis. *Front Physiol* 2014; 5:404.
10. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415(6868):198–205. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1038/415198a>.
11. Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I. EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J* 2005; 39(1-2):13–23.
12. Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 1993; 262(5134):740–4.

13. Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, Blaustein MP, Boguslavskyi A, Bossuyt J et al. Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *The Journal of Physiology* 2015; 593(6):1361–82.
14. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 2014; 129(8):837–47.
15. Zoni-Berisso M, Lercari F, Carazza T, Domenicucci S. Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin Epidemiol* 2014; 6:213–20.
16. Heeringa J, van der Kuip, Deirdre A M, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker, Bruno H Ch et al. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006; 27(8):949–53.
17. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GYH, Schotten U, Savelieva I, Ernst S et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2010; 31(19):2369–429.
18. Friberg L, Hammar N, Rosenqvist M. Stroke in paroxysmal atrial fibrillation: report from the Stockholm Cohort of Atrial Fibrillation. *Eur Heart J* 2010; 31(8):967–75.
19. Knecht S, Oelschläger C, Duning T, Lohmann H, Albers J, Stehling C et al. Atrial fibrillation in stroke-free patients is associated with memory impairment and hippocampal atrophy. *Eur Heart J* 2008; 29(17):2125–32.
20. Gaita F, Corsinovi L, Anselmino M, Raimondo C, Pianelli M, Toso E et al. Prevalence of Silent Cerebral Ischemia in Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation and Correlation With Cognitive Function. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62(21):1990–7.
21. Grönefeld GC, Hohnloser SH. Heart failure complicated by atrial fibrillation: Mechanistic, prognostic, and therapeutic implications. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003; 8(2):107–13.
22. Thrall G, Lane D, Carroll D, Lip, Gregory Y H. Quality of life in patients with atrial fibrillation: a systematic review. *Am J Med* 2006; 119(5):448.e1-19.

23. Li J, Becker R, Rauch B, Schiele R, Schneider S, Riemer T et al. Usefulness of heart rate to predict one-year mortality in patients with atrial fibrillation and acute myocardial infarction (from the OMEGA trial). *Am J Cardiol* 2013; 111(6):811–5.
24. Batra G, Svennblad B, Held C, Jernberg T, Johanson P, Wallentin L et al. All types of atrial fibrillation in the setting of myocardial infarction are associated with impaired outcome. *Heart* 2016.
25. Nabauer M, Gerth A, Limbourg T, Schneider S, Oeff M, Kirchhof P et al. The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management. *Europace* 2009; 11(4):423–34.
26. Lip GYH, Laroche C, Ioachim PM, Rasmussen LH, Vitali-Serdoz L, Petrescu L et al. Prognosis and treatment of atrial fibrillation patients by European cardiologists: one year follow-up of the EURObservational Research Programme-Atrial Fibrillation General Registry Pilot Phase (EORP-AF Pilot registry). *Eur Heart J* 2014; 35(47):3365–76.
27. Rietbergen DDD, Scholte AJHA, Al Younis I, Stokkel MPM. Myocardial perfusion scintigraphy before and after cardioversion for atrial fibrillation: Recovery of quantitative parameters. *J Nucl Cardiol* 2011; 18(1):192–5.
28. Anter E, Jessup M, Callans DJ. Atrial fibrillation and heart failure: treatment considerations for a dual epidemic. *Circulation* 2009; 119(18):2516–25.
29. Lip GYH, Nieuwlaat R, Pisters R, Lane DA, Crijns, Harry J G M. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest* 2010; 137(2):263–72.
30. Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998; 339(10):659–66.
31. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008; 1(1):62–73.
32. Daoud EG, Bogun F, Goyal R, Harvey M, Man KC, Strickberger SA et al. Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. *Circulation* 1996; 94(7):1600–6.

33. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999; 44(1):121–31.
34. Sun H, Chartier D, Leblanc N, Nattel S. Intracellular calcium changes and tachycardia-induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2001; 49(4):751–61.
35. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002; 415(6868):219–26.
36. Heijman J, Voigt N, Wehrens XHT, Dobrev D. Calcium dysregulation in atrial fibrillation: the role of CaMKII. *Front Pharmacol* 2014; 5:30.
37. Chiang DY, Li N, Wang Q, Alsina KM, Quick AP, Reynolds JO et al. Impaired local regulation of ryanodine receptor type 2 by protein phosphatase 1 promotes atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2014; 103(1):178–87.
38. Hove-Madsen L, Llach A, Bayes-Genis A, Roura S, Rodriguez Font E, Aris A et al. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation* 2004; 110(11):1358–63.
39. Ai X. SR calcium handling dysfunction, stress-response signaling pathways, and atrial fibrillation. *Front Physiol* 2015; 6:46.
40. Ausma J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997; 96(9):3157–63.
41. Corradi D, Callegari S, Maestri R, Benussi S, Alfieri O. Structural remodeling in atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5(12):782–96.
42. Maier LS, Bers DM. Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002; 34(8):919–39.
43. Hudmon A, Schulman H. Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 2002; 71:473–510.

44. Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem* 1989; 264(30):17907–12.
45. Yamauchi T. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(8):1342–54.
46. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:417–45.
47. Mattiazzi A, Bassani RA, Escobar AL, Palomeque J, Valverde CA, Vila Petroff M et al. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308(10):H1177-91.
48. Maier LS, Ziolo MT, Bossuyt J, Persechini A, Mestril R, Bers DM. Dynamic changes in free Ca-calmodulin levels in adult cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006; 41(3):451–8.
49. Wu Y, Luczak ED, Lee E-J, Hidalgo C, Yang J, Gao Z et al. CaMKII effects on inotropic but not lusitropic force frequency responses require phospholamban. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012; 53(3):429–36.
50. Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J. Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 1999; 42(1):254–61.
51. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ. Res.* 2005; 97(12):1314–22.
52. Tessier S, Karczewski P, Krause E-G, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M et al. Regulation of the Transient Outward K⁺ Current by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinases II in Human Atrial Myocytes. *Circ. Res.* 1999; 85(9):810–9.
53. Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA. Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca(2+)-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *Circ. Res.* 1994; 75(5):854–61.

54. Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balsler JR, Anderson ME. Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol* 2000; 2(3):173–7.
55. Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R et al. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 2002; 106(10):1288–93.
56. Wehrens, Xander H T, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ. Res.* 2004; 94(6):e61-70.
57. Wehrens XHT. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circ. Res.* 2004; 94(6):e61-e70.
58. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ. Res.* 2003; 92(8):904–11.
59. Kushnir A, Shan J, Betzenhauser MJ, Reiken S, Marks AR. Role of CaMKII phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107(22):10274–9.
60. Kreusser MM, Backs J. Integrated mechanisms of CaMKII-dependent ventricular remodeling. *Front Pharmacol* 2014; 5:36.
61. Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M et al. Regulation of the transient outward K(+) current by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circ. Res.* 1999; 85(9):810–9.
62. Wagner S, Dybkova N, Rasenack, Eva C L, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 2006; 116(12):3127–38.
63. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K et al. CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ. Res.* 2010; 106(6):1134–44.

64. Guo T, Zhang T, Mestril R, Bers DM. Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ. Res.* 2006; 99(4):398–406.
65. Li N, Chiang DY, Wang S, Wang Q, Sun L, Voigt N et al. Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model. *Circulation* 2014; 129(12):1276–85.
66. Wolke C, Bukowska A, Goette A, Lendeckel U. Redox control of cardiac remodeling in atrial fibrillation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850(8):1555–65.
67. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail* 2009; 2(6):664–75.
68. Voigt N, Zhou X-B, Dobrev D. Isolation of human atrial myocytes for simultaneous measurements of Ca²⁺ transients and membrane currents. *J Vis Exp* 2013; (77):e50235.
69. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 2000; 27(2):97–106.
70. Fluo-4, AM, FluoroPure grade - Special Packaging - Life Technologies [cited 2015 Jul 7]. Available from: URL: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/F23917?CID=search-product>.
71. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods* 2008; 46(3):143–51.
72. Fluorescent Ca²⁺ Indicators Excited with Visible Light [cited 2016 Mar 23]. Available from: URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/indicators-for-ca2-mg2-zn2-and-other-metal-ions/fluorescent-ca2-indicators-excited-with-visible-light.html#head1>.
73. Carl Zeiss Microscopy GmbH. LSM700 [cited 2016 Feb 5]. Available from: URL: [http://applications.zeiss.com/C125792900358A3F/0/3D363BCA69792649C12579E50034EA30/\\$FILE/60-1-0022_d_LSM700.pdf](http://applications.zeiss.com/C125792900358A3F/0/3D363BCA69792649C12579E50034EA30/$FILE/60-1-0022_d_LSM700.pdf).

74. Carl Zeiss Microscopy GmbH. Confocal Laser Scanning Microscopy [cited 2016 Mar 3]. Available from: URL:
[http://applications.zeiss.com/C125792900358A3F/0/47469FD8D23E171AC12579060047E643/\\$FILE/60-1-0030_Confocal-Principles.pdf](http://applications.zeiss.com/C125792900358A3F/0/47469FD8D23E171AC12579060047E643/$FILE/60-1-0030_Confocal-Principles.pdf).
75. Naredi-Rainer N. Advanced confocal microscopy: From setups to applications [Dissertation]. München: LMU München; 2014.
76. Guatimosim S, Guatimosim C, Song L-S. Imaging calcium sparks in cardiac myocytes. *Methods Mol. Biol.* 2011; 689:205–14.
77. Caffeine powder, ReagentPlus® | Sigma-Aldrich [cited 2016 Mar 3]. Available from: URL:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/c0750?lang=de®ion=DE>.
78. Eisner D. Calcium in the heart: from physiology to disease. *Exp Physiol* 2014; 99(10):1273–82.
79. Autocamtide 2-related inhibitory peptide ≥97% (HPLC), lyophilized powder | Sigma-Aldrich [cited 2016 Mar 23]. Available from: URL:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a4308?lang=de®ion=DE&cm_sp=Insite-_-recent_fixed-_-recent5-1.
80. Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H. A Novel Highly Specific and Potent Inhibitor of Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 212(3):806–12.
81. Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293(3):C1073-81.
82. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2011; 121(8):2955–68.
83. Swaminathan PD, Purohit A, Hund TJ, Anderson ME. Calmodulin-dependent protein kinase II: Linking heart failure and arrhythmias. *Circ. Res.* 2012; 110(12):1661–77.
84. Fischer TH, Eiringhaus J, Dybkova N, Förster A, Herting J, Kleinwächter A et al. Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2014; 16(12):1292–300.

85. Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K et al. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Protein Kinase A Differentially Regulate Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Human Cardiac Pathology. *Circulation* 2013; 128(9):970–81.
86. Blayney LM, Lai FA. Ryanodine receptor-mediated arrhythmias and sudden cardiac death. *Pharmacol Ther* 2009; 123(2):151–77.
87. Dibb K, Eisner D. A small leak may sink a great ship but what does it do to the heart? *The Journal of Physiology* 2010; 588(24):4849.
88. Schotten U, Greiser M, Benke D, Buerkel K, Ehrenteidt B, Stellbrink C et al. Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res* 2002; 53(1):192–201.
89. Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ. Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1998; 30(4):743–9.
90. Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A et al. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2006; 98(2):235–44.
91. Mesubi OO, Anderson ME. Atrial remodelling in atrial fibrillation: CaMKII as a nodal proarrhythmic signal. *Cardiovasc Res* 2016.
92. Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T et al. Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ. Res.* 2010; 107(9):1150–61.
93. Belevych AE, Terentyev D, Terentyeva R, Nishijima Y, Sridhar A, Hamlin RL et al. The relationship between arrhythmogenesis and impaired contractility in heart failure: Role of altered ryanodine receptor function. *Cardiovasc Res* 2011; 90(3):493–502.
94. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I et al. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2012; 125(17):2059–70.

95. Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort, Ralph J, Skapura DG et al. Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest* 2009; 119(7):1940–51.
96. Shan J, Xie W, Betzenhauser M, Reiken S, Chen B-X, Wronska A et al. Calcium leak through ryanodine receptors leads to atrial fibrillation in 3 mouse models of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ. Res.* 2012; 111(6):708–17.
97. Li N, Wang T, Wang W, Cutler MJ, Wang Q, Voigt N et al. Inhibition of CaMKII phosphorylation of RyR2 prevents induction of atrial fibrillation in FKBP12.6 knockout mice. *Circ. Res.* 2012; 110(3):465–70.
98. Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M et al. Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 2014; 129(2):145–56.
99. Kato T, Yamashita T, Sagara K, Iinuma H, Fu L-T. Progressive nature of paroxysmal atrial fibrillation. Observations from a 14-year follow-up study. *Circ J* 2004; 68(6):568–72.
100. Rokita AG, Anderson ME. New therapeutic targets in cardiology: arrhythmias and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII). *Circulation* 2012; 126(17):2125–39.
101. Jug B, Šebeštjen M, Šabovič M, Pohar M, Keber I. Atrial fibrillation is an independent determinant of increased NT-proBNP levels in outpatients with signs and symptoms of heart failure. *Wien Klin Wochenschr* 2009; 121(21-22):700–6.
102. Lenski M, Schleider G, Kohlhaas M, Adrian L, Adam O, Tian Q et al. Arrhythmia causes lipid accumulation and reduced glucose uptake. *Basic Res Cardiol* 2015; 110(4).
103. Zima AV, Bovo E, Bers DM, Blatter LA. Ca²⁺ spark-dependent and -independent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in normal and failing rabbit ventricular myocytes. *The Journal of Physiology* 2010; 588(23):4743–57.
104. Santiago DJ, Curran JW, Bers DM, Lederer WJ, Stern MD, Ríos E et al. Ca sparks do not explain all ryanodine receptor-mediated SR Ca leak in mouse ventricular myocytes. *Biophys J* 2010; 98(10):2111–20.

105. Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative assessment of the SR Ca²⁺ leak-load relationship. *Circ. Res.* 2002; 91(7):594–600.
106. Ghosh S, Reuveni I, Barkai E, Lamprecht R. CaMKII activity is required for maintaining learning-induced enhancement of AMPAR-mediated synaptic excitation. *J. Neurochem.* 2015:n/a-n/a.
107. Buard I, Coultrap SJ, Freund RK, Lee Y-S, Dell'Acqua ML, Silva AJ et al. CaMKII "Autonomy" Is Required for Initiating But Not for Maintaining Neuronal Long-Term Information Storage. *Journal of Neuroscience* 2010; 30(24):8214–20.
108. Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M, Ikenouchi J. CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier. *Sci. Rep.* 2015; 5:13262.
109. Winters CJ, Koval O, Murthy S, Allamargot C, Sebag SC, Paschke JD et al. CaMKII inhibition in type II pneumocytes protects from bleomycin-induced pulmonary fibrosis by preventing Ca²⁺-dependent apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016; 310(1):L86-L94.
110. Salas MA, Valverde CA, Sánchez G, Said M, Rodriguez JS, Portiansky EL et al. The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010; 48(6):1298–306.
111. Wang Y-y, Zhao R, Zhe H. The emerging role of CaMKII in cancer. *Oncotarget* 2015; 6(14):11725–34.

8. Abkürzungsverzeichnis

AIP	Autocamtide-2-Related Inhibitory Peptide
AM	Azetoxy methylester
BCS	Rinderkalbserum
BDM	2,3-Butandionmonoxim
CaMKII	Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II
DMSO	Dimethylsulfoxid
EKG	Elektrokardiogramm
FDHM	Dauer der Sparks bei halbmaximaler Amplitude
FWHM	Breite der Sparks bei halbmaximaler Amplitude
HCN-Kanal	hyperpolarization-activated-cyclic nucleotide-gated cation-Kanal
IVS	Intraventrikuläres Septum
KN-93	N-[2-[N-(4-Chlorocinnamyl)-N-methylaminomethyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzenesulfonamidphosphatsalz
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
NTproBNP	N-terminales Propeptid des natriuretischen Peptids vom Typ B
PLN	Phospholamban
RyR2	Ryanodinrezeptor vom Typ 2
SEM	standard error of the mean
SERCA	sarkoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum

Die Datensammlung und die Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift haben im Zeitraum von Oktober 2014 bis April 2016 stattgefunden

9. Danksagung

Zuerst gilt mein Dank den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung für Innere Medizin II. Besonders Thomas Sowa und Felicia Steuer möchte ich für die geduldige und immer hilfreiche Zusammenarbeit danken: Thomas vor allem für den technischen Support und die Einarbeitung und Felicia für die Unterstützung und Hilfestellung bei allen anderen Labortätigkeiten. Aber auch die ärztlichen Kollegen, die die Aufklärung der Patienten übernommen haben, sind unvergessen.

Ein weiterer Dank geht an meine Mitdoktoranden Sebastian Meindl, Melanie Durczok und Bernadette Memmel für die gegenseitige Unterstützung und Motivation während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.

Auch bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Wagner möchte ich mich bedanken.

Außerhalb des Labors geht mein herzlichster Dank an meine Familie und Freunde, die mich durch die gesamte Zeit begleitet und mir immer den Rücken gestärkt haben! Ich bin sehr dankbar dafür, dass ihr immer für mich da seid! Ihr seid die Besten.

10.Lebenslauf

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 06.12.2017

Alexander Biedermann