

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

**Auswirkungen eines herzspezifischen CASK-Knock-Outs auf
Aktionspotentialmorphologie und späte Natriumströme**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
(für Humanmedizin)
der Medizinischen Fakultät der
Universität Regensburg

vorgelegt von

Felix Lucas Bähr

aus

Meerbusch

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter Prof. Dr. Stefan Wagner

2. Berichterstatter Prof. Dr. Frank Schweda

Datum der mündlichen Prüfung: 28.05.2019

Hiermit erkläre ich, 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.

Berlin, den 18.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung.....	5
1.1 Die Herzmuskelzelle.....	5
1.2 Das Aktionspotential.....	7
1.3 Die elektromechanische Kopplung	10
1.4 Natriumhaushalt der Herzmuskelzelle.....	13
1.5 Der sarkolemmale Natriumkanal.....	14
1.6 Herzinsuffizienz.....	17
1.7 Der späte Natriumeinstrom	18
1.8 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)	20
1.8.1 Struktur der CaMKII	20
1.8.2 Aktivierung der CaMKII	21
1.8.3 Inaktivierung der CaMKII.....	22
1.8.4 Funktion der CaMKII in der Herzmuskelzelle	23
1.8.5 Pathophysiologische Bedeutung der CaMKII	24
1.9 Ca ²⁺ /CaM-abhängige Serin-Proteinkinase (CASK).....	27
1.10 Zielsetzung.....	29
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Die CASK-Knock-Out Maus.....	31
2.2 Isolation ventrikulärer Mäusekardiomyozyten.....	32
2.2 Die Patch-Clamp-Technik.....	35
2.2.1 Geschichte.....	35
2.2.2 Die Technik	35
2.3 Versuchsaufbau.....	38
2.3.1 Messstand	38
2.3.3 Lösungen.....	40
2.3.4 Pipetten und Elektroden	41
2.4 Versuchsdurchführung	42
2.5 Messprotokolle.....	45
2.6 Pharmakologische Intervention mit Isoprenalin.....	45
2.7 Datenerfassung und Auswertung.....	46
2.7.1 Auswertung der späten Natriumströme	46
2.7.2 Auswertung der Aktionspotentiale	46
3 Ergebnisse.....	47
3.1 Einfluss eines CASK-Knock-Outs auf die Herz- und Zellgröße und die Überlebenszeit	47
3.2 Effekte eines CASK-Knock-Outs auf den späten Natriumstrom	50
3.2.1 Effekte unter basalen Messbedingungen	50
3.2.2 Effekte unter der Einwirkung von Isoprenalin	52
3.2.3 Effekte unter hoher intrazellulärer Kalziumkonzentration	53
3.3 Effekte eines CASK-Knock-Outs auf die Aktionspotentialmorphologie	55
3.3.1 Effekte unter basalen Messbedingungen	56
3.3.2 Effekte unter der Einwirkung von Isoprenalin	57
3.3.3 Nachdepolarisationen	60
4 Diskussion	62

4.1 Einfluss eines CASK-Knock-Outs auf die Herz- und Zellgröße und die Überlebenszeit	62
4.2 Auswirkungen eines CASK-Knock-Outs auf den späten Natriumstrom	63
4.4 Limitationen dieser Arbeit	68
4.5 Ausblick	69
4.6 CASK als möglicher therapeutischer Ansatz	70
5 Zusammenfassung	72
6 Literaturverzeichnis	73
7 Danksagung	
8 Lebenslauf	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	7
Abbildung 2	9
Abbildung 3	10
Abbildung 4	12
Abbildung 5	13
Abbildung 6	15
Abbildung 7	18
Abbildung 8	19
Abbildung 9	21
Abbildung 10	24
Abbildung 11	26
Abbildung 12	28
Abbildung 13	33
Abbildung 14	37
Abbildung 15	39
Abbildung 16	44
Abbildung 17	48
Abbildung 18	49
Abbildung 19	50
Abbildung 20	51
Abbildung 21	51
Abbildung 22	52
Abbildung 23	54
Abbildung 24	55
Abbildung 25	56
Abbildung 26	57
Abbildung 27	58
Abbildung 28	58
Abbildung 29	59
Abbildung 30	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	34
Tabelle 2	34
Tabelle 3	41
Tabelle 4	41
Tabelle 5	61

Abkürzungsverzeichnis

AIP	<i>autocamtide-2-related-inhibitory peptide</i>
AP	Aktionspotential
APD	<i>action potential duration</i> / Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
CaMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
Ca ²⁺ /CaM	aktiviertes Calmodulin
CASK	<i>calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase</i>
DAD	<i>delayed afterdepolarization</i> / verzögerte Nachdepolarisation
EAD	<i>early afterdepolarization</i> / frühe Nachdepolarisation
Epac	cAMP aktivierbares Austauschprotein
FDAR	<i>frequency-dependent acceleration of relaxation</i>
I _{Ca}	Kalziumeinstrom
I _{Na}	Natriumeinstrom
I _{Na,Late}	später Natriumeinstrom
I _{Na,peak}	schneller Natriumeinstrom
I _{Ks}	langsamer spannungsaktivierter Kaliumausstrom
I _{Kr}	schneller spannungsaktivierter Kaliumausstrom
I _{Kur}	ultraschneller spannungsaktivierter Kaliumausstrom
I _{to}	transienter K ⁺ Auswärtsstrom
IP ₃	<i>inositide 1,4,5 triphosphate</i>
ISO	Isoprenalin
Kir2.1	<i>inward rectifier channel</i> , einwärts gerichteter Kaliumkanal
LM	laterale Kardiomyozytenmembran
LoxP	<i>locus of X-over of P1</i>
MAGUK	<i>membrane-associated guanylate kinase</i> / membranassoziierte Guanylatkinase
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Nav1.5	spannungsabhängig, einwärts gerichteter Natriumkanal
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ - Austauscher
NHE	Natrium- /Wasserstoff-Austauscher
NKA	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodinrezeptor
SERCA	<i>sarcoplasmic endoplasmic reticulum calciumtransporting ATPase</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
T-Tubuli	transversale Tubuli
TTX	Tetrodotoxin
UPR	<i>unfolded protein response</i>
V _{max}	maximale Aufstrichgeschwindigkeit

1. Einleitung

In der folgenden Arbeit soll die Auswirkung eines herzspezifischen Knock-Outs des MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*) -Proteins CASK (*calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase*) auf die Aktionspotentialmorphologie und späte Natriumströme in Mäuseherzmuskelzellen untersucht werden. Die Rolle der CASK in der Herzmuskelzelle ist aktuell Gegenstand ausgedehnter Forschung. In verschiedenen Arbeiten konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der CASK und der Proteinkinase CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) gezeigt werden. Die CaMKII ist seit längerem im Fokus der Herzinsuffizienzforschung und wird mit vielen verschiedenen pathologischen Vorgängen im insuffizienten Myokard in Verbindung gebracht. Diese Arbeit soll Aufschluss darüber geben, ob die CASK auch im Herzmuskel eine Funktion einnimmt und ob sie dies über eine Interaktion mit der CaMKII tut. Diesbezüglich soll außerdem eine Aussage darüber getroffen werden, ob die CASK in der Entwicklung der Herzinsuffizienz von Relevanz ist und einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt bietet.

1.1 Die Herzmuskelzelle

Der Herzmuskel setzt sich aus einzelnen parallel angeordneten, quergestreiften Kardiomyozyten zusammen, die durch die sog. Glanzstreifen (*Disci intercalares*) miteinander verbunden sind und so funktionelle Synzytien bilden (1). In den Glanzstreifen lokalisiert sind zum einen die mechanischen Haftkontakte (*Adhärenskontakte* und *Desmosomen*), die die Zellen mechanisch miteinander verbinden, und zum anderen die *Gap junctions* (*Konnexone*), welche zu einer chemischen und elektrischen Kopplung der Zellen führen und so eine kontinuierliche Erregungsausbreitung und synchrone Kontraktion ermöglichen.

Die Herzmuskelzelle des Menschen ist ca. 100 µm lang, hat einen Durchmesser von ca. 15 µm und besitzt eine tubuläre, häufig stark verzweigte Form. Die meisten Herzmuskelzellen besitzen zwei Zellkerne und werden von einer Phospholipid-Doppelschicht, dem sog. Sarkolemm, umgeben. Diese gewährleistet eine räumliche Trennung von Extra- und Intrazellularraum und ermöglicht so die Aufrechterhaltung unterschiedlicher Ionenkonzentrationen in den einzelnen Kompartimenten. Des

Weiteren enthält sie eine Vielzahl unterschiedlicher Transport-Proteine, die sowohl einen aktiven, als auch einen passiven Austausch von Ionen und Stoffwechselprodukten ermöglichen (2). Charakteristisch für die Kardiomyozyten sind tiefe Einstülpungen des Sarkolemm in die Zelle, die sog. transversalen Tubuli (T-Tubuli). Sie stehen in enger räumlicher und funktioneller Verbindung mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) der Zelle und sind essentiell für die elektromechanische Kopplung (s. Kapitel 1.1.4). Das SR besteht aus longitudinalen Tubuli (L-Tubuli) und terminalen Zisternen und dient der Speicherung und Freisetzung von Kalzium. Die räumliche Verbindung zwischen SR und T-Tubulus wird auch als Diade bezeichnet, der zytosolische Raum dazwischen als diadischer Spalt. Hier befinden sich die meisten L-Typ-Kalziumkanäle im Sarkolemm und auf SR-Seite die Ryanodin-Rezeptoren.

Die charakteristische Querstreifung der Muskelfasern kommt durch die regelmäßige Anordnung der sog. Myofibrillen zustande (3,4). Die kleinste funktionelle Untereinheit dieser Myofibrillen ist das Sarkomer, welches sich hauptsächlich aus Aktin, Myosin und Titin zusammensetzt und in Ruhe eine Länge von ca. 2 μm hat. Unter dem Elektronenmikroskop können die einzelnen Abschnitte eines Sarkomers genau beschrieben werden. Ein Sarkomer wird durch zwei Z-Scheiben begrenzt, an denen dünne Aktinfilamente (7 nm) hängen, welche so quervernetzt werden. Die Aktinfilamente (15 nm) sind ihrerseits mit dicken Myosinfilamenten verzahnt, welche in der Mitte des Sarkomers durch eine sog. M-Scheibe quervernetzt sind. Der Bereich um die Z-Scheiben, in dem sich nur Aktinfilamente befinden, wird I-Bande, der Bereich zwischen den I-Bändern als A-Bande bezeichnet. Innerhalb der A-Bande befindet sich die H-Zone, welche den Bereich beschreibt, in dem die Myosinfilamente nicht von den Aktinfilamenten überlappt werden. Die Myofilamente machen über 50% des Gesamtproteins der Muskelzelle aus. Weitere wichtige Bestandteile der Herzmuskelzelle sind verschiedene Zellorganellen (u.a. Mitochondrien, Golgi-Apparat, Lysosomen und das Zytoskelett) und eine Vielzahl von Proteinen mit verschiedensten Funktionen.

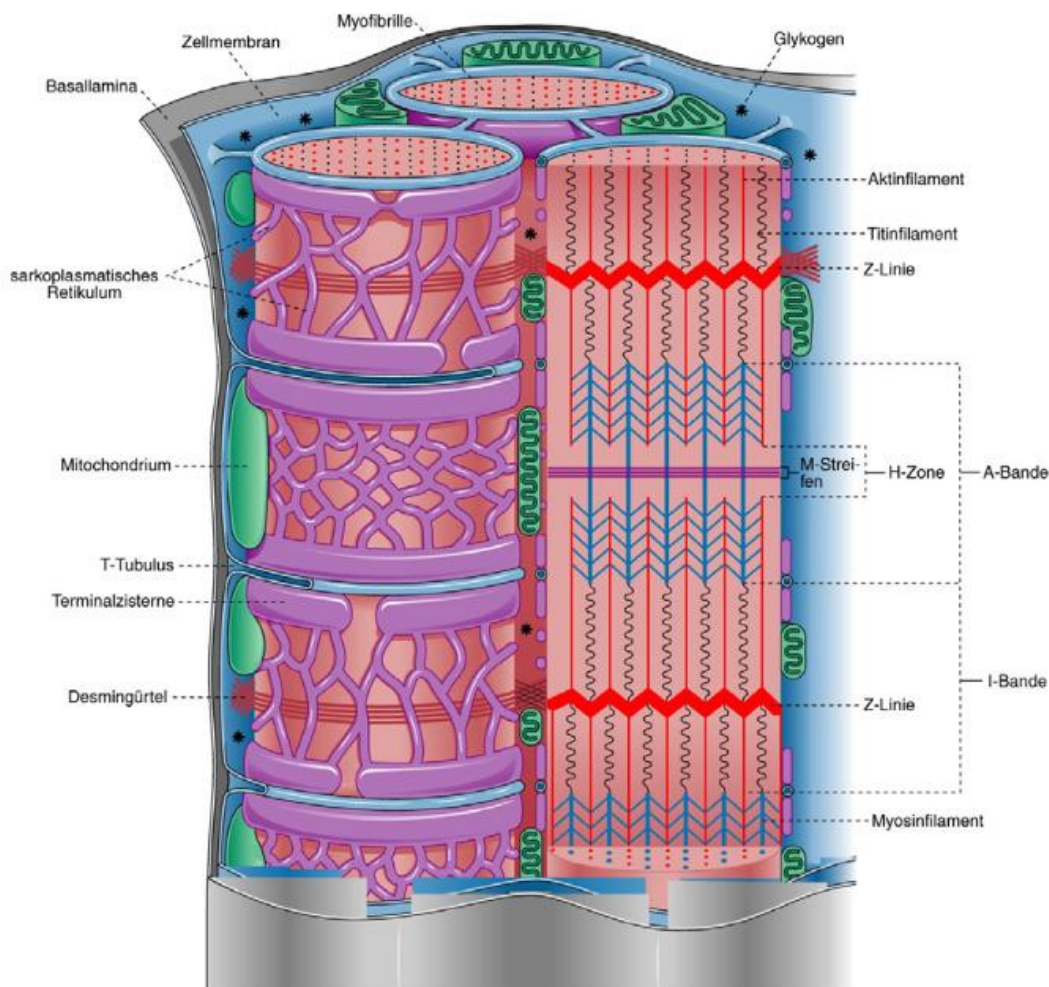


Abbildung 1 Schematische Darstellung des SR (5).

1.2 Das Aktionspotential

Am Anfang einer Herzkontraktion steht die elektrische Stimulation der Herzmuskelzellen in Form eines Aktionspotentials (AP), welches meist aus dem Sinusknoten stammt und sich über das Reizleitungssystem bis zum Arbeitsmyokard ausbreitet. Das AP im ventrikulären Arbeitsmyokard des Menschen hat eine Dauer von ca. 300ms, während das AP einer ventrikulären Mäuseherzmuskelzelle mit ca. 100ms deutlich kürzer ausfällt. Weitere Unterschiede sollen weiter unten beschrieben werden. Das Ruhemembranpotential der Herzmuskelzelle beträgt ungefähr -80mV und wird hauptsächlich durch das Kalium-Gleichgewichtspotential bestimmt, da die Zellmembran größtenteils nur für Kalium-Ionen (K^+) über sog. einwärts

gleichgerichtete Kaliumkanäle (*inward rectifier channels*, *Kir2.1*) permeabel ist. Diese Ruhephase wird auch als Phase IV bezeichnet (6).

Dies ändert sich in der ersten Phase des Aktionspotentials (auch als Phase 0 oder Depolarisationsphase bezeichnet), in der spannungsabhängig einwärts gerichtete Natriumkanäle (*Nav1.5*) öffnen. Durch den gradientenbedingten Einstrom (I_{Na}) positiver Natriumionen (Na^+) in die Zelle kommt es zu einer Membrandepolarisation in den positiven Bereich bis ca. +30mV (auch *overshoot* genannt). Die *Nav1.5* schließen zeitabhängig nach wenigen Millisekunden und begrenzen so den Einstrom. In Phase I (schnelle Repolarisationsphase) kommt es durch einen transienten K^+ -Auswärtsstrom (I_{to}) über verschiedene Kaliumkanäle (*Kv4.2*, *Kv4.3* und *Kv1.4*) sowie einem Chlorid-Einstrom zu einem leichten Abfall des Membranpotentials auf ca. 0mV. Die folgende Phase II (Plateauphase) wird durch die Aktivierung spannungsgesteuerter Kalzium-Kanäle (L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, Dihydropyridin-Rezeptoren) bestimmt, wodurch es zu einem langsamen Kalziumeinstrom (I_{Ca}) in die Zelle kommt (7). Dieser wird durch einen Kaliumausstrom (I_{Ks}) über verzögert korrigierende Kaliumkanäle (*delayed rectifier channels*) kompensiert, wodurch sich das Membranpotential relativ konstant hält. In Phase III (Repolarisationsphase) nimmt die Offenwahrscheinlichkeit L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ab und das zytosolische Kalzium wird aus dem Zytosol, ATP-abhängig in das SR und über membranständige Na^+/Ca^{2+} - Austauscher (NCX) in den Extrazellularraum eliminiert. Gleichzeitig kommt es zu einem spannungsaktivierten Kaliumausstrom über ultra-schnell (I_{Kur}), schnell (I_{Kr}) und langsam (I_{Ks}) aktivierte K^+ -Kanäle, was zu einer deutlichen Repolarisation führt. Die endgültige Repolarisation auf Höhe des Ruhemembranpotentials erfolgt außerdem über einen Kaliumeinstrom (I_{K1}) durch die bereits o.g. einwärts gleichgerichteten Kaliumkanäle (8).

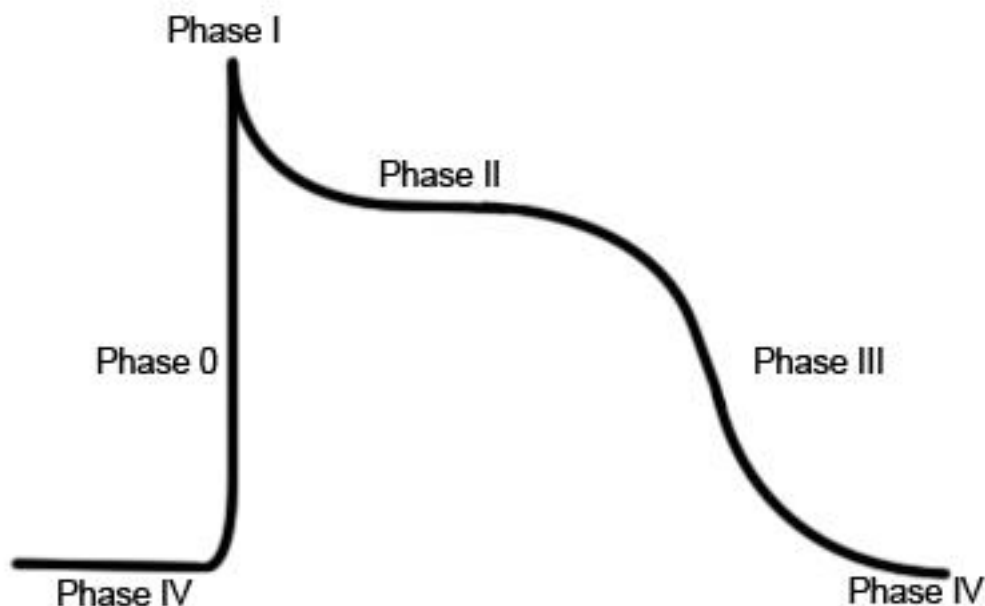


Abbildung 2 Phasen eines Aktionspotentials im Arbeitsmyokard

In dieser Arbeit wurden Kardiomyozyten von Mäusen untersucht. Auch wenn diese viele Parallelen zu menschlichen Kardiomyozyten aufweisen, soll hier noch einmal auf die Grundlegenden Unterschiede eingegangen werden. Die Herzfrequenz ist bei Mäusen mit 500-700 Schlägen pro Minute (9) deutlich schneller als beim Menschen (ca. 60-120 Schläge pro Minute). Dies setzt eine sehr viel kürzere Aktionspotentialdauer (APD) voraus. Sie liegt bei ca. 100ms (10). Des Weiteren unterscheidet sich die Morphologie der murinen Aktionspotentiale von denen des menschlichen Arbeitsmyokards. So ist die Plateauphase (Phase II) deutlich weniger ausgeprägt und die APD30 und APD50 sehr viel kürzer (11). Dies ist vor allem durch einen Unterschied der vorherrschenden Ionenströme in den Mäuseherzzellen zu erklären. Während beim Menschen die Phase III (Repolarisationsphase) wie oben beschrieben durch einen langsamen Kalziumeinstrom (I_{Ca}) und einen ausgleichenden Kaliumausstrom (I_{Ks}) bestimmt wird, kommt es bei der Maus durch einen vermehrten Kaliumausstrom ($I_{K,slow 1+2}$) über schnell aktivierende und langsam deaktivierende Kaliumkanäle (12) und einen verminderten Kalziumeinstrom L-Typ-Kalziumkanäle zu einer schnelleren Repolarisation (siehe Abb. 3).

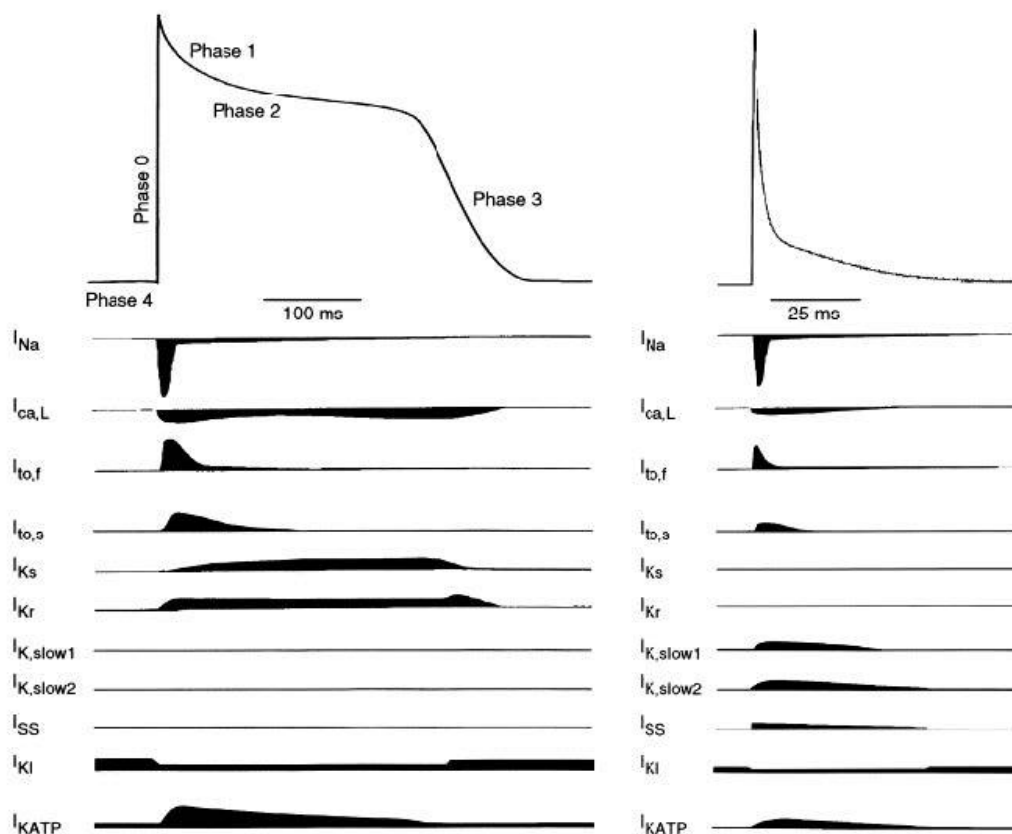


Abbildung 3 Aktionspotentiale von Mensch und Maus und die dabei vorherrschenden Ionenströme im Vergleich (13).

1.3 Die elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung (*excitation-contraction coupling*) beschreibt die Umsetzung des elektrischen Impulses in Form eines Aktionspotentials in eine mechanische Kraftentwicklung und die Kontraktion der Herzmuskelzelle. Entscheidend für diese Umsetzung sind die Kalziumionen (Ca^{2+}) als *second messenger*. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts zeigte Sidney Ringer mit seinen Experimenten an Froschherzen, dass in kalziumfreiem Medium keine Muskelkontraktionen durch Aktionspotentiale ausgelöst werden können (14).

Die Übertragung von elektrischem Stimulus auf eine mechanische Antwort beginnt mit dem Öffnen der L-Typ-Kalziumkanäle in der Plateauphase des Aktionspotentials (siehe Kap. 1.2). Durch den Kalziumeinstrom kommt es zu einer starken Erhöhung der Kalziumkonzentration im diastischen Spalt. Dadurch werden Ryanodinrezeptoren (RyR) des SR aktiviert und es kommt zu einer Ca^{2+} -induzierten Kalziumfreisetzung aus dem SR (*calcium-induced calcium release*) (7). RyR und L-Typ-Kalziumkanäle bilden dabei eine räumliche Einheit, die als „Couplon“ bezeichnet wird und in der Lage ist, in kurzer Zeit große Mengen Ca^{2+} in Form sog. „Sparks“ freizusetzen (15). Die Kalziumkonzentration wird so von ca. 10^{-7} mol/l während der Diastole auf etwa 10^{-5} mol/l systolisch erhöht, wobei das aus dem SR stammende Kalzium den Großteil ausmacht. Die stark erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt ihrerseits zu einer Deaktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Ca^{2+} bindet dann an Troponin C, eine regulatorische Untereinheit des Aktins, welches in Ruhe die Myosin-Bindungsstelle blockiert. Durch die Bindung von Ca^{2+} wird diese freigegeben und Myosin bindet nach Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) durch die Myosin-ATPase an Aktin (4). Durch die Abgabe von ADP und Phosphat kommt es zu einem Abkippen der Myosinköpfe von 90° auf 45° , wodurch Aktin und Myosin um ungefähr 10 Nanometer ineinandergeschoben werden. Bei einer erneuten Bindung von ATP an die Myosinköpfe, lösen sich diese wieder vom Aktin und der Prozess beginnt von vorn, vorausgesetzt Ca^{2+} ist in ausreichend hoher Konzentration vorhanden (Gleitfilamenttheorie (16)).

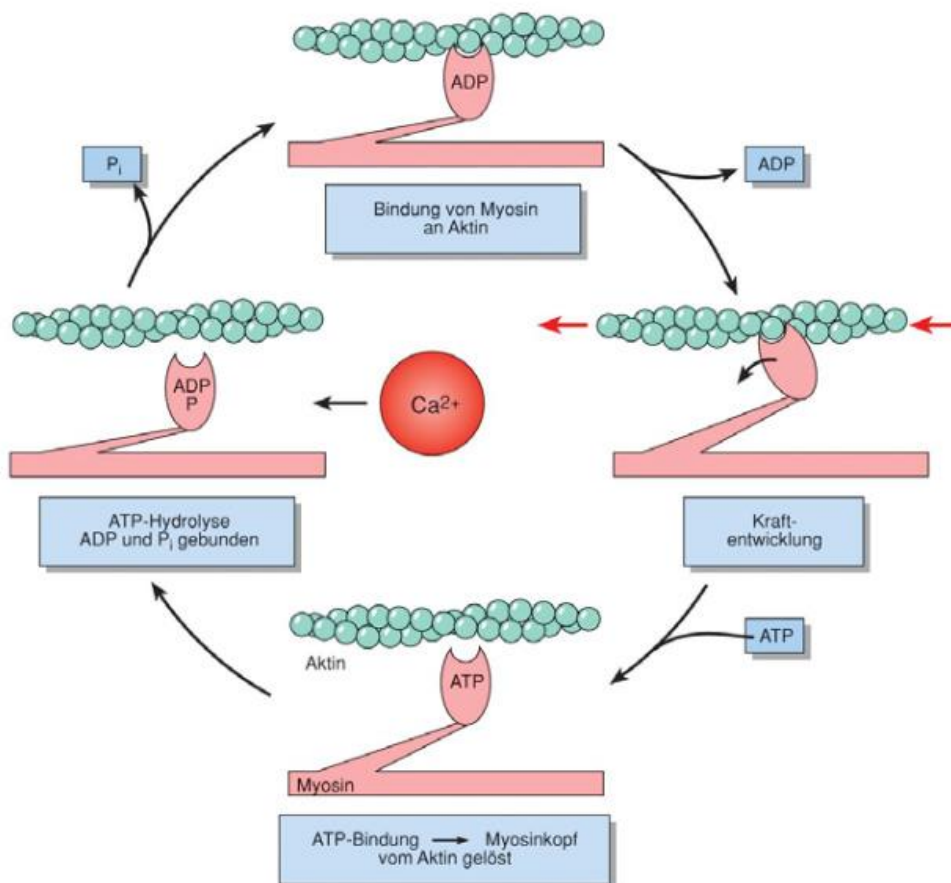


Abbildung 4 Der Querbrückenzyklus (17).

Um eine Relaxation des Herzmuskels möglich zu machen, ist die aktive Eliminierung von Ca²⁺ aus dem Zytosol notwendig. Die größte Rolle spielen hierbei zum einen die im SR lokalisierte Ca²⁺-ATPase (*Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calciumtransporting ATPase*, SERCA), welche durch Phospholamban (PLB) reguliert wird, und zum anderen der im Sarkolemm befindliche NCX. Je nach Spezies ist dabei der Anteil an der Kalziumelimination unterschiedlich. Während beim Menschen, ähnlich wie beim Kaninchen, ca. 70% über die SERCA und 28% über den NCX eliminiert werden, sind es bei Maus und Ratte über 90% SERCA und nur ca. 7% NCX (2,18). Weitere Systeme (auch als *slow system* bezeichnet), die eine weniger große Rolle spielen, sind unter anderem die sarkolemmale Ca²⁺-ATPase und die mitochondrialen Ca²⁺-Uniporter.

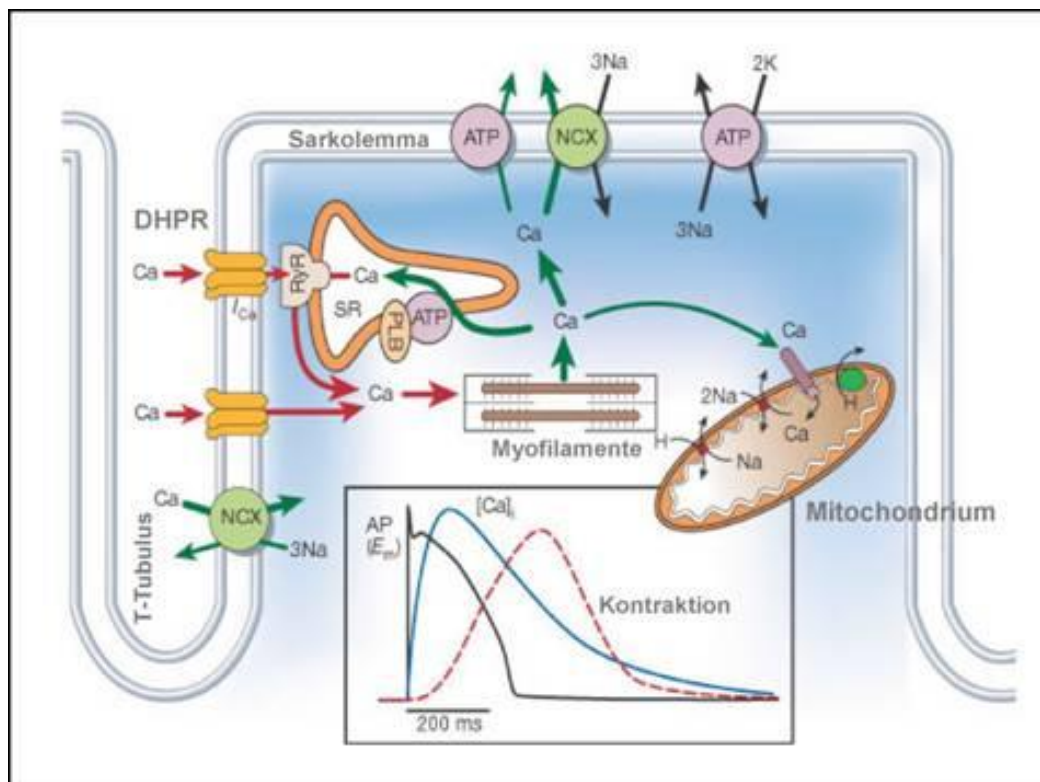


Abbildung 5 Die elektromechanische Kopplung: Wie im Kasten dargestellt, kommt es in Folge eines Aktionspotentials zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (rote Pfeile). Dies führt zum Eintreten der Plateauphase des Aktionspotentials und der Aktivierung der Myofilamente. Die Ca^{2+} -Eliminierung erfolgt über die SERCA, den NCX und weitere Transportsysteme (grüne Pfeile) (19).

1.4 Natriumhaushalt der Herzmuskelzelle

Neben Kalzium, welches als *second messenger* eine Schlüsselrolle in der elektromechanischen Kopplung einnimmt (siehe Kapitel 1.3), ist der Natriumhaushalt der Herzmuskelzelle von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion. Natrium- und Kalziumstoffwechsel sind funktionell eng miteinander verbunden, was an dieser Stelle näher erläutert werden soll.

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, ist der Einstrom von Natriumionen (Na^+) in die Zelle (I_{Na}) über den sarkolemmalen Natriumkanal ($\text{Nav}1.5$) entscheidend für die Depolarisationsphase. Der hierfür benötigte Konzentrationsgradient wird vornehmlich durch die sarkolemmale Na^+ - K^+ -ATPase (NKA) geschaffen, welche auch dafür sorgt,

dass die K^+ -Ionen im Zuge der Repolarisation entlang des Konzentrationsgradienten nach extrazellulär diffundieren. Der Natriumgradient ist außerdem für eine Reihe aktiver Transportmechanismen essenziell. In Bezug auf den Kalziumhaushalt ist hier vor allem der NCX zu nennen, der, wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, den Gradienten nutzt, um Ca^{2+} aus der Zelle zu eliminieren. Diese Verbindung zwischen Kalzium- und Natriumhaushalt ist aus pathophysiologischer Sicht von großer Bedeutung. So ist im gesunden Myokard die positive Kraft-Frequenz-Beziehung mit einem parallelen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration ($[Na^+]_i$) vergesellschaftet (20). Am insuffizienten Myokard ist $[Na^+]_i$ in noch größerem Maße erhöht, obwohl es hier zu einer negativen Kraft-Frequenz-Beziehung kommt (20,21). Diese Natriumüberladung der Zelle ist sowohl auf eine erhöhte Expression des Natrium- / Wasserstoff-Austauschers (NHE) (22), als auch auf einen erhöhten späten Natriumeinstrom ($I_{Na,late}$) zurückzuführen. Über den NCX kommt es im Zuge einer Natriumüberladung und einer darauffolgenden Natriumextraktion zu einer Kalziumüberladung der Zelle, welche zu einer diastolischen Dysfunktion im Sinne einer verminderten diastolischen Relaxation führt. Simultan zur Kalziumüberladung der Zelle ist aufgrund einer verminderten SERCA-Aktivität die Kalziumbeladung des SR gestört. Hieraus ergibt sich die bereits erwähnte negative Kraft-Frequenz-Beziehung (23)

1.5 Der sarkolemmale Natriumkanal

Der sarkolemmale Natriumkanal leitet das Aktionspotential der Herzmuskelzelle durch den konzentrationsabhängigen Natriumeinstrom (I_{Na}) ein und ist damit ein essentieller Teil der Erregungsbildung und Fortleitung im Arbeitsmyokard.

Der sarkolemmale Natriumkanal ist ein Transmembranprotein, welches aus mehreren Untereinheiten besteht. Die transmembrane α -Untereinheit, welche im Herzen prädominant als Isoform Nav1.5 exprimiert wird, bildet hierbei die Pore durch die der I_{Na} zustande kommt, während die angehängte β -Untereinheit modulatorische Eigenschaften besitzt.

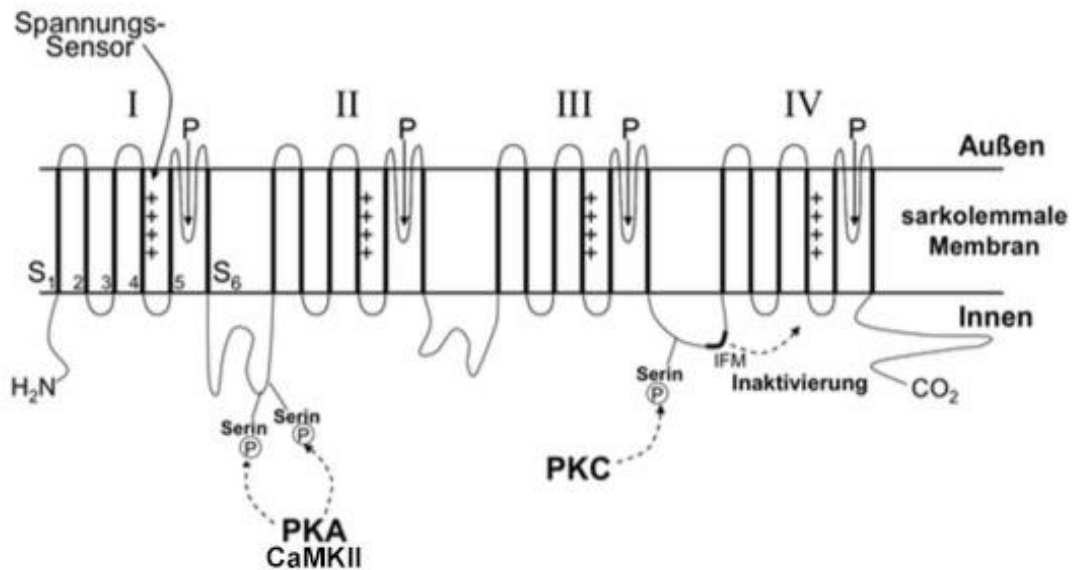


Abbildung 6 Aufbau von Nav1.5 bestehend aus 4 homologen Domänen (I-IV) mit jeweils 6 transmembranen alpha-Helices-Segmenten (S1-S6). S4 jeder Domäne dient als Spannungssensor, S5 und S6 bilden die Ionendurchlässige Pore. Die sog. IFM-Region führt durch Bindung in der Pore zur Inaktivierung des Kanals. Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und CaMKII beeinflussen die Kanalfunktion durch Phosphorylierung an verschiedenen Linker-Regionen (modifiziert nach Bers 2001, Seite 69).

Nav1.5, welche durch das SCN5A-Gen kodiert wird, besteht aus vier homologen Domänen (I-IV), welche sich jeweils aus sechs transmembranen alpha-Helices-Segmenten (S1-S6) zusammensetzen (Abbildung 6). S5 und S6 aller vier Domänen bilden zusammen die Ionen-durchlässige Pore und regulieren durch ihre extrazelluläre Verbindung (P-Segment) die Selektivität und Leitfähigkeit des Kanals (24,25). Das positiv geladene S4-Segment ist als Spannungssensor für die Kanalaktivierung während der Membran-Depolarisation zuständig (26). Während der Membran-Depolarisation kommt es zu einer Verschiebung des S4 nach außen, was eine Konformationsänderung von S5 und S6 und eine konsekutive Öffnung der Pore zuzufolge hat (2). Die Inaktivierung des Kanals erfolgt indem ein Teil der intrazellulären Verbindung (Linker) zwischen Domäne III und IV, die sog. IFM-Region, an die Pore bindet und sie verschließt. Der Kanal ist damit inaktiviert und kann nicht sofort wieder aktiviert werden. Hierzu benötigt es eine Repolarisation der Membran, was ein Abdissoziieren des Linkers sowie eine erneute Verschiebung von S4 zuzufolge hat. Der

Kanal ist dann geschlossen und erneut aktivierbar (27). Eine Mutation in S4 führt zu einer verzögerten Inaktivierung des Kanals und folglich zu einem persistierenden Natriumeinstrom, wie es beim Long-QT3-Syndrom der Fall ist (28).

Die bereits oben erwähnten β -Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 4$) bestehen ihrerseits aus einem zyttoplasmatischen C-terminus, einem transmembranen Mittelteil und einem großen extrazellulären N-Terminus und haben regulatorischen Einfluss auf die α -Untereinheit (29). Neben der Membranspannung wird der sarkolemmale Natriumkanal durch eine Vielzahl von intrazellulären Botenstoffen, Ionen und physikalischen Faktoren beeinflusst. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) bewirkt über Phosphorylierung eine Leitfähigkeitszunahme des Kanals (30) während die Proteinkinase C (PKC) ebenfalls über Phosphorylierung an einer anderen Linkerregion eine beschleunigte Inaktivierung und Reduktion des Natriumeinstroms hervorruft (31). Calmodulin bindet Ca^{2+} -abhängig am C-Terminus und fördert eine verzögerte Inaktivierung des Kanals (32). WAGNER et al. konnten zudem eine Phosphorylierung des Kanals durch die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) nachweisen, welche mit einer Erhöhung des späten Natriumeinstroms einhergeht (33).

Die gewebespezifische Expression der Untereinheiten sowie posttranslationale Modifikationen haben weiteren Einfluss auf die Funktionsweise des Kanals. Durch alternatives Splicing der mRNA der α -Untereinheit kommt es über den sog. *unfolded protein response* (UPR) zu einer vermehrten Bildung funktionsunfähiger Proteine und dadurch zu einer verminderten Anzahl funktionsfähiger Natrium-Kanäle(34).

Zudem haben physikalische Faktoren wie Temperatur, Osmolarität und mechanische Zugkraft Einfluss auf den Natriumkanal.

Verschiedene Gifte und Pharmaka erzielen ihre Wirkung durch Interaktion mit dem Natriumkanal. So bindet Tetrodotoxin (TTX) extrazellulär zwischen S5 und S6 der Domäne 1 und führt zu einer Blockierung des Kanals (35). Seeanemonentoxine hemmen hingegen die Inaktivierung des Kanals und Lokalanästhetika führen über eine Bindung an S6 der Domäne IV zu einer frühzeitigen Inaktivierung (36).

1.6 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist eine der Haupttodesursachen der westlichen Welt (37). Sie ist gekennzeichnet durch ein Pumpversagen des Herzens aufgrund kontraktile Dysfunktion und einem vermehrten Auftreten letaler Arrhythmien. Dies geht sowohl mit makroskopischen Veränderungen des Herzmuskels, als auch mit zahlreichen Prozessen auf molekularer Ebene einher. Meist entwickelt sich die Herzinsuffizienz im Rahmen einer erhöhten mechanischen Belastung des Herzens, wie es zum Beispiel im Rahmen von Herzinfarkten bzw. Ischämien mit folgender Narbenbildung, arteriellem Hypertonus oder Klappenerkrankungen der Fall ist. Am Beginn der Herzinsuffizienz steht die Hypertrophie des gesunden Myokards, welche zunächst die erhöhte mechanische Belastung kompensiert, bei gleichzeitiger Zunahme des umgebenden Bindegewebes und einer folgenden reduzierten Dehnbarkeit des Herzens. Dieser Vorgang wird auch als kardiales „*remodeling*“ bezeichnet. Die so entstehende Überbelastung der vitalen Kardiomyozyten fördert über verschiedene Wege deren Apoptose und Zellnekrose. Außerdem kommt es reaktiv zu einer veränderten Genexpression verschiedener Proteine, die großen Einfluss auf die Homöostase und damit die Funktion der Zelle haben. Es ist bereits bekannt, dass es im insuffizienten Myokard zu einer Störung der Kalziumhomöostase und darüber zu einer starken Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung kommt. Dies wird durch eine Vielzahl von Prozessen auf subzellulärer Ebene verursacht. Im insuffizienten Myokard ist die Konzentration der SERCA (38) und ihrem Inhibitor PLB vermindert, wobei die SERCA-Reduktion überwiegt, was in einer verminderten SERCA-Aktivität und damit einem reduzierten Ca^{2+} -Gehalt im SR und einer verlangsamten Relaxation der Herzmuskelzelle resultiert (39). Zusätzlich kommt es zu einer Herunterregulierung des RyR, welche jedoch mit einer stark erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit einhergeht. Die Folge ist eine verminderte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR in der Systole bei gleichzeitig erhöhtem Ca^{2+} -Verlust aus dem SR in der Diastole (Ca^{2+} -Leck). Aufgrund der erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Diastole kommt es über eine diastolische Aktivierung kontraktile Proteine, zu einem vermehrten Energieverbrauch und letztendlich zur diastolischen Dysfunktion. Weiterhin konnte in vielen verschiedenen Studien eine Hochregulierung des NCX bei Herzinsuffizienz gezeigt werden (40,41). Dies führt zum einen zu einer erhöhten Ca^{2+} -Extraktion in der Diastole und damit zu einer weiteren Verminderung des Ca^{2+} -

Gehaltes im SR (42). Zum anderen wird eine erhöhte NCX-Aktivität mit dem Auftreten von Arrhythmien in Verbindung gebracht (43).

1.7 Der späte Natriumeinstrom

Der späte Natriumeinstrom ($I_{Na,late}$) wurde erstmals 1979 beschrieben (44) und eine Erhöhung desselben wurde seitdem in verschiedenen pathologischen Zuständen des Herzens wie Ischämie, Hypoxie, Herzinsuffizienz und Long-QT-Syndrom beobachtet (45,46).

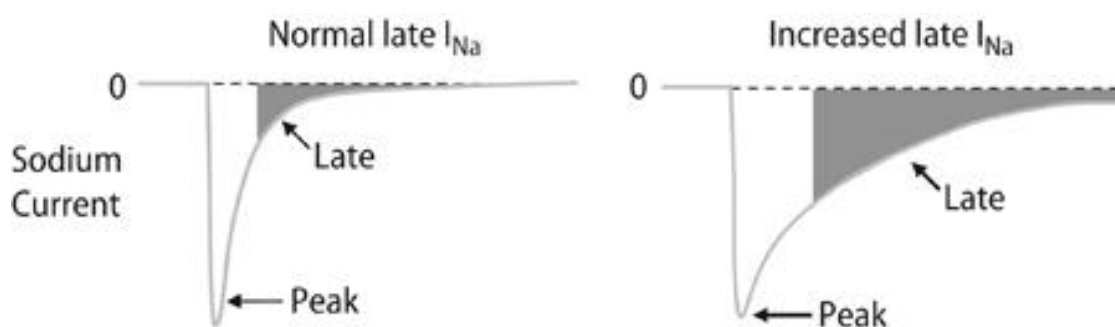


Abbildung 7 Anteil des späten Natriumstroms unter physiologischen (links) und pathologischen Bedingungen (rechts) (47).

Der $I_{Na,late}$ macht im gesunden Myokard unter 1% des I_{Na} aus, persistiert jedoch aufgrund einer längeren Offenwahrscheinlichkeit und einer teilweise erneuten Öffnung der betreffenden Natriumkanäle weit länger als der Natriumspitzenstrom ($I_{Na,peak}$) (48). Im erkrankten Myokard kann er zudem so stark erhöht sein, dass er einen vergleichbaren, oder sogar größeren Anteil als $I_{Na,peak}$ an der Gesamtmenge der einströmenden Natrium-Ionen ausmacht. Aufgrund dieser Eigenschaften beeinflusst er sowohl die Morphologie und Länge des Aktionspotentials, als auch die Natriumkonzentration in der Herzzelle. Die ist insbesondere während der Plateauphase des Aktionspotentials, in der bereits kleine Veränderungen der beteiligten Ionenströme große Auswirkungen haben können, entscheidend. Ein erhöhter $I_{Na,late}$ führt so zu einer Verlängerung des Aktionspotentials und einer höheren $[Na^+]_i$ (49). Diese beiden Effekte sind entscheidend für die Bedeutsamkeit des $I_{Na,late}$ im geschädigten Herzen. Eine Erhöhung von $[Na^+]_i$ fördert wie schon in

Kapitel 1.4 beschrieben den umgekehrten Transport von Natrium- und Kalziumionen über den NCX und führt somit zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums $[Ca^{2+}]_i$ (Kalziumüberladung) (2). Dies addiert sich zu einer bereits bestehenden Kalziumüberladung im geschädigten Myokard durch andere Prozesse wie eine verminderte SERCA-Aktivität. Der Austausch von einem Ca^{2+} -Ion gegen 3 Na^+ -Ionen über den NCX ist zudem elektrisch wirksam und kann Membranpotential-Schwankungen bedingen. In Kombination mit der verlängerten Membranpotentialdauer erhöht sich so die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten früher (EADs) und später Nachdepolarisationen (DADs) und damit gefährlicher Arrhythmien (50).

Einen wichtigen Anteil am erhöhten $I_{Na,late}$ im geschädigten Herzen kommt der Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) zu, welche durch Phosphorylierung des Natriumkanals Nav1.5 entscheidend in dessen Öffnungseigenschaften eingreift.

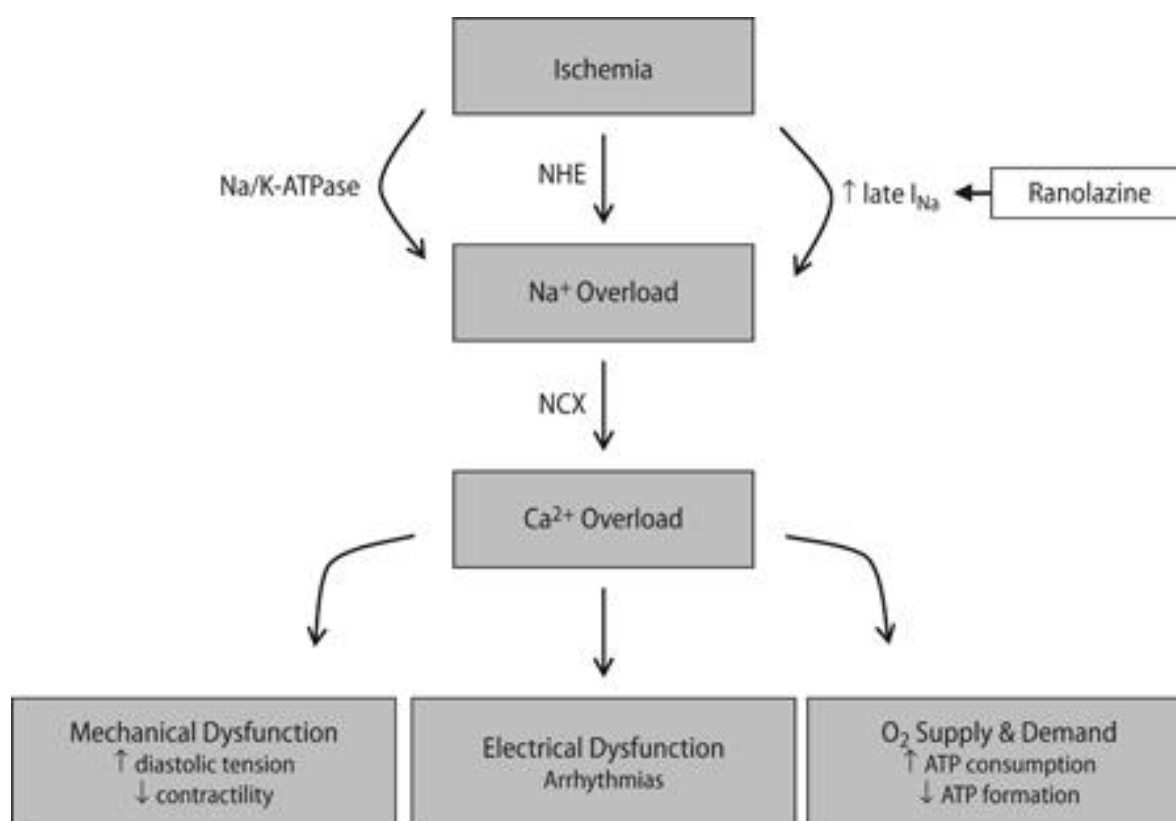


Abbildung 8 Natriumüberladung der Herzmuskelzelle bei Ischämie und ihre Folgen (47).

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

Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist eine multifunktionale Serin/Threonin-Proteinkinase und die häufigste Isoform der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen im Herzen. Sie wird durch Kalzium-gebundenes Calmodulin aktiviert und phosphoryliert verschiedene zytosolische und nukleäre Proteine. Im Herzen existieren vornehmlich zwei Splicevarianten (CaMKII δ_C und CaMKII δ_B), wobei CaMKII δ_C im Zytosol und CaMKII δ_B im Zellkern vorkommt (51).

1.8.1 Struktur der CaMKII

Das CaMKII-Holoenzym setzt sich aus zwei hexameren Ringen zusammen, welche jeweils aus 6 Monomeren bestehen (52,53). Diese CaMKII-Monomere bestehen jeweils aus einer am N-Terminus gelegenen katalytischen Untereinheit, einer mittleren regulatorischen Untereinheit und einer am C-Terminus gelegenen assoziierenden Untereinheit. 6 Monomere lagern sich mit der assoziierenden Untereinheit zu einer ringförmigen Struktur zusammen und bilden mit einem weiteren Ring das CaMKII-Holoenzym. Die katalytischen und regulatorischen Untereinheiten ragen dabei nach außen (54).

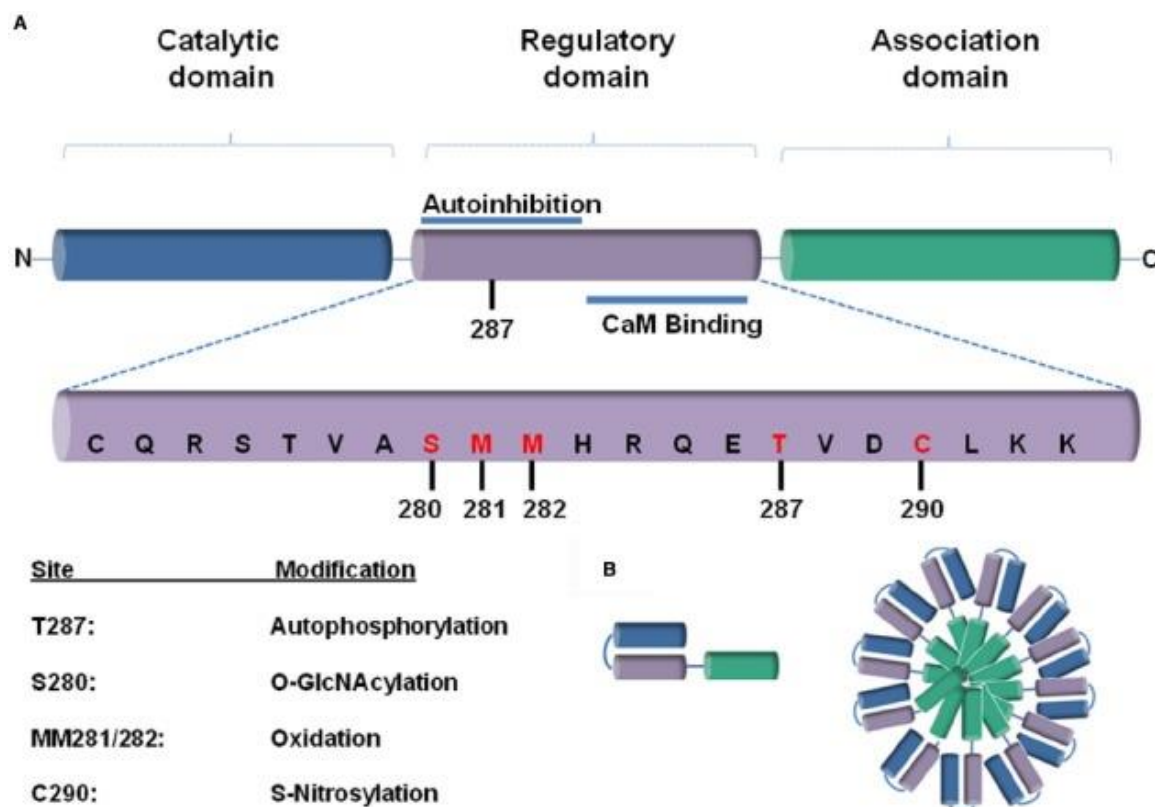


Abbildung 9 Struktur der CaMKII: (A) schematische Darstellung des CaMKII Monomers, bestehend aus einer N-terminalen katalytischen Domäne, einer regulatorischen Domäne und einer C-terminalen assoziierenden Domäne. (B) Zusammenlagerung der assoziierenden Domäne zum CaMKII-Holoenzym (54).

1.8.2 Aktivierung der CaMKII

Die Aktivierung der CaMKII erfolgt durch die Bindung von aktiviertem Calmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) an die autoinhibitorische Domäne der regulatorischen Untereinheit und hängt damit maßgeblich vom Ca^{2+} -Gehalt der Zelle ab. Die daraus resultierende Konformationsänderung führt zur Freilegung der katalytischen Untereinheit, welche nun andere Proteine phosphorylieren kann. Dabei werden u.a. benachbarte Untereinheiten der CaMKII selbst an Threonin 287 (siehe Abb. 9) phosphoryliert. Dies führt zu einer stark erhöhten Affinität von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ zur autoinhibitorischen Domäne (55) und hält die CaMKII damit im aktiven Zustand. Zudem kann die CaMKII durch die Autophosphorylierung auch nach Abdissoziieren von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ca. 20-80% ihrer Aktivität erhalten (56,57). Die Aktivierung kann weiterhin durch ein erhöhtes Angebot von Ca^{2+} verstärkt werden, wie es zum Beispiel im Rahmen einer verlängerten APD oder einer erhöhten Stimulationsfrequenz der Fall ist (58,59). Auch

ein erhöhter $I_{Na,late}$ scheint die CaMKII über den NCX zu aktivieren (60). Studien konnten zudem zahlreiche weitere Aktivierungswege der CaMKII nachweisen. So wird die CaMKII durch Oxidation an Methionin 281/282 (siehe Abb. 9) aktiviert (61), wie es zum Beispiel bei erhöhtem oxidativem Stress und der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies passiert. Auch hier kommt es zu einer Verlängerung der Aktivität durch Blockade der autoinhibitorischen Bindungsstelle (62).

Für diese Arbeit besonders wichtig ist die Aktivierung der CaMKII durch β -adrenerge Stimulation, welche über mehrere Wege funktioniert. β -Agonisten führen über eine Aktivierung der Adenylatcyclase zu einer Erhöhung von cAMP und damit zu einer Aktivierung der PKA. PKA phosphoryliert ihrerseits verschiedene Proteine wie den sarkolemmalen Kalziumkanal, PLB und RyR, was zu einem erhöhten Kalziumtransienten und damit zu einer Aktivierung der CaMKII führt.

Zusätzlich dazu kommt es PKA-unabhängig zu einer Aktivierung der CaMKII durch Stickstoffmonoxid (NO) (S-Nitrosylation) (63) sowie durch das cAMP aktivierbare Austauscherprotein (Epac) (64). Epac wird direkt durch cAMP aktiviert und führt über PLC zu einer Produktion von DAG (diacyl glycerol) und IP_3 (inositide 1,4,5 trisphosphate) und nachfolgend CaMKII-vermittelt über eine Aktivierung des RyR zu einer Kalziumausschüttung aus dem SR (65).

Ein weiterer Aktivierungsweg ist die O-gebundene Glykosylierung an S290 in Folge erhöhter Blutzuckerwerte (Diabetes Mellitus) (66).

1.8.3 Inaktivierung der CaMKII

Proteinphosphatasen wie PP1 und wahrscheinlich PP2A dephosphorylieren die CaMKII und inaktivieren diese so (67). Außerdem führt eine Phosphorylierung an Threonin 306 und 307 ebenfalls zur Inaktivierung der CaMKII (68). Lu et al. konnten bereits 2003 zeigen, dass Camguk (Homolog der CASK in Drosophila) in der Lage ist über einer Autophosphorylierung an Thr306 (bzw. Thr305 in Säugetieren) die CaMKII zu deaktivieren (69) (s. Kap. 1.8).

Pharmakologisch ist es möglich, die CaMKII gezielt durch verschiedene Substanzen zu inhibieren. Neben KN62 und KN93, die kompetitiv die Bindung von CaM an die CaMKII hemmen, jedoch auch Auswirkungen auf bestimmte Ionenkanäle haben (34,70), kann dabei insbesondere der Peptid-Inhibitor *Autocamtide-2-related-inhibitory-peptide* (AIP) eingesetzt werden. Dieser hemmt CaMKII sehr selektiv und

mit hoher Affinität (50-500mal höher als KN93) und scheint keine Auswirkung auf die PKA, PKC oder Ionenkanäle zu haben (71).

1.8.4 Funktion der CaMKII in der Herzmuskelzelle

Die CaMKII ist eine multifunktionale Proteinkinase, die verschiedenste Proteine durch Phosphorylierung beeinflusst. Sie interagiert mit vielen Schlüsselproteinen des Zellstoffwechsels und nimmt eine wichtige Rolle in der Kalzium- und Natriumhomöostase sowie der elektromechanischen Kopplung ein. CaMKII kann durch Phosphorylierung sowohl den Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}), die Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR, als auch die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR beeinflussen. So phosphoryliert sie den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal an verschiedenen Positionen und führt so zu einer erhöhten I_{Ca} -Amplitude und einer langsameren Inaktivierung der Kanäle (sog. I_{Ca} -Faszilitation) (72). Des Weiteren beeinflusst die CaMKII die Offenwahrscheinlichkeit des RYR2 und erhöht so sowohl den systolischen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR, als auch das diastolische Ca^{2+} -Leck (72,73), was zu einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und einer Aktivierung des NCX führt. Die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das SR wird durch eine Interaktion mit PLB von der CaMKII reguliert. PLB inhibiert die SERCA2a, was durch eine Phosphorylierung durch die CaMKII unterbunden wird (74). Dadurch kommt es zu einer schnelleren Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das SR. In diesem Zusammenhang wurde auch eine verkürzte Relaxationszeit bei hohen Stimulationsfrequenzen (*frequency-dependent acceleration of relaxation*, FDAR) beobachtet. Während die Verbindung zwischen PLB-Hemmung durch die CaMKII und FDAR fraglich ist (75), scheint ein Zusammenhang zwischen erhöhter CaMKII-Aktivität und FDAR als gesichert.

Neben den oben genannten Effekten auf den Ca^{2+} -Haushalt der Herzmuskelzelle, interagiert die CaMKII außerdem mit anderen sarkolemmalen Ionenkanälen. So konnten mehrere Studien einen direkten Zusammenhang zwischen CaMKII-Aktivität und Na^+ -Überladung über einen erhöhten späten Natriumstrom nachweisen (33), was eine Interaktion zwischen CaMKII und Na^+ -Kanal nahelegt. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass die CaMKII verschiedenen K^+ -Kanäle beeinflusst und selber von diesen beeinflusst wird und so eine Auswirkung auf die verschiedenen Komponenten des I_{to} ($I_{\text{to,slow}}$ und $I_{\text{to,fast}}$) (76) sowie den I_{Ks} (77) und damit auf die Repolarisation der Herzmuskelzelle hat.

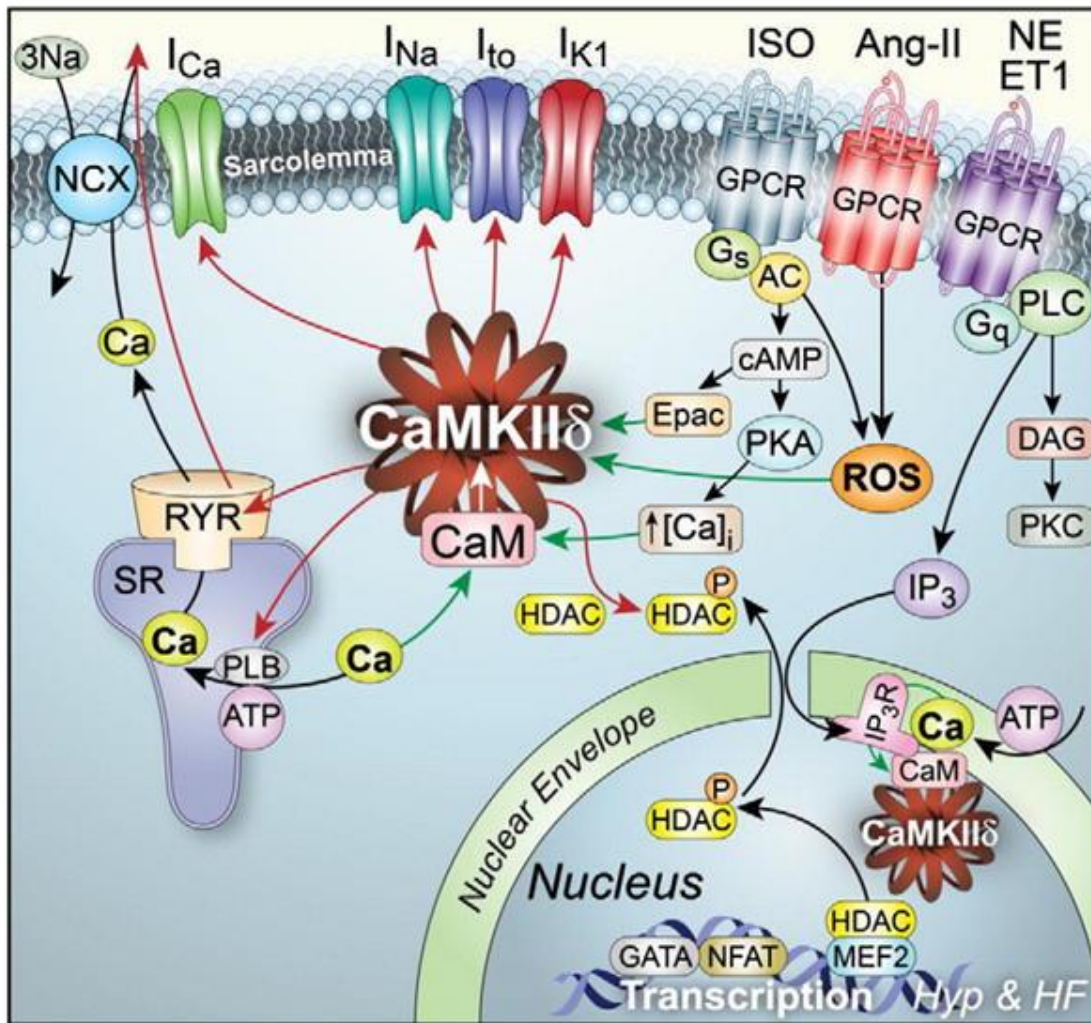


Abbildung 10 Aktivierung und Auswirkung der CaMKII in der Herzmuskelzelle (78).

1.8.5 Pathophysiologische Bedeutung der CaMKII

KIRCHHEFER et al. konnten bereits 1999 zeigen, dass die CaMKII im insuffizienten Myokard eine erhöhte Expression und Aktivität aufweist und mit einer erhöhten Kontraktilität des Herzmuskels einhergeht (79). Dies ließ die Autoren zunächst vermuten, dass es sich bei dieser CaMKII-Erhöhung um einen Kompensationsmechanismus handelt. Jedoch zeigten spätere Überexpressionsmodelle der CaMKII δ c mit transgenen Mäusen, dass eine erhöhte CaMKII-Aktivität ihrerseits kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz induziert und mit einem gestörten Ca²⁺-Haushalt und einer Neigung zu Arrhythmien einhergeht (72,80). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein CaMKII δ c-spezifischer Knock-Out Mäuse vor der Entwicklung von Herzinsuffizienz schützt (81). Dies kann durch die oben beschriebenen Effekte der CaMKII in der Herzmuskelzelle erklärt werden. Der erhöhte I_{Ca} durch Phosphorylierung der L-Typ- Ca²⁺-Kanäle in Kombination mit

dem CaMKII-induzierten Ca^{2+} -Verlust aus dem SR (Ca^{2+} -Leck) führen zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zelle, was, wie bereits oben beschrieben, mehrere Probleme nach sich zieht. Zum einen bedingt die erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration eine erhöhte diastolische Kontraktilität und führt so zur diastolischen Dysfunktion. Außerdem begünstigt die I_{Ca} -Faszilitation das Auftreten von frühen Nachdepolarisationen (*early afterdepolarizations*, EADs) und führt über eine erhöhte Aktivität des NCX zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für späte Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarizations*, DADs) (82).

Über die oben beschriebene Interaktion der CaMKII mit sarkolemmlenen Ionenkanälen kommt es zusätzlich zu einer Verlängerung der APD, was wiederum das Auftreten von EADS und damit von Arrhythmien begünstigt (83). Die CaMKII kann an verschiedenen Stellen Nav1.5 phosphorylieren und bewirkt darüber eine verminderte Kanalverfügbarkeit und vermehrte intermediäre Inaktivierung (84). Zudem führt die Phosphorylierung von Nav1.5 durch CaMKII zu einem erhöhten $I_{\text{Na,Late}}$ (85), was wiederum über den NCX zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zelle führt (s. Kap. 1.6). Da eine erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wiederum eine Aktivierung der CaMKII zu Folge hat, kann hier von einer Art Teufelskreis gesprochen werden.

Eine erhöhte CaMKII-Aktivität scheint zudem über die Phosphorylierung des mitochondrialen NCX die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu fördern (86). ROS werden vermehrt in infarziertem und insuffizientem Myokard generiert und werden über eine Beeinträchtigung der Ca^{2+} - und Na^+ -Homöostase mit kontraktile Dysfunktion, elektrischer Instabilität und Zelltod in Verbindung gebracht (87). Es ist anzunehmen, dass die CaMKII eine wichtige Rolle in der Vermittlung dieser Effekte spielt. ROS können über Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit der CaMKII an Methionin 281/282 (siehe auch Kap. 1.7.2) diese aktivieren (61). Auch hier besteht also eine Art Potenzierung, da CaMKII durch ROS aktiviert wird und selber zur Entstehung von ROS beiträgt. Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass ROS zu einer Erhöhung des $I_{\text{Na,Late}}$ und folglich zu einer Na^+ - und Ca^{2+} -Überladung mit den oben genannten Konsequenzen führt (88). WAGNER et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass das Fehlen von CaMKII diese Effekte signifikant vermindert, was die Annahme unterstützt, dass CaMKII hier als eine Art Mediator fungiert (89).

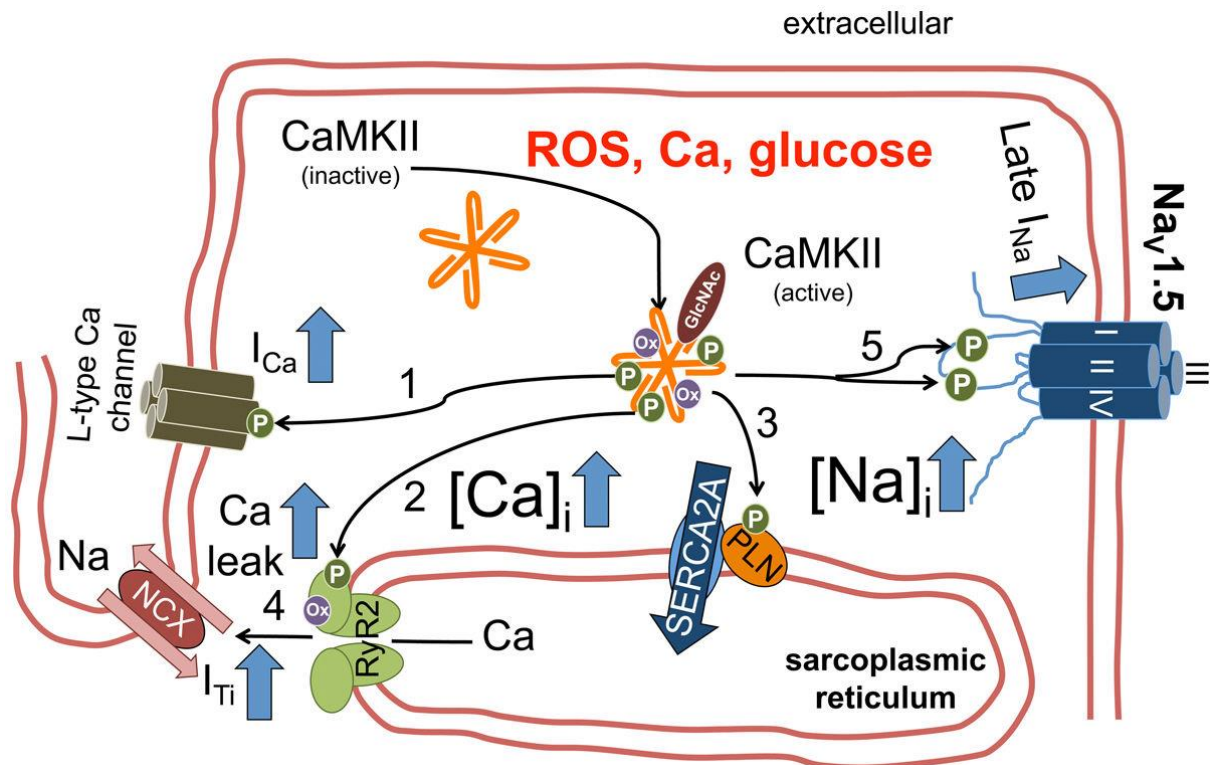


Abbildung 11 Aktivierung der CaMKII δ c sowie Einfluss auf Kalziumhaushalt der Herzmuskelzelle und Elektromechanische Kopplung (90): CaMKII δ c wird über verschiedene pathophysiologische Stimuli wie erhöhte reaktive Sauerstoffspezies (ROS), erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen oder Hyperglykämie, aktiviert. Erhöhte CaMKII-Aktivität führt über Phosphorylierung zu einem erhöhten I_{Ca} [1], prädisponierend für das vermehrte Auftreten von EADs, einem erhöhten diastolischem Kalziumleck über RyR-Phosphorylierung [2] und einer erhöhten SERCA2A-Aktivität, was möglicherweise ebenfalls zu einem erhöhten diastolischem Kalziumleck führt [3]. Ein erhöhtes diastolisches Kalziumleck aus dem SR hat das Auftreten transienter Einwärtsströme und DADs zu Folge [4]. Phosphorylierung von Nav1.5 führt zu einem erhöhten späten Natriumeinstrom und somit zum vermehrten Auftreten von EADs und DADs.

Aufgrund der vielseitigen Verbindungen einer erhöhten CaMKII-Aktivität und der Entwicklung von HF und Arrhythmien, ist die CaMKII als therapeutisches Ziel immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Damit einhergehend werden auch alternative Wege die CaMKII zu beeinflussen immer interessanter und sind heute Gegenstand ausgedehnter Forschung. Ein möglicher Kandidat in dieser Hinsicht ist

die Ca^{2+} /CaM-abhängige Serin-Proteinkinase (CASK), welche im folgenden Kapitel näher beschrieben werden soll.

1.9 Ca^{2+} /CaM-abhängige Serin-Proteinkinase (CASK)

Die CASK ist eine membranassoziierte Guanylatkinase (MAGUK) und gehört damit zu einer Gruppe von Scaffolding-Proteinen, die durch mehrere Proteinbindungsstellen große Proteinkomplexe an Zellekontakten zusammenbringen und so durch räumliche Nähe die Effizienz von Signaltransduktionen erheblich steigern können (91). MAGUKs sind durch mindestens drei verschiedene Domänen charakterisiert: eine N-terminale PDZ-Domäne (PSD 95, Dlg, ZO-1), eine zentrale SH3-Domäne und eine C-terminale Guanylatkinase-Domäne. Die CASK besitzt als LIN2 ähnliche MAGUK vom N zum C Terminus folgende Domänen: eine CaMKII ähnliche Domäne mit autoinhibitorischem Anteil und einer CaM-Bindeeinheit (in Drosophila ist diese Domäne nur in der CASK- β vorhanden), zwei L27 (Lin2 und Lin7) Domänen, eine PDZ- und eine GuK- Domäne (92). Sie wurde erstmals 1996 in drei unabhängigen Studien beschrieben (92–94) und ist seitdem Gegenstand ausgedehnter Forschung. Obwohl die CASK ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommt, lag der Fokus der CASK-Forschung vor allem auf ihrer Rolle im zentralen Nervensystem und dessen Entwicklung, wo sie gehäuft an synaptischen Membranen lokalisiert ist. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Funktionen der CASK beschrieben. In Nervenzellen interagiert sie mit einer großen Anzahl an Proteinen, mit denen sie Signalkomplexe bildet, unter anderem Neurexine, Syndecane und SynCam und so die Signaltransduktion zwischen Nervenzellen reguliert (95,96). Es konnte gezeigt werden, dass die CASK über ihre PDZ-Domäne den Transkriptionsfaktor TBR1 beeinflusst und eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gehirns spielt (97). Dies wird durch weitere Studien unterstützt, die einen CASK-Defekt mit genetischen Erkrankungen wie dem FG-Syndrom (Opitz-Kaveggia-Syndrom) in Verbindung bringen (98). Ein kompletter CASK-Knock-Out in Mäusen ist letal (99), was die Relevanz der CASK insbesondere in der Entwicklung des Nervensystems unterstreicht. Zusätzlich spielt CASK eine Rolle in der embryonalen Entwicklung der Niere und der Ausprägung von intestinalen Tumoren.

Interessanterweise wurde bereits in mehreren Arbeiten eine Interaktion zwischen CASK und der oben bereits beschriebenen CaMKII beobachtet. CASK nimmt dabei

eine regulatorische Funktion ein und kann die CaMKII über ihre CamKinase-Domäne an T306 phosphorylieren und dadurch (in *Drosophila*, entspricht T305 in Säugern) hemmen (69,100). Wie bereits in Kapitel 1.7.3 beschrieben, führt eine Phosphorylierung der CaMKII an Thr306/307 bzw. Thr305/306 zu einer Konformationsänderung der CaMKII, welche die Wiederanlagerung von CaM und damit die erneute Aktivierung der CaMKII verhindert. Die fehlende Aktivierung durch CaM bewirkt außerdem eine verminderte Autophosphorylierung der CaMKII an Thr287, was deren Aktivität weiter einschränkt. Diesbezüglich konnten Versuche in Neuronen von *Drosophila* zeigen, dass eine CASK-Deletion mit einer gesteigerten Autophosphorylierung von Thr287 einhergeht (s. Abb. 12) (69).

Neben der CaMKII scheint CASK zudem mit der PKA zu interagieren. PKA phosphoryliert CASK in Neuronen an S562 der PDZ-Domäne und an T724 der GuK-Domäne und nimmt so Einfluss auf die Interaktion zwischen CASK und Transkriptionsfaktor Tbr-1 (101). Dies ist auch deshalb interessant, weil ein Großteil der Interaktionen zwischen CASK und anderen Proteinen über die ihre PDZ-Domäne vermittelt zu werden scheint (102–105) und sich eine Phosphorylierung durch die PKA in dieser Domäne starke Auswirkungen auf die Funktionsweise der CASK haben könnte.

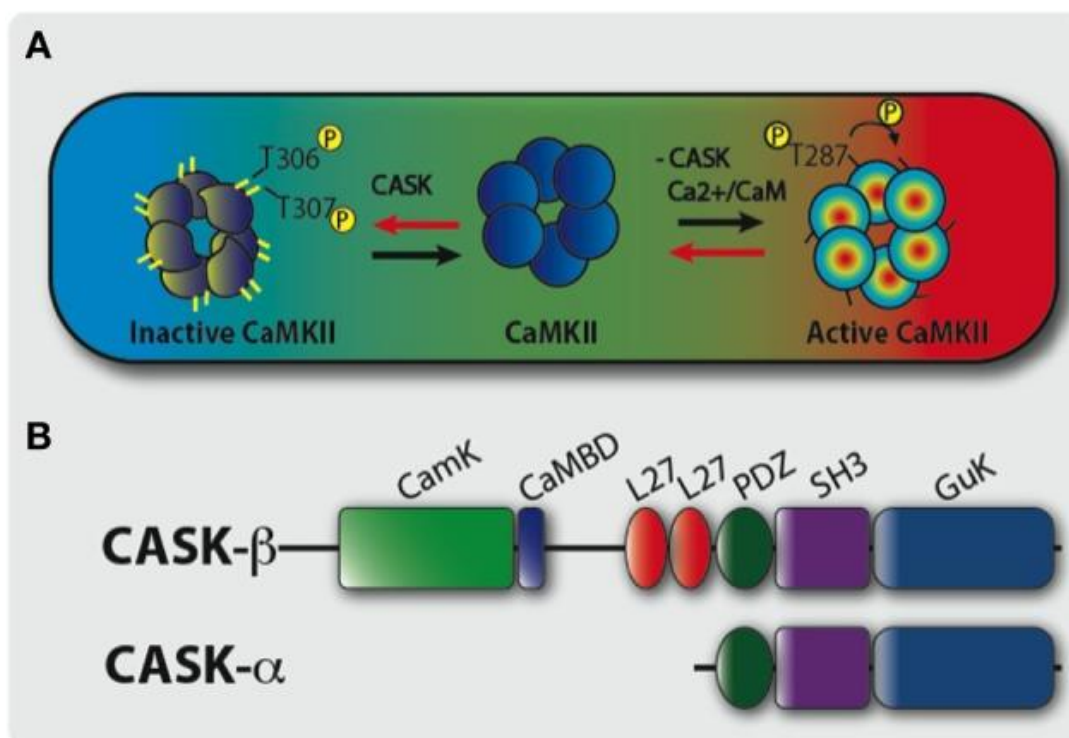


Abbildung 12 Hemmung der CaMKII durch CASK (A) und struktureller Aufbau der beiden CASK-Isoformen in *Drosophila* (B) (106).

Die Rolle der CASK als Regulator der CaMKII wurde bislang nur in Neuronen nachgewiesen. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass es eine ähnliche Interaktion zwischen CASK und CaMKII auch in anderen Geweben, insbesondere den Herzmuskelzellen, gibt. Wäre dies der Fall, könnte die CASK ein therapeutischer Ansatzpunkt in der Regulierung der CaMKII-Aktivität und damit der Behandlung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien sein.

Zusätzlich dazu konnten Eichel et al. eine direkte Interaktion zwischen CASK und dem Nav1.5 nachweisen. CASK scheint hierbei ausschließlich in der lateralen Kardiomyozytenmembran (LM) lokalisiert zu sein und Einfluss im Sinne einer Herunterregulierung des Nav1.5 zu nehmen und so den schnellen Natriumeinstrom I_{Na} zu vermindern (107).

1.10 Zielsetzung

Wie oben beschrieben, ist eine regulierende Funktion der CASK auf die CaMKII in Herzmuskelzellen naheliegend. Ein CASK-Knock-Out mit Ausbleiben dieser Regulierung müsste folglich eine vermehrte Wirkung der CaMKII und somit eine Verstärkung der oben beschriebenen CaMKII-Effekte (Kapitel 1.8.5) im Sinne einer Erhöhung des $I_{Na,late}$, mit folgender APD-Verlängerung, sowie eines vermehrten Auftretens von EADs und DADs zu Folge haben. Um diese Hypothese zu evaluieren, sollen zunächst die Auswirkungen eines herzspezifischen CASK-Knock-Outs auf den $I_{Na,late}$, sowohl unter basalen Bedingungen, als auch unter Aktivierung der CaMKII-Aktivität mittels Isoprenalin über β -adrenerge Stimulation und unter erhöhter, intrazellulärer Kalziumkonzentration gemessen werden.

Um mögliche Einwirkungen des Cre/LoxP-Rekombinasesystems auf die Physiologie der Herzmuskelzellen auszuschließen, wurden als Kontrollgruppe die zur Züchtung der Knock-Out-Maus verwendete Cre-Linie untersucht. Folglich bestehen die beiden untersuchten Gruppen aus einer Knock-Out-Gruppe (CASKflox^{+/+}/Cre^{-/+}) und einer Cre-Kontrollgruppe (CASKflox^{-/-}/Cre^{-/+}).

Zusätzlich zur Messung des späten Natriumeinstroms in Ruhe und unter β -adrenerger Stimulation, soll die Aktionspotentialmorphologie in den beiden Gruppen basal und unter Einwirkung von Isoprenalin untersucht und das Auftreten von EADs und DADs evaluiert werden. Hierbei geht es vor allem um die Frage, ob eine

mögliche Erhöhung des späten Natriumstroms die vermuteten Effekte im Sinne einer Aktionspotentialverlängerung und dem gehäuftten Auftreten von EADs und DADs hat. Ausgehend von den dadurch erhobenen Ergebnissen sollen Rückschlüsse auf die Rolle der CASK in der Entwicklung der Herzinsuffizienz und die Interaktion mit der CaMKII im Herzen gezogen werden.

Es ergeben sich daher folgende Fragestellungen:

Messung der späten Natriumströme

1. Ist der späte Natriumstrom bei einem CASK-Knock-Out im Vergleich zur Kontrollgruppe unter basalen Bedingungen erhöht?
2. Werden beobachtete Veränderungen des späten Natriumstroms im CASK-Knock-Out durch die Einwirkung von Isoprenalin oder hohe intrazellulärer Kalziumkonzentrationen verstärkt?

Messung der Aktionspotentiale:

1. Führt ein CASK-Knock-Out unter basalen Bedingungen zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer mit einer Verzögerung der Depolarisation und / oder Repolarisation?
2. Ist eine mögliche Verlängerung der Aktionspotentialdauer frequenzabhängig?
3. Welchen Einfluss hat eine Stimulation durch Isoprenalin auf die Aktionspotentialmorphologie in den verschiedenen Genotypen?
4. Bewirkt Isoprenalin (über Aktivierung der CaMKII) eine Verstärkung der unter basalen Bedingungen beobachteten Unterschiede?
5. Treten im CASK-Knock-Out unter basalen Bedingungen und / oder unter Stimulation mit Isoprenalin vermehrt EADs und DADs auf?

2 Material und Methoden

2.1 Die CASK-Knock-Out Maus

Für diese Arbeit wurden, wie oben bereits kurz beschrieben, transgene CASK-Knock-Out Mäuse untersucht und mit den Ergebnissen in der Cre-Linie (Kontrollgruppe) verglichen. Der kardiale CASK-Knock-Out wurde durch das sog. Cre-Lox-Recombinase-System in Kombination mit dem *alpha-myosin heavy chain* (alpha-MHC) Promotor hervorgerufen.

Die Cre-Rekombinase (*cyclization recombination*) des Bakteriophagen P1 katalysiert die Rekombination zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen (*locus of X-over of P1*) und kann so Genabschnitte, die durch loxP flankiert sind, gezielt ausschalten (108). Da ein kongenitaler CASK-Knock-Out letal ist, war es nötig, eine Maus mit einem herzspezifischen CASK-Knock-Out zu züchten. Um eine gewebespezifische Gendeletion zu erreichen, müssen zunächst 2 Mauslinien gezüchtet werden. Die eine Mauslinie trägt das von loxP-flankierte („gefloxte“) Zielgen (in diesem Fall CASK) und wurde durch das Labor von Prof. Südhof in Stanford bereitgestellt (CASK^{tm1sud}, (99)). Diese Mauslinie hat eine bis zu 66%ig reduzierte CASK-Expression. Die andere Mauslinie exprimiert Cre, wobei dabei der an Cre gebundene Promotor so ausgewählt wird, dass Cre gewebespezifisch exprimiert wird. In diesem Fall handelt es sich um den bereits erwähnten alpha-MHC-Promotor (109). Werden nun die geflochten Zielmäuse mit den Cre-exprimierenden Mäusen verpaart, entstehen Nachkommen, in denen das geflochte Zielgen in allen Zellen, die die Cre-Rekombinase exprimieren, ausgeschaltet wird.

Das Cre/LoxP-Rekombinationssystem ist mittlerweile eines der wichtigsten Werkzeuge zur Herstellung gewebespezifischer Knock-Out Mäuse. Neuere Studien zeigen jedoch, dass das Cre/LoxP-System auch fehleranfällig ist. So konnte bereits gezeigt werden, dass in einigen Mauslinien Cre trotz gewebespezifischen Promotors auch in anderen Geweben exprimiert wird und dadurch zur Entwicklung verfälschter Phänotypen führen kann. Außerdem scheint es Unterschiede in der Expression von Cre zu geben, je nachdem ob das Allel mütterlicherseits oder väterlicherseits weitervererbt wurde. Hierbei führte eine maternale Vererbung zu signifikant besseren Expressionsmustern als eine paternale Vererbung. Außerdem scheint es in manchen

Cre-Linien eine Variabilität der Cre-Aktivität zu geben, was sich zusätzlich negativ auf die Konsistenz der Messergebnisse auswirken kann (110).

Um eine möglichst homogene Mauspopulation mit vollständigem CASK-Knock-Out zu erhalten, wurde die Knock-Out-Linie mit CASK-flox-Mäusen über 4 Generationen zurück gekreuzt, bevor sie für die Experimente verwendet wurden. Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Alle Experimente wurden der örtlichen Tierschutzbehörde angezeigt und in Übereinstimmung mit dem „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996) durchgeführt.

2.2 Isolation ventrikulärer Mäusekardiomyozyten

Zu Beginn der Isolation wurden die Mäuse gewogen und das genaue Alter notiert. Danach wurden sie unter einer Glasglocke mit Isofluran (Abbott GmbH & Co KG), welches abhängig vom Körpergewicht der Maus dosiert wurde, narkotisiert. Nachdem die Mäuse klare Anzeichen einer vollständigen Narkose zeigten, wurde ihnen umgehend das Genick gebrochen. Hiernach erfolgte die Freilegung des Herzens. Zunächst wurde ein V-förmiger Schnitt vom Nabel in Richtung der oberen Extremitäten bis zum Rippenbogen durchgeführt. Es folgte die Darstellung des Diaphragmas und die Erweiterung der Schnitte bis zur Axilla, wodurch die ventrale Thoraxwand nach kranial geklappt und das Herz dargestellt werden konnte. Das Herz wurde dann durch ein scharfes Absetzen der großen Gefäße mobilisiert und verbliebenes Blut durch Druck und Spülung aus den Herzhöhlen entfernt. Im nächsten Schritt folgte die Bestimmung des Herzgewichts auf einer Feinwaage (Hersteller: Sartorius). Der am Herzen verbliebene Aortenstumpf wurde dann unter einem Binokular (Olympus SZ51) auf eine 18G-Kanüle aufgefädelt und mit einem Prolene-Faden und einer Klemme fixiert. Es erfolgte die retrograde Perfusion des Herzens zur Überprüfung der Dichtigkeit und um die Koronarien von Restblut zu säubern. Anschließend wurde das kanülierte Herz an eine Langendorff-Perfusionsanlage (s. Abb. 13) angeschlossen, welche zuvor mit der Perfusionslösung (s. Tab. 1 Isolationstyrode) retrograd gespült und auf 36,5 °C temperiert wurde. Die Perfusion und Verdauung erfolgten mit einer enzymhaltigen Lösung (s. Tab. 2.1 Enzymlösung) bei ebenfalls 36,5 °C und einem Fluss von 3 mL/min für 7 bis 8 Minuten. Zeigte das Herz eine milchglasartige Verfärbung, wurde

es von der Perfusionsanlage entfernt und die Ventrikel von den Vorhöfen getrennt. Die Ventrikel wurden dann in 2,5 mL Enzymlösung zerkleinert und durch vorsichtiges Vermengen weiter verdaut. Der Vorgang wurde mit einer Stopplösung (s. Tab 1 Stopplösung) beendet, sobald keine größeren Gewebestücke mehr zu erkennen waren. Durch die Filtration durch eine Nylongaze mit einem Porendurchmesser von 200 μm wurden zusätzlich größere Zellverbände entfernt und die Zelllösung danach in einem 50 ml Falconröhrchen aufgefangen. Im letzten Schritt der Zellisolation wurde ein Kalzium-Aufbau durchgeführt, um die Zellen an die Kalziumkonzentration der später verwendeten Badlösung zu gewöhnen. Zunächst wurde die Zelllösung für 7 bis 10 Minuten stehen gelassen, damit sich die Zellen absetzen und ein Zellpellet bilden konnten. Dann wurde die überstehende Zellsuspension abpipettiert und mit dem Kalzium-Aufbau begonnen. Hierbei wurden in 4 Schritten Kalziumlösungen in aufsteigender Konzentration (0,1 mmol/L, 0,2 mmol/L, 0,4 mmol/L und 0,8 mmol/L) auf die Zellen gegeben und nach 7 Minuten der verbliebene Überstand entfernt. Nach der Überführung in die 0,8 mmol/L Lösung wurde die Zellsuspension dann auf die Messkammern verteilt.

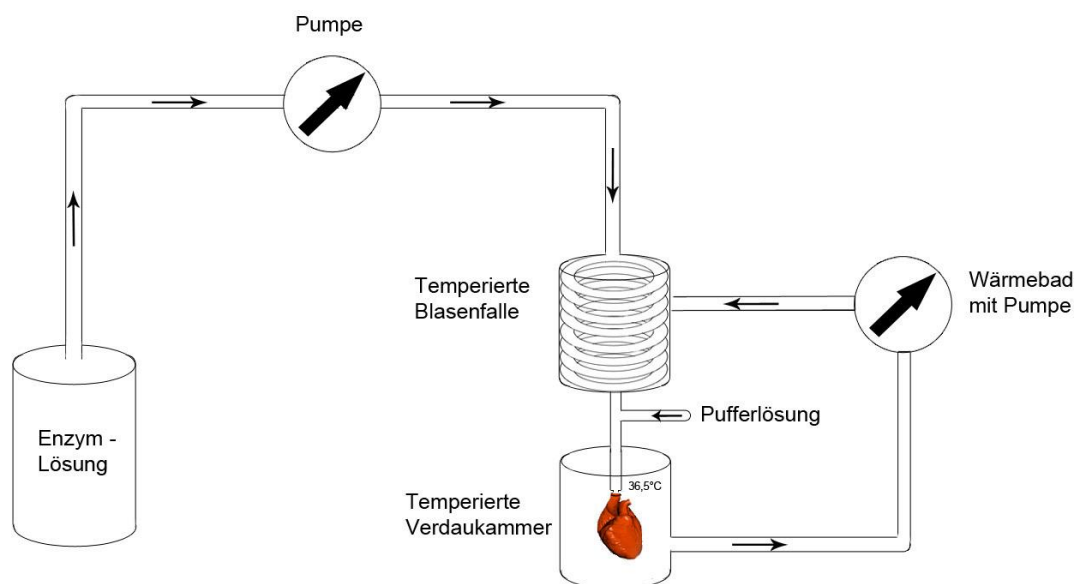


Abbildung 13 Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage.

	Substanz	Konzentration	
Isolationstyrode	NaCl	113 mmol/L	Gelöst in ddH ₂ O; pH 7,42 bei 36,5 °C
	KCl	4,7 mmol/L	
	KH ₂ PO ₄	0,6 mmol/L	
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,6 mmol/L	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mmol/L	
	Phenol-red	0,032 mmol/L	
	NaHCO ₃	12 mmol/L	
	KHCO ₃	10 mmol/L	
	HEPES	10 mmol/L	
	Taurine	30 mmol/L	
	Glucose	5,5 mmol/L	
	BDM (Stock)	10 mmol/L	
Enzymlösung	Liberase	0,05 g/L	Gelöst in Tyrode; pH 7,42 bei 36,5 °C
	Trypsin (10fach, 2,5%)	0,4 Vol%	
	CaCl ₂	0,0125 mmol/L	
Stopplösung	BCS	ca. 10 Vol%	Gelöst in Tyrode; pH 7,42 bei 36,5 °C
	CaCl ₂	0,0125 mmol/L	

Tabelle 1 Lösungen zur Isolation der Mäusekardiomyozyten

Kalziumaufbau	CaCl ₂	0,1 mM
	CaCl ₂	0,2 mM
	CaCl ₂	0,4 mM
	CaCl ₂	0,8 mM

Tabelle 2 Kalziumaufbau

2.2 Die Patch-Clamp-Technik

2.2.1 Geschichte

Der Patch-Clamp-Methode zu Grunde liegt die Technik der Spannungsklemme, welche erstmals 1939 beschrieben wurde (111). Cole und Curtis verwendeten zu Beginn Nervenzellen von Riesenkalmaren, welche extrem groß werden können und somit leicht mit den damals herstellbaren Elektroden zu punktieren waren. Mit der Entwicklung kleinerer Mikro-Pipetten wurde es in den folgenden Jahren möglich, auch kleinere Strukturen wie Muskelzellen zu untersuchen (112).

Die ebene erwähnte Spannungsklemme basiert auf der Idee, dass die Spannung über einer Zellmembran vorgegeben werden kann. Unterscheidet sich die vorgegebene Spannung vom Ruhemembranpotential der Zelle, entsteht ein Strom über die Zellmembran, der die Spannung wieder an das Ruhemembranpotential annähert. Soll die vorgegebene Spannung also konstant bleiben, muss ein Strom appliziert werden, der dem Strom über die Membran entspricht. Dies lässt Rückschlüsse auf die fließenden Ströme während verschiedener Membranspannungen zu. Eines der größten Probleme hierbei war das durch die relativ großen Pipetten verursachte Membranleck, welches Messungen kleinerer Ströme, oder gar Ströme durch einzelne Ionenkanäle, aufgrund der auftretenden Störströme unmöglich machte. Das Verlangen nach immer genaueren Messungen veranlasste Erwin Neher und Bert Sakmann die so genannte Patch-Clamp-Technik zu entwickeln. 1976 gelang es ihnen dadurch erstmals mittels einer Mikroelektrode Ströme einzelner Ionenkanäle aufzuzeichnen (113). Für die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik erhielten Neher und Sakmann 1992 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

2.2.2 Die Technik

Die Patch-Clamp-Technik zielt darauf ab, durch die Isolation eines möglichst kleinen Areals der Zellmembran, eine sehr genaue Messung einzelner Ionenströme über die Membran zu ermöglichen. Um dies zu erreichen, sind Mikropipetten mit einem Spitzen-Durchmesser von 1-5 μm notwendig, welche mittels eines Mikromanipulators an die zu untersuchende Zelle herangeführt werden. Unter leichtem Unterdruck wird die Zellmembran dann an die Mikropipette herangezogen. Das Areal, welches von

der Pipettenöffnung umschlossen wird, ist der sog. Membran-Patch. Ziel ist es eine möglichst stabile Verbindung zwischen Membran und Pipette zu schaffen, um den Patch elektrisch zu isolieren und so Störströme und Lecks zu minimieren. Ein ebenfalls von Neher und Sakmann etablierter Begriff ist das Giga-Seal. Es handelt sich dabei um eine sehr stabile Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran, die mit einem Widerstand über einem Giga-Ohm gemessen wird. Die Konfiguration sollte zu jeder Messung angestrebt werden. Ist sie erreicht, gibt es verschiedene Möglichkeiten weiter zu verfahren und Messungen durchzuführen. Der Ausgangszustand, in dem das Giga-Seal besteht und die Membran nicht von der Pipette durchstoßen wurde, wird On-Cell- oder Cell-attached-Modus genannt (Abb. 14 B). In diesem Modus ist es lediglich möglich, das Membranpotential für den isolierten Patch vorzugeben, also den Patch auf ein bestimmtes Membranpotential zu ‚klemmen‘.

Um einen direkten elektrischen Zugang in die Zelle zu erhalten, kann der Membranpatch durch einen ruckartigen Sog über die Pipette oder einen elektrischen Puls zerstört und die Zellmembran durchbrochen werden. Im besten Falle bleibt dabei die Verbindung zwischen Pipettenglas und Membran vollständig bestehen und es entsteht eine abgeschlossene Verbindung zwischen Zytosol und Pipettenlösung, welche sowohl den Flüssigkeitsaustausch als auch gegebenenfalls die Applikation von Pharmaka erlaubt. Dieser Zustand wird *whole-cell*-Modus genannt (Abb. 14 C) und wurde sowohl für die Messungen der Aktionspotentiale, als auch der späten Natriumströme, in dieser Doktorarbeit verwendet. Im *whole-cell*-Modus ist es möglich die Membranspannung für die gesamte Zellmembran vorzugeben (Spannungsklemme) oder Spannungsverläufe durch Applikation eines konstanten Stroms (*current-clamp mode*) zu messen.

Zwei weitere fortgeschrittene Mess-Konfigurationen sind die „*inside-out*“- und „*outside-out*“-Konfiguration, welche der Vollständigkeit halber kurz erklärt werden sollen, jedoch in dieser wissenschaftlichen Arbeit keine Rolle gespielt haben. Die „*inside-out*“-Konfiguration wird erreicht, indem nach Erreichen des „*on-cell*“-Modus die Pipette ruckartig von der Zelle gezogen wird (Abb. 14 D). Dabei wird der Membranpatch aus der Zelle gerissen, verbleibt aber an der Pipettenöffnung. Die ehemals intrazelluläre Membranseite des Patches zeigt nun nach außen in die Badlösung, deshalb der Begriff „*inside-out*“ (Abb. 14 F). Die „*outside-out*“-Konfiguration geht aus der „*whole-cell*“-Konfiguration hervor, indem die im Zytosol

befindliche Pipettenspitze langsam von der Zelle weggezogen wird. (Abb. 14 E) Hierbei entsteht eine Art Membranrohr, welches an einem bestimmten Punkt abreißt und sich verschließt. Es bildet sich dadurch ein neuer Membranpatch an der Pipettenöffnung. Die ursprünglich intrazelluläre Membranseite ist nun der Pipettenöffnung zugewandt, die extrazelluläre Membranseite zeigt in die Badlösung der Messkammer (Abb. 14 G). Beide Konfigurationen erlauben Messung von Spannungsverläufen und Strömen über dem generierten Membranpatch und damit sehr genaue Messungen, die sich auf wenige bis einzelne Ionenkanäle beschränken.

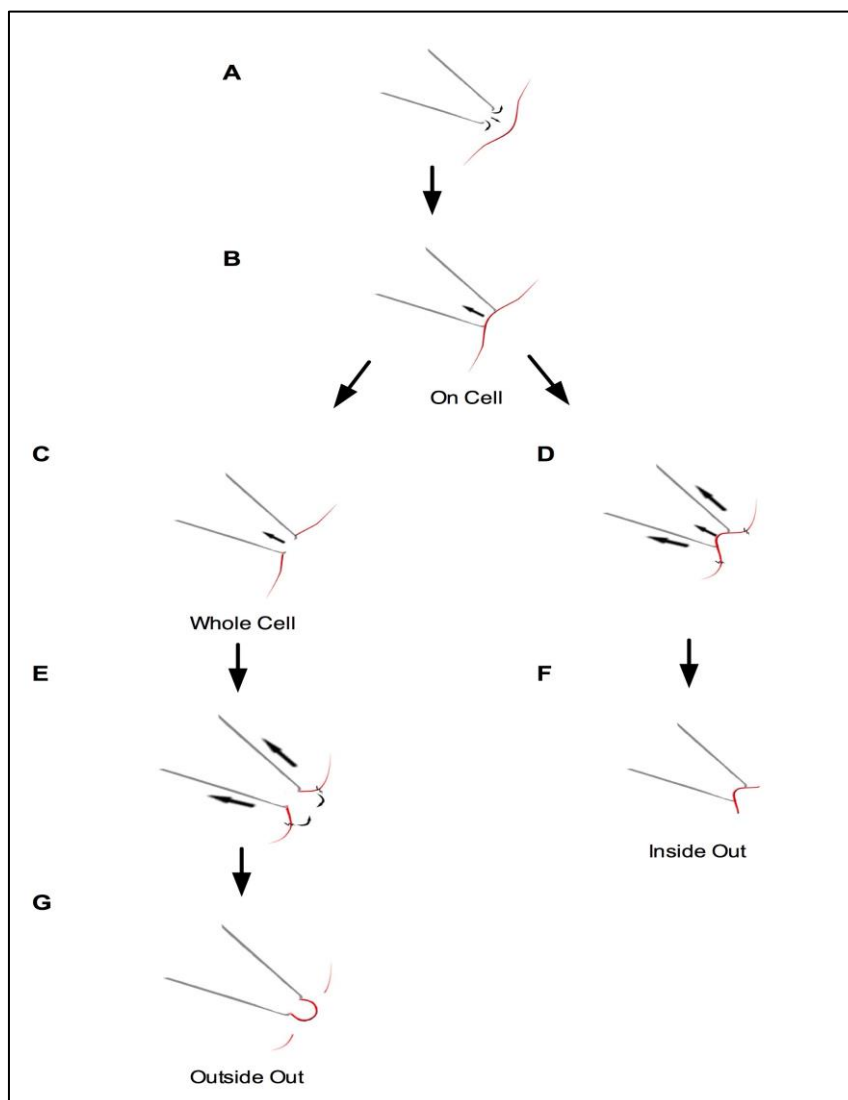


Abbildung 14 Konfigurationsmöglichkeiten in der Patch-Clamp-Technik.

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Messstand

Herzstück des Messstandes ist das Mikroskop (Abb. 15 A) (Nikon Eclipse, Tokyo), welches auf einem schwingungsdämpfenden Tisch (Abb. 15 B) angebracht ist. Es handelt sich hierbei um ein sog. invertiertes Mikroskop, was bedeutet, dass sich die Objektive des Mikroskops unter der Messkammer befinden. Dies hat den großen Vorteil, dass die Zellen, die natürlicherweise auf den Boden der Messkammer sinken und dort am Laminin haften, ohne Verzerrungen und Verunreinigung durch die Badlösung beobachtet werden können. Das in dieser Arbeit verwendete Mikroskop kann Strukturen in bis zu 400facher Vergrößerung darstellen, was eine präzise Arbeit mit den untersuchten Zellen ermöglichte.

Der Objektisch (Abb. 15 C) oberhalb der Objektive ist sowohl in horizontaler, als auch in vertikaler Ebene, über Drehregler frei beweglich und bewerkstelligt eine genaue Ausrichtung der Messkammer zum Objektiv.

Neben dem Mikroskop befindet sich der Mikromanipulator inklusive Pipettenhalter (Abb. 15 D). Dieser wird über einen Joystick außerhalb des Messstands vom Untersucher bedient und ermöglicht die nötigen punktgenauen Bewegungen der Messpipette. Zusätzlich ist der Pipettenhalter über ein luftdichtes Schlauchsystem und einen ebenfalls außerhalb des Messstands befindlichen Dreiwegehahn mit 2 Spritzen verbunden, welche zur Druckeinstellung innerhalb der Pipette dienen. Auf der anderen Seite des Mikroskops ist die Zulaufvorrichtung für die Badlösung mit integriertem Heizmodul angebracht. Die Badlösung läuft hierbei aus 50-ml-Spritzen über einen Flussregler und das Heizmodul (Abb. 15 E) in die Messkammer und wird auf der anderen Seite durch ein weiteres Schlauchsystem mittels Vakuumpumpe abgesaugt.

Der gesamte oben beschriebene Versuchsaufbau ist von einem Faraday-Käfig umgeben, welcher den Messstand von elektromagnetischen Störungen abschirmt und der über den außerhalb des Messstands befindlichen Verstärker geerdet ist. Die oben erwähnten Schlauchsysteme, sowie alle nötigen Leitungen sind zudem mechanisch über den Faraday-Käfig am schwingungsdämpfenden Tisch fixiert, um jegliche Störungen durch mechanische Schwingungen zu vermeiden. Außerhalb des Messstands befindet sich der Patch-Clamp-Verstärker vom Typ EPC 10 (HEKA

Elektronik Dr. Schulze GmbH) mit integriertem AD/DA-Wandler sowie ein PC zur Bedienung, Datenerhebung und Speicherung.

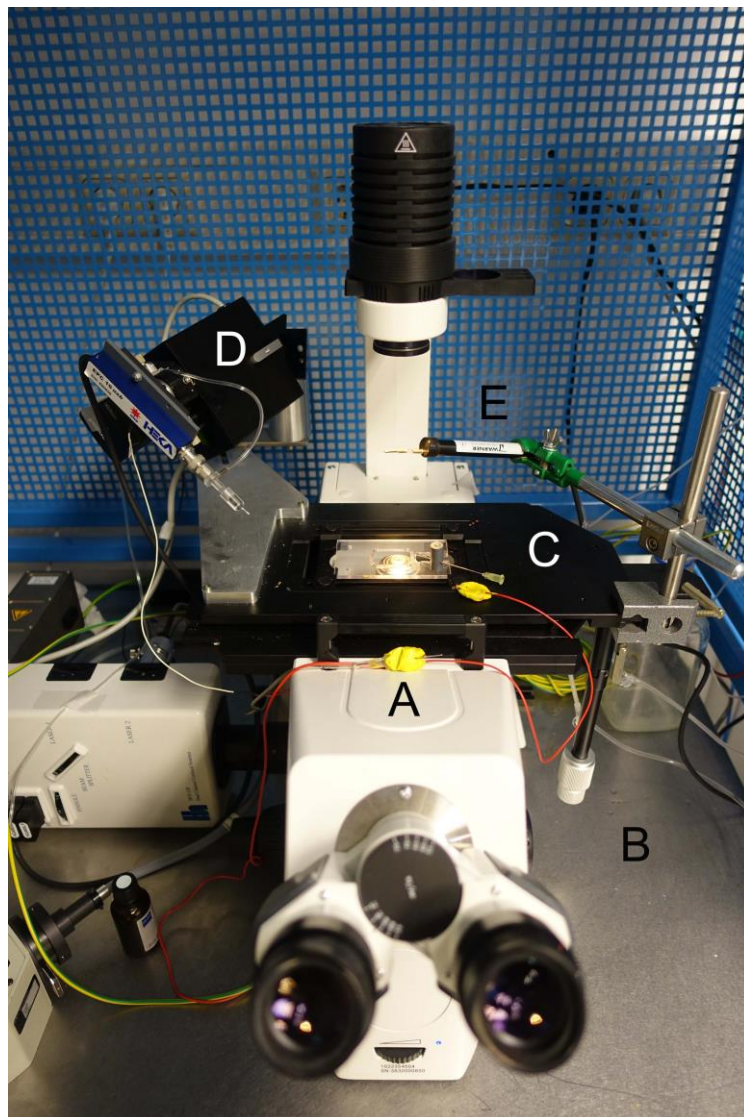


Abbildung 15 Der für diese Arbeit verwendete Patch-Clamp-Messstand.

2.3.2 Messkammern und Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Messkammern aus Hartplastik wurden in den technischen Werkstätten der Universitätsmedizin Göttingen hergestellt und im Labor mit einem Deckglas beklebt. Dieses wurde vor dem Befüllen der Messkammer mit 2,5 μ l Laminin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bestrichen. Das Laminin dient der mechanischen Fixierung der Zellen auf dem Deckglas. Je nach Zelldichte wurden

250-400 µl Zellsuspension in die Zellkammer plattiert und dann für 10 Minuten ruhen gelassen, um ein Absinken und Fixieren der Zellen zu erreichen.

2.3.3 Lösungen

Bei der Messung der Aktionspotentiale und späten Natriumströme wurden jeweils eine Bad- und eine Pipettenlösung verwendet, welche sich im Falle der Badlösung nur geringfügig unterschieden, im Falle der Pipettenlösung jedoch größere Unterschiede aufwiesen.

Badlösungen: Die Badlösungen entsprachen hierbei in ihrer Zusammensetzung in etwa dem Extrazellularraum in vivo, um ein möglichst physiologisches Milieu für die isolierten Kardiomyozyten zu schaffen. Sie wurden jeweils am Versuchstag frisch aus einem 10fach Stock angesetzt und bei 37°C auf einen pH-Wert von 7,4 mit NaOH eingestellt

Pipettenlösungen: Die Pipettenlösung wiederum wurde in ihrer Zusammensetzung der des Intrazellularraums angepasst, um nach der Ruptur des Patches und der Vermengung von Pipettenlösung und Intrazellularflüssigkeit negative Auswirkungen aufgrund von Ionen- und Osmolaritätsunterschieden wie Schwellung oder Schrumpfung der Zelle zu verhindern. Alle verwendeten Pipettenlösungen stammten hierbei aus einem einzigen Ansatz. Sie wurden bei -20°C je 500 µl Portionen gelagert und am Versuchstag aufgetaut.

Lösung	Substanz	Konzentration	
Pipettenlösung	K-Aspartic Acid	122 mmol/L	Gelöst in ddH ₂ O; pH 7,2 mit KOH bei RT Lagerung bei -20°C
	NaCl	10 mmol/L	
	KCl	8 mmol/L	
	MgCl ₂	1 mmol/L	
	Mg-ATP	5 mmol/L	
	HEPES	10 mmol/L	
Badlösung	NaCl	140 mmol/L	Gelöst in ddH ₂ O; pH 7,4 mit NaOH bei 37°C
	KCl	4 mmol/L	
	MgCl ₂	1 mmol/L	
	Glucose	10 mmol/L	

	CaCl ₂	1 mmol/L	Lagerung bei 4°C
	HEPES	5 mmol/L	

Tabelle 3 Lösungen zur Messung von Aktionspotentialen

	Substanz	Konzentration	
Pipettenlösung	CsCl	95 mmol/L	Gelöst in ddH ₂ O; pH 7.2 mit CsOH bei RT Lagerung bei -20°C
	Cs-Glutamate	40 mmol/L	
	NaCl	10 mmol/L	
	MgCl ₂	0.92 mmol/L	
	EGTA	1 mmol/L	
	Mg-ATP	5 mmol/L	
	Li-GTP	0.3 mmol/L	
	CaCl ₂	0.36 mmol/L	
	Niflumic Acid	0.03 mmol/L	
	Nifedipin	0.02 mmol/L	
	Strophanthidin	0.004 mmol/L	
	HEPES	5 mmol/L	
Badlösung	NaCl	135 mmol/L	Gelöst in ddH ₂ O; pH 7.4 mit CsOH bei 37°C Lagerung bei 4°C
	Tetramethylammonium chloride (TMAC)	5 mmol/L	
	CsCl	4 mmol/L	
	MgCl ₂	2 mmol/L	
	Glucose	10 mmol/L	
	HEPES	10 mmol/L	

Tabelle 4 Lösungen zur Messung von späten Natriumströmen

2.3.4 Pipetten und Elektroden

Die Herstellung der Patchpipetten erfolgte aus Glasskapillaren der Firma Precision Instruments (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 1,2 mm, Länge 76 mm) mit Hilfen eines Pipettenziehgerätes (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Puller). Die

Pipetten wurden in den Puller eingespannt und in einem zweizeitigen Verfahren gezogen und hitzepoliert. Durch die Parameter Hitze, Wartezeit und Zugkraft konnte die Geometrie der hergestellten Pipetten modifiziert werden, um optimale Messergebnisse zu erreichen. Hierbei musste sowohl in Betracht gezogen werden, dass große Pipettendurchmesser mit einem geringeren Pipettenwiderstand einhergehen und so das Aufzeichnen von Strömen erleichtern, gleichzeitig jedoch dadurch die Verschlusseigenschaften zwischen Pipette und Zellmembran beeinträchtigt werden, was zu einem erschwerten Erreichen eines Gigaseals und vermehrten Leckströmen führen kann. Bei dieser Versuchsreihe wurde ein Pipettenwiderstand von 1,5 - 2,5 M Ω für die Messungen der späten Natriumströme und ein etwas höherer Pipettenwiderstand von 2,0 – 3,5 M Ω für die Messungen der Aktionspotentiale angestrebt.

Das Befüllen der Pipetten mit der Pipettenlösung erfolgte mit einer Einfüllhilfe (Microfil, World Precision Instruments Inc.) mit vorgeschaltetem Filter (Filteropur / Sarstedt AG, Porengröße 0,2 μm) zur Vermeidung von Verschmutzungen und Verstopfung der Pipette.

Die Messelektrode (Pipettenelektrode) bestand aus einem chlorierten Silberdraht, der sich während der Messung innerhalb der Pipette befand. Die Referenzelektrode (Badelektrode) bestand aus einem chlorierten Silberquader und befand sich in der Badlösung.

2.4 Versuchsdurchführung

Zu Beginn wurde die Versuchskammer mit den bereits plattierten und durch Laminin fixierten Zellen auf dem beweglichen Objektisch platziert und die Badelektrode in die Badlösung getaucht und fixiert. Da alle Experimente unter einer physiologischen Temperatur von 37°C durchgeführt werden sollten, wurde danach die Zulaufvorrichtung für die erwärmte Badlösung und die Absaugung an der Messkammer angebracht. Hier war insbesondere darauf zu achten, einen kontinuierlichen Fluss der Badlösung zu erreichen, ohne dass sich der Flüssigkeitsstand in der Messkammer über die Maße verändert. War dies erreicht, wurde die Pipette mit Pipettenlösung befüllt und luftdicht über die Pipettenelektrode in die Pipettenhalterung eingespannt. Über das Schlauchsystem und die damit verbundene Spritze wurde dann ein leichter Überdruck und damit ein geringer

Ausfluss aus der Pipettenspitze erzeugt, um eine Verunreinigung während des Einführens in die Badlösung zu verhindern. Der leichte Überdruck ermöglichte außerdem ein genaueres Annähern an die zu messende Zelle, ohne diese versehentlich mit der Pipettenspitze zu verletzen. War die Pipette in die Badlösung eingebracht, erfolgte zunächst ein Nullabgleich des Potentials. Dies diente zur Kompensation des sog. *liquid junction potential* (Diffusionspotential), welches durch den Austausch von Ionen zwischen Pipettenlösung und Badlösung entsteht und zu Potentialschwankungen führen kann. Durch Applikation biphasischer Testpulse wurde dann der Widerstand zwischen Pipetten- und Badelektrode bestimmt und notiert. Anschließend wurde eine geeignete Zelle ausgesucht, wobei insbesondere darauf geachtet wurde, dass die Zellen eine mittlere Größe mit glatter Oberfläche und regelmäßiger Querstreifung aufwiesen. Unregelmäßig kontrahierende Zellen oder Zellen, die bereits Zeichen der Zellyse wie Vakuolisierung oder Auftreibungen aufwiesen, wurden nicht berücksichtigt. War eine geeignete Zelle gefunden, wurde die Pipette zunächst mit Hilfe des Mikromanipulators über der Zelle positioniert und langsam an die Zelle angenähert. Über das Patch-Clamp-Programm war es möglich, den Widerstand zwischen beiden Elektroden kontinuierlich mit zu verfolgen. Ein rapides Ansteigen des Widerstandes sprach für einen sehr geringen Abstand zwischen Pipettenöffnung und Zelle. Nun wurde der zu Beginn des Versuchs angelegte Überdruck abgelassen. Häufig reichte dies bereits um ein Anlegen der Zellmembran an die Pipette und das Ausbilden eines Gigaseals (s. Patch-Clamp-Technik) zu erreichen. War dies noch nicht der Fall, konnte durch Aufbau eines leichten Unterdrucks über das Schlauchsystem ein weiteres Anlegen der Zelle versucht werden.

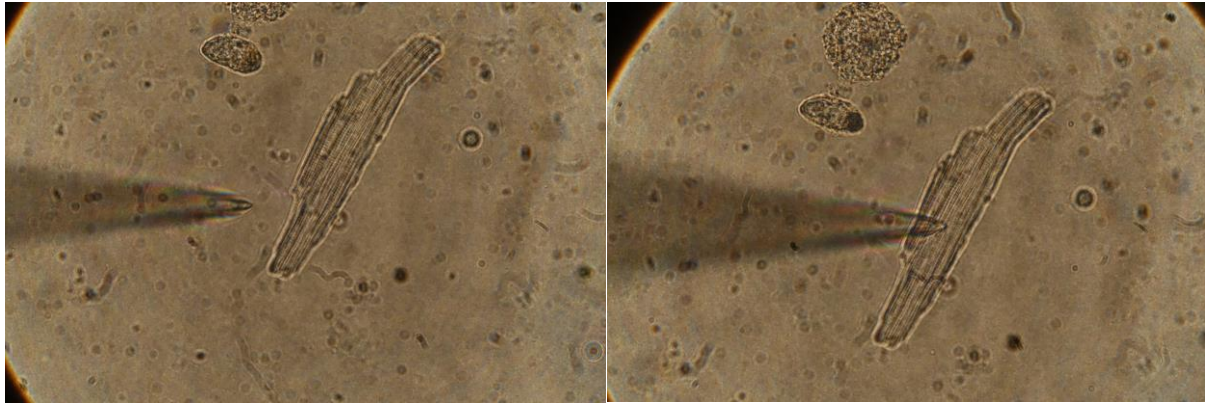


Abbildung 16 Heranfahren der Pipette an eine geeignete Herzmuskelzelle unter dem Mikroskop.

Nach Erreichen des Gigaseals und damit dem Zustand der *on-cell*-Konfiguration wurde die Zellmembran durch kurzes Erzeugen eines größeren Unterdrucks durchbrochen und so eine Verbindung zwischen Pipettenlösung und Intrazellularflüssigkeit hergestellt. Die dadurch entstandene *whole-cell*-Konfiguration ermöglichte nun das Messen von Strömen und Spannungen über der gesamten Zelloberfläche. Über den Patch-Master wurde zunächst in den *whole-cell*-Modus gewechselt. Dies geht mit einem Abgleich kapazitiver Ströme und einer Aktivierung einer kontinuierlichen Serienwiderstandskompensation einher. Der Serienwiderstand (*r-series*) setzt sich aus Pipettenwiderstand, Zellwiderstand und Widerstand der Badlösung zusammen und sollte relativ gering sein. Die Kompensation des Stroms bewirkt eine zum applizierten Strom proportionale Erhöhung der Kommandospannung. Dies verhindert einen Abfall der Sollspannung aufgrund des Serienwiderstands und somit eine Verfälschung der Messwerte. Es folgte eine Wartezeit von 5 Minuten, um einen ausreichenden Austausch zwischen Pipettenlösung und Intrazellularflüssigkeit zu gewährleisten. Außerdem konnte in dieser Zeit beobachtet werden, ob die Zelle die Punktierung gut überstanden hatte und über einen längeren Zeitraum hinsichtlich ihres Ruhemembranpotentials stabil blieb. War dies der Fall, konnte nun mit der Messung begonnen werden. Der Ablauf zwischen Aktionspotential- und $I_{Na,late}$ -Messung unterschied sich dabei geringfügig. Die Messung der späten Natriumströme erfolgte im *voltage-clamp*-Modus. Hierbei wurde die Zelle auf ein Ruhemembranpotential von -120 mV geklemmt und beobachtet, ob sie auch unter der Spannungsklemme stabil blieb. War dies der Fall, wurde anschließend ein standardisiertes Strom-Spannungs-Protokoll ausgeführt.

Zur Messung der Aktionspotentiale wurde über den Patch-Master in den *current clamp*-Modus geschaltet. In diesem Modus wird ein konstanter Strom (Stromklemme) appliziert, um die Zelle auf ein bestimmtes Ruhemembranpotential zu bringen. Ist das Ruhemembranpotential erreicht, kann durch kurze Impulse eine Membranpotentialschwankung in Form eines Aktionspotentials erreicht und registriert werden.

2.5 Messprotokolle

Messung der späten Natriumströme: Nachdem die Zelle auf ein Ruhemembranpotential von -120 mV im *whole-cell*-Modus geklemmt wurde, erfolgte eine Depolarisierung für 5 ms auf 50 mV, gefolgt von einer Einstellung des Membranpotentials auf -20 mV über 250 ms. Danach erfolgte die Normalisierung auf -120 mV. Dieser Ablauf wurde für jede Messung 10mal mit einer Frequenz von 2 Hz wiederholt.

Aktionspotentialmessung: Wie schon in Kapitel 2.4 beschrieben, wurde das Messprotokoll für Aktionspotentiale im *current-clamp*-Modus durchgeführt. Hierbei wurde eine Spannung von maximal -100 pA vorgegeben, um ein stabiles Ruhemembranpotential von ca. -70 - -80 mV zu erreichen. Dann wurde die Zelle mit Rechteckimpulsen von 1-6 ms Dauer und einer Amplitude von 1000 pA stimuliert. Es wurde in vier verschiedenen Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz und 3 Hz) gemessen und die Daten mit einer Rate von 4 kHz aufgezeichnet.

2.6 Pharmakologische Intervention mit Isoprenalin

Das verwendete Isoprenalin wurde für jeden Tag frisch angesetzt. Dabei wurde zunächst eine Grundlösung (ASC-Tyrode) bestehend aus 50 mg Ascorbinsäure, 5 µl HCL (rauchend=32%) und einem Liter Calcium-freier Badlösung mit Glucose angesetzt. Es erfolgte dann die Herstellung einer 10 mM Isoprenalin-Stock-Lösung, indem 24,77 mg Isoprenalin (Molekulargewicht 247,7 g/mol), welches bei -80 Grad Celsius gelagert wurde, in 10 ml ASC-Lösung gelöst wurden. Im letzten Schritt wurde durch weiteres Verdünnen eine 1M Isoprenalin-Lösung hergestellt. Alle Versuche mit Isoprenalin erfolgten hierbei in einer abgedunkelten Messkammer mit lichtgeschützten Infusionssystemen, um eine lichtbedingte Abschwächung der Isoprenalinwirkung zu verhindern.

2.7 Datenerfassung und Auswertung

Die Rohdaten der gemessenen Aktionspotentiale und späten Natriumströme wurden zunächst auf dem mit dem Verstärker verbundenen PC mit der Software Patchmaster (HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH) gespeichert. Es erfolgte die Übertragung der Messungen in ACS-Dateien, welche dann als Text-Datei in das Programm LabChart übertragen und ausgewertet wurden. Die durch LabChart errechneten Mittelwerte wurden dann in Excel-Tabellen gespeichert. Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA)

2.7.1 Auswertung der späten Natriumströme

Für die späten Natriumströme wurden die Rohdaten wie oben beschrieben mit der Software Patchmaster (HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH) in eine Excel-Arbeitsmappe exportiert. Hier wurde das Integral der Datenkurve im Zeitraum zwischen 50 und 450 ms berechnet. Der bei 1000 ms gemessene Natriumstrom wurde als Leckstrom vom Gesamtstrom subtrahiert. Um Schwankungen in der Zellgröße auszugleichen, wurde zudem das Ergebnis auf die Membrankapazität (C_m) normalisiert.

2.7.2 Auswertung der Aktionspotentiale

Die Aktionspotentiale wurden hinsichtlich folgender Werte ausgewertet: Maximale Aufstrichgeschwindigkeit (V_{max}), Amplitude und Aktionspotentialdauer. Die Aktionspotentialdauer wurde hierbei in 30%, 50%, 80% und 90%-Repolarisation der Aktionspotentialamplitude unterteilt ($APD_{30\%}$, $APD_{50\%}$, $APD_{80\%}$ und $APD_{90\%}$). Das Ruhemembranpotential jeder gemessenen Zelle wurde dokumentiert.

Außerdem wurden die Nachdepolarisationen in LabChart ausgezählt, um eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit von Arrhythmien treffen zu können. Die Nachdepolarisationen wurden in frühe (EADs) und späte Nachdepolarisationen (DADs) unterteilt. Zu den EADs wurden dabei alle Nachdepolarisationen gezählt, die vor einer vollständigen Repolarisation auftraten, alle anderen Nachdepolarisationen

wurden den DADs zugeordnet, hierbei wurden jedoch nur jene DADs berücksichtigt, die in der Lage waren ein vollständiges Aktionspotential auszulösen.

2.7.3 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Alle Daten dieser Arbeit werden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M) dargestellt. Der Standardfehler (S.E.M.) wurde durch folgende Formel errechnet:

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

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

Die statistische Analyse sowie die graphische Darstellung erfolgte mit der Software Graphpad Prism. Je nach Anzahl und Zusammenhang der zu vergleichenden Gruppen erfolgte die statistische Analyse mittels Fisher's exact test für kategoriale Variablen, Ein-Weg-ANOVA mit Mehrfachvergleich (Newman-Keuls Multiple Comparison Test) oder Zwei-Wege-ANOVA. Ein P-Wert von $p < 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss eines CASK-Knock-Outs auf die Herz- und Zellgröße und die Überlebenszeit

Die beiden untersuchten Mäuselinien zeigten während der Haltung keine Unterschiede in Verhalten, Nahrungsaufnahme oder körperlicher Aktivität.

Ein CASK-Knock-Out hatte keinen Einfluss auf das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht. Wie in **Abbildung 17** dargestellt, war sowohl das Herzgewicht als auch das Körpergewicht in der Cre-Kontrollgruppe (CASKflox^{-/-}/Cre^{+/-}) signifikant höher als in CASK-Knock-Out-Gruppe (CASKflox^{+/-}/Cre^{+/-}). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppen von Prof. Südhoff (99), die bereits ein signifikant niedrigeres Körpergewicht in der Knock-In-Gruppe (CASKflox/WT) beobachteten.

Das Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen und betrug 7.10 ± 0.18 mg/g in der Knock-Out-Gruppe und 7.405 ± 0.44 mg/g in der Cre-Kontrollgruppe ($p = \text{n.s.}$).

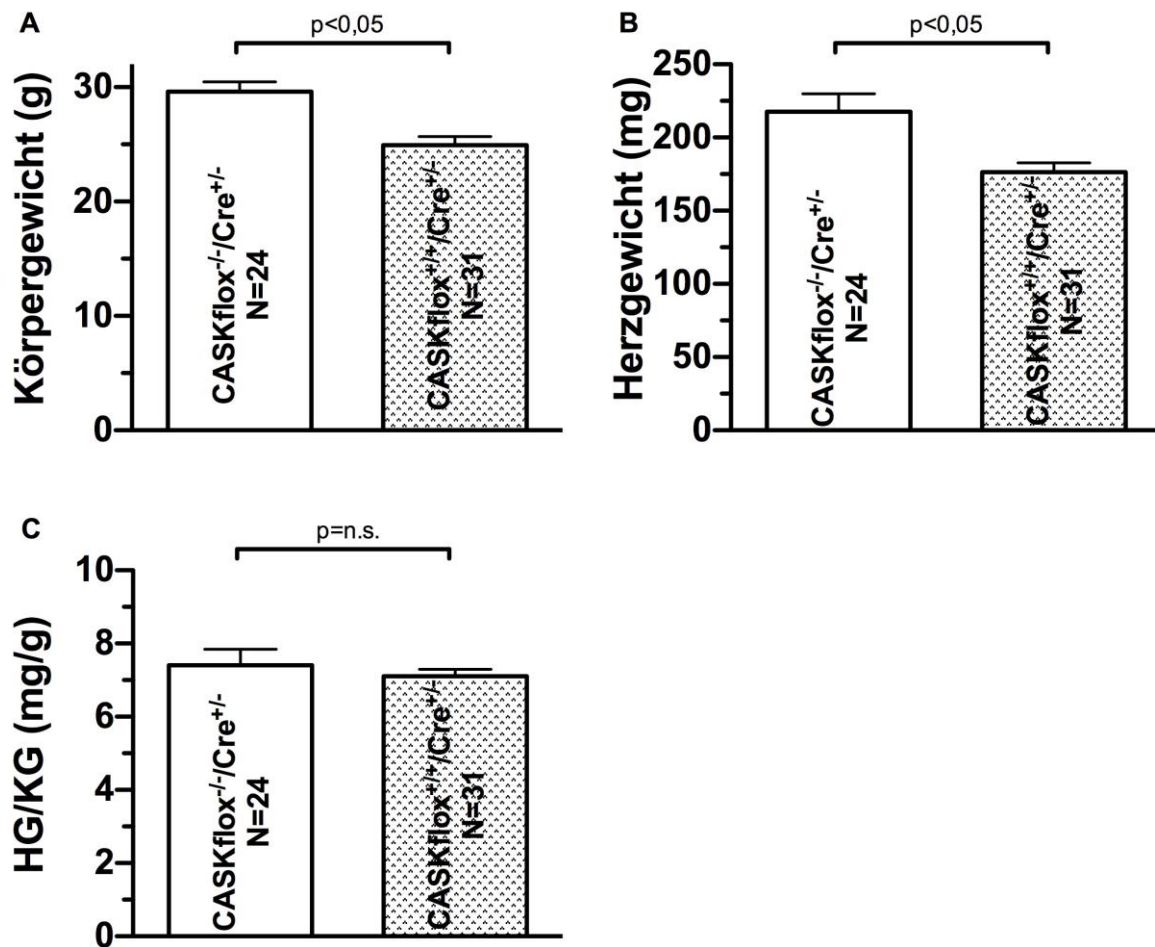


Abbildung 17 Graphische Darstellung der Mittelwerte für Körpergewicht (A), Herzgewicht (B) und des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht (HG/KG in mg/g) (C) bei CASK-Knock-Out-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Um mögliche Hypertrophie-Effekte eines CASK-Knock-Outs auf zellulärer Ebene zu beurteilen, wurde die Membrankapazität der Zellen (C_m) im Whole-cell-Modus vor jeder Messung bestimmt. Sie ist proportional zur Oberfläche der Zellmembran ($1 \text{ pF} \approx 1 \mu\text{m}^2$) und liefert so indirekt ein Maß für die Zellgröße.

Wie in **Abbildung 18** zu sehen ist, unterschieden sich die Membrankapazitäten in den beiden untersuchten Mauslinien nicht. Die Membrankapazität betrug in der Knock-Out-Gruppe $181.9 \pm 9.11 \text{ pF}$, in der Kontrollgruppe $201.0 \pm 9.82 \text{ pF}$ (CASKflox^{-/-}/Cre^{+/-}).

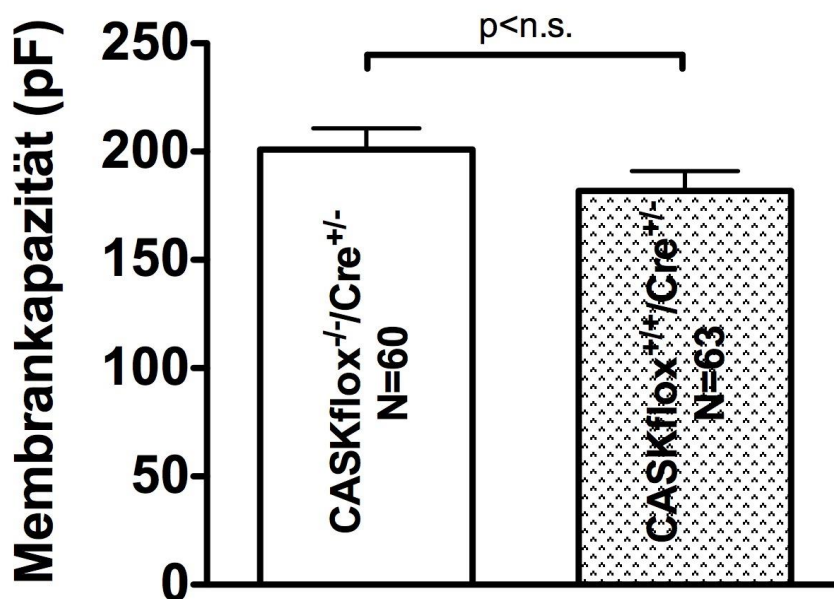
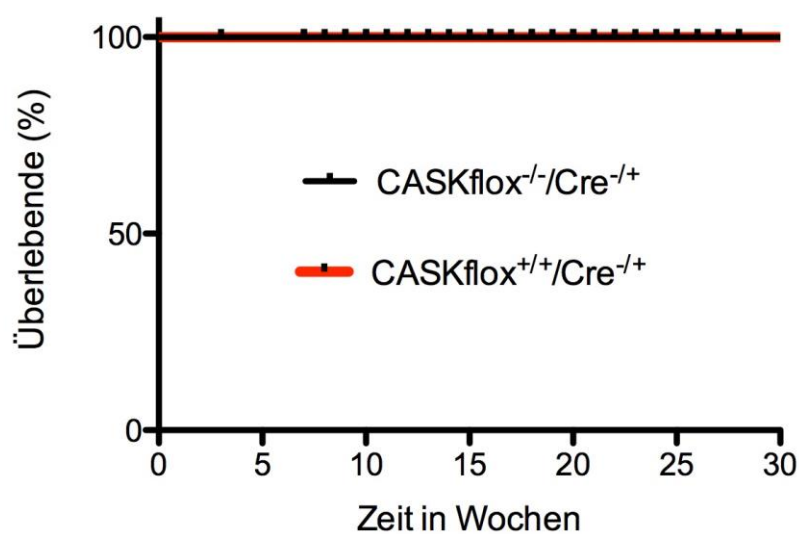


Abbildung 18 Die Membrankapazität (in pF) als Maß für die Zellgröße war in der CASK-Knock-Out-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert.

Auch in der Überlebenszeit ließ sich kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. **Abbildung 19** zeigt das Überleben der beiden Genotypen über die ersten 30 Wochen nach Geburt.



	Anzahl der lebenden Mäuse						
CASKflox ^{-/-} /Cre ^{-/+}	41	41	34	22	19	12	8
CASKflox ^{+/+} /Cre ^{-/+}	56	55	52	28	14	12	7

Abbildung 19 Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Überlebens der untersuchten Genotypen über einen Zeitraum von 180 Tagen ab der Geburt.

3.2 Effekte eines CASK-Knock-Outs auf den späten Natriumstrom

3.2.1 Effekte unter basalen Messbedingungen

Unter basalen Bedingungen konnte ein signifikant erhöhter $I_{Na,late}$ in der Knock-Out-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Hierbei betrug das errechnete Integral zwischen 50 und 450 ms in der Knock-Out-Gruppe (CASKflox^{+/+}/Cre^{-/+}) -103.8 ± 8.53 Ams/F (n=11), in der Kontrollgruppe -53.11 ± 9.80 Ams/F für CASKflox^{-/-}/Cre^{-/+} (n=12) ($p < 0.05$, 1Way-ANOVA). **Abbildung 20** zeigt Originalregistrierungen der späten Natriumströme in den Gruppen im Vergleich. In **Abbildung 21** sind die Mittelwerte des errechneten Integrals der einzelnen Genotypen graphisch dargestellt.

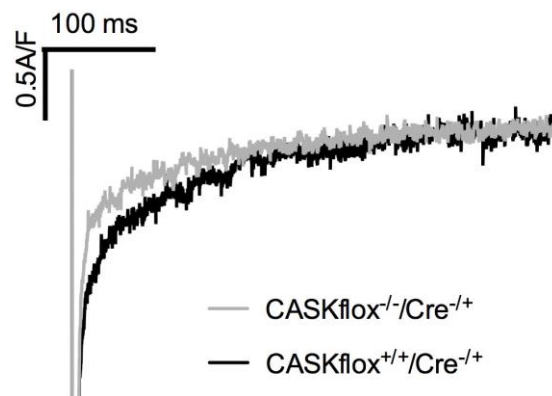


Abbildung 20 Repräsentative Originalabbildungen der späten Natriumströme unter basalen Messbedingungen in den getesteten Genotypen. Die Knock-Out-Gruppe (Schwarz) zeigt hierbei ein signifikant größeres Integral als die Kontrollgruppe (Grau).

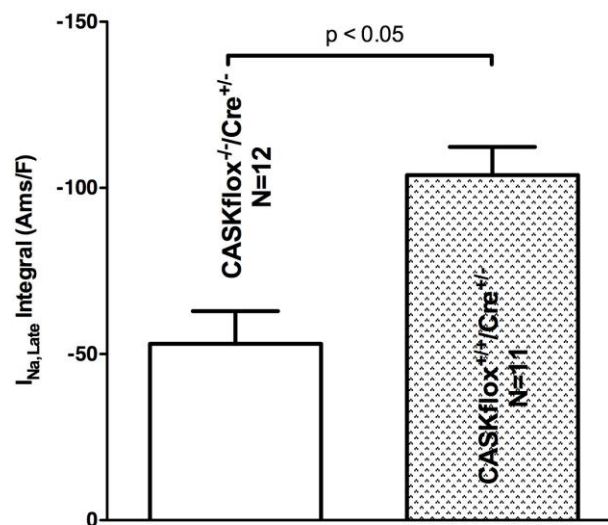


Abbildung 21 Darstellung der Mittelwerte für das errechnete Integral des späten Natriumstroms. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Knock-Out-Gruppe ($p < 0.05$, 1WayANOVA).

3.2.2 Effekte unter der Einwirkung von Isoprenalin

Unter der Einwirkung von Isoprenalin kam es in beiden untersuchten Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung des errechneten Integrals zwischen 50 und 450 ms. Es konnte jedoch, anders als unter basalen Messbedingungen, kein signifikanter Unterschied zwischen der Knock-Out-Gruppe mit -149.4 ± 9.31 Ams/F ($n=12$) und der Kontrollgruppe (-142.0 ± 15.98 Ams/F, $n=12$) festgestellt werden ($p=n.s.$).

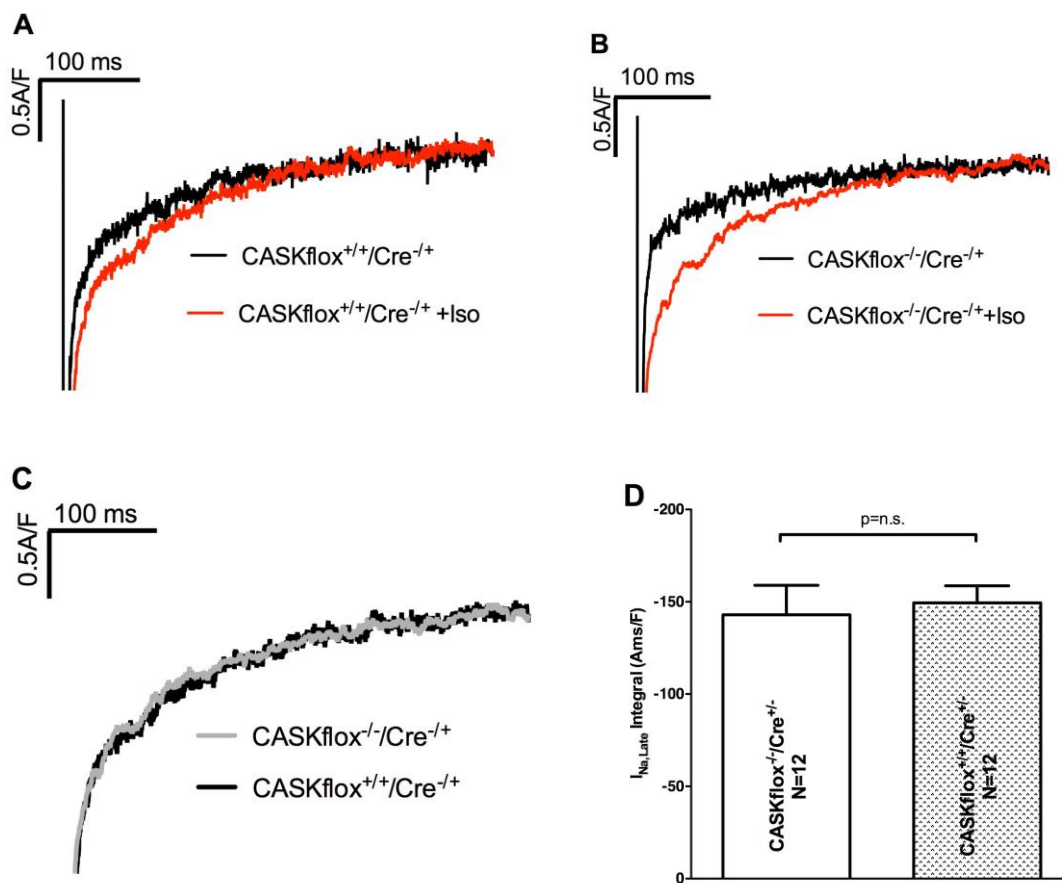


Abbildung 22 Graphik A und B zeigen Originalabbildungen der späten Natriumströme unter basalen Bedingungen im Vergleich mit Isoprenalin-Messungen. C zeigt die Originalabbildungen der Isoprenalin-Messungen und D die Mittelwerte des errechneten Integrals unter Einwirkung von Isoprenalin im Vergleich ($p=n.s.$).

3.2.3 Effekte unter hoher intrazellulärer Kalziumkonzentration

Um die Effekte eines CASK-Knock-Outs auf den späten Natriumeinstrom unter einer direkten CaMKII-Aktivierung durch Kalziumionen (siehe Kapitel 1.8.2) zu untersuchen, wurden zusätzlich späte Natriumströme bei hoher intrazellulärer Kalziumkonzentration (100nM bzw. 500nM) in den beiden Genotypen gemessen. Hierbei zeigte sich bereits unter niedriger, intrazellulärer Kalziumkonzentration ein erhöhter später Natriumstrom in der Knock-Out-Gruppe. Jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Dies änderte sich unter hohen, intrazellulären Kalziumkonzentrationen. In beiden Gruppen kam es zu einer signifikanten Zunahme des späten Natriumeinstroms unter hoher, intrazellulärer Kalziumkonzentration. Zudem zeigte sich ein signifikant erhöhtes Integral für den späten Natriumstrom in der Knock-Out-Gruppe im Vergleich zur Cre-Kontrollgruppe. Das errechnete Integral betrug, wie in **Abbildung 24** dargestellt, -145.0 ± 7.83 Ams/F (n=9) in der Knock-Out-Gruppe im Vergleich zu -120.0 ± 7.26 Ams/F (n=11) in der Kontrollgruppe ($p < 0.05$). **Abbildung 23** zeigt Originalregistrierungen der späten Natriumströme unter niedriger und hoher Kalziumkonzentration im Vergleich.

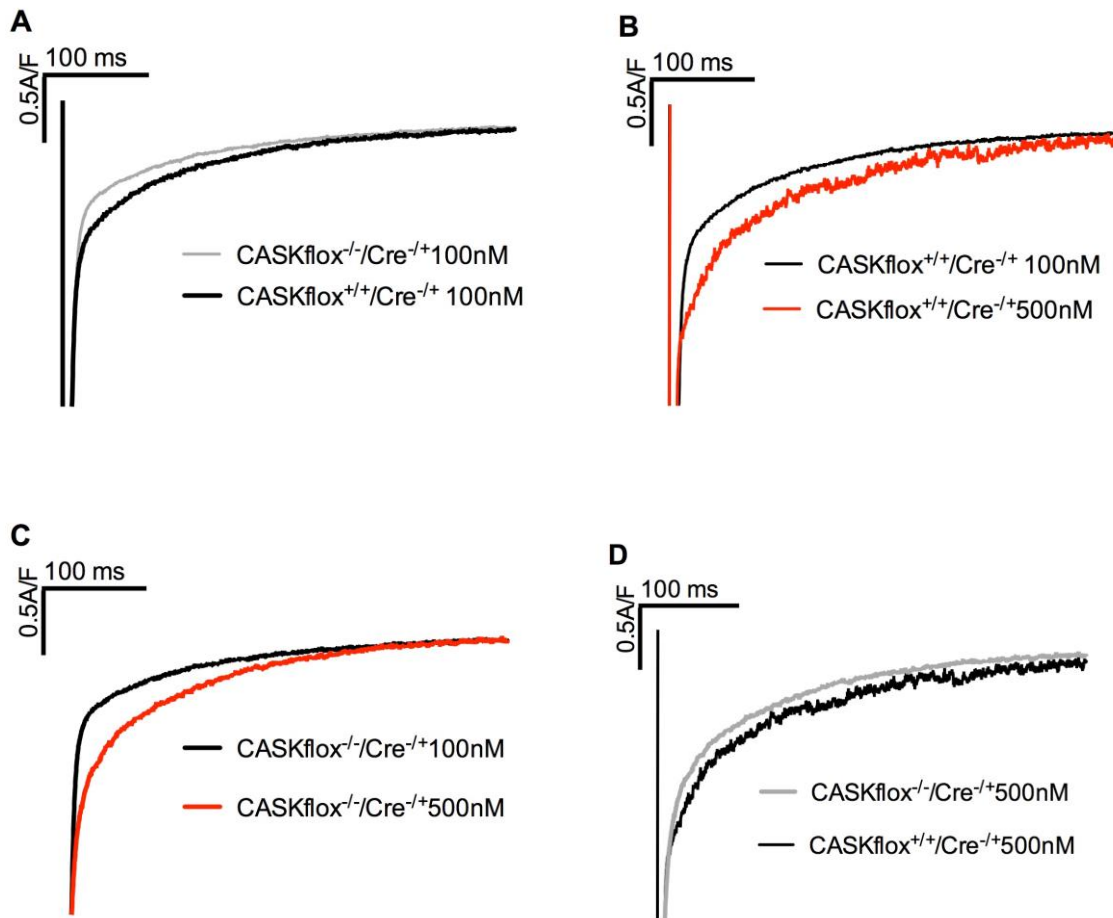


Abbildung 23 Repräsentative Originalabbildungen der späten Natriumströme bei niedriger (100nM) und hoher (500nM) intrazellulärer Kalziumkonzentration. Graphik A zeigt beide Genotypen unter niedriger Kalziumkonzentration im Vergleich. Graphik B und C zeigen die Veränderung des späten Natriumeinstroms unter hoher Kalziumkonzentration innerhalb der Genotypen. Graphik D zeigt beide Genotypen unter hoher Kalziumkonzentration im Vergleich.

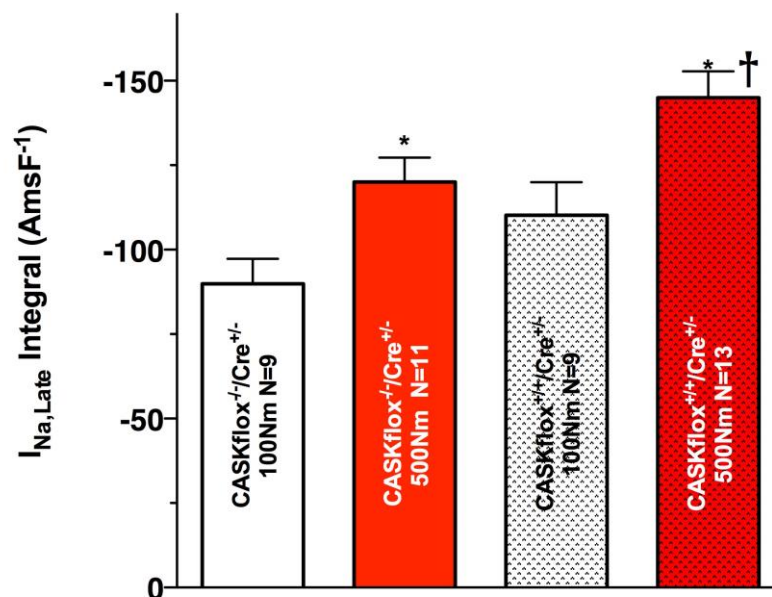


Abbildung 24 Abgebildet sind die Mittelwerte des errechneten Integrals des späten Natriumstroms bei niedriger, sowie hoher, intrazellulärer Kalziumkonzentration. Hierbei zeigte sich ein signifikant erhöhtes Integral in beiden Genotypen unter hoher intrazellulärer Kalziumkonzentration. Zudem ist der späte Natriumstrom unter hoher intrazellulärer Kalziumkonzentration in der Knock-Out-Gruppe im Vergleich zur Cre-Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0.05$).

3.3 Effekte eines CASK-Knock-Outs auf die Aktionspotentialmorphologie

Hinsichtlich der Aktionspotentialmorphologie wurden die maximale Aufstrichgeschwindigkeit (V_{max}), die Repolarisationsdauer bei 30%, 50% und 80% ($APD_{30\%}$, $APD_{50\%}$ und $APD_{80\%}$) sowie die Häufigkeit spontan auftretender Nachdepolarisationen unter basalen Bedingungen und unter der Einwirkung von Isoprenalin untersucht. Im Folgenden sollen nur die Werte für die V_{max} , die $APD_{50\%}$ und die $APD_{80\%}$ im Detail erwähnt und graphisch dargestellt werden. Alle weiteren erhobenen Daten werden am Ende des Kapitels tabellarisch aufgelistet.

3.3.1 Effekte unter basalen Messbedingungen

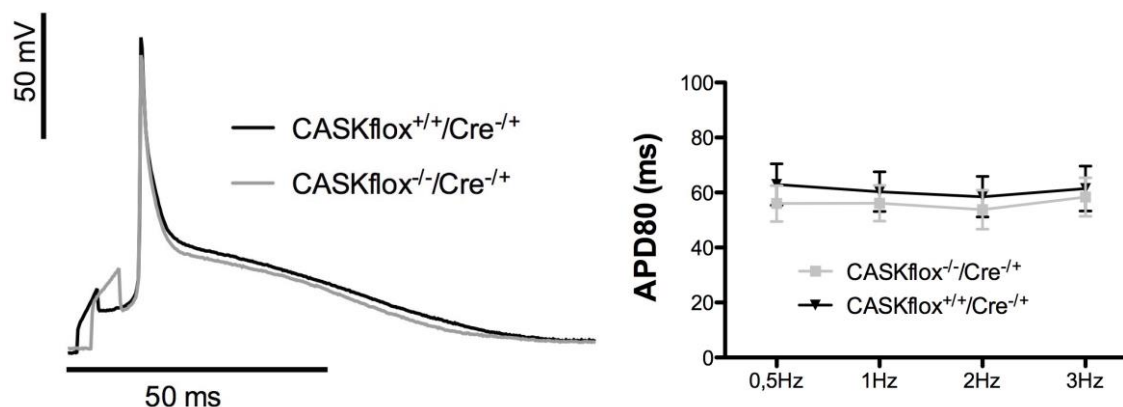


Abbildung 25 Originalregistrierungen der Aktionspotentiale unter basalen Messbedingungen und die gemittelte APD_{80%} über die verschiedenen Frequenzen.

Abbildung 25 zeigt repräsentative Originalaufzeichnungen der Knock-Out-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigten sich tendenziell verlängerte Repolarisationszeiten in der Knock-Out-Gruppe, jedoch waren diese nicht signifikant unterschiedlich zu den Werten in der Kontrollgruppe. Die Werte für die APD_{50%} betragen in der Kontrollgruppe 13.04 ± 1.3 ms (n=16) und 15.25 ± 1.59 ms (n=15) in der Knock-Out-Gruppe (p=n.s.).

Die gemittelte APD_{80%} betrug für die Kontrollgruppe 55.46 ± 7.25 ms (n=16) und für die Knock-Out-Gruppe 60.32 ± 7.23 ms (n=15) (p=n.s.).

Auch die Auswertung der maximalen Aufstrichgeschwindigkeit (V_{max}) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. So lieferten die Knock-Out-Gruppe und die Kontrollgruppe mit 117.04 ± 1.25 V/s (CASKflox^{+/+}/Cre^{-/+}, n=18) bzw. 117.67 ± 1.08 V/s (CASKflox^{-/-}/Cre^{-/+}, n=19) nahezu identische Werte. **Abbildung 26** zeigt die hier angegebenen Mittelwerte für die V_{max} bei einer Frequenz von 1 Hz und den Vergleich über die verschiedenen registrierten Frequenzen.

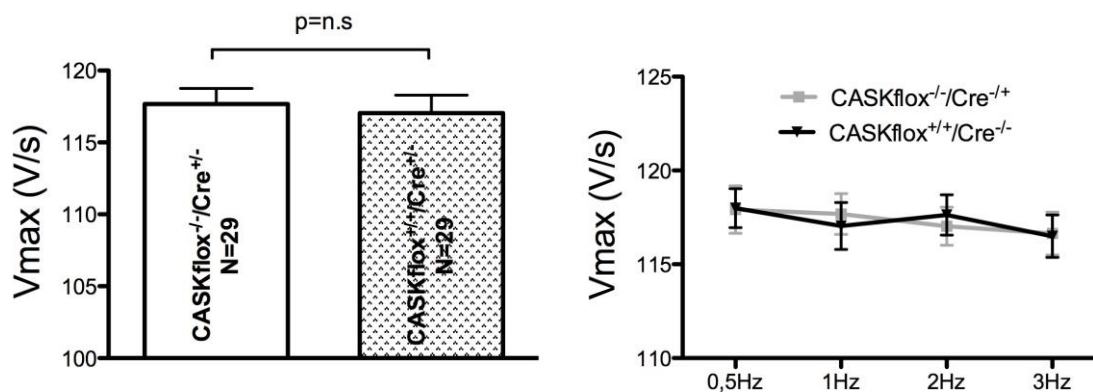


Abbildung 26 Maximale Aufstrichgeschwindigkeit (V_{max}) bei einer Frequenz von 1 Hz und über die vier ermittelten Frequenzen.

3.3.2 Effekte unter der Einwirkung von Isoprenalin

Unter Einwirkung von Isoprenalin kam es in den untersuchten Genotypen zu einer Verlängerung der Repolarisationszeit im Vergleich zur Messung unter basalen Bedingungen, wobei die Verlängerung sowohl in der Knock-Outgruppe als auch in der Kontrollgruppe signifikant war ($p < 0.05$ für 1 Hz).

Abbildung 28 zeigt den Vergleich der Isoprenalin-Werte über die ermittelten Frequenzen. Hierbei zeigte sich sowohl für die $APD_{30\%}$, als auch für die $APD_{50\%}$ in einer Zwei-Wege-Varianzanalyse der Isoprenalinwerte über die vier gemessenen Frequenzen ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (2WayANOVA, $p < 0.05$). Die Posthoc-Analyse der einzelnen Frequenzen ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied, was auf die niedrige Anzahl an Messungen zurückzuführen ist. Die gemittelte $APD_{50\%}$ unter Isoprenalin betrug 17.9 ± 2.29 ms ($n=20$) in der Knock-Out-Gruppe und 14.24 ± 1.23 ms ($n=20$) in der Kontrollgruppe. Die $APD_{80\%}$ hingegen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Mittelwerte der $APD_{80\%}$ unter Isoprenalin-Einwirkung betragen 80.91 ± 3.74 ms in der Knock-Out-Gruppe ($n=20$) und 85.05 ± 4.37 ms in der Cre-Kontrollgruppe ($n=20$).

Abbildung 27 zeigt exemplarische Originalaufzeichnungen der Aktionspotentiale mit und ohne Isoprenalin im Vergleich und die Isoprenalin-Originalabbildungen übereinander abgebildet.

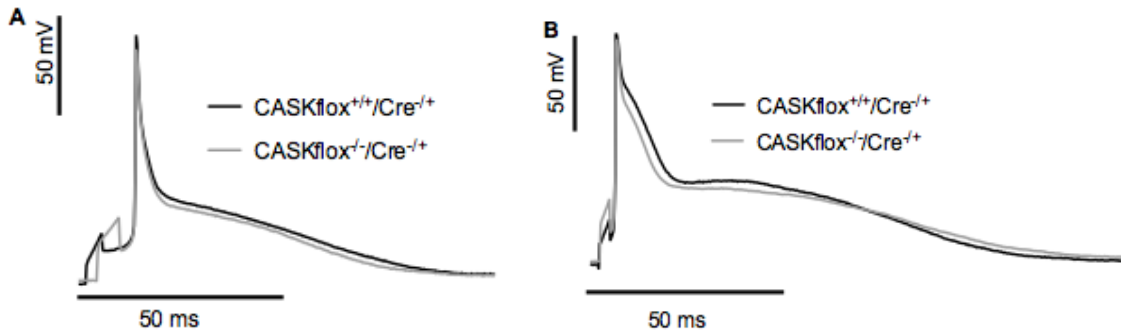


Abbildung 27 Exemplarische Originalaufzeichnungen der Aktionspotentiale unter basalen Messbedingungen (A) unter Einwirkung von Isoprenalin (B).

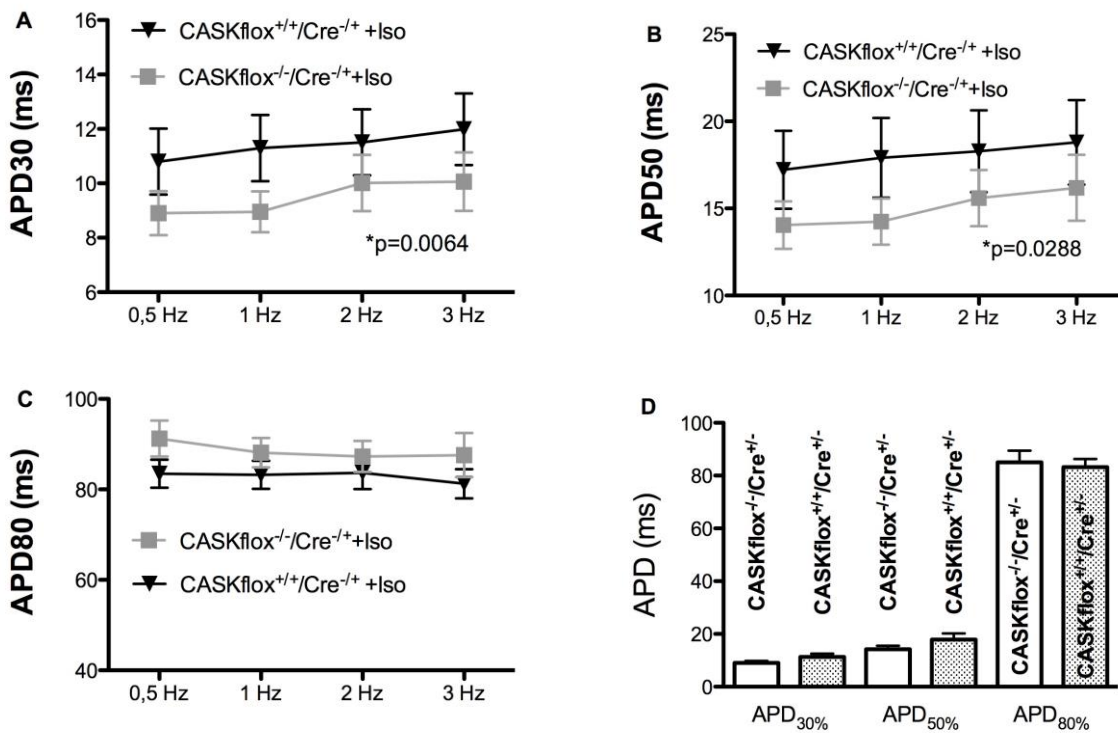


Abbildung 28 Vergleich der Isoprenalin-Werte über die ermittelten Frequenzen.

Die Auswertung der maximalen Aufstrichgeschwindigkeit unter Einwirkung von Isoprenalin ergab eine signifikante Erhöhung der V_{max} in der Knock-Out-Gruppe ($p < 0.05$ 1WayANOVA). Auch in der Kontrollgruppe kam es zu einer Erhöhung der V_{max} , jedoch war diese nicht signifikant. Die Mittelwerte bei einer Frequenz von 1Hz betragen 121.86 ± 1.36 V/s ($n=19$) in der Knock-Out-Gruppe und 120.16 ± 1.38 V/s ($n=19$) in der Kontrollgruppe. **Abbildung 29** zeigt die Auswirkung von Isoprenalin auf die V_{max} in den einzelnen Gruppen (A und B), den Vergleich zwischen den Genotypen unter Isoprenalin (C), sowie die errechneten Mittelwerte bei einer Frequenz von 1 Hz (D).

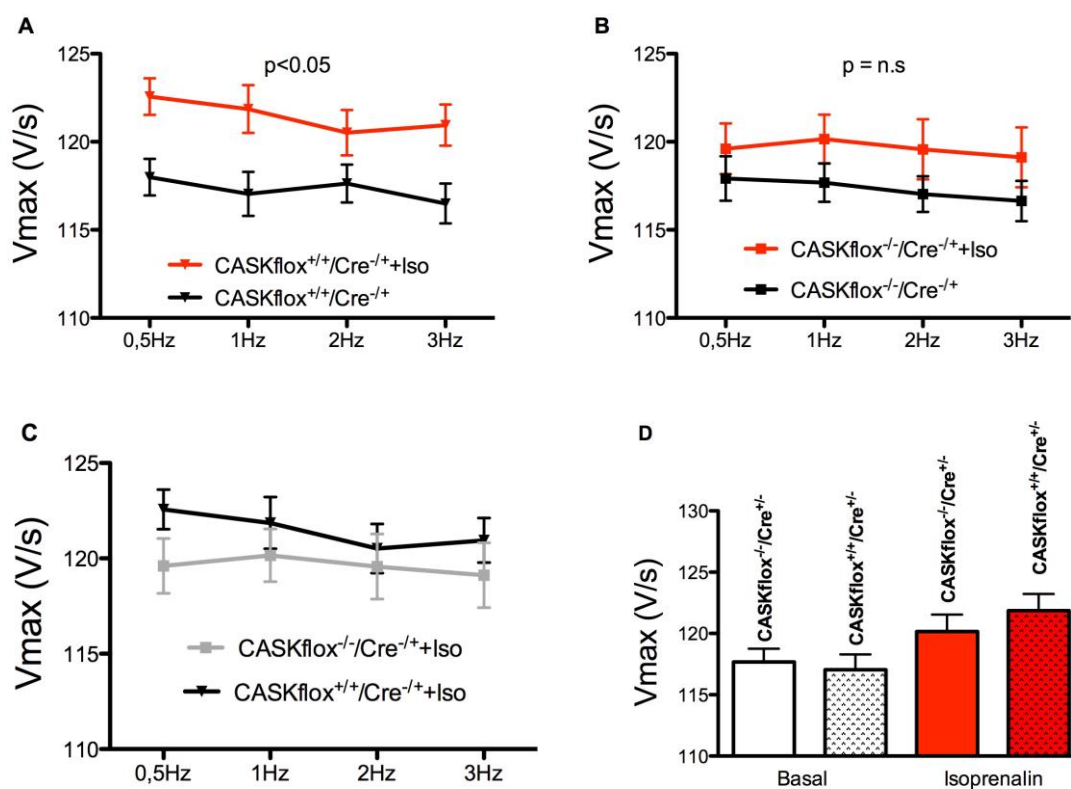


Abbildung 29 Veränderung der V_{max} unter Einwirkung von Isoprenalin in den einzelnen Genotypen (A= $CASKflox^{+/+}/Cre^{-/-}$, B= $CASKflox^{-/-}/Cre^{-/-}$) und der Vergleich der Isoprenalin-Daten (C). Abbildung D veranschaulicht die Mittelwerte der V_{max} bei einer Frequenz von 1 Hz unter Isoprenalin.

3.3.3 Nachdepolarisationen

Die Auszählung der Nachdepolarisationen ergab unter basalen Messbedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Sowohl frühe Nachdepolarisationen (EADs) als auch späte Nachdepolarisationen (DADs) traten nur in einem sehr geringen Prozentsatz der Zellen oder gar nicht auf. Unter der Einwirkung von Isoprenalin kam es zu einem vermehrten Auftreten von EADs und DADs. **Abbildung 30** zeigt jeweils eine repräsentative Originalabbildung eines EADs und eines DADs und den Vergleich zwischen basalen Messbedingungen und der Einwirkung von Isoprenalin.

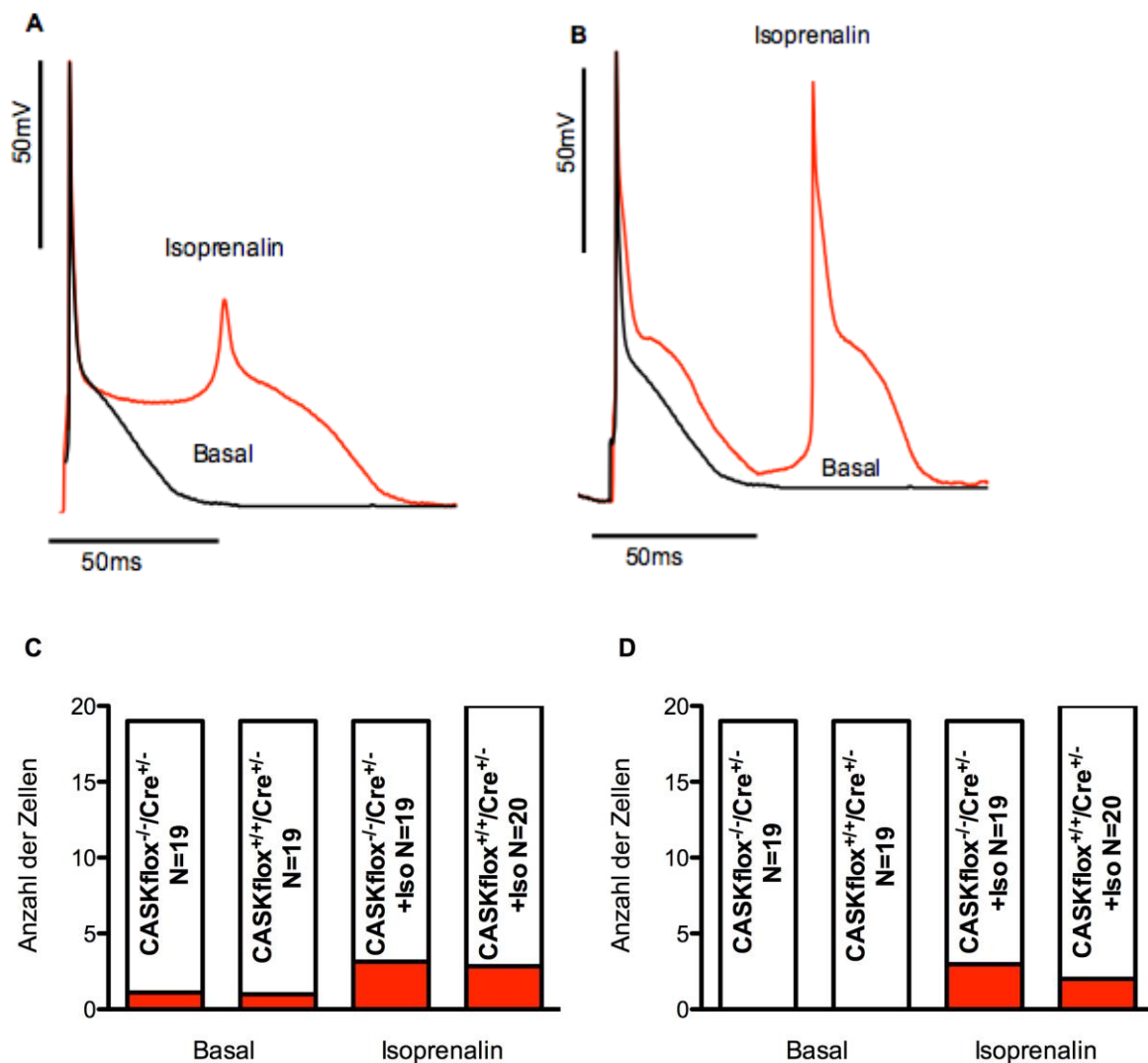


Abbildung 30 Originalabbildung eines EADs (A) und eines DADs (B). C und D zeigen den Anteil an Zellen (rot), in denen EADs (C) bzw. DADs (D) unter basalen Messbedingungen und unter Isoprenalin auftraten.

Es ist zu erkennen, dass es unter Isoprenalin zu einem signifikant höheren Auftreten von frühen Nachdepolarisationen in der Cre-Kontrollgruppe und der Knock-Outgruppe kommt. Außerdem kam es unter Isoprenalin zu einem deutlichen Anstieg der auftretenden späten Nachdepolarisationen, wobei hier die Kontrollgruppe mit 15,7% den höheren Anteil an Zellen mit DADs aufwies. In der Knock-Out-Gruppe traten DADs in 10% der Zellen auf.

	Knock-Out	Kontrolle	Knock-Out+Iso	Kontrolle+Iso
Ruhemembranpotential	-77.19 ± 2.13 mV	-75.64 ± 1.55 mV	-78.94 ± 2.21 mV	$-77,57 \pm 1.95$ mV
Vmax	117.04 ± 1.25 V/s	117.67 ± 1.08 V/s	121.86 ± 1.36 V/s	120.16 ± 1.38 V/s
Amplitude	125.5 ± 1.69 mV	127.1 ± 0.97 mV	128.1 ± 1.45 mV	124.8 ± 1.21 mV
APD _{30%}	11.01 ± 0.86 ms	9.4 ± 0.68 ms	11.29 ± 1.2 ms	8.95 ± 0.75 ms
APD _{50%}	15.25 ± 1.59 ms	13.04 ± 1.3 ms	17.9 ± 2.29 ms	14.24 ± 1.32 ms
APD _{80%}	60.32 ± 7.23 ms	55.46 ± 7.25 ms	80.91 ± 3.74 ms	85.05 ± 4.37 ms
APD _{90%}	76.99 ± 7.05 ms	83.46 ± 8.2 ms	101.3 ± 3.55 ms	107.0 ± 4.54 ms

Tabelle 5 Tabellarische Auflistung der erhobenen Mittelwerte \pm S.E.M bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz unter basalen Messbedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalin.

4 Diskussion

Um eine Aussage über die Auswirkungen eines CASK-Knock-Outs auf die Elektrophysiologie im Herzen und eine mögliche Verbindung zur CaMKII treffen zu können, wurden in dieser Arbeit späte Natriumströme und Aktionspotentiale mittels Patch-Clamp-Technik in Herzmuskelzellen von CASK-Knock-Out-Mäusen und einer Kontrollgruppe gemessen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen eines herzspezifischen CASK-Knock-Out bereits unter basalen Messbedingungen zu einem signifikant höheren späten Natriumeinstrom kommt. Dies war auch in den Messungen des späten Natriumeinstroms unter Stimulation der CaMKII-Aktivität mittels hoher, intrazellulärer Kalziumkonzentration der Fall.

Unter basalen Messbedingungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Aktionspotentialmorphologie. So waren sowohl die Aktionspotentialdauer (APD_{30%}, APD_{50%} und APD_{80%}), die maximale Aufstrichgeschwindigkeit (V_{max}), als auch das gemessene Ruhemembranpotential in beiden Messgruppen vergleichbar. Zudem zeigte sich unter basalen Bedingungen kein Unterschied im Auftreten von frühen und späten Nachdepolarisationen (EADs und DADs). Unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin konnte eine verlängerte frühe Repolarisation des Aktionspotentials in der Knock-Out-Gruppe (APD_{30%} und APD_{50%}) beobachtet werden. Zudem kam es sowohl in der Knock-Out-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg von EADs und DADs, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse noch einmal im Einzelnen betrachtet und diskutiert werden.

4.1 Einfluss eines CASK-Knock-Outs auf die Herz- und Zellgröße und die Überlebenszeit

Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, führt eine Überexpression der CaMKII zu Hypertrophie und die CaMKII ist ihrerseits in hypertrophen Herzen überexprimiert (80). Um mögliche Hypertrophie-Effekte eines CASK-Knock-Outs mit folgender CaMKII-Aktivierung auf den Phänotyp zu evaluieren, wurde das Verhalten der Mäuse beobachtet, die Herz- und Körpergewichte der Mäuse gemessen und das Verhältnis

von Herz- zu Körpergewicht bestimmt. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede im Verhalten oder Nahrungsaufnahme zwischen Knock-Out- und Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe hatte jedoch ein signifikant höheres Herz- und Körpergewicht, wobei es keinen signifikanten Unterschied im HG/KG-Verhältnis zwischen den beiden Gruppen gab.

ATASOY et al. haben bereits eine signifikante Reduktion des Herz- und Körpergewichts in Flox-Knock-In-Mäusen beschrieben (99). Es ist demnach davon auszugehen, dass der Flox-Knock-In in der CASK-Knock-Out-Gruppe für die Reduktion des Körper- und Herzgewichts verantwortlich ist. Da sich das Herzgewicht in der Knock-Out-Gruppe proportional zum Körpergewicht änderte, gibt es keinen Hinweis auf einen möglichen Hypertrophie-Effekt des CASK-Knock-Out.

Auf zellulärer Ebene wurde die Membrankapazität als indirektes Maß für die Zellgröße bestimmt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Knock-Out-Gruppe und Kontrollgruppe. Hierbei ist einschränkend zu erwähnen, dass beim Ausschuchen der Zellen während der Patch-Clamp-Messungen darauf geachtet wurde, Zellen vergleichbarer Größe zu messen. Die Auswertung der Membrankapazität der gemessenen Zellen stellt also keinen repräsentativen Querschnitt aller Herzzellen in den Genotypen dar, sondern dient vielmehr dazu, vergleichbare Messergebnisse zu erzielen.

4.2 Auswirkungen eines CASK-Knock-Outs auf den späten Natriumstrom

Wie bereits in Kap. 1.7.4 beschrieben, besteht ein klarer Zusammenhang zwischen CaMKII-Aktivität und der Ausprägung des späten Natriumstroms (33,89). Dieser ist in verschiedenen pathologischen Zuständen des Herzens vergrößert und beeinflusst die Aktionspotentialdauer sowie den Natriumhaushalt der Zelle. Um eine Aussage über eine mögliche Auswirkung der CASK auf den späten Natriumstrom machen zu können, wurden in dieser Arbeit späte Natriumströme unter basalen Bedingungen, unter der Einwirkung von Isoprenalin und bei hoher, intrazellulärer Kalziumkonzentration gemessen. Interessanterweise zeigte sich bereits in den Messungen unter basalen Bedingungen ein signifikant erhöhter später Natriumstrom in der Knock-Out-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies ist ein klares Indiz dafür, dass CASK einen regulierenden Einfluss auf den späten Natriumstrom hat.

Eichel et. al konnten bereits zeigen, dass CASK direkt mit dem Nav1.5 interagiert. Zudem scheint CASK nur an der lateralen Membran der Kardiomyozyten (LM) mit

Nav1.5 zu interagieren, jedoch nicht an den Glanzstreifen, und dort einen repressiven Effekt auf die Oberflächenexprimierung des Nav1.5 zu haben. So wurde gezeigt, dass ein CASK-Knock-Out zu einem erhöhten Natriumeinstrom durch erhöhte Nav1.5-Exprimierung an der LM führt (107). Diese Beobachtung könnte Grund für den bereits unter basalen Bedingungen erhöhten späten Natriumeinstrom, als simultane Erhöhung, bei ebenfalls erhöhtem Gesamt-Natriumeinstrom, sein. Eine zweite Möglichkeit ist ein erhöhter später Natriumeinstrom aufgrund einer erhöhten CaMKII-Aktivität (s. Kapitel 1.8.5).

Unter der Einwirkung von Isoprenalin kam es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Steigerung des späten Natriumstroms. Dies deckt sich mit früheren Publikationen (114,115).

Überraschenderweise gab es dabei aber keinen signifikanten Unterschied zwischen Knock-Out- und Kontrollgruppe. Der unter basalen Bedingungen erhöhte späte Natriumstrom in der Knock-Out-Gruppe scheint sich durch β -adrenerge Stimulation nicht im gleichen Ausmaß zu verstärken, wie in der Kontrollgruppe. Dies lässt zunächst vermuten, dass unter Isoprenalin-Einwirkung nicht die Interaktion zwischen CASK und CaMKII für die Ausprägung des späten Natriumstroms verantwortlich ist, da ein CASK-Knock-Out in diesem Fall mit einem noch deutlicher erhöhten $I_{Na,Late}$ einhergehen müsste. Wang et al. konnten bereits zeigen, dass die β -adrenergen Effekte der CaMKII vor allem bei einer relativ langen β -adrenergen Stimulation (über 24h) entscheidend sind und eine CaMKII-Inhibition nur wenig Auswirkungen auf β -adrenerge Effekte bei kurzzeitiger Stimulation hat. Vielmehr scheint bei akuter β -adrenerger Stimulation der cAMP/PKA-Signalweg unabhängig von der CaMKII entscheidend zu sein (116). Dies könnte erklären, warum unter Isoprenalin-Einwirkung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden konnte. Ein hauptsächlich über cAMP/PKA vermittelter erhöhter später Natriumeinstrom mit nachrangiger Beteiligung der CaMKII könnte die unter basalen Bedingungen gemessenen CASK-Knock-Out-Effekte verschleiern.

Eine weitere Erklärung für den fehlenden Unterschied bei β -adrenerger Stimulation könnte die in Kap. 1.9 beschriebene Interaktion zwischen PKA und CASK sein. Bislang konnten zwei Phosphorylierungsstellen von PKA an CASK beschrieben werden (101), wobei vor allem die Phosphorylierung an Thr724 zu einer erhöhten nukleären Funktion von CASK zu führen scheint. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass PKA, als eher aktivierende Kinase (im Sinne einer *fight-or-flight*-Reaktion mit

Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels und Aktivierung der CaMKII), bislang unbekanntem regulatorischen Effekt auf CASK im Herzen hat und regulatorische Effekte der CASK auf die CaMKII insbesondere bei akuter β -adrenerger Stimulation vermindert.

Um eine selektive CaMKII-Aktivierung ohne zeitgleiche PKA-Aktivierung zu erreichen, wurden zusätzlich späte Natriumströme bei einer hohen intrazellulären Kalziumkonzentration gemessen. Eine erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration führt nachweislich zu einer direkten Aktivierung der CaMKII (55). In den für diese Arbeit durchgeführten Messungen unter 500nM intrazellulärer Kalziumkonzentration konnte ein signifikant erhöhter späten Natriumstrom in beiden Gruppen festgestellt werden. Zudem kam es zu einem signifikant höheren Anstieg des späten Natriumstroms in der CASK-Knock-Out-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Dies erhärtet den Verdacht, dass die CASK einen regulierenden Effekt auf einen erhöhten späten Natriumstrom im Rahmen einer CaMKII-Aktivierung hat.

Aufgrund seiner Auswirkung auf das $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnis beeinflusst ein erhöhter $I_{\text{Na,late}}$ die Repolarisationseigenschaften der Herzzelle und damit die Aktionspotentialmorphologie (119). Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine Blockade des $I_{\text{Na,late}}$ mittels TTX zu einer signifikanten Aktionspotentialverkürzung führt und das Auftreten früher Nachdepolarisationen verhindert (120). Andersherum scheint ein erhöhter $I_{\text{Na,late}}$ mit einer erhöhten Beat-to-Beat-Variabilität und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von EADs einherzugehen (46).

Folgend sollen daher die Messergebnisse der Aktionspotentiale unter basalen Bedingungen sowie unter Isoprenalin-Einwirkung diskutiert und ein möglicher Zusammenhang zum erhöhten späten Natriumeinstrom erörtert werden.

4.3 Effekte eines CASK-Knock-Outs auf die Aktionspotentialmorphologie

Die Messung der Aktionspotentiale ergab unter basalen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in den Repolarisationszeiten oder der V_{max} zwischen der Knock-Out-Gruppe und der Kontrollgruppe. Eine Überexpression bzw. erhöhte Aktivität der CaMKII ist mit einer verlängerten Repolarisationszeit und darüber mit einem vermehrten Auftreten von Arrhythmien vergesellschaftet (80). Als Gründe hierfür werden zum einen die Auswirkung der CaMKII auf den NCX (89), zum anderen die Interaktion mit dem sarkolemmalen Natriumkanal in Betracht gezogen

(33). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine chronische CaMKII-Inhibition mit einer verkürzten APD infolge eines erhöhten I_{to} einhergeht (121). Eine verminderte Hemmung der CaMKII infolge eines CASK-Knock-Outs könnte somit über oben genannte Mechanismen ebenfalls zu einer Verlängerung der Repolarisationszeit und zu einem vermehrten Auftreten von DADs und EADs führen. Dass dies unter basalen Messbedingungen nicht der Fall war, ist vorerst nicht unbedingt verwunderlich, da die oben angesprochene, durch eine erhöhte CaMKII-Aktivität hervorgerufene Aktionspotentialverlängerung bisher nur in Überexpressions- und Herzinsuffizienzmodellen beobachtet wurde und die CaMKII unter Ruhebedingungen bzw. im gesunden Herzen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint (81). Die bereits unter basalen Messbedingungen beobachtete Erhöhung des späten Natriumeinstroms in der Knock-Out-Gruppe scheint hier nicht ausgeprägt genug zu sein, um zu einer signifikanten Veränderung in der Repolarisationszeit zu führen.

Um den Effekt eines CASK-Knock-Outs auf die Aktionspotentialmorphologie unter Aktivierung der CaMKII zu untersuchen, wurden ebenfalls Messungen mit Isoprenalin durchgeführt. Hierbei kam es zu einer signifikanten Verlängerung der Aktionspotentiale in beiden Gruppen und darüber hinaus zu einer deutlich verlängerten $APD_{30\%}$ und $APD_{50\%}$ in der Knock-Out-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, was eine Auswirkung des CASK-Knock-Out auf die repolarisationsrelevanten Ionenströme, insbesondere des I_{CaL} und des I_{Na} bzw. $I_{Na,late}$ nahelegt. Überraschenderweise traf dies jedoch nur auf die frühe Repolarisation zu. So zeigten die $APD_{80\%}$ und $APD_{90\%}$ keinen klaren Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Für diese Beobachtung gibt es mehrere mögliche Erklärungen.

Isoprenalin führt wie in Kap. 1.7.2 beschrieben über eine β -adrenerge Stimulation zu einer Aktivierung der CaMKII, welche direkten Einfluss auf die Aktionspotentialbestimmenden Ionenströme durch Phosphorylierung verschiedener Schlüsselproteine hat. So führt eine Überexpression von CaMKII zu einem erhöhten I_{Ca} und I_{Na} . Außerdem reguliert die CaMKII KCNQ1 während chronischer β -adrenerger Stimulation und inhibiert so I_{Ks} (77). WAGNER et al. konnten zeigen, dass eine CaMKII-Überexpression zu einer Reduktion von I_{ToFast} und einer Erhöhung von I_{ToSlow} führt (122). Folglich kommt es durch eine CaMKII-Aktivierung bzw. Überexpression zu einer Verlängerung des Aktionspotentials und somit auch zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von EADs (123). Wie bereits beschrieben, ist die β -adrenerge Stimulation durch Isoprenalin jedoch PKA-vermittelt.

Die Aktivierung der PKA führt ihrerseits zu einer Modulation der Ionenströme durch Phosphorylierung verschiedener Schlüsselproteine des Zellstoffwechsels. XIE et al. konnten eine Vorübergehende Verlängerung der APD durch eine Erhöhung des I_{Ca} mit nachfolgender Verminderung der APD durch einen erhöhten I_{Ks} feststellen. Zudem scheint die PKA zusätzlich über eine Phosphorylierung von PLM und einen erhöhten I_{NaK} die APD weiter zu reduzieren (114). PRIORI und CORR beschrieben in ihrer Arbeit eine Verlängerung der APD unter 1-10 nM ISO-Konzentration, während sie unter 100 nM bis 1 mM Konzentration eine Verkürzung der APD beobachteten (124). Hierbei ist einschränkend zu erwähnen, dass es sich dabei nicht um Mäuse-, sondern um Kaninchenherzmuskelzellen handelte. Es ist mittlerweile bekannt, dass es klare Unterschiede in der Aktionspotentialmorphologie und der Gewichtung einzelner Ionen Ströme zwischen den einzelnen Spezies gibt und ein direkter Vergleich daher schwierig ist (13).

Es ist vorstellbar, dass die durch Isoprenalin hervorgerufene erhöhte CaMKII- und PKA-Aktivität zunächst über einen erhöhten I_{Ca} und einen verminderten $I_{To,fast}$ zu einer Verlängerung der frühen Repolarisationszeit führt und dass dieser Effekt durch ein CASK-Knock-Out und einer damit einhergehenden fehlenden CaMKII-Regulierung verstärkt wird. Gleichzeitig scheint dieser Effekt in der späten Repolarisationsphase nicht mehr zu bestehen. Dies könnte mit den oben beschriebenen Einflüssen der PKA auf den I_{Ks} und den I_{NaK} zusammenhängen, welche eine weitere AP-Prolongierung verhindern.

An dieser Stelle ist außerdem anzumerken, dass die späten Repolarisationszeiten, insbesondere die $APD_{80\%}$, innerhalb der Gruppen teilweise stark schwankten, ohne dass dies auf objektive Parameter wie applizierter Strom, Ruhemembranpotential oder Zellgröße zurückzuführen war. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei der Zellisolation das gesamte Mäuseherz perfundiert wurde. Folglich waren Herzmuskelzellen aus allen Teilen und Wandschichten des Herzens vertreten. Eine elektrophysiologische Heterogenität in ventrikulären Herzmuskelzellen wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben, wobei es sowohl klare Unterschiede zwischen Zellen aus Epi-, Myo- und Endokard (125), als auch zwischen basalen und apikalen Zellen einer Wandschicht gibt (126). Diese Heterogenität der Zellen könnte zu einem Verfälschen der Messergebnisse beigetragen und mögliche CASK-Knock-Out-Effekte auf die späte Repolarisation verschleiern haben.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass aufgrund der vielschichtigen Interaktion zwischen CASK, CaMKII und PKA eine klare Aussage über die Ursache für die verlängerte frühen Repolarisationszeit in der Knock-Out-Gruppe bei gleichbleibender später Repolarisationszeit schwierig ist. Zieht man in Betracht, dass die in dieser Arbeit gemessenen späten Natriumströme keinen signifikanten Unterschied unter ISO-Einwirkung zeigten, ist davon auszugehen, dass $I_{Na,Late}$ zumindest unter β -adrenerger Stimulation in gesunden Herzmuskelzellen nicht der entscheidende Faktor für die beobachtete Verlängerung der frühen Repolarisation ist. Vielmehr ist anzunehmen, dass die durch die CaMKII und PKA beeinflussten Calcium- und Kalium-Ströme hier maßgeblich sind.

Die Auszählung der auftretenden Nachdepolarisationen lieferte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Knock-Out-Gruppe und der Kontrollgruppe. Während unter basalen Messbedingungen nur sehr vereinzelt Nachdepolarisationen auftraten, kam es unter Isoprenalin zu einem signifikanten Anstieg der Häufigkeit. Dieses Ergebnis deckt sich mit Daten anderer Arbeiten mit Isoprenalin. Die β -adrenerge Stimulation durch Isoprenalin führt zu einem über eine I_{CaL} -Faszilitation zu einem verstärkten I_{NCX} , was das Auftreten von EADs begünstigt (127). Außerdem führt eine intrazelluläre Anreicherung von Ca^{2+} infolge β -adrenerger Stimulation zu einem vermehrten Auftreten von DADs (128). Viele Arbeiten konnten zudem den Zusammenhang zwischen einer erhöhten CaMKII-Aktivität und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von EADs und DADs beweisen (33,72,129). Interessanterweise konnte in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten keine erhöhte Arrhythmie-Rate im CASK-Knock-Out beobachtet werden. Dies könnte an der bereits beschriebenen Dominanz des PKA-Signalwegs im Rahmen einer akuten β -adrenergen Stimulation liegen. Erst eine chronische CaMKII-Aktivierung z.B. im Rahmen einer Herzinsuffizienz würde dann signifikante Unterschiede im CASK-Knock-Out aufgrund der größeren Gewichtung der CaMKII zeigen und hätte ggf. eine deutlichere APD-Verlängerung sowie eine erhöhte Arrhythmiewahrscheinlichkeit zur Folge.

4.4 Limitationen dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein CASK-Knock-Out in Mäuseherzzellen zu einer signifikanten Erhöhung des späten Natriumstroms führt. Wie die Messungen der späten Natriumströme unter Isoprenalin gezeigt haben,

scheint Isoprenalin als Aktivator der CaMKII zu unspezifisch zu sein, um eine klare Aussage über die Wirkung eines CASK-Knock-Out auf die CaMKII-Aktivität zu treffen. Die Messung der späten Natriumströme durch den Einsatz einer hohen intrazellulären Kalziumkonzentration konnte hingegen die unter basalen Messbedingungen erhobenen Ergebnisse, dass ein CASK-Knock-Out zu einem signifikant erhöhten späten Natriumstrom führt, bestätigen und legt zudem den Verdacht nahe, dass die CASK einen regulatorischen Effekt auf die CaMKII hat. Es wäre nun von Vorteil, wenn eine spezifische CaMKII-Stimulation durch hohe Kalziumkonzentrationen auch bei der Aktionspotentialmessung zum Einsatz kommen könnte. Dies ist jedoch aufgrund der Tatsache, dass eine Manipulation der intrazellulären Ionenzusammensetzung zu einer extremen Veränderung der Aktionspotentialmorphologie führt und damit die Messergebnisse deutlich verfälschen würde, nicht möglich. Hier wäre eine neue Versuchsreihe in einem Herzinsuffizienzmodell mit erhöhter CaMKII-Aktivität und herabgesetzter PKA-Aktivität sinnvoll.

Hinsichtlich der oben beschriebenen transmuralen Heterogenität der untersuchten Zellen und der möglichen Auswirkungen auf die Aktionspotentialdauer wäre außerdem eine gewebespezifischere Untersuchung von Vorteil. Dies ist aufgrund der Größe der Mäuseherzen und der Komplexität der Datengewinnung mittels Patch-Clamp-Technik im Rahmen dieser Arbeit nur schwer umsetzbar. Um eine Unterscheidung zwischen einzelnen Zelltypen zu realisieren, wäre ein sehr viel längerer Messzeitraum mit einer höheren Anzahl durchgeführter Messungen nötig.

4.5 Ausblick

Die Rolle der CASK im Herzen, insbesondere in Bezug auf eine mögliche Interaktion mit der CaMKII und einer daraus resultierenden Funktion in der Entwicklung der Herzinsuffizienz, ist aktuell noch in weiten Teilen unbekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit angestellten Patch-Clamp-Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die CASK einen wichtigen Einfluss auf den Natriumhaushalt der Herzzellen hat und dies möglicherweise über die Interaktion mit der CaMKII stattfindet. Zeitgleiche Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigen zudem, dass ein CASK-Knock-Out weitreichende Auswirkungen auf den Kalziumstoffwechsel der Herzzelle hat und zudem vermehrt im insuffizienten Myokard des Menschen gebildet wird. Außerdem

konnten Untersuchungen mittels Co-Immunopräzipitation eine Interaktion zwischen CASK und CaMKII und CASK und dem sarkolemmalen Natriumkanal (Nav1.5) nachweisen (die Ergebnisse wurden erstmals im Rahmen des ESC 2015 in London vorgestellt und sind bislang nicht publiziert) (Mustroph et al. 2015, ESC Abstract). Hinsichtlich der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wäre der nächste Schritt eine Wiederholung derselben unter pathologischen Bedingungen, wie sie zum Beispiel nach TAC-Operation der Fall sind. Es ist bereits bekannt, dass es in TAC-operierten Mäuseherzen zu einer deutlichen CaMKII-Aktivitätssteigerung kommt (130). Eine Versuchsreihe, die TAC-operierte CASK-Knock-Out-Mäuse mit einer TAC-operierten Kontrollgruppe vergleicht, könnte deshalb weiteren Einblick in die Relevanz der CASK unter pathologischen Bedingungen und im Rahmen einer CaMKII-Aktivitätssteigerung liefern. Eine andere Möglichkeit wäre die Züchtung einer Mauslinie, die CaMKII überexprimiert und in der zusätzlich ein CASK-Knock-Out herbeigeführt wird. Dieser Ansatz wäre insbesondere in Hinblick auf die Fragestellung, ob die CASK hauptsächlich über eine CaMKII-Interaktion in den Stoffwechsel der Zelle eingreift, noch spezifischer als der zuvor genannte Ansatz mit voroperierten TAC-Mäusen.

Außerdem sollte die direkte Interaktion zwischen CASK und dem sarkolemmalen Natriumkanal (Nav1.5) genauer betrachtet werden, um zwischen CASK-Effekten über eine CaMKII-Regulierung und direkten CASK-Effekten unterscheiden zu können. Hier wäre eine Wiederholung der durchgeführten Experimente unter Einsatz des CaMKII-Inhibitors AIP hilfreich. Eine andere Möglichkeit wäre die Züchtung einer Mauslinie mit simultanem CaMKII- und CASK-Knock-Out mit einer reinen CASK-Knock-Out-Linie als Kontrollgruppe.

4.6 CASK als möglicher therapeutischer Ansatz

Die Relevanz des späten Natriumstroms in der Pathologie der Herzinsuffizienz ist gut erforscht und mit Ranolazin existiert mittlerweile auch schon ein spezifischer Inhibitor des späten Natriumstroms, der bei der Herzinsuffizienzbehandlung zum Einsatz kommt. Die CASK scheint ihrerseits einen regulierenden Effekt auf den späten Natriumstrom zu haben und wäre somit ein weiterer möglicher Ansatzpunkt in der Herzinsuffizienztherapie. Durch eine Hochregulierung der CASK-Aktivität könnte eine Aktivitätssteigerung der CaMKII und die Erhöhung des späten Natriumstroms im Rahmen der Herzinsuffizienz eingeschränkt und so die im Einleitungsteil

beschriebenen pathologischen Prozesse frühzeitig unterbunden werden. Eine 2014 publizierte Arbeit konnte zeigen, dass das Diabetes-Medikament Exendin-4 über Stimulation des Glucagon-like Peptide-1 Rezeptors zu einer erhöhten Expression von CASK führt (131). Berücksichtigt man die Tatsache, dass Exenatide als Medikament bereits klinische Anwendung findet und zudem ein Patientenkollektiv betrifft, das ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufweist, wäre eine zusätzliche kardioprotektive Wirkung durch CASK-Stimulation von großer klinischer Relevanz. Interessanterweise wurde Exenatide bereits mit gewissen kardioprotektiven Eigenschaften in Zusammenhang gebracht. So scheint eine akute Exenatide-Exposition einen positiven Effekt auf die Hämodynamik bei Herzinsuffizienz von Typ 2 Diabetikern zu haben (132) und Myokardschäden im Rahmen einer Infarzierung zu vermindern (133). Eine längere Exenatide-Behandlung nach Herzinfarkt scheint sich außerdem positiv auf Infarktgröße und Outcome auszuwirken (134). Die genauen Prozesse hinter diesen Eigenschaften sind weitgehend unbekannt, jedoch könnte CASK mit ihrer Verbindung zur CaMKII-Aktivität einen Ansatzpunkt liefern.

5 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen vermuten, dass die CASK eine wichtige modulierende Funktion in der Homöostase der Herzmuskelzelle einnimmt und dies u.a. durch Einwirkung auf die CaMKII tut. Während ihr Einfluss auf die Aktionspotentialmorphologie nicht eindeutig charakterisiert werden konnte, verdeutlichen die erhobenen Daten, dass die CASK einen Effekt auf den späten Natriumstrom und damit auf den Ionenhaushalt der Herzmuskelzelle hat. Dies könnte insbesondere unter pathologischen Bedingungen, wie sie bei der Herzinsuffizienz auftreten, von großer Bedeutung sein. Weiterführende Experimente sind nötig, um die genauen Auswirkungen der CASK im Myokard zu eruieren. Die CaMKII ist an vielen pathologischen Prozessen im geschädigten Myokard beteiligt und der modulierende Charakter der CASK in diesem Zusammenhang könnte in Zukunft einen vielversprechenden Therapieansatz liefern.

6 Literaturverzeichnis

1. Sjostrand FS, Andersson-Cedergren E, Dewey MM. The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *J Ultrastruct Res.* April 1958;1(3):271–87.
2. Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.* Springer Science & Business Media; 2001. 468 S.
3. Hanson J, Huxley HE. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature.* 19. September 1953;172(4377):530–2.
4. Huxley HE. The contractile structure of cardiac and skeletal muscle. *Circulation.* August 1961;24:328–35.
5. Welsch U. *Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; 15 Tabellen.* Elsevier, Urban&FischerVerlag; 2005. 280 S.
6. Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I. EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J SCJ.* April 2005;39(1–2):13–23.
7. Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol.* 1979;41:473–84.
8. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:23–49.
9. Kramer K, van Acker SA, Voss HP, Grimbergen JA, van der Vijgh WJ, Bast A. Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. *J Pharmacol Toxicol Methods.* Dezember 1993;30(4):209–15.
10. Anumonwo JM, Tallini YN, Vetter FJ, Jalife J. Action potential characteristics and arrhythmogenic properties of the cardiac conduction system of the murine heart. *Circ Res.* 17. August 2001;89(4):329–35.
11. Knollmann BC, Schober T, Petersen AO, Sirenko SG, Franz MR. Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Januar 2007;292(1):H614-621.
12. Zhou J, Kodirov S, Murata M, Buckett PD, Nerbonne JM, Koren G. Regional upregulation of Kv2.1-encoded current, IK_{slow2}, in Kv1DN mice is abolished by crossbreeding with Kv2DN mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Februar 2003;284(2):H491-500.
13. Nerbonne JM. Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc Med.* April 2004;14(3):83–93.
14. Ringer S. Further Observations regarding the antagonism between Calcium Salts and Sodium Potassium and Ammonium Salts. *J Physiol.* 16. November 1895;18(5–6):425–9.

15. Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 29. Oktober 1993;262(5134):740–4.
16. Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science*. 20. Juni 1969;164(3886):1356–65.
17. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R. *Physiologie*. Elsevier, Urban&FischerVerlag; 2008. 936 S.
18. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*. 15. April 1994;476(2):279–93.
19. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 10. Januar 2002;415(6868):198–205.
20. Pieske B, Maier LS, Piacentino V, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S. Rate Dependence of $[Na^+]_i$ and Contractility in Nonfailing and Failing Human Myocardium. *Circulation*. 23. Juli 2002;106(4):447–53.
21. Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, u. a. Alterations in Intracellular Calcium Handling Associated With the Inverse Force-Frequency Relation in Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 9. Januar 1995;92(5):1169–78.
22. Baartscheer A. Chronic inhibition of Na^+/H^+ -exchanger in the heart. *Curr Vasc Pharmacol*. Januar 2006;4(1):23–9.
23. Pogwizd SM, Bers DM. Calcium Cycling in Heart Failure: The Arrhythmia Connection. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1. Januar 2002;13(1):88–91.
24. Catterall WA. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev*. 1. Oktober 1992;72(suppl_4):S15–48.
25. Kass RS. Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain. *J Cardiovasc Electrophysiol*. Mai 2006;17 Suppl 1:S21–5.
26. Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol*. 1. Mai 1998;508 (Pt 3):647–57.
27. Rohl CA, Boeckman FA, Baker C, Scheuer T, Catterall WA, Klevit RE. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry*. 19. Januar 1999;38(3):855–61.
28. Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*. 24. August 1995;376(6542):683–5.
29. Makita N, Bennett PB, George AL. Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na^+ channels. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15. November 1996;16(22):7117–27.

30. Frohnwieser B, Chen LQ, Schreibmayer W, Kallen RG. Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J Physiol*. 15. Januar 1997;498 (Pt 2):309–18.
31. Qu Y, Rogers JC, Tanada TN, Catterall WA, Scheuer T. Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na⁺ channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C. *J Gen Physiol*. November 1996;108(5):375–9.
32. Tan HL, Kupershmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AAM, u. a. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature*. 24. Januar 2002;415(6870):442–7.
33. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, u. a. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest*. 1. Dezember 2006;116(12):3127–38.
34. Gao G, Xie A, Zhang J, Herman AM, Jeong E-M, Gu L, u. a. Unfolded protein response regulates cardiac sodium current in systolic human heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. Oktober 2013;6(5):1018–24.
35. Lipkind GM, Fozzard HA. A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na⁺ channel. *Biophys J*. Januar 1994;66(1):1–13.
36. Balsler JR, Nuss HB, Romashko DN, Marban E, Tomaselli GF. Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol*. Mai 1996;107(5):643–58.
37. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update. *Eur Heart J*. Oktober 2013;34(39):3028–34.
38. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, u. a. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 9. Januar 1994;75(3):434–42.
39. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, u. a. Alterations of Sarcoplasmic Reticulum Proteins in Failing Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 15. August 1995;92(4):778–84.
40. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, u. a. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*. 9. Februar 1999;99(5):641–8.
41. Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM. Upregulation of Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res*. 26. November 1999;85(11):1009–19.
42. Schillinger W, Janssen PM, Emami S, Henderson SA, Ross RS, Teucher N, u. a. Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na(+)-Ca(2+) exchanger. *Circ Res*. 29. September 2000;87(7):581–7.

43. Zhao Z, Wen H, Fefelova N, Allen C, Baba A, Matsuda T, u. a. Revisiting the ionic mechanisms of early afterdepolarizations in cardiomyocytes: predominant by Ca waves or Ca currents? *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 15. April 2012;302(8):H1636–44.
44. Coraboeuf E, Deroubaix E, Coulombe A. Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. *Am J Physiol*. April 1979;236(4):H561-567.
45. Undrovinas AI, Fleidervish IA, Makielski JC. Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine. *Circ Res*. November 1992;71(5):1231–41.
46. Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur J Heart Fail*. März 2007;9(3):219–27.
47. Hasenfuss G, Maier LS. Mechanism of action of the new anti-ischemia drug ranolazine. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc*. April 2008;97(4):222–6.
48. Saint DA, Ju YK, Gage PW. A persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 1992;453:219–31.
49. Despa S, Bers DM. Na⁺ transport in the normal and failing heart - remember the balance. *J Mol Cell Cardiol*. August 2013;61:2–10.
50. Noble D, Noble PJ. Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart Br Card Soc*. Juli 2006;92 Suppl 4:iv1–5.
51. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:417–45.
52. Zhang T, Brown JH. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*. 15. August 2004;63(3):476–86.
53. Rosenberg OS, Deindl S, Sung R-J, Nairn AC, Kuriyan J. Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell*. 2. Dezember 2005;123(5):849–60.
54. Rosenberg OS, Deindl S, Comolli LR, Hoelz A, Downing KH, Nairn AC, u. a. Oligomerization states of the association domain and the holoenzyme of Ca²⁺/CaM kinase II. *FEBS J*. Februar 2006;273(4):682–94.
55. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science*. 22. Mai 1992;256(5060):1199–202.
56. Lai Y, Nairn AC, Gorelick F, Greengard P. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: identification of autophosphorylation sites responsible for generation

-
- of Ca²⁺/calmodulin-independence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. August 1987;84(16):5710–4.
57. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol*. August 2002;34(8):919–39.
 58. Koninck PD, Schulman H. Sensitivity of CaM Kinase II to the Frequency of Ca²⁺ Oscillations. *Science*. 1. September 1998;279(5348):227–30.
 59. Wu Y, Roden DM, Anderson ME. Calmodulin Kinase Inhibition Prevents Development of the Arrhythmogenic Transient Inward Current. *Circ Res*. 30. April 1999;84(8):906–12.
 60. Fischer TH, Herting J, Mason FE, Hartmann N, Watanabe S, Nikolaev VO, u. a. Late I_{Na} increases diastolic SR-Ca²⁺-leak in atrial myocardium by activating PKA and CaMKII. *Cardiovasc Res*. 1. Juli 2015;107(1):184–96.
 61. Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, u. a. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*. 2. Mai 2008;133(3):462–74.
 62. Chao LH, Pellicena P, Deindl S, Barclay LA, Schulman H, Kuriyan J. Intersubunit capture of regulatory segments is a component of cooperative CaMKII activation. *Nat Struct Mol Biol*. März 2010;17(3):264–72.
 63. Gutierrez DA, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E. NO-dependent CaMKII activation during β -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res*. 1. Dezember 2013;100(3):392–401.
 64. Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, u. a. The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 1. September 2007;583(Pt 2):685–94.
 65. Ruiz-Hurtado G, Morel E, Domínguez-Rodríguez A, Llach A, Lezoualc'h F, Benitah J-P, u. a. Epac in cardiac calcium signaling. *J Mol Cell Cardiol*. Mai 2013;58:162–71.
 66. Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, u. a. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 17. Oktober 2013;502(7471):372–6.
 67. Huke S, Bers DM. Temporal dissociation of frequency-dependent acceleration of relaxation and protein phosphorylation by CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*. März 2007;42(3):590–9.
 68. Pi HJ, Otmakhov N, Lemelin D, De Koninck P, Lisman J. Autonomous CaMKII can promote either long-term potentiation or long-term depression, depending on the state of T305/T306 phosphorylation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 30. Juni 2010;30(26):8704–9.

69. Hodge JJJ, Mullasseril P, Griffith LC. Activity-dependent gating of CaMKII autonomous activity by *Drosophila* CASK. *Neuron*. 3. August 2006;51(3):327–37.
70. Gao L, Blair LAC, Marshall J. CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 14. Juli 2006;345(4):1606–10.
71. Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H. A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun*. 26. Juli 1995;212(3):806–12.
72. 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*. 2. Mai 2003;92(8):904–11.
73. Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, u. a. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res*. 3. Februar 2006;98(2):235–44.
74. Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol*. Dezember 2000;32(12):2131–9.
75. DeSantiago J, Maier LS, Bers DM. Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol*. August 2002;34(8):975–84.
76. Mustroph J, Maier LS, Wagner S. CaMKII regulation of cardiac K channels. *Front Pharmacol*. 2014;5:20.
77. Shugg T, Johnson DE, Shao M, Lai X, Witzmann F, Cummins TR, u. a. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulation of IKs during sustained β -adrenergic receptor stimulation. *Heart Rhythm*. Juni 2018;15(6):895–904.
78. Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. Oktober 2011;51(4):468–73.
79. 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*. 1. April 1999;42(1):254–61.
80. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, u. a. The δ C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 2. Mai 2003;92(8):912–9.
81. Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, u. a. The δ isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17. Februar 2009;106(7):2342–7.

82. Koval OM, Guan X, Wu Y, Joiner M-L, Gao Z, Chen B, u. a. CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16. März 2010;107(11):4996–5000.
83. Bers DM, Grandi E. CaMKII Regulation of Cardiac Ion Channels. *J Cardiovasc Pharmacol*. September 2009;54(3):180–7.
84. Ashpole NM, Herren AW, Ginsburg KS, Brogan JD, Johnson DE, Cummins TR, u. a. Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) Regulates Cardiac Sodium Channel NaV1.5 Gating by Multiple Phosphorylation Sites. *J Biol Chem*. 8. Juni 2012;287(24):19856–69.
85. Glynn P, Musa H, Wu X, Unudurthi SD, Little S, Qian L, u. a. Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function in vivo. *Circulation*. 18. August 2015;132(7):567–77.
86. Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Saito S, Fukui A, u. a. Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. Mai 2012;52(5):1103–11.
87. Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L. Blocking Late Sodium Current Reduces Hydrogen Peroxide-Induced Arrhythmogenic Activity and Contractile Dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*. 7. Januar 2006;318(1):214–22.
88. Ward CA, Giles WR. Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 1. Mai 1997;500(Pt 3):631–42.
89. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, u. a. Reactive Oxygen Species-Activated Ca/Calmodulin Kinase II δ Is Required for Late INa Augmentation Leading to Cellular Na and Ca Overload. *Circ Res*. 3. April 2011;108(5):555–65.
90. Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of Sodium and Calcium Dysregulation in Tachyarrhythmias in Sudden Cardiac Death. *Circ Res*. 5. Juni 2015;116(12):1956–70.
91. Funke L, Dakoji S, Bredt DS. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:219–45.
92. Hata Y, Butz S, Südhof TC. CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuexins. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15. April 1996;16(8):2488–94.
93. Hoskins R, Hajnal AF, Harp SA, Kim SK. The *C. elegans* vulval induction gene *lin-2* encodes a member of the MAGUK family of cell junction proteins. *Dev Camb Engl*. Januar 1996;122(1):97–111.
94. Martin JR, Ollo R. A new *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (Caki) is localized in the central nervous system and implicated in walking speed. *EMBO J*. 15. April 1996;15(8):1865–76.

95. Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LMM, Vandenberg CA. A Multiprotein Trafficking Complex Composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 Is Associated with Inward Rectifier Kir2 Potassium Channels. *J Biol Chem*. 30. April 2004;279(18):19051–63.
96. Hsueh Y-P. The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function. *Curr Med Chem*. 2006;13(16):1915–27.
97. Hsueh YP, Wang TF, Yang FC, Sheng M. Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature*. 16. März 2000;404(6775):298–302.
98. Piluso G, D'Amico F, Saccone V, Bismuto E, Rotundo IL, Di Domenico M, u. a. A Missense Mutation in CASK Causes FG Syndrome in an Italian Family. *Am J Hum Genet*. 13. Februar 2009;84(2):162–77.
99. Atasoy D, Schoch S, Ho A, Nadasy KA, Liu X, Zhang W, u. a. Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13. Februar 2007;104(7):2525–30.
100. Lu CS, Hodge JJL, Mehren J, Sun XX, Griffith LC. Regulation of the Ca²⁺/CaM-responsive pool of CaMKII by scaffold-dependent autophosphorylation. *Neuron*. 18. Dezember 2003;40(6):1185–97.
101. Huang T-N, Chang H-P, Hsueh Y-P. CASK phosphorylation by PKA regulates the protein-protein interactions of CASK and expression of the NMDAR2b gene. *J Neurochem*. März 2010;112(6):1562–73.
102. Martinez-Estrada OM, Villa A, Breviario F, Orsenigo F, Dejana E, Bazzoni G. Association of junctional adhesion molecule with calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK/LIN-2) in human epithelial caco-2 cells. *J Biol Chem*. 23. März 2001;276(12):9291–6.
103. Fallon L, Moreau F, Croft BG, Labib N, Gu W-J, Fon EA. Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *J Biol Chem*. 4. Januar 2002;277(1):486–91.
104. Olsen O, Liu H, Wade JB, Merot J, Welling PA. Basolateral membrane expression of the Kir 2.3 channel is coordinated by PDZ interaction with Lin-7/CASK complex. *Am J Physiol Cell Physiol*. Januar 2002;282(1):C183-195.
105. Aravindan RG, Fomin VP, Naik UP, Modelski MJ, Naik MU, Galileo DS, u. a. CASK interacts with PMCA4b and JAM-A on the Mouse Sperm Flagellum to Regulate Ca²⁺ Homeostasis and Motility. *J Cell Physiol*. August 2012;227(8):3138–50.
106. Malik BR, Hodge JJL. CASK and CaMKII function in *Drosophila* memory. *Front Neurosci* [Internet]. 25. Juni 2014 [zitiert 11. November 2015];8. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4070058/>
107. Eichel CA, Beuriot A, Chevalier MYE, Rougier J-S, Louault F, Dilanian G, u. a. Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates NaV1.5 Channel

- in Cardiac Myocytes Novelty and Significance. *Circ Res.* 5. August 2016;119(4):544–56.
108. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Juli 1988;85(14):5166–70.
 109. Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J. Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem.* 25. Dezember 1991;266(36):24613–20.
 110. Heffner CS, Herbert Pratt C, Babiuk RP, Sharma Y, Rockwood SF, Donahue LR, u. a. Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. *Nat Commun.* 20. November 2012;3:1218.
 111. Cole KS, Curtis HJ. ELECTRIC IMPEDANCE OF THE SQUID GIANT AXON DURING ACTIVITY. *J Gen Physiol.* 20. Mai 1939;22(5):649–70.
 112. Graham J, Gerard RW. Membrane potentials and excitation of impaled single muscle fibers. *J Cell Physiol.* August 1946;28(1):99–117.
 113. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 29. April 1976;260(5554):799–802.
 114. Xie Y, Grandi E, Puglisi JL, Sato D, Bers DM. β -Adrenergic Stimulation Activates Early Afterdepolarizations Transiently via Kinetic Mismatch of PKA targets. *J Mol Cell Cardiol.* Mai 2013;58:153–61.
 115. Dybkova N, Wagner S, Backs J, Hund TJ, Mohler PJ, Sowa T, u. a. Tubulin polymerization disrupts cardiac β -adrenergic regulation of late INa. *Cardiovasc Res.* 1. Juli 2014;103(1):168–77.
 116. Wang Wang, Zhu Weizhong, Wang Shiqiang, Yang Dongmei, Crow Michael T., Xiao Rui-Ping, u. a. Sustained β 1-Adrenergic Stimulation Modulates Cardiac Contractility by Ca²⁺/Calmodulin Kinase Signaling Pathway. *Circ Res.* 15. Oktober 2004;95(8):798–806.
 117. Lin X, Liu N, Lu J, Zhang J, Anumonwo J, Isom LL, u. a. Subcellular heterogeneity of sodium current properties in adult cardiac ventricular myocytes. *Heart Rhythm Off J Heart Rhythm Soc.* Dezember 2011;8(12):1923–30.
 118. Shy D, Gillet L, Ogrodnik J, Albesa M, Verkerk AO, Wolswinkel R, u. a. PDZ domain-binding motif regulates cardiomyocyte compartment-specific NaV1.5 channel expression and function. *Circulation.* 8. Juli 2014;130(2):147–60.
 119. Kiyosue T, Arita M. Late sodium current and its contribution to action potential configuration in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res.* Februar 1989;64(2):389–97.
 120. Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RSD, Silverman N, Lesch M, Undrovinas AI. Novel, Ultraslow Inactivating Sodium Current in Human Ventricular Cardiomyocytes. *Circulation.* 12. August 1998;98(23):2545–52.

121. Li J, Marionneau C, Zhang R, Shah V, Hell JW, Nerbonne JM, u. a. Calmodulin kinase II inhibition shortens action potential duration by upregulation of K⁺ currents. *Circ Res.* 10. November 2006;99(10):1092–9.
122. Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, u. a. Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* Juni 2009;2(3):285–94.
123. Grandi E, Herren AW. CaMKII-dependent regulation of cardiac Na⁽⁺⁾ homeostasis. *Front Pharmacol.* 2014;5:41.
124. Priori SG, Corr PB. Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *Am J Physiol.* Juni 1990;258(6 Pt 2):H1796-1805.
125. Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol.* November 2001;96(6):517–27.
126. Keller DUJ, Weiss DL, Dossel O, Seemann G. Influence of I(Ks) heterogeneities on the genesis of the T-wave: a computational evaluation. *IEEE Trans Biomed Eng.* Februar 2012;59(2):311–22.
127. Volders PG, Kulcsár A, Vos MA, Sipido KR, Wellens HJ, Lazzara R, u. a. Similarities between early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* Mai 1997;34(2):348–59.
128. Antzelevitch C, Burashnikov A. Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. *Card Electrophysiol Clin.* 1. März 2011;3(1):23–45.
129. Luo M, Anderson ME. Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure. *Circ Res.* 30. August 2013;113(6):690–708.
130. Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, u. a. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation.* 7. September 2010;122(10):993–1003.
131. Zhu Z-Q, Wang D, Xiang D, Yuan Y-X, Wang Y. Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase is involved in exendin-4-induced insulin secretion in INS-1 cells. *Metabolism.* Januar 2014;63(1):120–6.
132. Nathanson D, Ullman B, Löfström U, Hedman A, Frick M, Sjöholm A, u. a. Effects of intravenous exenatide in type 2 diabetic patients with congestive heart failure: a double-blind, randomised controlled clinical trial of efficacy and safety. *Diabetologia.* April 2012;55(4):926–35.
133. Hu G, Zhang Y, Jiang H, Hu X. Exendin-4 attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein expression. *Cardiol J.* 2013;20(6):600–4.
134. Woo JS, Kim W, Ha SJ, Kim JB, Kim S-J, Kim W-S, u. a. Cardioprotective effects of exenatide in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of exenatide

myocardial protection in revascularization study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* September 2013;33(9):2252–60.

7 Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Prof. Dr. med. Lars Maier für die Möglichkeit bedanken, in seinem Labor an der Universitätsmedizin Göttingen diese Doktorarbeit beginnen zu dürfen und große Teile der erforderlichen Experimente durchführen zu können. Als Leiter der Arbeitsgruppe in Göttingen stand er mir stets mit gutem Rat zur Seite und sorgte für ein sehr angenehmes und gleichzeitig professionelles Arbeitsklima.

Zudem möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Stefan Wagner für die ausgezeichnete Betreuung und vielseitige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, der Datenauswertung und der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin gilt mein größter Dank dem gesamten Team um Prof. Maier und Prof. Wagner für die großartige Unterstützung und die tolle Arbeitsatmosphäre. Hierbei möchte ich insbesondere Dr. med. Shamin Gupta erwähnen, der mich mit der Patch-Clamp-Technik vertraut gemacht hat und mir stets mit guten Ratschlägen zur Seite stand. Des Weiteren gilt mein Dank den technischen Assistenten Timo Schulte und Thomas Sowa, welche für die Vorbereitung der Mäuseherzzellen unentbehrlich waren und jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatten. Dies gilt auch für den Rest des Teams, welches ausnahmslos durch stetige Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Mit-Doktoranden Dr. med. Julian Muströph für die gemeinsame Zeit und gute Zusammenarbeit in Göttingen und Regensburg danken.

8 Lebenslauf

Ich, Felix Lucas Bähr, wurde am 04.04.1989 als Sohn meiner Eltern Susanne Rogge und Mathias Bähr in Meerbusch geboren. Mein Bruder Tobias Bähr kam 2 Jahre, meine Schwester Anike Bähr 5 Jahre nach mir zur Welt. Ich wuchs in Tübingen auf, wo ich von 1995 bis 2001 die Grundschule auf der Wanne und von 2001 bis 2003 das Wildermuth Gymnasium besuchte. 2003 zog ich mit meiner Familie nach Göttingen und bestand 2008 mein Abitur auf dem Felix Klein Gymnasium (Gesamtnote 1,7).

Zum Wintersemester 2008/2009 begann ich mein Studium im Fach Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Über meine Famulatur in der Abteilung Kardiologie, kam ich mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Lars Maier in Kontakt und begann 2012 meine experimentelle Doktorarbeit mit dem Thema „Auswirkungen eines herzspezifischen CASK-Knock-Outs auf Aktionspotentialmorphologie und späte Natriumströme“. Hierfür absolvierte ich im Wintersemester 2012/2013 ein Forschungssemester und führte in den darauffolgenden Semestern neben dem Studium meine wissenschaftliche Tätigkeit fort.

Im Juli 2015 bestand ich das zweite Staatsexamen (Gesamtnote 2,16) und erhielt die Approbation als Arzt.

Seit März 2016 bin ich als Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie am Campus Virchow-Klinikum der Charité in Berlin angestellt.