

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

DIE EXPRESSION UND AKTIVITÄT DER  $Ca^{2+}$ -CALMODULIN-KINASE II BEI  
PATIENTEN MIT OBSTRUKTIVEM SCHLAFAPNOESYNDROM ALS  
MOLEKULARER MECHANISMUS DER ENTSTEHUNG VON VORHOFFLIMMERN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Karoline Keller

2019



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

DIE EXPRESSION UND AKTIVITÄT DER  $Ca^{2+}$ -CALMODULIN-KINASE II BEI  
PATIENTEN MIT OBSTRUKTIVEM SCHLAFAPNOESYNDROM ALS  
MOLEKULARER MECHANISMUS DER ENTSTEHUNG VON VORHOFFLIMMERN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Karoline Keller

2019

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Wagner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Jonathan Jantsch
Tag der mündlichen Prüfung:	25.06.2020

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Das obstruktive Schlafapnoe Syndrom (OSAS).....	9
1.2 Klinischer Zusammenhang zwischen OSAS und Vorhofflimmern.....	11
1.3 Pathophysiologische Mechanismen der Entstehung von VHF.....	13
1.4 $Ca^{2+}$ und die elektromechanische Kopplung.....	16
1.5 Die Entstehung von Nachdepolarisationen und ektope Aktivität.....	17
1.6 Phospholamban als Faktor für die Entstehung eines SR $Ca^{2+}$ -Lecks.....	18
1.7 Struktur und Funktion des Ryanodinrezeptors im Rahmen der Entstehung von Arrhythmien.....	19
1.8 Struktur und Aktivierungsmechanismen der CaMKII .....	21
1.9 Arrhythmieentstehung durch erhöhte CaMKII-Aktivität .....	23
1.10 Fragestellung .....	26
2 Material und Methoden .....	27
2.1 Probengewinnung von humanem Herzvorhofgewebe .....	27
2.2 Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalysen mittels Western Blot.....	27
2.2.1 Herstellung von Gewebelysaten .....	27
2.2.2 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
2.2.3 Blotting.....	31
2.2.4 Blocken unspezifischer Bindungsstellen und Immunmarkierung.....	31
2.2.5 Detektion mittels Chemielumineszenz .....	34
2.2.6 Membran-Stripping .....	34
2.3 Histondeacetylase 4 (HDAC4) -CaMKII-Bindungsassay.....	35
2.3.1 Herstellung von Gewebelysaten .....	35
2.3.2 Vorbereitung der GST-HDAC4-Beads.....	36

	4
2.3.3	Aufbereitung der Proben..... 37
2.3.4	Western Blot und Immundetektion..... 39
2.4	Auswertung der ermittelten Immunfluoreszenzsignale ..... 40
2.4.1	Datenakquisition ..... 40
2.4.2	Statistische Methoden ..... 41
3	Darstellung der eigenen Untersuchungen..... 43
3.1	Klinische Daten der gesamten, in die Auswertung eingegangenen, Patientenkohorte..... 43
3.1.1	Verteilung des AHI im gesamten Patientenkollektiv ..... 43
3.1.2	Klinische Daten aller Patienten im Vergleich in Abhängigkeit vom Vorliegen eines OSAS ..... 44
3.2	HDAC4-CaMKII-Bindungsassay ..... 46
3.2.1	Verteilung des AHI in der Patientenkohorte, bei denen ein Bindungsassay durchgeführt wurde ..... 46
3.2.2	Klinische Daten in der Patientenkohorte, bei denen ein Bindungsassay durchgeführt wurde ..... 47
3.2.3	Die CaMKII-Aktivität in Beziehung zum AHI und im Gruppenvergleich abhängig vom Vorliegen eines OSAS..... 49
3.2.4	Regressionsanalyse klinischer Daten im Bezug zur CaMKII-Aktivität ... 50
3.2.5	PSM-Analyse der CaMKII-Aktivität in Abhängigkeit vom Vorliegen eines OSAS ..... 51
3.3	Proteinanalysen mittels Western Blot-Technik..... 53
3.3.1	Verteilung des AHI bei den Patienten, bei denen Daten mittels Western Blot-Analysen erhoben wurden ..... 53
3.3.2	Klinische Daten der Patienten, bei denen Ergebnisse mittels Western Blot-Analysen erhoben wurden..... 54
3.3.3	Statistische Analysen der CaMKII-Expression..... 56
3.3.4	Statistische Analysen der Autophosphorylierung der CaMKII an Threonin 287 ..... 59

3.3.5	Statistische Analysen der Oxidation der CaMKII an Methionin 281/282.....	63
3.3.6	Statistische Analysen der CaMKII-abhängige Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors Typ 2 an Serin 2814 .....	66
3.3.7	Statistische Analysen der CaMKII-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban an Threonin 17.....	69
4	Besprechung der Ergebnisse im Zusammenhang mit den Angaben in der Literatur.....	72
4.1	Die klinischen Charakteristika der untersuchten Studienkohorte im Vergleich.....	72
4.1.1	Vergleich der gebildeten Untergruppen .....	72
4.1.2	Charakteristika von Patienten mit OSAS in anderen Studien .....	73
4.1.3	Risikofaktoren und Zusammenhänge zwischen OSAS und Vorhofflimmern .....	74
4.2	Aktivierungsmechanismen der CaMKII bei Herzerkrankungen.....	75
4.2.1	Erhöhte CaMKII-Aktivität durch Autophosphorylierung.....	75
4.2.2	Die Aktivität der CaMKII bei Vorhofflimmern.....	75
4.2.3	Die Aktivität der CaMKII bei anderen kardialen Erkrankungen .....	76
4.2.4	CaMKII- Oxidation .....	77
4.2.5	CaMKII Aktivierung durch weitere Signale.....	78
4.3	Therapeutische Möglichkeiten für Patienten mit OSAS .....	79
4.3.1	Derzeitige Therapie des OSAS.....	79
4.3.2	Therapie des zentralen Schlafapnoesyndroms.....	79
4.3.3	Therapieausblick: CaMKII-Inhibitoren.....	81
4.3.4	Weitere mögliche Therapieansätze zur Beeinflussung der Entstehung von VHF bei Patienten mit OSAS .....	83
4.4	Diskussion der Methoden und ihrer Limitationen .....	84
4.5	Abschließende Schlussfolgerungen.....	85
5	Zusammenfassung.....	86

6	Literaturverzeichnis .....	87
7	Danksagung.....	99



## Abkürzungsverzeichnis

AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
aHTN	Arterielle Hypertonie
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body-Mass-Index
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin-Kinase II
CSAS	Zentrales Schlafapnoesyndrom
CPVT	Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie
CRP	C-reaktives Protein
DAD	Späte Nachdepolarisation, engl. delayed afterdepolarisation
ddH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DM	Diabetes mellitus
EAD	Frühe Nachdepolarisation, engl. early afterdepolarisation
EF	Ejektionsfraktion der linken Herzkammer in der Echokardiographie
FKBP12.6	12.6 kDa FK506-bindendes-Protein / calstabin2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GST	Glutathion-S-Transferase
HCl	Salzsäure
HDAC4	Histondeacetylase 4
IQR	Interquartiler Abstand, engl. interquartile range
kDa	Kilodalton
Krea	Kreatinin
LA	Linkes Atrium
NCX	Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NT-proBNP	Engl. N-terminal pro-brain natriuretic peptide
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom

OxCaMKII	Oxidierter CaMKII an Methionin 281/282
pCaMKII	Autophosphorylierter CaMKII an Threonin 287
PI	Proteaseinhibitor
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PSM	Engl. Propensity Score Matching
pS2814RyR	Phosphorylierter RyR2 an Serin2814
pT17PLB	Phosphoryliertes PLB an Threonin 17
p-Wert	Statistisches Signifikanzniveau
ROS	Radikale Sauerstoff(O <sub>2</sub> )-Spezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. revolutions per minute
RyR	Ryanodinrezeptor
RyR2	Ryanodinrezeptor Typ 2
SDB	Schlafbezogene Atemstörung, engl. sleep disordered breathing
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBS	Tris-Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
TTBS	Tris-Buffered Saline mit Tween 20
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat
VHF	Vorhofflimmern

# 1 Einleitung

## 1.1 Das obstruktive Schlafapnoe Syndrom (OSAS)

Das obstruktive Schlafapnoe Syndrom (OSAS) ist in der allgemeinen Bevölkerung weit verbreitet. Die Prävalenz schwankt in Studien je nach untersuchter Population und Diagnosekriterien zwischen 4% und 49% [1–4], wobei eine eindeutige Assoziation des OSAS mit männlichem Geschlecht, Alter und Übergewicht vorliegt [1–5].

Beim OSAS liegen wiederholte, vollständige oder teilweise Verlegungen der oberen Atemwege im Bereich des Mund-Rachen-Raums vor, die zu einer Verminderung oder Unterbrechung des Atemflusses führen (s. Abb. 1.1). Während dieser Episoden kommt es zu Hypoxie, Hyperkapnie im Blut und zu Druckschwankungen im Thorax aufgrund von Atembewegungen gegen den Widerstand des verschlossenen Atemwegs. Die Apnoe- oder Hypopnoephasen werden oft durch Aufweckreaktionen beendet [1,6].

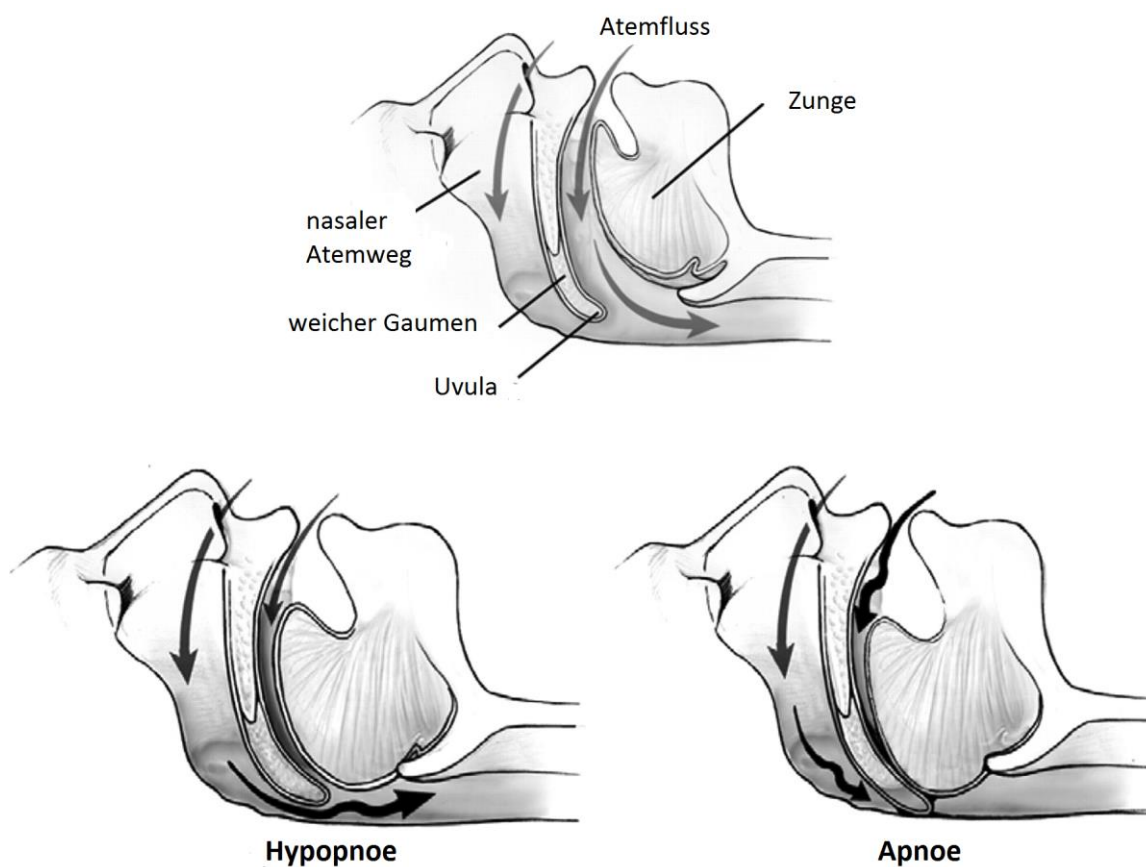


Abb. 1.1: Teilweise oder komplette Verlegung der Atemwege bei Apnoe und Hypopnoe. Modifiziert nach Hahn et al.,2007 [7].

Klinische Symptome und Hinweise auf das Vorliegen eines OSAS sind nächtliches Schnarchen, Tagesmüdigkeit, Erschöpfung, Konzentrationsschwierigkeiten und morgendlicher Kopfschmerz [1,8].

Der Goldstandard zur Diagnosestellung ist eine Polysomnographie in einem Schlaflabor. In der Praxis häufig angewandt werden mobile Screening-Geräte, die in Zusammenschau mit einer klinischen Anamnese und Untersuchung ebenfalls zu einer validen Diagnosestellung führen können. Als Mindestanforderung sollte ein solches Gerät Sensoren für die Messung des Atemflusses, der mechanischen Atemarbeit und der Sauerstoffsättigung im Blut enthalten. Hierdurch werden Apnoe- und Hypopnoe-Phasen während des Schlafes erfasst und als obstruktiv erkannt. Anhand der Messdaten wird der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) errechnet, der die durchschnittliche Anzahl der Apnoen und Hypopnoen im Schlaf pro Stunde angibt [1,9,10].

Anhand des AHI wird die Diagnose des OSAS gestellt und nach Schweregraden eingeteilt. Dies erfolgt jedoch nicht immer einheitlich und es können verschiedene Grenzwerte in der Literatur gefunden werden. In neueren Studien wird häufig ein  $AHI \geq 15$  als Kriterium für das Vorliegen eines OSAS verwendet, ein AHI zwischen 5 und 14 kann bereits als milde Form des OSAS gewertet werden [1,3,4].

Eine Bedeutung als Erkrankung bekommt das OSAS durch seine Konsequenzen für die betroffenen Patienten. Zum einen kann eine Verminderung des körperlichen und mentalen Wohlbefindens durch die schlechte Schlafqualität für Betroffene im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung festgestellt werden. Der Unterschied bleibt auch nach Berücksichtigung weiterer Faktoren wie Übergewicht, Alter, Rauchen, Alkoholgebrauch und kardiovaskuläre Erkrankungen signifikant [11,12].

Außerdem kann eine vermehrte Beteiligung von OSAS-Patienten an Verkehrsunfällen beobachtet werden. Dies wird auf die verstärkte Tagesmüdigkeit zurückgeführt [13].

Zusätzlich lässt sich eine Assoziation des OSAS mit kardiovaskulären Erkrankungen feststellen. So besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz [14], das Auftreten eines plötzlichen Herztodes während des Schlafs [15], und die Entstehung von Arrhythmien [16,17] bei Patienten mit OSAS.

Neben dem OSAS gibt es als weitere schlafbezogene Atemstörung (SDB, sleep disordered breathing) das Zentrale Schlafapnoesyndrom (CSAS). Wie der Name schon erschließen lässt, liegt die Ursache der Atempausen beim CSAS im zentralen Nervensystem. Während der Apnoephasen wird hierbei keine Atemanstrengung

gegen Widerstand beobachtet, wie es für das OSAS charakteristisch ist. Das CSAS ist bei weitem seltener als das OSAS und tritt insbesondere bei Patienten mit Herzinsuffizienz, einigen neurologischen Erkrankungen, idiopathisch und unter hohen Opiatdosen auf. Zudem werden Mischformen der SDB aus OSAS und CSAS beobachtet [18]. Das Vorliegen einer SDB hat zudem eine wichtige prognostische Bedeutung für die Herzinsuffizienz [19]. Man geht davon aus, dass sich Herzinsuffizienz und SDB gegenseitig negativ beeinflussen [19].

## **1.2 Klinischer Zusammenhang zwischen OSAS und Vorhofflimmern**

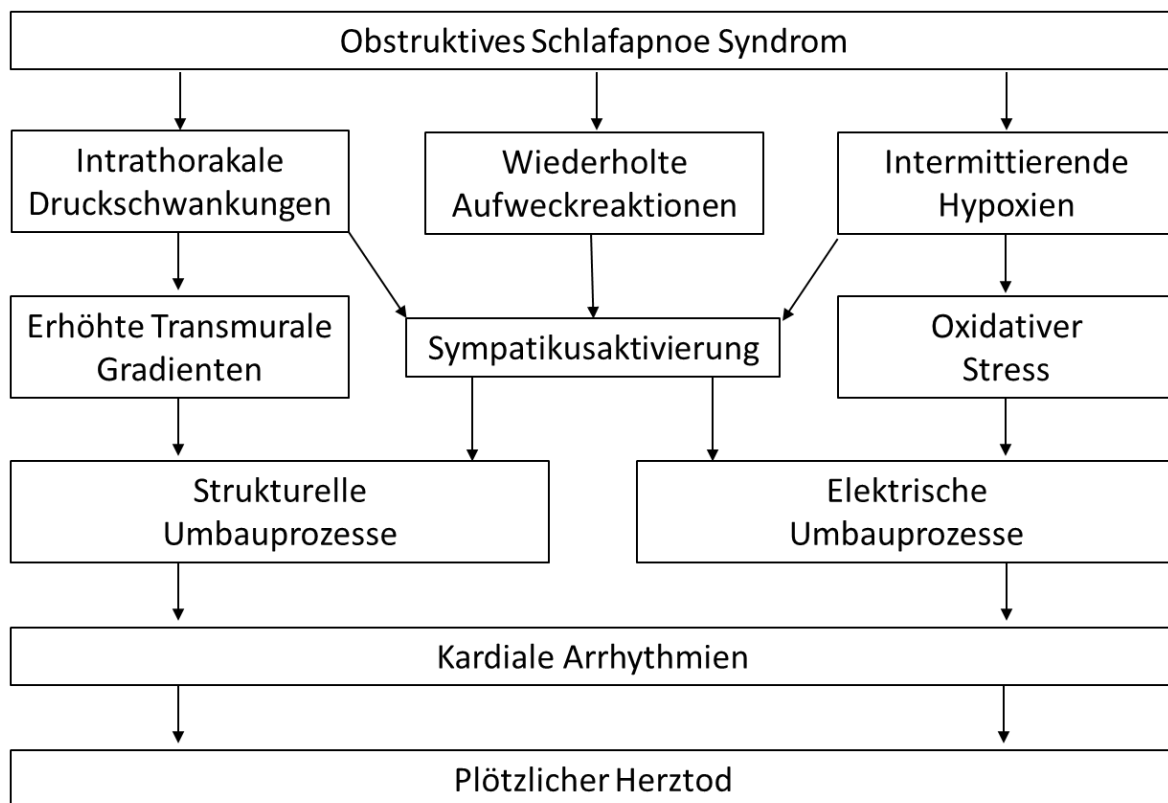
Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist die enge Assoziation des OSAS mit dem Herzvorhofflimmern (VHF). Es konnte nachgewiesen werden, dass das Vorliegen eines OSAS die Entstehung von VHF im Vergleich zu Patienten ohne OSAS begünstigt [20]. Umgekehrt wurde unter Patienten mit VHF ein erhöhter Anteil mit zusätzlichem OSAS im Vergleich zu Patienten ohne diese Herzrhythmusstörung gefunden [21,22]. Interessanterweise gibt es Hinweise, dass das OSAS negative Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf des VHF hat. So zeigte sich, dass Patienten mit OSAS nach der Therapie eines VHF durch eine Katheterablation eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Wiederauftreten des VHF besitzen als Patienten ohne OSAS, die ebenfalls diesem Verfahren unterzogen wurden [23,24].

Allerdings ist noch nicht abschließend geklärt, wie genau das OSAS zur Entstehung von VHF beiträgt. Verschiedene Mechanismen werden als Erklärung für die Assoziation zwischen dem OSAS und VHF angenommen (s. Abb. 1.2).

Remmers et al. konnten bereits 1978 zeigen, dass es während der Hypo- und Apnoephasen zu Druckdifferenzen zwischen intrathorakal und supraglottisch gemessenen Werten kommt, die durch die Atembewegungen gegen den Widerstand schwanken [6]. Bei gesunden Probanden, die mithilfe eines Müller-Manövers diese Druckverhältnisse nachstellten, kam es durch diesen plötzlichen intrathorakalen Druckabfall während der Apnoephasen zur Deformierung beider Ventrikel und Beeinträchtigung der Herzfunktion [25]. *In vitro* führt eine derartige mechanische Belastung durch Zugkräfte an atrialen Myozyten zu Veränderungen der  $Ca^{2+}$ -Transienten und vermehrter Empfindlichkeit für Repolarisierungsstörungen [26]. Eine weitere beobachtete Veränderung während der Apnoe-Hypopnoe-Phasen sind intermittierende Hypoxien. Man geht davon aus, dass der Abfall der Sauerstoffsättigung im Blut mit folgender Reoxigenierung zur Entstehung von

oxidativem Stress und verminderter antioxidativer Aktivität beiträgt [27,28]. Dabei entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die Einfluss auf die Natrium-, Kalium- und Kalzium-Ion-Homöostase nehmen und zur Veränderung von Ionenkanalaktivitäten führen und somit zur Arrhythmogenese beitragen [29–31].

Zudem wurde beobachtet, dass Patienten mit OSAS eine erhöhte Sympathikusaktivität aufweisen [32]. Diese kann zum einen auf die Aufweckreaktionen zurückgeführt werden. Zum anderen wird davon ausgegangen, dass auch die thorakalen Druckschwankungen [33] und die chronisch-intermittierende Hypoxie [34] zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems führen. Auf der anderen Seite wird dem autonomen Nervensystem auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF zugeschrieben [35].



*Abb. 1.2: Mögliche Mechanismen zur Erklärung des Zusammenhangs zwischen OSAS und kardialen Arrhythmien. Erstellt am Beispiel von Rossi et al, 2013 [36].*

Als wahrscheinliche Folge der vorher genannten Mechanismen können bei Patienten mit OSAS strukturelle und elektrische Veränderungen des Herzens beobachtet werden. Chami et al. konnten bei einer Kohorte an Patienten in mittlerem und höherem Alter aus der „Sleep Heart Health Study“ eine Assoziation zwischen dem Vorliegen eines OSAS und einer Linksherzhypertrophie und verminderter systolischer Funktion

des linken Ventrikels nachweisen [37]. Dimitri et al. [38] hingegen beobachteten bei Patienten mit OSAS vermehrt strukturelle und elektrische Umbauprozesse der Herzvorhöfe, die vor allem die elektrische Reizleitung betrafen.

Die Konsequenz dieser Umbauprozesse ist die Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF und das damit verbundene Risiko für die Entstehung von thromboembolischen Ereignissen und eine erhöhte Hospitalisierung und Mortalität [39].

Das CSAS ist, wie das OSAS, mit dem Auftreten von VHF assoziiert, jedoch gibt es für diesen Zusammenhang keine so umfangreiche Datenlage [40,41].

### **1.3 Pathophysiologische Mechanismen der Entstehung von VHF**

Klinisch unterteilt man VHF in verschiedene Stadien. Das paroxysmale VHF ist selbstlimitierend und die einzelnen Episoden dauern weniger als 7 Tage. Persistierendes VHF terminiert nicht spontan, kann aber durch therapeutisches Eingreifen beendet werden. Beim permanenten VHF handelt es sich um ein dauerhaftes, anhaltendes VHF, das auch durch therapeutische Maßnahmen nicht mehr beendet werden kann [42]. Meist werden die verschiedenen Stadien nacheinander durchlaufen. Allerdings kann auch bei Erstdiagnosestellung bereits ein permanentes VHF vorliegen [43].

Die Grundlage für die Entstehung von VHF wird häufig durch das Bestehen bestimmter Risikofaktoren (z.B. Alter) und Vorerkrankungen (z.B. Herzinsuffizienz, Herzklappenfehler, koronare Herzerkrankung oder arterielle Hypertonie) gelegt [44–46]. Ebenso führt, wie bereits erwähnt, das OSAS zu strukturellen und funktionellen Veränderungen am Herzen, die die Entwicklung von VHF begünstigen [38]. Allerdings kann VHF auch bei ansonsten gesunden Personen auftreten, die keine dieser Risikofaktoren aufweisen [47].

Zunächst benötigt das Auftreten des VHF als Grundvoraussetzung geeignete Bedingungen im Gewebe, das sogenannte vulnerable Substrat und einen Trigger [43]. Laut Allessie et al [46] stellen zum Beispiel sympathische oder parasympathische Stimulation, Bradykardien, Tachykardien, supraventrikuläre Extrasystolen, akzessorische Leitungsbahnen oder Dehnung der Vorhöfe derartige Trigger dar. Ebenso können spontane fokale ektope Entladung Vorhofflimmern auslösen. Häufig liegt der entsprechende Fokus im Bereich der Mündung der Pulmonalvenen im linken Vorhof [45,48]. Diese Trigger können VHF verursachen, das häufig zunächst paroxysmal auftritt und spontan wieder terminiert. Die Aufrechterhaltung des VHF und

der Übergang zu den beständigeren Formen des VHF ist im Wesentlichen davon abhängig, ob zum einen diese Trigger weiterhin bestehen und zum anderen die Trigger auf geeignete Bedingungen im Gewebe, d.h. ein vulnerables Substrat, treffen und daraufhin auch ohne erneuten Trigger aufrechterhalten werden. Das Substrat entsteht durch Veränderungen im Vorhofmyokard, dem sogenannten atrialen Remodelling – häufig bedingt durch die oben genannten Vorerkrankungen und Risikofaktoren. Das Remodelling sind strukturelle und funktionelle Veränderungen der Herzvorhöfe [49]. Insbesondere die Fibrosierung der Herzvorhöfe stellt einen Vorgang des atrialen Remodellings dar. Dies verursacht eine lokale Verlangsamung der Erregungsleitung oder einen lokalen Leitungsblock [50]. Das funktionelle Remodelling basiert auf der Veränderung der Expression und des Verhaltens von Ionenkanälen. Dabei kommt es zur Veränderung von Ionenkanalströmen, die Einfluss auf die Dauer und die Frequenzadaption der Aktionspotentiale haben. Das strukturelle und funktionelle Remodelling sind nicht nur Ursachen des VHF, sondern ebenfalls eine Folge davon und tragen zu dessen Erhalt bei [51,52]. Man geht davon aus, dass diese Remodellingvorgänge auch verantwortlich für das Fortschreiten des VHF – vom paroxysmalen über den persistierenden zum permanenten Typ – sind [47]. Liegt kein Remodelling vor, verursachen fokale Aktivitäten in der Regel VHF, das spontan sistiert und somit nur paroxysmal auftritt. Ist das Remodelling nur funktionell – also elektrisch – kann das VHF durch therapeutische Interventionen wieder beendet werden und es besteht das klinische Bild eines persistierenden VHF. Liegen allerdings zudem bereits fixierte, also strukturelle Veränderungen vor kann das VHF oft auch nicht mehr terminiert werden und klinisch spricht man von einem permanenten VHF (s. Abb. 1.3) [45].

Einer der wichtigen Mechanismen bei der Aufrechterhaltung des VHF ist der Reentry-Mechanismus. Hierbei kommt es zum Zusammenspiel der vorher genannten Vorbedingungen: Der Trigger trifft auf Gewebe, das noch teilweise refraktär und zum Teil wieder erregbar ist. Dieses heterogen erregbare Herzvorhofgewebe stellt das vulnerable Substrat dar und die Erregung breitet sich dort nur unidirektional aus und bildet eine kreisende Erregung. Dies geschieht dann, wenn die Weiterleitungsgeschwindigkeit langsam genug und die Strecke, die entlang des Erregungskreises läuft, lang genug ist um immer wieder auf Gewebe zu treffen, das bereits wieder erregbar ist. Die kreisende Erregung wird vor allem durch pathologische Veränderungen, wie verkürzte Refraktärphasen der Vorhofmuskelzellen,



verlangsamte Erregungsleitung sowie Barrieren für die Erregungsleitung in Form von Fibrosierungen, begünstigt und aufrechterhalten [49].

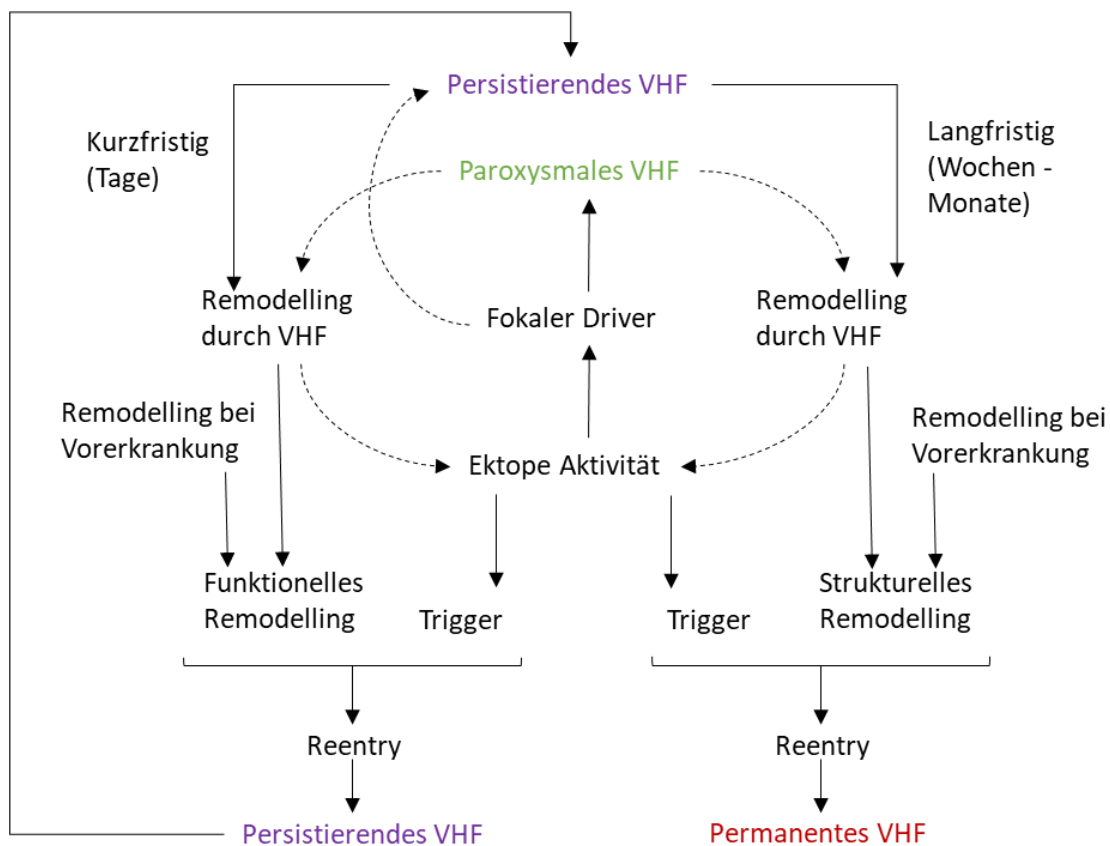


Abb. 1.3: Schema zur VHF-Entstehung. Erstellt am Beispiel von Wakili et al., 2011 [45].

Hejman et al [43] bezeichnen Reentry-Mechanismen und fokale ektope Aktivitäten als die beiden fundamentalen Mechanismen der VHF-Entstehung.

Fokale ektope Aktivitäten sind autonome Erregungen des Myokards, die ihren Ursprung außerhalb des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems haben. Der wichtigste Mechanismus bei der Entstehung von fokalen ektopen Aktivitäten sind Nachdepolarisationen. Man unterscheidet frühe (EAD/ early afterdepolarization) und verzögerte Nachdepolarisationen (DAD/ delayed afterdepolarization) [45]. DADs treten nach der vollständigen Repolarisation der Zelle auf, EADs kommen dieser zuvor [48]. Bei der Entstehung der Nachdepolarisationen stehen Veränderungen der Kalziumströme und -kanäle klar im Vordergrund. Aus diesem Grund soll im Folgenden zunächst ein Überblick über den Kalziumhaushalt der Herzmuskelzelle bei der elektromechanischen Kopplung gegeben werden.

## 1.4 $\text{Ca}^{2+}$ und die elektromechanische Kopplung

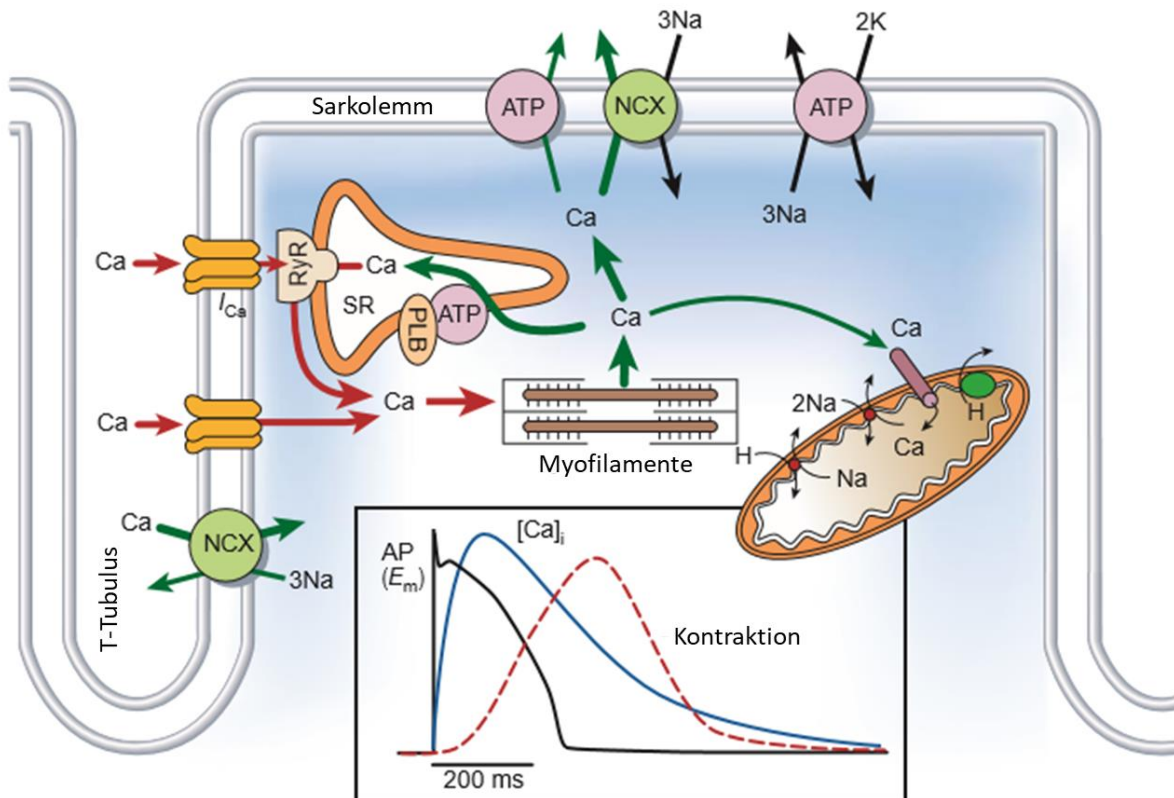


Abb. 1.4: Kalziumtransport im Myozyten. Die eingefügten Graphen zeigen den zeitlichen Verlauf von Aktionspotential (AP), Kalziumtransient und mechanischer Kontraktion. NCX:  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, ATP: ATPase, RyR: Ryanodinrezeptor, PLB: Phospholamban, SR: sarkoplasmatisches Retikulum. Modifiziert nach Bers, 2002 [53].

Das kardiale Aktionspotential im Myozyten (außerhalb des Erregungsbildungssystems) wird bei Eintreffen einer elektrischen Erregung durch die Öffnung von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen gestartet, die einen depolarisierenden Natriumeinstrom ( $I_{\text{Na}}$ ) in die Zelle ermöglichen. In der elektrophysiologischen Messung zeigt sich dies durch den initialen steilen Anstieg des Aktionspotentials. Durch die Depolarisation werden daraufhin spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanäle, die sich an der Zellmembran befinden, geöffnet und  $\text{Ca}^{2+}$  strömt aus dem extrazellulären Raum in die Zelle ein ( $I_{\text{Ca}}$ ). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom löst eine noch größere Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Ryanodinrezeptor Typ 2 Kanäle (RyR2) aus.  $\text{K}^+$ -Kanäle bewirken die Repolarisation und beenden das Aktionspotential. Die resultierende hohe Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle begünstigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$  vermehrt an Troponin C binden kann und somit die Kontraktion der Myofilamente ermöglicht. Zur

Beendigung der Kontraktion muss  $\text{Ca}^{2+}$  wieder aus dem Zytoplasma entfernt werden. Zum einen wird  $\text{Ca}^{2+}$  durch die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) zurück in das SR transportiert. Phospholamban (PLB) ist ein endogener Inhibitor, der in unphosphoryliertem Zustand die Aktivität der SERCA hemmt. Andererseits erfolgt ein elektrogener Austausch über die Plasmamembran mittels des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX), der bei hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion im Austausch gegen 3  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle befördert. Der Austausch bewirkt netto einen depolarisierenden Einwärtsstrom an positiv geladenen Ionen. Durch die fallende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird die Relaxation während der Diastole ermöglicht (s Abb. 1.4) [43,53,54].

### **1.5 Die Entstehung von Nachdepolarisationen und ektope Aktivität**

Bei der Entstehung von frühen Nachdepolarisationen (EADs) ist eine verlängerte Aktionspotentialdauer entscheidend. Während dieser kann es passieren, dass die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erneut einen aktivierbaren Zustand erreichen und einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom ermöglichen, der das umliegende Gewebe bis zum Erregungspotenzial depolarisiert und somit eine ektope Erregung auslöst (s. Abb. 1.5) [48].

Bei erhöhtem diastolischem Kalziumgehalt oder verstärkter NCX-Aktivität kann es durch den elektrogenen Austausch des NCX zu späten Nachdepolarisationen (DADs) kommen. Bei Erreichen der Depolarisationsschwelle entsteht ein Aktionspotential, das zu einer ektope Aktivität führt [45,55]. Zudem werden DADs durch RyR2-Dysregulation und erhöhten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt begünstigt [56,57]. Bei Patienten mit VHF wurde eine vermehrte spontane diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR und einer erhöhten Aktivität der RyR2 beobachtet [58]. Diese spontanen, lokalisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus dem SR werden auch als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks bezeichnet [59]. Die diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus dem SR sind zum einen selbst elektrogen und zum anderen erhöhen sie den diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Zelle und führen zu einem depolarisierenden  $\text{Na}^+$ -Einstrom durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransport des NCX, der als Hauptverursacher von getriggerten Potentialen gilt [60]. So konnten Christ et al [61] in isolierten humanen rechtsatrialen Myozyten von Patienten mit VHF erhöhte NCX Aktivitäten im Vergleich zu Patienten im Sinusrhythmus nachweisen.

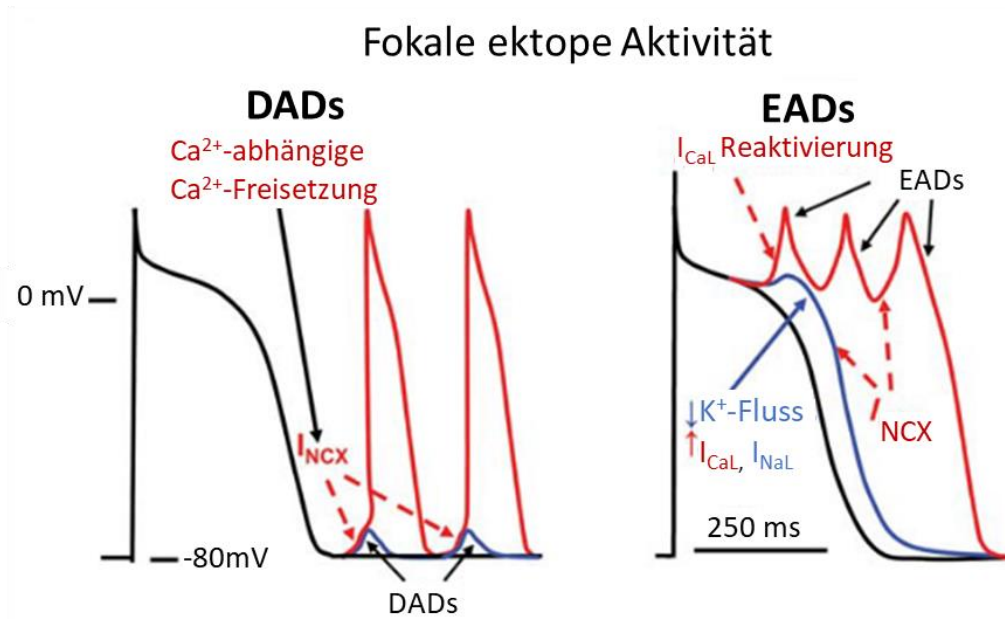


Abb. 1.5: Zelluläre Entstehungsmechanismen von fokalen ektope Erregungen. Ca<sup>2+</sup>-abhängige Vorgänge sind in Rot dargestellt. Modifiziert nach Nattel et al, 2012 [48].

## 1.6 Phospholamban als Faktor für die Entstehung eines SR Ca<sup>2+</sup>-Lecks

Ein weiterer Faktor, der die Entstehung von Ca<sup>2+</sup>-Sparks begünstigt, ist ein hoher SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt. Dieser entsteht, wenn die SERCA vermehrt Ca<sup>2+</sup> in das SR transportiert. Die Aktivität der SERCA steht maßgeblich unter dem Einfluss des reversiblen Inhibitors PLB. In unphosphoryliertem Zustand hemmt PLB die SERCA [62]. Diese Hemmung wird durch die Phosphorylierung von PLB durch Proteinkinase A (PKA) und Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) vermindert [63]. Durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation phosphoryliert die PKA PLB an Serin 16. Unabhängig davon wird PLB an Threonin 17 frequenzabhängig durch die CaMKII phosphoryliert. Beide Phosphorylierungen wirken synergistisch hemmend auf PLB, steigern die diastolische Funktion der SERCA und beschleunigen dadurch die Relaxation der Myozyten bei hohen Frequenzen (lusitroper Effekt) [64].

Im Experiment mit PLB-knock-out-Mäusen wurde ein erhöhter SR Ca<sup>2+</sup>-Gehalt gemessen und Ca<sup>2+</sup>-Sparks wurden dreimal so häufig bei den transgenen Mäusen als beim Wildtyp beobachtet [65].

Die Dephosphorylierung von PLB erfolgt durch die Proteinphosphatasen PP1, PP2A, PP2C [66]. Bei Patienten mit permanentem Vorhofflimmern wurde eine erhöhte Aktivität des Inhibitors I-1 der PP1 beobachtet. El-Armouche et al. zogen daraus den Schluss, dass die erhöhte PLB-Phosphorylierung und das daraus resultierende SR Ca<sup>2+</sup>-Leck von einer erniedrigten Phosphataseaktivität stammen könnten [67].

## 1.7 Struktur und Funktion des Ryanodinrezeptors im Rahmen der Entstehung von Arrhythmien

Das arrhythmogene Potential des Ryanodinrezeptors zeigt sich bei Patienten, die eine Missense-Mutation des Kanals aufweisen. Patienten mit catecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardien (engl. catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia /CPVT) und strukturell gesundem Herzen erleiden bei physischem oder emotionalem Stress ventrikuläre Arrhythmien, die mit Synkopen bis hin zum plötzlichen Herztod einhergehen können [68]. Priori et al. [69] konnten als zugrundeliegende Pathologie bei den betroffenen Patienten eine Mutation im Gen des RyR2 nachweisen.

In einem knock-in-Maus-Modell, das die entsprechende Mutation des RyR2 der CPVT Patienten trägt, konnten unter adrenerger Stimulation ventrikuläre Tachykardien provoziert werden. Dies stützt die These der Verbindung zwischen Ryanodinrezeptordysfunktion und der Entstehung von kardialen Arrhythmien [70].

*In vitro* zeigten RyR2-Kanäle, die eine CPVT-assoziierte Mutation trugen, unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation eine vermehrte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR im Vergleich zu den Wildtyp-Kanälen [71].

Auch bei genetisch nicht veränderten RyR2 bestehen Regulationsmechanismen, die die Sensitivität des RyR2 für zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  und somit seine Offenwahrscheinlichkeit beeinflussen. Hierbei kommen insbesondere assoziierte Bindungsproteine und posttranslatorische Modifikationen (v.a. Phosphorylierungen) in Frage [72].

Die Unterform des RyR, die Bedeutung bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem kardialen SR hat, ist der Typ 2. Der RyR2 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der aus vier kanalbildenden Monomeren mit einem relativ kleinen transmembranären C-Terminus und einer N-terminalen zytosolischen Domäne besteht. Die zytosolische Domäne dient als Verankerung für zahlreiche regulatorische Bindungsproteine: CaM (Calmodulin), FKBP12.6 (12.6 kDa FK506-binding-protein / calstabin2), PKA (Proteinkinase A), CaMKII, PP1 (Proteinphosphatase 1) und PP2A (Proteinphosphatase 2A) (s. Abb. 1.6) [72]. Die dynamische Bindung der Kinasen und Phosphatasen an den RyR2-Makromolekülkomplex erfolgt mittels Leuzin-/Isoleuzin-Zipper [73], die somit eine lokale Kontrolle über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ausüben [74].

Sood et al. [75] zeigten, dass Mäuse mit einem Defizit der RyR2 stabilisierenden Untereinheit FKBP12.6 anfällig für stimulationsinduziertes VHF sind und eine erhöhte

Auftreten von spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR aufweisen. In humanem Herzvorhofgewebe von Patienten mit chronischem VHF konnte eine verminderte Bindung von FKBP12.6 an den RyR2-Komplex nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich bei diesen Patienten eine erhöhte Phosphorylierung des RyR2 an S2808, der Phosphorylierungsstelle der PKA [76]. Die PKA-Phosphorylierung des RyR2 reguliert die FKBP12.6-Bindung an den Makromolekülkomplex und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. PKA-Hyperphosphorylierte RyR2-Kanäle zeigten eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität für zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  und eine erhöhte Kanalaktivität [74]. Transgene Mäuse mit einer erhöhten katalytischen Aktivität der PKA im Herzen wiesen eine Hyperphosphorylierung des RyR2 und eine vermehrte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung auf. Diese Mäuse entwickelten eine dilatative Kardiomyopathie und Arrhythmien [77]. Unter physiologischen Bedingungen wird die PKA vor allem durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation aktiviert, die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren zu einer intrazellulären cAMP-Erhöhung führt [78,79].

Ein weiterer Weg der RyR2-Aktivierung ist die Phosphorylierung durch die CaMKII an der spezifischen Phosphorylierungsstelle Serin 2814 (oder S2815, speziesabhängig). Die Aktivierung des RyR2 durch CaMKII-Phosphorylierung ist FKBP12.6 unabhängig und führt nicht zu der Dissoziation des Bindungsproteins vom Kanal [80].

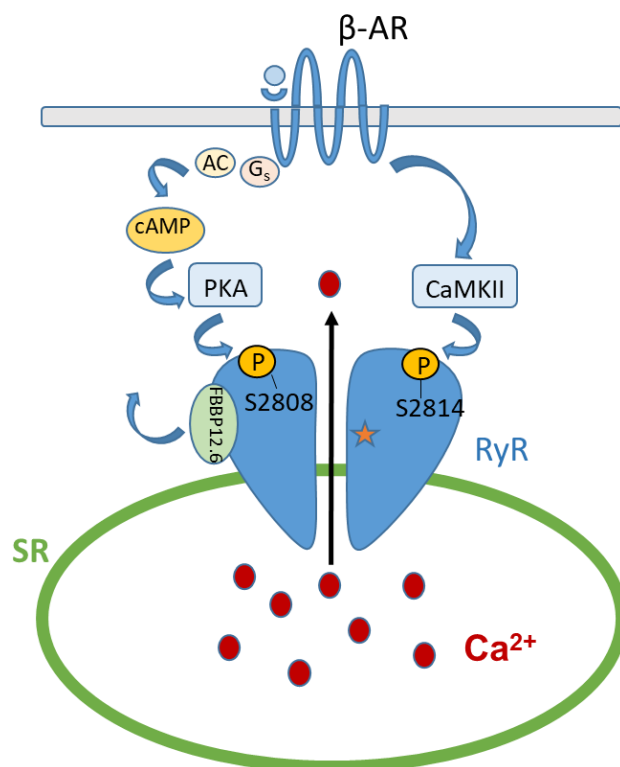


Abb. 1.6: Regulation des RyR.

Dargestellt sind Mechanismen der fehlerhaften Regulation des RyR im Zusammenhang mit diastolischer SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und kardialen Arrhythmien:

Aktivierung der PKA und der CaMKII über Stimulation des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta$ -AR). Phosphorylierung des RyR durch PKA an S2808, durch CaMKII an S2814, Bindung und Freisetzung von FKBP12.6. Erbliche Mutationen sind durch einen Stern symbolisiert. Details s. Text, modifiziert nach Chelu und Wehrens, 2007 [81].

## 1.8 Struktur und Aktivierungsmechanismen der CaMKII

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin abhängige Kinase (CaMK) ist eine Serin-Threonin-Kinase und ubiquitär in allen Zellen vorhanden. Das Holoenzym ist ein Multimer, das aus 6 bis 12 Untereinheiten besteht. Jedes Monomer hat eine N-terminale katalytische Domäne, eine autoregulatorische Domäne in der Mitte und eine Assoziationsdomäne am C-Terminus [82,83]. Typ II ist der vorherrschende Typ der CaMK im Herzen (s. Abb. 1.7) [84]. Es gibt vier verschiedene Isoformen der CaMKII,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Während die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form spezifische Formen in neuronalem Gewebe sind, gibt es CaMKII $\gamma$  und  $\delta$  auch im Herzen [85]. Durch alternatives Splicing entstehen weitere Unterformen. CaMKII $\delta$ b besitzt eine Nucleus-Lokalisations-Sequenz und ist vor allem im Zellkern zu finden. CaMKII $\delta$ c besitzt diese Sequenz nicht und befindet sich insbesondere im Zytosol [86].

Wie ihr Name bereits andeutet, wird die CaMKII von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin aktiviert. Bei einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bindet Calmodulin (CaM) jeweils vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex kann verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zielproteine aktivieren wie zum Beispiel die CaMKII [82,87].

Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM an die regulatorische Domäne vollzieht die CaMKII eine Konformationsänderung, bei der die katalytische Domäne zugänglich wird. In dieser Form kann die CaMKII nun ihre Zielproteine phosphorylieren. Zudem ist eine Autophosphorylierung der einzelnen Monomere innerhalb des Holoenzym möglich [88]. Durch die Autophosphorylierung an Threonin 287 erhöht sich zum einen die Affinität der CaMKII zu  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM.  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM wird zudem stärker und länger gebunden und somit wird die Dissoziation behindert. Zum anderen kann die autophosphorylierte CaMKII auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM den aktivierten Zustand aufrechterhalten, die sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-unabhängige Aktivität (s. Abb. 1.7). Der Vorgang der Autophosphorylierung selbst ist hingegen abhängig von der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ , CaM und ATP [88–90].

Die CaMKII kann auch negativ reguliert werden. Dies geschieht durch Dephosphorylierung des Threonin 287 durch die Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2C [91].



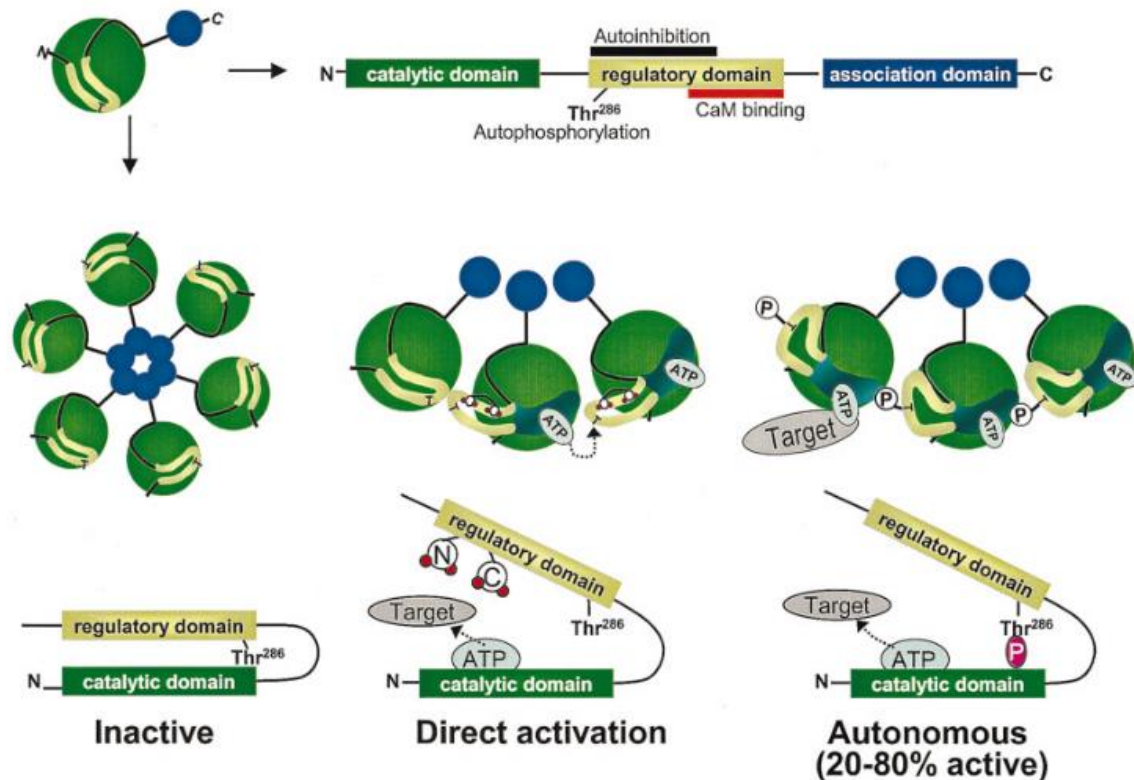


Abb. 1.7: Organisation des oligomeren CaMKII-Komplexes und der Domänen des Monomers. Dargestellt sind:

Oben: CaMKII-Monomer in räumlicher und linearer Konfiguration,

Mitte: Bildung von CaMKII-Multimeren aus 6 Monomeren und Aktivierung durch Autophosphorylierung an Threonin286,

Unten: Konfigurationsänderung und Aktivierung durch (unten Mitte) Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin bzw. (unten rechts) Autophosphorylierung.

Aus Maier und Bers, 2002 [83], modifiziert nach Braun und Schulman, 1995 [82].

Es existieren noch weitere Mechanismen, die die Aktivität der CaMKII regulieren. Erickson et al. [92] beschrieben eine  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-unabhängige Aktivierung der CaMKII durch Methionin-Oxidation an Position 281/282. Wagner et al [93] konnten eine erhöhte CaMKII-Aktivität unter oxidativen Bedingungen nachweisen, die zur Entstehung von EADs/DADs und Arrhythmien führte. Dies war bei Myozyten mit fehlender CaMKII $\delta\text{c}$  deutlich reduziert.

Mäuse, denen durch Mutation die entsprechende Oxidationsstelle fehlte, zeigten sich im Gegensatz zum Wildtyp resistent gegenüber einer Induktion von VHF durch Angiotensin-II-Infusion. Zudem konnte eine vermehrte Oxidation von Methionin 281/282 bei Patienten mit VHF nachgewiesen werden, eine Erhöhung der gesamten CaMKII Expression wurde dabei nicht festgestellt [94].



Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Aktivierung der CaMKII und deren Autophosphorylierung bewirkt, dass es bei vermehrtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, wie zum Beispiel bei Tachykardien oder  $\beta$ -adrenerger Stimulation, zu einer vermehrten Aktivität, verbunden mit diastolischer SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, kommt. Diese Aktivitätssteigerung wirkt längerfristig als die  $\beta$ -adrenerge Aktivierung von cAMP/PKA [95,96].

### 1.9 Arrhythmieentstehung durch erhöhte CaMKII-Aktivität

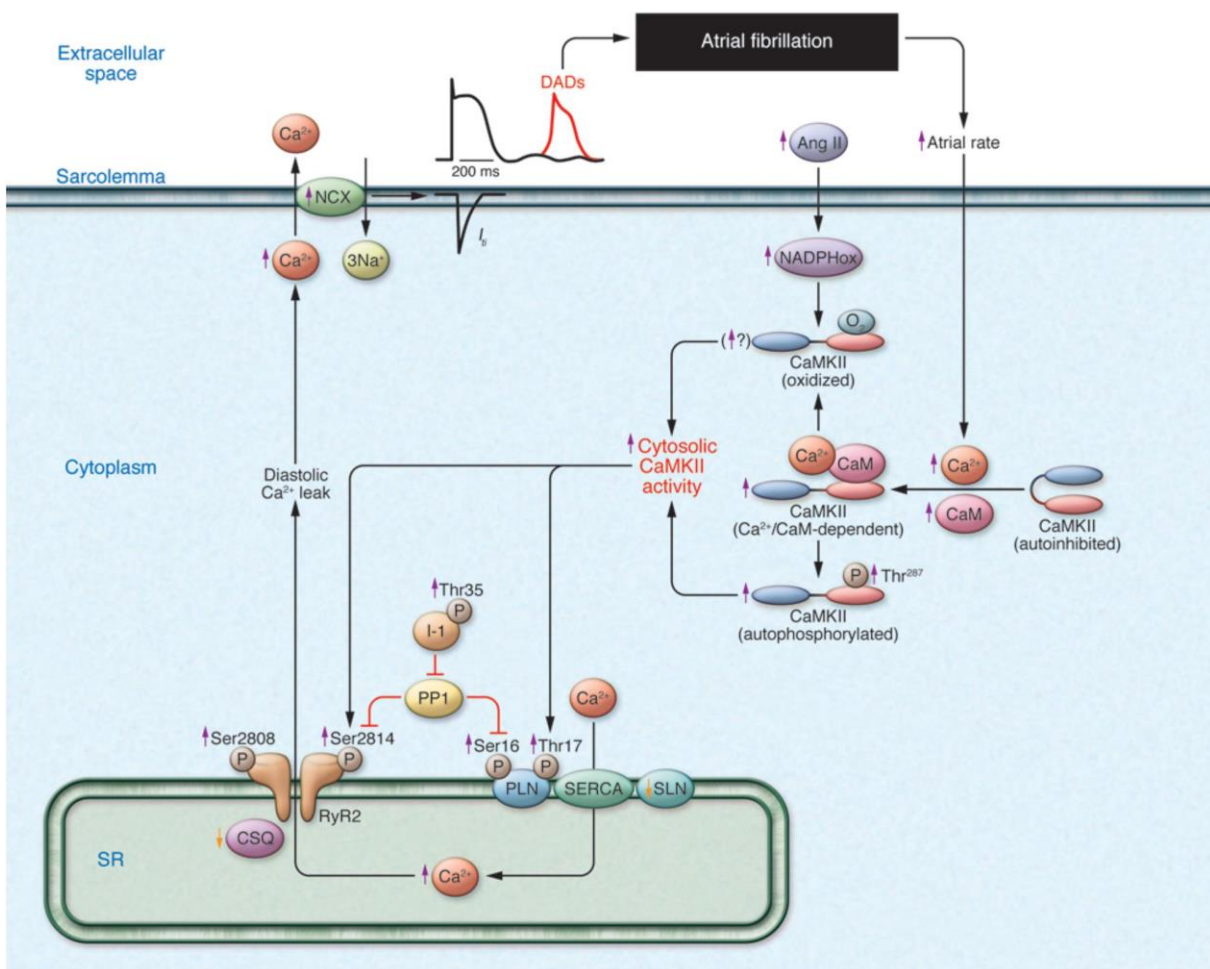


Abb. 1.8: VHF-Entstehung durch diastolische SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung.

Durch eine hohe atriale Erregungsfrequenz steigt das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  und die CaMKII wird aktiviert. Eine zusätzliche Aktivierung erfolgt durch Oxidation und Autophosphorylierung, was zu einem Persistieren der CaMKII-Aktivität führt. Die CaMKII phosphoryliert PLB (PLN) und den RyR2 und bewirkt somit die diastolische SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Unter zusätzlicher depolarisierender Aktivität des NCX entstehen DADs, die zu ectopen Erregungen führen können und somit die Entstehung von VHF begünstigen. Aus Wakili et al. [45].

Die CaMKII hat auch Einfluss auf die Pathogenese der Arrhythmieentstehung, da sie Proteine durch Phosphorylierung reguliert, die wichtig für die Entstehung fokaler Erregungen sind. Insbesondere die Phosphorylierung des RyR2 und PLB trägt hierzu bei (s. Abb. 1.8) [45]. Unter Inhibition der CaMKII hingegen konnten Arrhythmien im Mausmodell reduziert werden [97].

Neef et al. [98] zeigten, dass bei Patienten mit VHF eine verstärkte Phosphorylierung des RyR2 und diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR beobachtet werden können. Dies führte zu erhöhten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, jedoch wurde gleichzeitig ein verminderter SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt festgestellt. Durch CaMKII-Inhibition oder Hemmung des RyR2 mit Tetracain konnten diese Effekte vermindert werden. Eine Veränderung der CaMKII-abhängigen PLB-Phosphorylierung konnte nicht festgestellt werden.

Zu einem ähnlichen Resultat kamen auch Voigt et al. [99]. Patienten mit permanentem Vorhofflimmern besaßen eine vermehrte Phosphorylierung des RyR2 an CaMKII- und PKA-Stellen, spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen, DADs und getriggerte Aktivitäten durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2. Durch spezifische CaMKII Blockierung nahm die spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und RyR2-Offenwahrscheinlichkeit ab. Die Expression und Autophosphorylierung der CaMKII $\delta$  zeigten sich hier ebenfalls erhöht.

Auch in Myozyten im Tiermodell mit Herzinsuffizienz wurde eine erhöhte Auto- und RyR2-Phosphorylierung der CaMKII beobachtet, was zu diastolischer SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, einem vermindertem SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und der Entstehung von Arrhythmien führte. Durch die Blockierung der CaMKII (nicht aber der PKA) wurde die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung vermindert und der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt erhöhte sich [100].

Transgene Mäuse mit einer gain-of-function Mutation des RyR2 (RyR2R176Q/+ Mäuse) zeigten eine vermehrte diastolische SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung,  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Nachdepolarisationen und Entwicklung von VHF durch atriale Stimulation im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen. Sowohl eine genetische CaMKII-Inhibition als auch die Blockade der CaMKII mit KN93 reduzierte die Anfälligkeit der transgenen Mäuse für stimulationsinduziertes VHF. Dieser Versuch spricht dafür, dass mehrere Faktoren für die Entstehung von VHF verantwortlich sind. Hier zum einen die genetische Veränderung des RyR2 der Mäuse und zusätzliche eine durch Vorhofstimulation hervorgerufene Aktivierung der CaMKII [101].

Auch die Ergebnisse von Maier et al [102] stützen die Hypothese der gesteigerten RyR2-Aktivität durch CaMKII-Phosphorylierung. Mäuse mit einer transgenen Überexpression der zytosolischen CaMKII $\delta$ c entwickelten eine dilatative Kardiomyopathie. In den Herzmuskelzellen zeigte sich ein erniedrigter SR Ca<sup>2+</sup>-Gehalt, vermehrte diastolisch Ca<sup>2+</sup>-Sparkfrequenzen und eine verstärkte NCX-Expression und Funktion.

Mäuse mit einer transgenen Überexpression des Transkriptionsrepressors CREM-IbC-X (CREM-Mäuse) zeigten ein altersabhängiges Fortschreiten von fokalen Ektopien über paroxysmales VHF bis zum permanenten VHF. Im Laufe dieser Entwicklung wurden diastolische Kalziumfreisetzungen und eine Vergrößerung der Vorhöfe beobachtet. Durch die genetische Inhibition der CaMKII Phosphorylierung am RyR2 konnten diese pathologischen Veränderungen und die Entwicklung von permanentem Vorhofflimmern verhindert werden [103,104].

Veränderungen des Kalziumhaushalts und eine Vergrößerung der Vorhöfe konnten auch bereits vor dem Auftreten von VHF beobachtet werden und stellen wichtige Zeichen für das atriale Remodelling dar [103]. Das atriale Remodelling als Faktor für die Entstehung und Aufrechterhaltung des VHF scheint durch die CaMKII begünstigt zu werden [105].

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf ein CaMKII-vermitteltes SR Ca<sup>2+</sup>-Leck hin, das für die Entstehung von ektopen Erregungen und die Initiierung und Aufrechterhaltung von VHF verantwortlich ist [106].

## 1.10 Fragestellung

Schlussfolgernd aus dem dargestellten Sachverhalt stellt sich nun die Frage, ob bei der Entstehung von VHF bei Patienten mit OSAS die CaMKII ebenfalls als wichtiger pathophysiologischer Vermittler wirkt.

Mit den pathologischen Veränderungen beim OSAS wie Sympathikusaktivierung, thorakale Druckschwankungen und oxidativem Stress mit Bildung von ROS (s. 1.2) existieren mögliche Aktivatoren der CaMKII über Oxidation, atriale Frequenzerhöhung und Sympathikusaktivität (s. 1.8).

Aus diesem Grund sollen mit dieser Doktorarbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Liegt im Vorhofmyokard von Patienten mit OSAS eine veränderte Expression der CaMKII vor?
2. Ist die CaMKII bei diesen Patienten durch Autophosphorylierung an Threonin 287 und Oxidation an Methionin 281/282 verstärkt aktiviert?
3. Ist die Phosphorylierung der Zielproteine RyR und PLB an deren spezifischen CaMKII-Phosphorylierungsstellen im Vergleich zu Patienten ohne OSAS verändert?
4. Ist im HDAC4-CaMKII-Bindungsassay eine veränderte CaMKII-Aktivität bei Patienten mit OSAS feststellbar?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Probengewinnung von humanem Herzvorhofgewebe**

Durch eine Kooperation mit der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie des Uniklinikums Regensburg wurde die Nutzung von humanem Herzvorhofgewebe für diese Arbeit ermöglicht.

Bei Operationen am offenen Herzen, wie Bypass-Operationen und Operationen zum Ersatz oder zur Rekonstruktion von Herzklappen, ist in der Regel eine Kardioplegie nötig. Um den Kreislauf weiterhin aufrecht zu erhalten wird eine Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Dafür werden die Hauptschlagader und der rechte Vorhof kanüliert. Die Zugänge für die Herz-Lungen-Maschine werden bei Beendigung der Operation wieder entfernt und beim Vernähen der Schnittstelle im rechten Herzvorhof fällt dabei in der Regel ein Gewebestück als Überstand an. Dieses Gewebestück wurde vom Operateur entfernt, sofort in eine Custodiol-Lösung gegeben und konnte im Labor portioniert und in kleinen Stücken bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden.

Zur Nutzung des Herzvorhofgewebes wurde der Patient am Vortag der Operation über das Vorgehen ärztlich aufgeklärt und die Einwilligung in die Studienteilnahme eingeholt. Außerdem wurde der Patient mittels eines Polysomnographiegeräts (Apnea Link®, ResMed, Sydney, Australia) in der Nacht vor der Operation auf das Vorliegen eines Schlafapnoesyndroms getestet und der AHI ermittelt. Hierzu wurden die Brustkorbexkursionen, die Sauerstoffsättigung im Blut und der Luftstrom an der Nase gemessen. Zudem wurden sowohl vor als auch nach der Operation klinische Daten des Patienten mithilfe von Befragung und Einsicht in die Patientenakte erhoben.

Der Ethikantrag für dieses Vorgehen lag bereits vor.

### **2.2 Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalysen mittels Western Blot**

#### **2.2.1 Herstellung von Gewebelysaten**

Von den gefrorenen Proben des humanen Vorhofgewebes wurden kleine Stücke entnommen, in einen Eppendorf-Cup gegeben und gekühlter Lysepuffer (Tab. 2.1) zugegeben.

Lysepuffer:

Destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	
Natriumchlorid (NaCl)	200 mmol/l
Tris(Trishydroxymethyl-aminomethan)-Lösung, pH 7,4	20 mmol/l
Natriumfluorid (NaF)	20 mmol/l
Triton X-100 Puffer, 1%ig	1 Vol.-%
Natriumorthovanadat	1 mmol/l
1,4-Dithiothreitol	1 mmol/l
Phosphatase-Inhibitor (PhosSTOP EASYpack, Cocktail Tablets, Roche Diagnostics GmbH)	1 Tablette / 100 ml
Proteinase-Inhibitor (cOMplete Tablets EDTA-free, Cocktail Tablets, EASY-Pack, Roche Diagnostics GmbH)	1 Tablette / 200 ml

Tab. 2.1: Zusammensetzung des Lysepuffers in ddH<sub>2</sub>O

Als Nächstes wurden die Stücke mit Hilfe einer Bohrmaschine mit konischem Bohraufsatz mechanisch zerkleinert. Während des Zerkleinerns wurde der Cup immer wieder in flüssigem Stickstoff gekühlt. Anschließend erfolgte eine Inkubationszeit von 30 min auf Eis, in der das zerkleinerte Gewebe im Lysepuffer zur Zersetzung verblieb. Dieser Vorgang wurde durch wiederholtes Vibrationsmischen alle 5-10 Minuten unterstützt und diente dazu die Zellstrukturen aufzubrechen und die intrazellulären Proteine in Lösung zu bringen. Danach wurden die Gewebehomogenate 10 Minuten bei 4°C und 6600 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Cup überführt und das Gewebepellet verworfen. Die so gewonnenen Lysate wurden auf Eis kühlgestellt.

Bei der Proteinanalyse sollten nach Möglichkeit immer gleiche Mengen an Gesamtprotein pro Probe für die Gelelektrophorese verwendet werden um den Anteil der gesuchten Proteine quantitativ ermitteln zu können. Hierzu musste die Gesamtproteinkonzentration in den Proben ermittelt werden und Probenverdünnungen mit gleicher Proteinkonzentration hergestellt werden. Dem zur Folge schloss sich als nächster Schritt die Bestimmung des Proteingehalts der Proben mit Hilfe der BCA (Bicinchoninsäure)-Variante der Biuretreaktion an. Hierbei werden durch Zugabe von Kupfer (II) in basischer Lösung entsprechend der vorhandenen Proteine Kupfer (I) Ionen in proportionalem Verhältnis zur Proteinkonzentration gebildet. Dabei bildet BCA einen farbigen Komplex mit Kupfer (I) Ionen, der bei einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert und sich somit mit einer Absorbionsmessung

nachweisen lässt. Mit dieser Methode lassen sich Proteinkonzentrationen im Bereich zwischen 0,005 und 2 mg/ml bestimmen [107].

Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:10 zusammen mit einer Verdünnungsreihe an Proteinstandard und reinem Lysepuffer als Leerwert auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Zudem wurde in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte die Proteinbestimmungslösung für die Biuretreaktion zugegeben. Diese Lösung setzt sich aus den Reagenzien Kupfer(II)sulfat und BCA zusammen, die in einem Verhältnis von 1:50 gemischt worden waren (Kit zur Proteinkonzentrationsbestimmung: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim).

Die Mikrotiterplatte wurde nun für 30 min bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Darauf erfolgte die Bestimmung der Extinktion (Gerät: InfiniteM200PRO; Software: Tecan i-control). Die dabei ermittelten Extinktionswerte wurden in eine vorbereitete Excel-Tabelle übertragen. Aus den gemessenen Werten der Proteinstandardverdünnungen wurde eine Eichkurve erstellt und anschließend die Konzentrationen der Proben ermittelt.

Um nun fertige Proben für den anschließenden Western Blot zu erhalten, mussten die Lysate mit PBS (Dublecco's phosphate buffered saline), Ladepuffer (Tab. 2.2) und Mercaptoethanol verdünnt werden.

Ladepuffer, pH 6,8 (37°C)

Tris-Lösung, 0,5 mol/l, pH 6,8 (37°C), s.Tab.2.5	31,25 Vol.-%
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,35 mol/l
Bromphenolblau Natriumsalz	0,07 mmol/l
Glyzerol	0,5 Vol.-%

*Tab. 2.2: Zusammensetzung des Ladepuffers in ddH<sub>2</sub>O*

Hierzu wurden jeweils 18% des Endvolumens an Ladepuffer und 2% Mercaptoethanol zugegeben und die Konzentration mit PBS auf einen Gesamtproteingehalt von 1mg/ml eingestellt. Diese Proben wurden nun entweder für die Untersuchung zytosolischer Proteine für 5 Minuten auf 95°C oder für die Untersuchung von Proteinen, die sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums befinden, für 30 Minuten auf 37°C mit Hilfe eines Thermomixers erhitzt. Sowohl die übrigen, nicht erhitzten als auch die bei 95°C und 37°C erhitzten Proben wurden zur Aufbewahrung und baldigen

Weiterverarbeitung bei -20° eingefroren. Übrige Lysate wurden für eine längere Konservierung bei -80°C eingefroren.

### 2.2.2 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Gelelektrophorese mussten zunächst Polyacrylamidgele (Tab. 2.3 und Tab. 2.4) hergestellt werden. Die gewählte Konzentration an Polyacrylamid im Gel richtete sich nach der Größe des gesuchten Proteins. Für sehr kleine Proteine wie Phospholamban wurde eine Konzentration des Gels von 12,5% gewählt. Für die Darstellung der CaMKII wurden 8%ige Gele verwendet und bei sehr großen Proteinen wie dem Ryanodinrezeptor war es notwendig ein Zweiphasen-Gel mit 10% und 5% herzustellen, damit sowohl das Zielprotein als auch das Housekeeping-Protein GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) dargestellt werden konnten.

Trenngel für die Gelelektrophorese:

Polyacrylamid	5%, 8%,10% bzw. 12,5%
1,5 mol/l Tris/SDS-Lösung, pH 8,8; (s. Tab. 2.5)	25 Vol.-%
Ammoniumpersulfat (APS)	4,4 nmol/l
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	0,1 Vol.-%

Tab. 2.3: Zusammensetzung der Trenngele in ddH<sub>2</sub>O

Sammelgel für die Gelelektrophorese (5%)

Polyacrylamid	5 %
0,5 mol/l Tris /SDS-Lösung, pH 6,8 (s. Tab. 2.5)	25 Vol.-%
APS	4,4 nmol/l
TEMED	0,1 Vol.-%

Tab. 2.4: Zusammensetzung des Sammelgels in ddH<sub>2</sub>O

Lösungen Tris/SDS, pH 6,8 und pH 8,8

	Tris 1,5 mol/l /SDS, pH 8,8	Tris 0,5 mol/l /SDS, pH 6,8
Tris Base	1,5 mol/l	0,5 mol/l
SDS	14 mmol/l	14 mmol/l
HCl 37%	Einstellung pH 8,8	Einstellung pH 6,8

Tab. 2.5: Zusammensetzung der Lösungen Tris/SDS, pH 6,8 und pH 8,8 in ddH<sub>2</sub>O

Je nach untersuchtem Protein wurde eine Auftragsmenge zwischen 10 µl und 30 µl gewählt. In die erste und letzte Geltasche wurden jeweils 2,5 µl Proteinmarker (Standard V peqGold Protein Marker V; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) aufgetragen. Die Gelkammer wurde hierauf in Laufpuffer (s. Tab. 2.6) gestellt, an einen Power Supply (Bio-Rad) angeschlossen und die Gelelektrophorese bei 30mA/Gel für



2 bis 2,5 Stunden gestartet. Die maximale Spannung wurde auf 100 Volt und die maximale Leistung auf 50 Watt limitiert.

#### Gelelektrophorese-Laufpuffer pH 8,3

Tris	25 mmol/l
Glycin	192 mmol/l
SDS	3,5 mmol/l
HCl	Einstellung pH 8,3

Tab. 2.6: Zusammensetzung des Gelelektrophorese-Laufpuffers in ddH<sub>2</sub>O

### 2.2.3 Blotting

Nachdem die Laufmittelbande in den Proben beinahe den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Das Gel wurde von den Glasplatten gelöst und mit Schwämmen, Filterpapier und Transfermembran in ein Transfersystem überführt. Es wurden sowohl Transfermembranen aus Nitrozellulose (GE Health Care), als auch aus Polyvinylidendifluorid (Millipore Corporation) verwendet. Das Transfersystem wurde in eine Kammer gestellt, die mit Transferpuffer (Tab. 2.7) vollständig aufgefüllt wurde. Dann wurde der Transfer bei 400 mA für 2 Stunden gestartet. Während des Transfers erfolgte eine Kühlung der Kammer durch Eis.

#### Transferpuffer 20% Methanol

Tris	32,5 mmol/l
Glycin	192 mmol/l
Methanol	20 Vol.-%
SDS	0,35 mmol/l
HCl 37%	Einstellung pH 8,3

Tab. 2.7: Zusammensetzung des Transferpuffers in ddH<sub>2</sub>O

### 2.2.4 Blocken unspezifischer Bindungsstellen und Immunmarkierung

Nach dem Transfer wurde die Membran zugeschnitten. Danach erfolgte die Färbung der Membran mit Ponceau-Rot. Nach kurzer Einwirkzeit wurde der Farbstoff weggegossen und die Membran mit destilliertem Wasser solange gewaschen, bis die roten Proteinbanden gut sichtbar waren. Diese Färbung diente der Kontrolle, ob sich nach Elektrophorese und Transfer tatsächlich Proteinbanden auf der Membran zeigten.

Anschließend wurde die Membran beschriftet und mit einem Skalpell zerschnitten. Die Schnittstelle wurde nach der Lokalisation des gesuchten Proteins und der GAPDH-Bande gewählt, damit die Membranteilstücke getrennt in verschiedenen Antikörperlösungen inkubiert werden konnten. Zur Orientierung für den Schnitt dienten die Markerbanden und die mit Ponceau angefärbten Proteinbanden. Dann wurden die Membranstücke in beschriftete Schalen gelegt und für einige Minuten auf einem Schwenkschüttler mit TTBS (Tris-Buffered Saline mit Tween 20, Tab. 2.8) gewaschen bis der rote Farbstoff vollständig entfernt war.

TTBS (Tris-Buffered Saline mit Tween 20)

Tris	0,02 mol/l
NaCl	0,15 mol/l
HCl 37%	Einstellung pH 7,5
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	0,1 Vol.-% ml

*Tab. 2.8: Zusammensetzung des TTBS-Puffers in ddH<sub>2</sub>O*

Im Anschluss daran wurden die Membranstücke in 5% Milchpulverlösung in TTBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Daran schloss sich die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tab. 2.9) in 5% Milchpulverlösung in TTBS an. Dies erfolgte über Nacht bei 5°C auf einem Schüttler bei ständiger Agitation.

Am darauffolgenden Tag wurden zunächst die Antikörperlösungen aus den Schalen entfernt und dann die Membranen dreimal für 10 Minuten auf dem Schwenkschüttler mit TTBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Anschließend wurden die sekundären Antikörper (Tab. 2.10) in 5% Milchpulverlösung in TTBS in die Schalen mit den Membranstücken gegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur und niedriger Agitation. Daran schlossen sich erneut drei Waschschriffe für jeweils 10 Minuten in TTBS an.

## Primäre Antikörper (AK) und Verdünnungsfaktor des entsprechenden sekundären AK

<b>Anti-körper (AK)</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller/Referenz</b>	<b>Sek. AK</b>	<b>Verdünnung des sek. AK</b>
CaMKII	Maus (monoklonal)	1:10.000 (Expr.) 1:1.000 (Aktivität)	Aktivitätsassay Expression u. Aktivität	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Anti-Maus	1:10.000 (Expr.), 1:3.000 (Aktivität)
HDAC4	Kaninchen (polyklonal)	1:15.000	Aktivitätsassay	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA	Anti-Kaninchen	1:30.000
GAPDH	Maus (monoklonal)	1:60.000	Aktivitätsassay, Western Blot	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland	Anti-Maus	1:30.000
CaMKII	Kaninchen (polyklonal)	1:15.000	Western Blot	AG Bers, Davis, CA, USA	Anti-Kaninchen	1:10.000
pCaMKII pThr286	Maus (monoklonal)	1:500	Western Blot	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	Anti-Maus	1:5.000
Ox-CaMKII	Kaninchen (polyklonal)	1:3.000	Western Blot	AG Anderson, Boston, MA, USA	Anti-Kaninchen abcam	1:10.000
PLB	Maus (monoklonal)	1:10.000	Western Blot	Badrilla Ltd. Leeds Innovation Centre, Leeds, Großbritannien	Anti-Maus	1:10.000
pThr17 PLB	Kaninchen (polyklonal)	1:6.666	Western Blot	Badrilla Ltd. Leeds Innovation Centre, Leeds, Großbritannien	Anti-Kaninchen	1:10.000
RyR2	Kaninchen (polyklonal)	1:10.000	Western Blot	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA	Anti-Kaninchen	1:10.000
p-Ser2814 RyR2	Kaninchen (polyklonal)	1:3.333	Western Blot	Badrilla Ltd. Leeds Innovation Centre, Leeds, Großbritannien	Anti-Kaninchen	1:10.000

Tab. 2.9: Primäre AK und Verdünnung des primären und sekundären AK

## Sekundäre Antikörper

Spezies	Antikörper	Verwendung	Hersteller
Anti-Maus	ECL™ Peroxidase labelled anti-mouse antibody	Western Blot, Aktivitätsassay	GE Health Care, Chalfont St Giles, Großbritannien
Anti-Kaninchen	ECL™ Peroxidase labelled anti-rabbit antibody	Western Blot, Aktivitätsassay	GE Health Care, Chalfont St Giles, Großbritannien
Anti-Kaninchen abcam	Donkey anti-rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed	Western Blot: OxCaMKII	abcam®, Cambridge, Großbritannien

Tab. 2.10: Sekundäre Antikörper

### 2.2.5 Detektion mittels Chemielumineszenz

Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurden die Membranstücke kurz auf einem Papiertuch zum Abtrocknen gewendet und dann in eine Schale auf einen trockenen, sauberen Untergrund gelegt. Als Nächstes wurde Entwicklerlösung (Immobilon™Western, Chemieluminescent HRP Substrate, Lösungen A und B im Mischverhältnis 1:1) auf die Membranstücke aufgetragen und 5 Minuten inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Membranen wieder auf ein Papiertuch gelegt und abgetupft, um die restliche Entwicklerlösung zu entfernen. Dann wurden die Membranstücke zunächst in zugeschnittene Stücke auf Klarsichtfolie gelegt und die Folie wurde mit Tape in die Entwicklerkassette geklebt.

Anschließend wurden in einer Dunkelkammer Röntgenfilme in die Kassetten gelegt. Die Entwicklerkassetten wurden zur Belichtung der Filme für eine kurze Zeit geschlossen und daraufhin die Filme in einen Entwickler gegeben. Auf den entwickelten Filmen waren nun die Proteinbanden durch eine Schwärzung sichtbar.

### 2.2.6 Membran-Stripping

In manchen Fällen kam es dazu, dass auf den Filmen zu starke Hintergrundsignale sichtbar waren oder die Antikörperbindung an die Banden sehr unregelmäßig war. In diesen Fällen wurden mittels Membran-Stripping sämtliche Antikörper wieder von der Membran entfernt ohne die Proteine zu lösen und die Membranen erneut mit Antikörpern inkubiert, um möglicherweise eine bessere Bandenqualität zu erhalten. Hierzu wurde die Membran zunächst für 5 Minuten in TTBS gewaschen um die

restliche Entwicklerlösung zu entfernen. Daran schloss sich ein Waschschrift für 4 Minuten in ddH<sub>2</sub>O an. Dann wurden die Antikörper mit 0,4 molarer NaOH-Lösung durch achtminütiges Waschen von der Membran entfernt. Im nächsten Schritt wurde zunächst wiederum 4 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O und danach 5 Minuten mit TTBS gewaschen. Daraufhin konnten die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wieder durch eine Inkubation mit 5%iger Milchpulverlösung über eine Stunde geblockt werden. Die Antikörper-Inkubation und Signaldetektion wurden entsprechend wie beim ersten Mal durchgeführt.

### **2.3 Histondeacetylase 4 (HDAC4) -CaMKII-Bindungsassay**

Das HDAC4-CaMKII-Bindungsassay ist eine neuentwickelte Methode der AG Backs (Abteilung Molekulare Kardiologie und Epigenetik, Heidelberg) zur Bestimmung des Anteils der aktivierten CaMKII an der Gesamt-CaMKII in den Proben. Dabei wird die Bindung der aktivierten CaMKII an ein bead-gebundenes GST-HDAC4-Fusionsprotein genutzt. Dabei bindet die aktivierte CaMKII an die GST (Glutathion-S-Transferase) und die Phosphorylierungsstelle von HDAC4 (Histondeacetylase 4). 2006 wurde zum ersten Mal ein Paper der AG Backs mit Bezug zu dieser neuen Methode veröffentlicht [108]. In den letzten Jahren konnten auch andere Gruppen die Methode erfolgreich anwenden und so weiter etablieren [109,110]. Mit Hilfe dieses Assays lässt sich der Anteil der aktivierten CaMKII im Vergleich zur Gesamtexpression der CaMKII in den jeweiligen Proben ermitteln.

Das Bindungsassay erfolgt in vielen Teilschritten, die analog zur Methode des Western Blots zur Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalyse sind. Insbesondere die Vorbereitung der Proben unterscheidet sich jedoch bei dieser Technik.

#### **2.3.1 Herstellung von Gewebelysaten**

Die Herstellung der Lysate unterschied sich nur in der Zusammensetzung des verwendeten Lysepuffers von der Lysatherstellung beim üblichen Western Blot (s. Tab. 2.11).

Die restlichen Schritte einschließlich der Proteinkonzentrationsbestimmung waren identisch. Die Verdünnung auf eine Gesamtproteinkonzentration von 1mg/ml wurde mit Lysepuffer durchgeführt. Anschließend wurden die verdünnten Lysate bei -80°C aufbewahrt.

## Lysepuffer für das Aktivitätsassay

Tris Base	20 mmol/l
NaCl	200 mmol/l
NaF	20 mmol/l
NP40 (Nonylphenyl Polyethylenglycol)	0,5 Vol.-%
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	34,2 mmol/l
Phosphatase-Inhibitor (PhosSTOP EASYpack, Cocktail Tablets, Roche Diagnostics GmbH)	1 Tablette / 100 ml
Proteinase-Inhibitor (cOmplete Tablets EDTA-free, Cocktail Tablets, EASY-Pack, Roche Diagnostics GmbH)	1 Tablette / 200 ml

Tab. 2.11: Zusammensetzung des Lysepuffers für das Aktivitätsassay in ddH<sub>2</sub>O

### 2.3.2 Vorbereitung der GST-HDAC4-Beads

Zuerst wurden GST-Leer-Beads (AG Backs, Abteilung Molekulare Kardiologie und Epigenetik, Heidelberg) mit GST-Puffer 150 mmol/l (s. Tab. 2.12) dreimal gewaschen. Hierzu wurde jedes Mal Puffer zu den Leerbeads in ein Reaktionsgefäß zugegeben, dann für 3 Minuten bei 750 rpm und 4°C auf einem Thermomixer geschüttelt und anschließend für 1 Minute bei 1600rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Nach dem dritten Waschschrift wurden GST-Puffer 150 mmol/l (+Proteaseinhibitor (PI) 1 Tablette / 100 ml) und das Substrat GST-HDAC4 (AG Backs, Abteilung Molekulare Kardiologie und Epigenetik, Heidelberg) zu den Leerbeads gegeben und über Nacht auf einem Überkopfröller (12 Umdrehungen/min, 4°C) vermischt.

GST-Puffer 150 mmol/l NaCl, pH 7,4

Tris Base	20 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
HCl 37%	Einstellung pH 7,4

Tab. 2.12: Zusammensetzung des GST-Puffers 150 mmol/l NaCl für das Aktivitätsassay in ddH<sub>2</sub>O

Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgefäß mit den Beads zentrifugiert (1 min, 1600rpm, 4°C) und der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Nun schloss sich ein Waschschrift an. Hierzu wurden GST-Puffer 150 mmol/l (+ PI 1 Tablette / 100 ml) zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für drei Minuten auf einem Thermomixer (750 rpm, 4°C) geschüttelt, dann wurde es zentrifugiert (1 min, 1600rpm, 4°C) und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von GST-Puffer

150 mmol/l (+ PI 1 Tablette / 100 ml) war die Herstellung der GST-HDAC4-Beads abgeschlossen.

Da beim Aktivitätsassay für optimale Bindungsverhältnisse ca. 1,5-2 µg der GST-HDAC4-Beads zugegeben werden sollten, musste noch zur Abschätzung des benötigten Volumens an GST-HDAC4-Bead-Lösung eine Konzentrationsbestimmung der Beads durchgeführt werden. Hierzu wurde auf ein fertiges Precast-Gel ein Marker, BSA-Standard als Verdünnungsreihe, Proben-Ansätze und Überstand, der bei der Herstellung der Beads aufbewahrt worden war, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Running-Puffer bei 40 mA, 150 V, 50 W für ca. 1 Stunde. Im Anschluss daran wurde das Gel in das ChemieDoc MP Imaging System eingelegt und die Proteinbanden mit dem Programm ImageLab 5.2. aufgezeichnet. Die Stärke der Proteinbanden wurde visuell beurteilt und die Konzentration der GST-HDAC4-Bead-Lösung anhand der Banden der BSA-Standard-Verdünnungen abgeschätzt.

### 2.3.3 Aufbereitung der Proben

Für das weitere Verfahren wurden in eine Serie von beschrifteten Reaktionsgefäßen GST-Puffer 750 mmol/l (Tab. 2.13)+PI (1 Tablette/ 500 ml), die jeweiligen Probe und GST-HDAC4-Beads (2 µg/µl) zugegeben. Diese Reaktionsgefäße wurden danach für zwei Stunden bei 4°C auf einem Überkoprotator mit 5 Umdrehungen/min rotiert.

GST-Puffer 750 mmol/l NaCl, 1 Liter, pH 7,4

Tris Base	20 mmol/l
NaCl	750 mmol/l
HCl 37%	Einstellung pH 7,4

*Tab. 2.13: Zusammensetzung des GST-Puffers 750mmol/l NaCl für das Aktivitätsassay in ddH<sub>2</sub>O*

Im nächsten Schritt wurden GST-Leer-Beads aufbereitet und zugegeben. Hierzu wurden zunächst Leer-Beads in ein Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (1600 rpm, 1 min, 4°C) und der Überstand abgenommen und verworfen. Darauf folgten 3 Waschschriffe, bei denen jedes Mal GST-Puffer 150 mmol/l+PI (1 Tablette/ 500ml) zugegeben wurden. Das Reaktionsgefäß wurde für 3 Minuten auf dem Thermomixer geschüttelt (750 rpm, 4°C), dann zentrifugiert (1600 rpm, 1 min, 4°C) und im Anschluss der Überstand mit einer Pipette abgenommen und verworfen.

Nach Abschluss der Reinigung wurden die Leer-Beads in die Reaktionsgefäße zugegeben, in denen die Proben mit den GST-HDAC4-Beads vermischt worden waren.

Dieses Gemisch wurde nun wieder einem Reinigungsprozess in mehreren Schritten unterzogen. Zunächst wurden die Proben auf dem Thermomixer geschüttelt (3 min, 750 rpm, 4°C), dann zentrifugiert (2 min, 1600 rpm, 4°C) und daraufhin der Überstand abgenommen. Als nächstes wurde zweimal mit GST-Puffer 750 mmol/l+PI gewaschen. Hierzu wurden jedes Mal zunächst 500 µl Puffer zugegeben, dann wurden die Proben auf dem Überkoprotator rotiert (5 min, 5 Umdrehungen/min, 4°C), im Anschluss zentrifugiert (1600 rpm, 2 min, 4°C) und der Überstand wieder abgenommen und verworfen. Genau das gleiche Vorgehen wurde mit GST-Puffer 150 mmol/l+PI wiederholt. Um möglichst jeglichen Rest an Puffer zu entfernen wurde nochmals zentrifugiert (1600 rpm, 1 min, 4°C) und dann aller restlicher Puffer mit einer Kanüle abgezogen.

Für das weitere Vorgehen wurde zunächst Ladepuffer (s. Tab. 2.2) 1:5 mit GST-Puffer 150 mmol/l+PI verdünnt. Anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß verdünnter Ladepuffer pipettiert und die Lösungsgemische wurden auf dem Thermomixer bei 95°C geschüttelt (2 min, 500 rpm) und zentrifugiert (800 rpm, 2 min, 4°C). Durch die Zugabe des Ladepuffers und das Erhitzen wurden die Proteine aus Ihrer Bindung an die GST-HDAC4-Beads gelöst und befanden sich nun im Überstand, der in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Zu dem Überstand wurde darauf β-Mercaptoethanol (5% des Probenvolumens) zugegeben. Diese Proben wurden geschüttelt (500 rpm, 5 min, 95°C) und zentrifugiert (1600 rpm, 2 min, 4°C). Nach Abschluss dieser Aufbereitung lagen die fertigen Proben für die Proteinanalyse der CaMKII-Aktivität und HDAC4 als Protein zu Normalisierung vor.

Für die CaMKII-Proteinexpressionsanalyse wurden die Lysatverdünnungen (1mg/ml) 1:4 mit Ladepuffer/ Mercaptoethanol (10%) vermischt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.



### **2.3.4 Western Blot und Immundetektion**

Die Gelelektrophorese und der Proteintransfer erfolgten ähnlich wie unter 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben. Für die Bestimmung der CaMKII-Aktivität wurden die speziell mit den Beads aufbereiteten Proben auf ein Gel (12,5%) aufgetragen. Die gleichen Proben wurden für die HDAC4-Bestimmung auf einem 12,5%iges Gel verwendet. Für die CaMKII-Expression und GAPDH wurden die denaturierten Lysatverdünnung mit Ladepuffer verwendet und in die Taschen eines 8%iges Gels gefüllt.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zunächst bei konstant 90 V, max. 120 mA und max. 50 W gestartet und nach Separierung der Markerbanden die Spannung auf 130 V erhöht. Nach 1,5 bis 2 Stunden erreichte die Laufmittelbande den unteren Rand des Gels und die Elektrophorese wurde beendet.

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte über Nacht in einer Kühlkammer. Das Powersupply wurde hierzu auf eine konstante Spannung von 100 V und einen Maximalwert für den Stromfluss von 150 mA pro Kammer eingestellt.

Am darauffolgenden Tag wurde der Transfer beendet und die Membranen wurden gewaschen, mit Ponceau-Rot angefärbt und geschnitten. Die unspezifischen Bindungsstellen auf den Membranen wurden geblockt. Hierzu wurden die Membranen mit 5%iger Milchpulverlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Antikörperlösungen in 2,5%iger Milchpulverlösung auf die Membranen gegeben und die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Morgen wurden die Membranen gewaschen, mit sekundärem Antikörper inkubiert und erneut gewaschen. Die Detektion mittels Chemielumineszenz erfolgte wie bereits unter 2.2.5. beschrieben.

## 2.4 Auswertung der ermittelten Immunfluoreszenzsignale

### 2.4.1 Datenakquisition

Die Röntgenfilme wurden nach der Entwicklung in ein Bildgebungssystem (ChemieDoc™ MP Imaging System) eingelegt und die Aufnahmen der Proteinbandenschwärzungen mittels des Programms ImageLab 5.2 erstellt und als TIFF-Bilddatei abgespeichert. Die Bilddatei konnte nun mit dem Programm Image J (Image Processing and Analysis in Java) geöffnet werden und die Schwärzung der Banden auf dem Film quantifiziert werden. Um die Ermittlung der Bandenschwärzung zu erleichtern wurde das Image J-Plug-In multi measure verwendet. Die Zahlenwerte, die den Grad der Bandenschwärzung repräsentierten, wurden in Microsoft Excel-Tabellen übertragen. Nach Abzug der Hintergrundsignale erfolgte eine Normalisierung auf GAPDH.

Die ermittelten Zahlenwerte stehen für die Menge an Protein, die detektiert wurde, und besitzen keine Maßeinheit. Für den Vergleich wurde von einem metrischen Skalenniveau ausgegangen.

Da die Konzentrationen der Antikörperlösungen und die Belichtungszeiten der Röntgenfilme technikbedingten Schwankungen unterliegen, sind die Proteinbanden auf verschiedenen Western Blots schwer miteinander vergleichbar. Um eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Western Blots zu erreichen wurde eine Standardisierung eingeführt. Hierzu wurden bei jedem Western Blot zwei Proben als Vergleichsproben aufgetragen. Unter der Annahme, dass die Proteinkonzentration in ein und derselben Probe immer konstant ist, wurde die ermittelte Menge an Protein aus jeder einzelnen Probe immer auf diese Standardproben bezogen und so eine vergleichbare Basis geschaffen. Die jeweils verwendete Standardprobe wurde auf den Wert 1 festgelegt und alle anderen Proben dazu in Relation gesetzt.

Insgesamt lag eine Probenanzahl von 103 Proben vor, die untersucht wurden. Jedoch war auf Grund von schlechter Gewebequalität, insbesondere durch einen hohen Anteil an fibrotischem Gewebe, ein großer Anteil nicht auswertbar.

Zudem mussten wegen methodenbedingten Problemen einzelne Blots oder Teile davon verworfen werden.

Aus diesem Grund liegt die Auswertung der CaMKII-Expression, -Autophosphorylierung und -Oxidation und der RyR- und PLB-Phosphorylierung nur für eine Anzahl zwischen 16 und 31 Proben vor. Für das Bindungsassay gingen 34 Proben in die Auswertung mit ein. Insgesamt wurden Proben von 45 verschiedenen Patienten berücksichtigt

#### **2.4.2 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Programme IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM Analytics) und Stata MP14 (StataCorp). Dazu wurden neben den Proteindaten auch die im Vorfeld erhobenen klinischen Daten verwendet.

Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte mit dem t-Test. P-Werte  $<0,05$  wurden als signifikant gewertet. Der Zusammenhang zweier Variablen wurde mittels linearer Regressionsanalysen abgeschätzt. In Boxplot-Graphiken wurden der Median, die Interquartilsabstände und Ausreißer dargestellt. In der deskriptiven Statistik wurden bei kategorialen Variablen die Anzahl und der prozentuale Anteil an der gesamten Stichprobe angegeben. Bei kontinuierlichen Variablen wurden ebenfalls der Median und Interquartilsabstand (IQR) verwendet. Der Median mit IQR wurde gewählt, da diese statistischen Maßzahlen im Vergleich zum arithmetischen Mittel und der Standardabweichung robuster gegenüber Ausreißern in einer nicht normalverteilten Stichprobe sind.

Zur Einbeziehung der klinischen Daten wurde das Verfahren der Propensity Score Matching (PSM)-Analyse genutzt.

Beim PSM handelt es sich um eine statistische Analyse, die insbesondere in retrospektiven Studien Anwendung findet, bei denen eine randomisierte Zuteilung in den Gruppen nicht gewährleistet werden kann. Mit dieser Methode wird versucht bei der Ermittlung des Behandlungseffekts/Outcome bekannte Störfaktoren zu berücksichtigen, die zum einen Einfluss auf die Zuteilung zu einer Behandlungsgruppe haben und zum anderen auch Einfluss auf das Outcome nehmen.

Im ersten Schritt wird der Propensity Score ermittelt. Der Propensity Score ist die geschätzte Wahrscheinlichkeit für jeden einzelnen Patienten anhand der bekannten Störvariablen der Interventionsgruppe zugewiesen zu werden. Bei einer 1:1-randomisierten Studie beträgt er für alle Teilnehmer 0,5. Der Propensity Score ist somit ein Index, der beschreibt wie die bekannten Störvariablen kollektiv auf jedes

einzelne Individuum verteilt sind. Daraus folgt, dass Personen mit dem gleichen Propensity Score, die gleiche kollektive Verteilung an berücksichtigten Störvariablen besitzen und durch die balancierte Verteilung der Störvariablen diese besser vergleichbar sind. Als nächster Schritt erfolgt nun das Matching. Hierbei werden jeweils einem oder mehreren Personen der Interventionsgruppe ein oder mehrere Partner in der Kontrollgruppe mit gleichem oder ähnlichem Propensity Score zugeteilt. Falls allerdings in einer der Gruppen Testpersonen mit sehr extremen Propensity Scores vorkommen, für die kein Matching-Partner vorliegt, müssen diese aus der Analyse ausgeschlossen werden. Die Effektivität des PSM kann daran ausgemacht werden, ob die berücksichtigten Störvariablen nach dem Matching besser balanciert sind als vor dem Matching, das heißt ob sich die Mittelwerte der Störvariablen in den Gruppen weniger stark unterscheiden. Im abschließenden Schritt wird nun zwischen den Gruppen eine Analyse des Behandlungseffekts (Treatmenteffekt) auf die Outcomevariable durchgeführt. Bei kontinuierlichen Outcomevariablen erfolgt das in der Regel mit einem gepaarten t-test für normalverteilte oder ein Wilcoxon-Rangsummentest für nicht normalverteilte Variablen [111,112].

In der vorliegenden Arbeit wurde das PSM-Verfahren genutzt um den Effekt des OSAS auf die ermittelten Proteindaten unter Berücksichtigung von Störvariablen ermitteln zu können.

Das Vorliegen eines OSAS ( $AHI \geq 15$ ) wurde als Behandlung/Treatment definiert. Die Patienten ohne OSAS ( $AHI < 15$ ) bildeten die Kontrollgruppe. Der Treatmenteffekt ist die Auswirkung des Vorliegens eines OSAS auf die untersuchten Proteinexpressionen, -phosphorylierungen, -oxidationen oder Bindungsverhalten im Aktivitätsassay.

Dieses Vorgehen erschien zielführend, da Variablen bekannt sind, die sowohl die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines OSAS bei den Patienten beeinflussen, als auch Einfluss auf die Expressionen und Phosphorylierungen etc. der untersuchten Proteine besitzen. In der hier vorliegenden Auswertung wurden das Alter, der BMI, der Raucherstatus (Raucher/ Nichtraucher/ Exraucher) und präoperativ gemessene Laborwerte für CRP, Kreatinin und NT-proBNP in die Analyse aufgenommen.

### 3 Darstellung der eigenen Untersuchungen

#### 3.1 Klinische Daten der gesamten, in die Auswertung eingegangenen, Patientenkohorte

##### 3.1.1 Verteilung des AHI im gesamten Patientenkollektiv

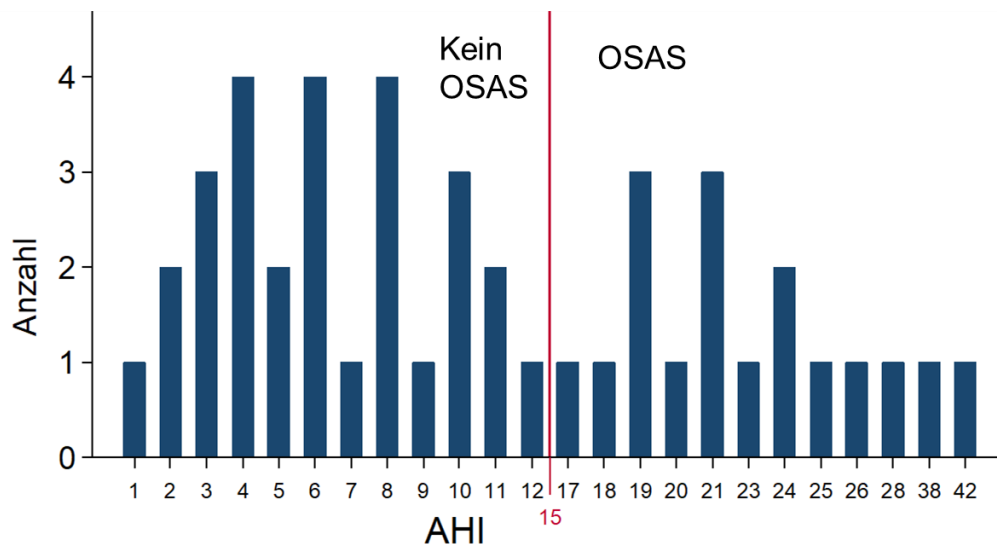


Abb. 3.1: Verteilung des AHI (in 1/1000/h) im Patientenkollektiv für das Bindungsassay

Anhand des präoperativ in der Polysomnographie erhobenen AHI wurden alle Patienten, die in die Auswertung gingen, in 2 Gruppen eingeteilt. Die Studienteilnehmer mit einem AHI  $< 15/h$  wurde als Gruppe „kein OSAS“ definiert und diejenigen mit einem AHI  $\geq 15/h$  als Gruppe „OSAS“. In Abb. 3.1. ist die Verteilung des AHI mit der Einteilung in die beiden Gruppen dargestellt. Insgesamt lag bei 28 Patienten ein AHI  $< 15/h$  vor mit einem mittleren AHI von 6,3/h in dieser Gruppe. Bei 17 untersuchten Personen lag der AHI bei  $\geq 15/h$ . Der Mittelwert des AHI in der OSAS-Gruppe lag bei 23,8/h.

### **3.1.2 Klinische Daten aller Patienten im Vergleich in Abhängigkeit vom Vorliegen eines OSAS**

Des Weiteren wurden die beiden Gruppen mit und ohne OSAS in Bezug auf klinische Charakteristika verglichen, die ebenfalls präoperativ erhoben worden waren (s. Tab. 3.1). Bei kategorialen Variablen ist die Anzahl der betroffenen Patienten und der prozentuale Anteil pro Gruppe angegeben, bei kontinuierlichen Variablen der Median und Interquartilsabstand (IQR) in der jeweiligen Patientengruppe. Mittels t-Test wurden die Unterschiede der Merkmalsausprägungen in den Gruppen auf Signifikanz überprüft.

Dabei zeigte sich, dass in der Gruppe mit Vorliegen eines OSAS die Patienten signifikant älter waren, eine geringere linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) besaßen und häufiger ein vergrößerter linker Herzvorhof vorlag.

Außerdem sind weitere Abweichungen der Verteilung der klinischen Charakteristika zwischen den Gruppen zu erkennen, die jedoch in der untersuchten Kohorte keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigten ( $p > 0,05$ ). So lässt sich feststellen, dass diejenigen Teilnehmer mit OSAS tendenziell höhere Werte für NT-pro-BNP, eine schlechtere Nierenfunktion (gemessen an Kreatinin und der GFR (glomeruläre Filtrationsrate)) und ein erhöhtes CRP (C-reaktives Protein, Entzündungswert) besaßen. Zudem waren bei Patienten mit OSAS häufiger die Diagnosen eines Diabetes mellitus und VHF gestellt worden. Unter den Patienten mit OSAS fanden sich weniger Raucher als unter den Patienten ohne OSAS.

		Kein OSAS (AHI<15)	OSAS (AHI ≥15)	p-Wert
Anzahl, n		28	17	
Alter, Median (IQR)		67 (60; 72,5)	74(68; 77)	<b>0,02*</b>
Geschlecht	Weiblich	4 (14%)	1 (6%)	<b>0,38</b>
	Männlich	24 (86%)	16 (94%)	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ], Median (IQR)		28,5 (25,3; 30)	31,6 (26,5; 32,8)	<b>0,37</b>
Raucher	Raucher ja	7 (26%)	1 (6%)	<b>0,18</b>
	Raucher nein	9 (33%)	9(56%)	
	Exraucher	11 (41%)	6 (38%)	
arterielle Hypertonie		24 (86%)	15 (88%)	<b>0,81</b>
Diabetes mellitus		6 (21%)	7 (41%)	<b>0,16</b>
Diagnose Vorhofflimmern	paroxysmales VHF	1 (4%)	2 (12%)	<b>0,28</b>
	permanentes VHF	2 (7%)	3 (18%)	
	kein VHF	25 (89%)	12 (71%)	
EF in % präoperativ, Median (IQR)		55,5 (50; 63,5)	42,5 (34; 55)	<b>0,03*</b>
Linkes Atrium vergrößert (>20 cm <sup>2</sup> )		4 (33%)	9 (75%)	<b>0,04*</b>
Hyperlipoproteinämie		18 (64%)	11 (65%)	<b>0,41</b>
NT-pro-BNP in [pg/ml], Median (IQR)		203 (83, 863)	705 (106, 3092)	<b>0,10</b>
Kreatinin [mg/dl], Median (IQR)		0,99 (0,88; 1,1)	1,06 (1; 1,19)	<b>0,15</b>
GFR [ml/min] CKD-EPI, Median (IQR)		75,5 (67; 84,5)	69,5 (53; 74,5)	<b>0,07</b>
CRP [mg/l], Median (IQR)		2,9 (2,9; 6,4)	6,0 (2,9; 8,35)	<b>0,27</b>

**Tab. 3.1: Präoperativ erhobene, klinische Daten aller Patienten, die in die Auswertung aufgenommen wurden, in Gegenüberstellung der Patienten ohne (AHI<15) und mit OSAS (AHI≥15).**

*IQR: Interquartilsabstand, BMI: Body-Mass-Index, aHTN: arterielle Hypertonie, DM: Diabetes mellitus, EF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion in der Echokardiographie, GFR: glomeruläre Filtrationsrate, berechnet anhand der CKD-EPI-Formel (Formel der Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) CRP: C-reaktives Protein, \*: Ergebnis signifikant, weil p<0,05*

## 3.2 HDAC4-CaMKII-Bindungsassay

Eine der wesentlichen Aufgabenstellungen, auf die diese Doktorarbeit eine Antwort geben sollte, war die Frage nach dem Unterschied des Anteils der aktivierten CaMKII an der gesamten CaMKII zwischen Patienten mit und ohne OSAS. Zur Bestimmung der aktivierten CaMKII wurde das HDAC4-CaMKII-Bindungsassay durchgeführt. Die Normalisierung der HDAC4 gebundenen CaMKII (aktivierte CaMKII) erfolgte auf HDAC4. Die HDAC4-CaMKII selbst wurde auf die CaMKII-Expression, normalisiert auf GAPDH, in den jeweiligen Proben bezogen. Vereinfacht wird im Folgenden von der CaMKII-Aktivität gesprochen.

### 3.2.1 Verteilung des AHI in der Patientenkohorte, bei denen ein Bindungsassay durchgeführt wurde

Zunächst erfolgte die Aufteilung der Studienteilnehmer, bei denen die CaMKII-Aktivität ermittelt wurde, in die beiden Gruppen entsprechend dem Vorliegen eines OSAS (vgl. 3.1.1).

Abb. 3.2 zeigt die Verteilung des AHI und die Aufteilung in die Gruppen in diesem Patientenkollektiv. Bei 20 Personen wurde ein  $AHI < 15/h$  ermittelt mit einem Mittelwert von 6,65/h. 14 Studienteilnehmer hatten einen  $AHI \geq 15$  und erfüllten somit das Kriterium für das Vorliegen eines OSAS. In dieser Gruppe lag der mittlere AHI bei 23,1/h.

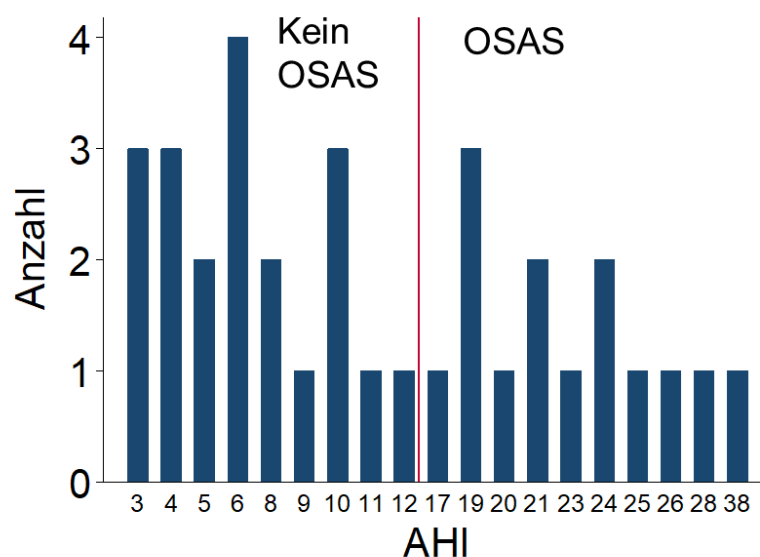


Abb. 3.2: Verteilung des AHI (in 1/Minute) im Patientenkollektiv für das Bindungsassay



### 3.2.2 Klinische Daten in der Patientenkohorte, bei denen ein Bindungsassay durchgeführt wurde

In Tab. 3.2 wurden die klinischen Daten im Patientenkollektiv für das Bindungsassay in den beiden OSAS-Gruppen gegenübergestellt.

		Kein OSAS (AHI<15)	OSAS (AHI ≥15)	p-Wert
Anzahl, n		20	14	
Alter, Median (IQR)		69 (61,5; 72,5)	74,5 (70, 77)	<b>0,02*</b>
Geschlecht	Weiblich	3 (15%)	1 (7%)	<b>0,48</b>
	Männlich	17 (85%)	13 (93%)	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ], Median (IQR)		29,4 (27,1; 30,6)	32,1 (26,8; 32,9)	<b>0,60</b>
Raucher	Raucher	5 (25%)	1 (7%)	<b>0,29</b>
	Nichtraucher	7 (35%)	8 (57%)	
	Exraucher	8 (40%)	5 (36%)	
arterielle Hypertonie		17 (85%)	13 (93%)	<b>0,48</b>
Diabetes mellitus		3 (15%)	5 (36%)	<b>0,52</b>
Diagnose Vorhofflimmern	paroxysmales VHF	1 (5%)	2 (14%)	<b>0,05*</b>
	permanentes VHF	0 (0%)	3 (21%)	
	kein VHF	19 (95%)	9 (65%)	
EF in %, präoperativ, Median (IQR)		55 (47, 67)	50 (34, 57)	<b>0,29</b>
Linkes Atrium vergrößert (>20 cm <sup>2</sup> )		3 (38%)	8 (80%)	<b>0,07</b>
Hyperlipoproteinämie		14 (70%)	9 (65%)	<b>0,48</b>
NT-proBNP in [pg/ml], Median (IQR)		164 (77, 439)	656 (110, 1899)	<b>0,03*</b>
Kreatinin [mg/dl], Median (IQR)		1,00 (0,90; 1,10)	1,06 (1,02; 1;19)	<b>0,19</b>
GFR [ml/min] CKD-EPI, Median (IQR)		74,5 (67; 82,5)	68 (59, 73)	<b>0,10</b>
CRP [mg/l], Median (IQR)		2,9 (2,9; 5,4)	5,8 (2,9; 6,9)	<b>0,48</b>

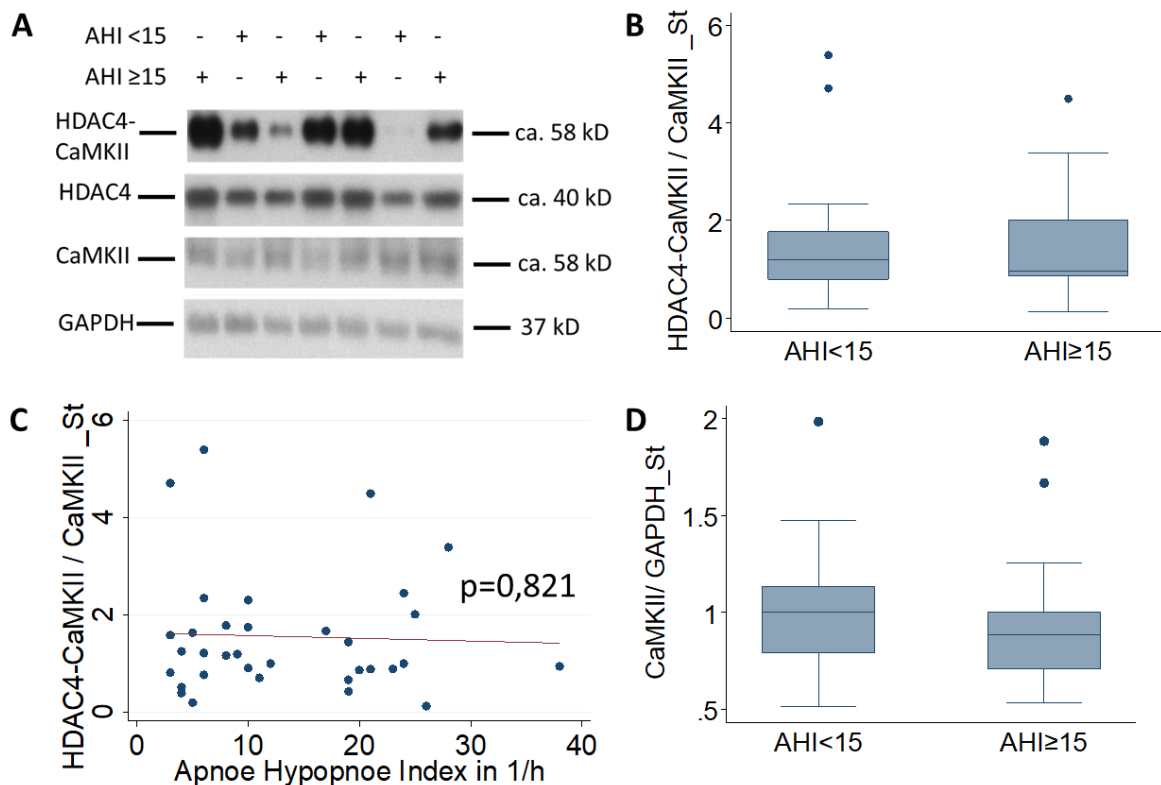
Tab. 3.2: Präoperativ erhobene, klinische Daten der Patienten, deren Gewebe mittels Bindungsassay untersucht wurde, in Gegenüberstellung der Patienten ohne (AHI<15) und mit OSAS (AHI≥15).

*IQR*: Interquartilsabstand, *BMI*: Body-Mass-Index, *aHTN*: arterielle Hypertonie, *DM*: Diabetes mellitus, *EF*: Ejektionsfraktion in der Echokardiographie, *GFR*: glomeruläre Filtrationsrate, berechnet anhand der CKD-EPI-Formel (Formel der Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration), *CRP*: C-reaktives Protein, \*: Ergebnis signifikant, weil  $p < 0,05$

Auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ist ersichtlich, dass die Patienten mit OSAS älter waren, häufiger VHF und erhöhte Werte an NT-proBNP (engl., N-terminal pro-brain natriuretic peptide) hatten. Zudem sind weitere Tendenzen zu erkennen, die aber in der kleinen Kohorte von 34 Patienten zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden führten. So besaßen die Patienten mit OSAS tendenziell einen vergrößerten linken Herzvorhof, eine schlechtere Nierenfunktion (gemessen an Kreatinin und der GFR (glomeruläre Filtrationsrate)) und eine schlechtere Linksventrikuläre Pumpfunktion (gemessen anhand der EF). Neben dem Übergewicht wurden weitere Diagnosen, die mit einem metabolischen Syndrom assoziiert sind, in den beiden Patientengruppen verglichen. Die betrachteten Diagnosen waren die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie. Bei dem Vergleich zeigten sich jedoch nur geringfügige Unterschiede. Außerdem war in der OSAS-Gruppe der Mittelwert des gemessenen CRP geringfügig höher und es fanden sich prozentual weniger Raucher als in der Kontrollgruppe.

### 3.2.3 Die CaMKII-Aktivität in Beziehung zum AHI und im Gruppenvergleich abhängig vom Vorliegen eines OSAS

Zur Beurteilung des Zusammenhangs der CaMKII-Aktivität mit dem OSAS wurde der AHI in Relation zur CaMKII-Aktivität gesetzt und auf einen Zusammenhang überprüft. In der linearen Regression zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der CaMKII-Aktivität und dem AHI (Abb. 3.3C).



**Abb. 3.3: CaMKII-Aktivität im HDAC4-CaMKII-Bindungsassay, standardisiert (St)**  
**A:** Originalregistrierungen für das HDAC4-CaMKII-Bindungsassay, die HDAC4 Gesamtproteinmenge und Gesamtproteinexpression von CaMKII und GAPDH  
**B:** Die HDAC4 gebundene CaMKII in den Patientengruppen ohne (AHI<15) und mit OSAS (AHI≥15), normalisiert auf HDAC4 und die CaMKII-Expression/GAPDH und Standardisiert (St). Dargestellt sind der Median, der Interquartilsabstand und die Extremwerte. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.  
**C:** Beziehung zwischen AHI und der HDAC4 gebundener CaMKII, normalisiert und standardisiert wie unter (B). Die Gerade zeigt die lineare Regression:  
 $f(x) = -0,006x + 1,629$  ( $p = 0,821$ , Standardfehler = 0,024)  
**D:** Die Expression der CaMKII in den Patientengruppen ohne (AHI<15) und mit OSAS (AHI≥15), normalisiert und standardisiert. Dargestellt sind der Median, die Interquartilsabstände und die Extremwerte. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Daraufhin wurden die Ergebnisse der CaMKII-Aktivität zwischen den OSAS-Gruppen verglichen. Die Patientengruppen mit und ohne OSAS unterschieden sich im direkten Vergleich nicht in ihrer CaMKII-Aktivität (Abb. 3.3B). Ein direkter Zusammenhang

zwischen CaMKII-Aktivität und OSAS konnte hier nicht festgestellt werden. Die CaMKII-Expression in den Gruppen ist in Abb. 3.3D dargestellt und wurde zur Normalisierung verwendet.

### 3.2.4 Regressionsanalyse klinischer Daten im Bezug zur CaMKII-Aktivität

Da sich im direkten Vergleich der CaMKII-Aktivität mit dem AHI und dem Vorliegen eines OSAS keine Korrelation und signifikante Unterschiede ergaben, wurde in Erwägung gezogen, dass klinische Störfaktoren bestehen könnten, die Einfluss auf den Zusammenhang zwischen dem Bestehen eines OSAS und der CaMKII-Aktivität nehmen. Im folgenden Schritt wurden nun einige der klinischen Parameter auf ihren Zusammenhang mit der CaMKII-Aktivität untersucht. Dafür wurden zum einen Faktoren gewählt, die im Zusammenhang mit der Entstehung des OSAS stehen, zum anderen solche, die einen möglichen Einfluss auf die CaMKII besitzen.

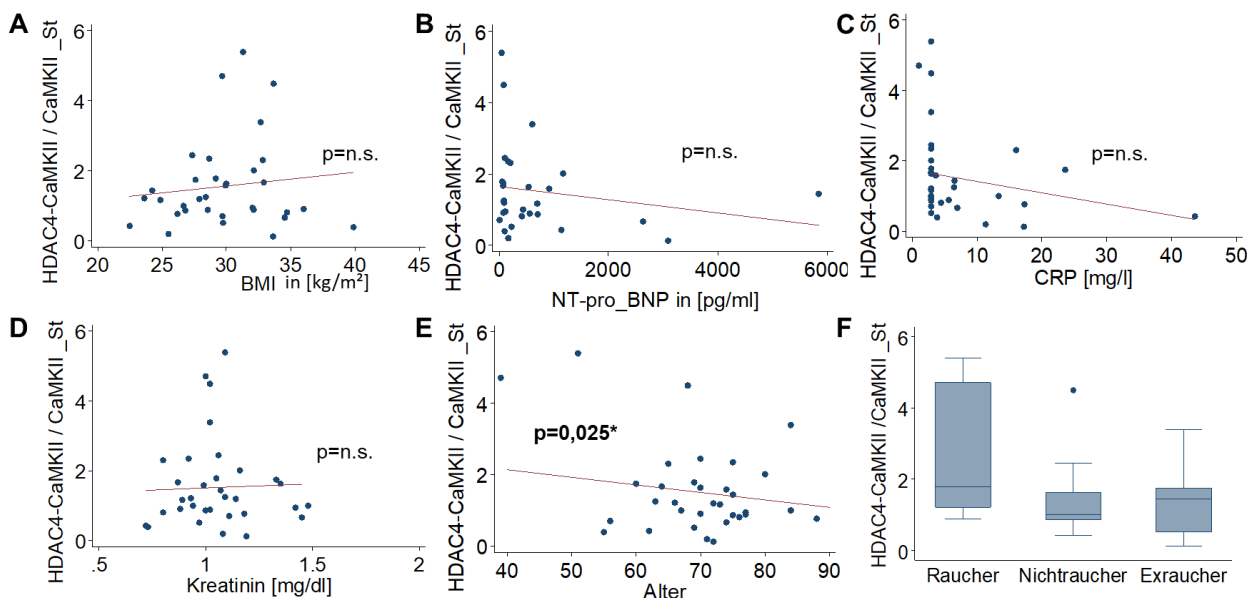


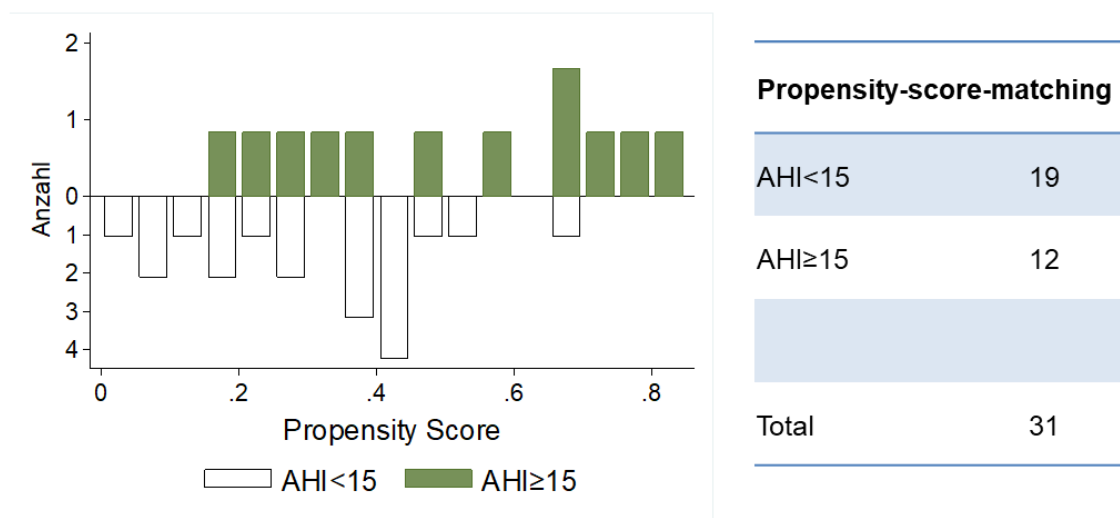
Abb. 3.4: Die klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus in Relation zur HDAC4 gebundenen CaMKII im Bindungsassay (normalisiert und standardisiert)

In Abb. 3.4 wurden der BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, das Alter und der Raucherstatus der Patienten in Beziehung zur CaMKII-Aktivität gesetzt. Dabei ließ sich eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Alter und der CaMKII-Aktivität beobachten. Die anderen Parameter zeigten in der vorliegenden Stichprobe keinen signifikanten Zusammenhang zur CaMKII-Aktivität.

### 3.2.5 PSM-Analyse der CaMKII-Aktivität in Abhängigkeit vom Vorliegen eines OSAS

Für die weitere Reduktion möglicher Störfaktoren wurden klinische Charakteristika anhand der statistischen Analyse berücksichtigt um deren Auswirkungen auf die Ergebnisse zu vermindern.

Deshalb wurde im folgenden Schritt ein PSM der Proben zwischen den OSAS-Gruppen anhand der klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus durchgeführt (s. Abb. 3.5).



**Abb. 3.5: Propensity Score Matching**

Dargestellt ist der Propensity Score für die verschiedenen Proben, der anhand der klinischen Daten (BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter, Raucher) ermittelt wurde. In die Analyse wurden alle 31 Patienten aufgenommen, für die Messwerte der CaMKII-Aktivität vorlagen. Es erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen (AHI < 15 und AHI ≥ 15).

Die Verteilung des Propensity Scores zeigte deutliche Unterschiede in der Interventions- und Kontrollgruppe (Abb. 3.5). Anhand des ermittelten Propensity Scores wurde daher anschließend ein Matching durchgeführt.

Die Mittelwerte der berücksichtigten Parameter zeigten nach Matching der Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr (s. Tab. 3.3A).

Anhand des PSM wurde nun eine Analyse des Treatmenteffekts auf die CaMKII-Aktivität durchgeführt. Dabei wurde als Treatment das Vorliegen eines OSAS definiert und die Patienten ohne OSAS bildeten die Kontrollgruppe (s. Tab. 3.3B).

A Variable	Unmatched (U) Matched (M)	Mittelwert		p-Wert
		AHI<15	AHI≥15	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	U M	28,15 28,86	29,89 30,08	<b>0,04</b> <b>0,45</b>
NTproBNP [pg/ml]	U M	945 4344	2481 1343	<b>0,02</b> <b>0,07</b>
CRP [mg/l]	U M	7,8098 12,133	10,15 8,34	<b>0,30</b> <b>0,36</b>
Kreatinin [mg/dl]	U M	1,03 1,07	1,38 1,08	<b>0,04</b> <b>0,82</b>
Alter [Jahre]	U M	66,54 75,83	71,03 73,17	<b>0,02</b> <b>0,49</b>
Raucher [relativer Zahlenwert]*	U M	2,1 2,33	2,5 2,33	<b>0,29</b> <b>1,00</b>

**B Treatmenteffekt (AHI≥ 15 vs. AHI<15) auf CaMKII-Aktivität/Expression**

Koeffizient	Standardfehler	P-Wert	95%- Konfidenzintervall
0,597	0,191	<b>0,002</b>	[0,222; 0,972]

Tab. 3.3: Propensity Score Matching und Treatmenteffekt.

**A:** Mittels PSM wurde der Einfluss verschiedener Variablen auf die CaMKII-Aktivität verringert. Nach Matching zeigten die Mittelwerte in den zwei Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr ( $p>0,05$ ).

\*relativer Zahlenwert für Modus  
Raucher: Nichtraucher=1,  
Extraucher=2, Raucher=3

**B:** Der Treatmenteffekt als Maß des Einflusses des OSAS auf die CaMKII-Aktivität. Es besteht ein signifikanter Unterschied ( $p=0,002$ ) zwischen den Gruppen.

Nach Berücksichtigung der Störfaktoren durch die Methode des PSM zeigte sich nun ein signifikanter Unterschied ( $p=0,002$ ) der CaMKII-Aktivität zwischen den Gruppen mit und ohne OSAS, der zuvor nicht nachgewiesen werden konnte. Durch die Analyse wurde ein Koeffizient einer um 0,597 stärkeren CaMKII-Aktivität in der Gruppe der OSAS-Patienten ermittelt, wobei die gemessenen Werte der CaMKII-Aktivität in einem Intervall zwischen 0,123 und 5,396 lagen mit einem Mittelwert von 1,554.

### 3.3 Proteinanalysen mittels Western Blot-Technik

Ein weiteres Aufgabenfeld der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der relativen Proteinmengen und der Anteil an phosphorylierten bzw. oxidierten Proteinen mittels Western Blot-Verfahrens im Vorhofmyokardgewebe der Patienten.

In diesen Versuchen wurden folgende Proteine analysiert:

- die CaMKII mit Expression, Autophosphorylierung und Oxidation,
- der Ryanodinrezeptor mit Phosphorylierung an der CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstelle Serin 2814 und
- das Phospholamban mit Phosphorylierung an der CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstelle Threonin 17.

#### 3.3.1 Verteilung des AHI bei den Patienten, bei denen Daten mittels Western Blot-Analysen erhoben wurden

Auch die Ergebnisse der Proteinanalysen sollten in ihrem Verhältnis zum AHI und OSAS untersucht werden. Deshalb wurde der AHI für das entsprechende Patientenkollektiv ermittelt und eine Einteilung nach dem Vorliegen eines OSAS vorgenommen, wie unter 3.1.1 beschrieben.

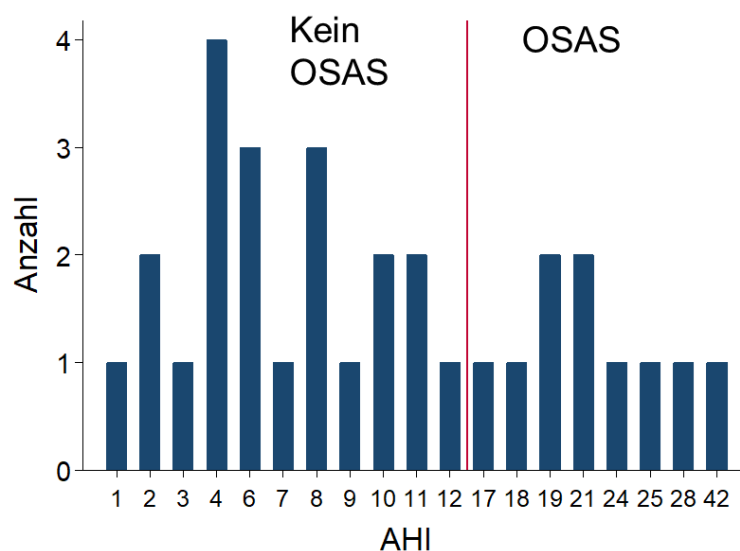


Abb. 3.6: Verteilung des AHI im Patientenkollektiv für die Western-Blot-Analysen

Die Verteilung des AHI der Patienten, mit deren Herzvorhofgewebe Western Blot-Versuche durchgeführt wurden, ist in Abb. 3.6 dargestellt. Von den insgesamt 31 Patienten zeigten 21 Patienten im Schlafapnoe-Screening einen AHI <15

(Mittelwert 6,5/h) und 10 Patienten einen AHI-Wert  $\geq 15$  (Mittelwert 23,4) und wiesen somit definitionsgemäß ein OSAS auf.

### **3.3.2 Klinische Daten der Patienten, bei denen Ergebnisse mittels Western Blot-Analysen erhoben wurden**

Für die weiterführenden statistischen Analysen sollten auch in diesem Patientenkollektiv klinische Daten berücksichtigt werden. In Tab. 3.4 wurden die klinischen Daten der Patienten in den beiden Patientengruppen gegenübergestellt. Bei den kategorialen Variablen wurden wiederum die Anzahl der betroffenen Patienten und der prozentuale Anteil pro Gruppe angegeben, bei den kontinuierlichen Variablen der Median und Interquartilsabstand in der jeweiligen Patientengruppe. Mittels t-Test wurden die Unterschiede der Merkmalsausprägungen in den Gruppen auf Signifikanz überprüft.

Auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ist ersichtlich, dass die Patienten mit OSAS eine geringere linksventrikuläre EF (Ejektionsfraktion) und häufiger einen vergrößerten linken Vorhof vorwiesen. Zudem ließen sich auch in der hier untersuchten Patientengruppe Tendenzen beobachten, die in der kleinen Kohorte von 31 Patienten keine statistisch signifikanten Unterschiede ergaben. So waren die Patienten mit OSAS tendenziell älter, mehr Männer als Frauen, hatten häufiger die Diagnose eines Vorhofflimmerns und eine schlechtere Nierenfunktion (gemessen an Kreatinin und der GFR). Die Laborwerte für NT-proBNP, Kreatinin und CRP waren bei den untersuchten Patienten in der OSAS-Gruppe im Durchschnitt höher. Hingegen konnten keine oder nur sehr geringe Unterschiede des BMI, Raucherstatus und der Häufigkeit der Diagnosen arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie festgestellt werden.



		Kein OSAS (AHI<15)	OSAS (AHI ≥15)	p-Wert
Anzahl, n		21	10	
Alter, Median (IQR)		66 (60; 72)	72,5 (62; 77)	<b>0,16</b>
Geschlecht	Weiblich	3 (14%)	0 (0%)	<b>0,21</b>
	Männlich	18 (86%)	10 (100%)	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ], Median (IQR)		27.9 (25,1; 29,7)	27,9 (24,2; 32,1)	<b>0,97</b>
Raucher	Raucher ja	5 (25%)	1 (11%)	<b>0,69</b>
	Raucher nein	6 (30%)	3 (33%)	
	Exraucher	9 (45%)	5 (56%)	
arterielle Hypertonie		17 (81%)	8 (80%)	<b>0,95</b>
Diabetes mellitus		6 (29%)	4 (40%)	<b>0,52</b>
Diagnose Vorhofflimmern	paroxysmales VHF	1 (5%)	2 (20%)	<b>0,25</b>
	permanentes VHF	2 (10%)	2 (20%)	
	kein VHF	18 (85%)	6 (60%)	
EF in % präoperativ, Median (IQR)		55,5 (50,5; 63,5)	37 (28,5; 47,5)	<b>0,02*</b>
Linkes Atrium vergrößert (>20 cm <sup>2</sup> )		2 (29%)	6 (86%)	<b>0,03*</b>
Hyperlipoproteinämie		13 (62%)	6 (60%)	<b>0,92</b>
NT-proBNP in [pg/ml], Median (IQR)		203 (88, 863)	872 (106, 4388)	<b>0,19</b>
Kreatinin [mg/dl], Median (IQR)		0,97 (0,84; 1,11)	1,04 (0,87; 1;09)	<b>0,83</b>
GFR [ml/min] CKD-EPI, Median (IQR)		76 (72; 85)	71 (59; 97)	<b>0,36</b>
CRP [mg/l], Median (IQR)		2,9 (2,9; 9,25)	5,8 (2,9; 7,7)	<b>0,50</b>

**Tab. 3.4: Präoperativ erhobene, klinische Daten der Patienten, deren Gewebe mittels Western-Blot-Analyse untersucht wurden, in Gegenüberstellung der Patienten mit Schlafapnoe (AHI≥15) und ohne Schlafapnoe (AHI<15).**

*IQR: Interquartilsabstand, BMI: Body-Mass-Index, aHTN: arterielle Hypertonie, DM: Diabetes mellitus, EF: Ejektionsfraktion in der Echokardiographie, GFR: glomeruläre Filtrationsrate, berechnet anhand der CKD-EPI-Formel (Formel der Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration), CRP: C-reaktives Protein, \*: Ergebnis signifikant, weil p<0,05*

### 3.3.3 Statistische Analysen der CaMKII-Expression

Als erste Western-Blot-Analyse wurde die Gesamtexpression der CaMKII, normalisiert auf GAPDH, in den Proben ermittelt.

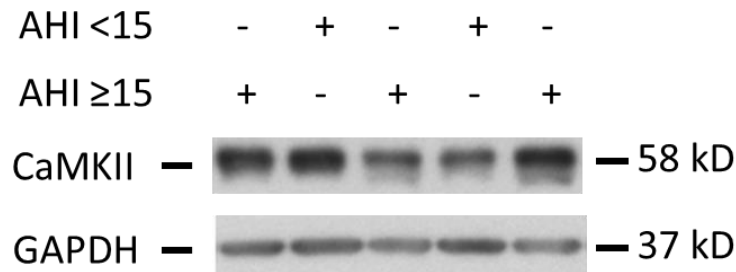


Abb. 3.7: Originalregistrierungen der CaMKII und GAPDH

In der linearen Regressionsanalyse zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem AHI und der CaMKII-Expression. Auch im Vergleich der OSAS-Gruppen konnte kein Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 3.8).

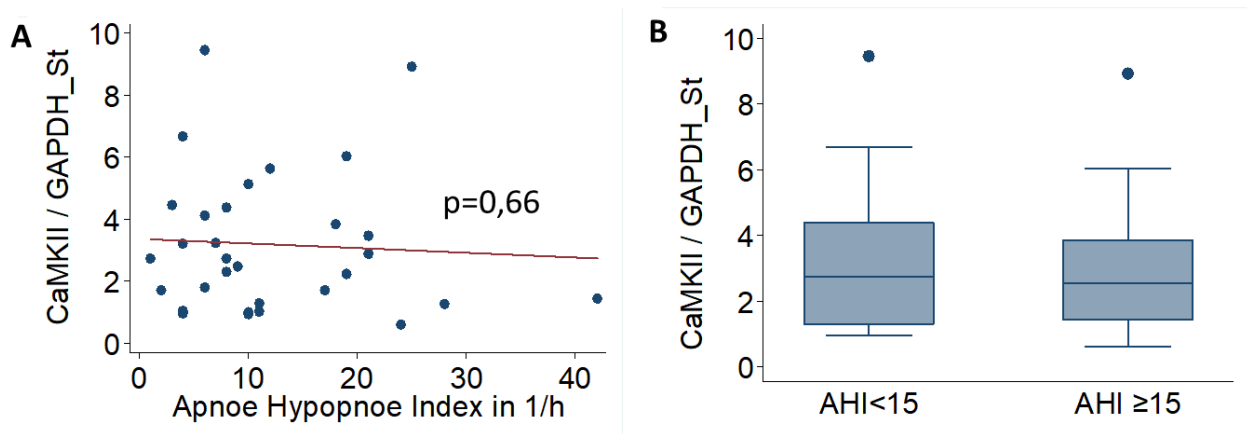


Abb. 3.8: CaMKII -Expression (CaMKII/GAPDH), standardisiert (St)

**A:** Beziehung zwischen AHI und dem Quotienten CaMKII/GAPDH. Die Gerade zeigt die lineare Regression  $f(x) = -0,006x + 0,63$ ; Standardfehler=0,01;  $p=0,66$

**B:** Die CaMKII-Expression in den Patientengruppen ohne (AHI <15) und mit OSAS (AHI ≥15). Dargestellt sind der Median, der Interquartilsabstand und Extremwerte. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und der CaMKII-Expression untersucht. Dieser ist in Abb. 3.9 dargestellt. In der linearen Regressionsanalyse ließ sich keine signifikante Korrelation der CaMKII-Expression mit dem BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin und Alter nachweisen. Es zeigte sich auch kein signifikanter Zusammenhang zum Raucherstatus.

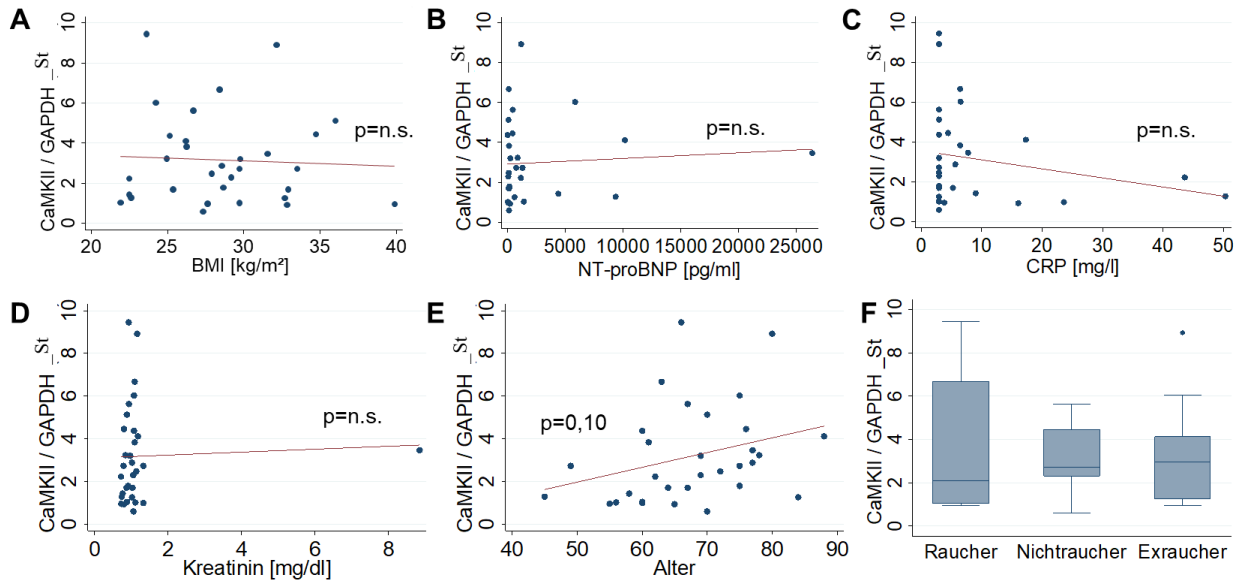


Abb. 3.9: Die klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus in Relation zur CaMKII-Expression (normalisiert und standardisiert)

Daraufhin wurde das PSM zur Berücksichtigung der klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus durchgeführt. Die Verteilung des Propensity Scores in den beiden Gruppen ist in Abb. 3.10 dargestellt.

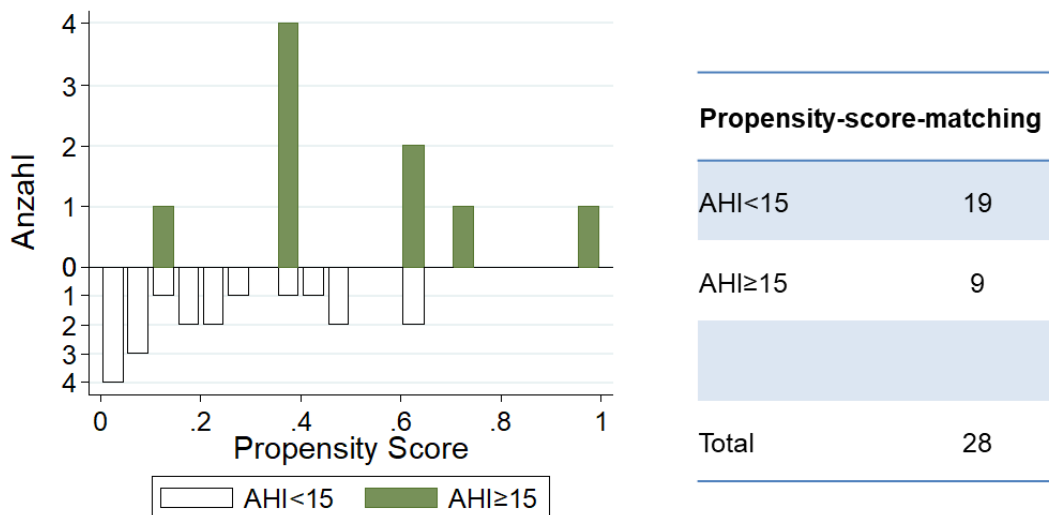


Abb. 3.10: Propensity Score Matching  
Dargestellt ist der Propensity Score, der anhand der klinischen Daten (BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter, Raucher) in den jeweiligen Gruppen ermittelt wurde.

Im nächsten Schritt erfolgte anhand des Propensity Scores das Matching der beiden Gruppen.

**A**

Variable	Unmatched (U) Matched (M)	Mittelwert		p-Wert
		AHI<15	AHI≥15	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	U M	28,15 28,79	29,89 28,68	<b>0,04</b> <b>0,93</b>
NTproBNP [pg/ml]	U M	946 133	2481 3994	<b>0,02</b> <b>0,20</b>
CRP [mg/l]	U M	7,81 12,1	10,15 9,21	<b>0,30</b> <b>0,60</b>
Kreatinin [mg/dl]	U M	1,03 1,15	1,38 1,87	<b>0,04</b> <b>0,42</b>
Alter [Jahre]	U M	66,54 63,55	71,03 72,22	<b>0,02</b> <b>0,02</b>
Raucher [relativer Zahlenwert]*	U M	1,95 2,42	2,00 3,0	<b>0,69</b> <b>0,04</b>

**B Treatmenteffekt (AHI≥ 15 vs. AHI<15) auf die CaMKII-Expression**

Koeffizient	Standard- fehler	P-Wert	95%-Konfidenzintervall
1,21	0,515	<b>0,019</b>	[0,195; 2,216]

Tab. 3.5: Propensity Score Matching und Treatmenteffekt

**A:** Mittels PSM wurde der Einfluss verschiedener Variablen auf die CaMKII-Expression berücksichtigt. Nach Matching zeigten die Mittelwerte in den zwei Gruppen, bis auf den Parameter Alter und Raucher, keine signifikanten Unterschiede mehr.

\*relativer Zahlenwert für Modus Raucher: Nichtraucher=1, Exraucher=2, Raucher=3

**B:** Der Treatmenteffekt als Maß des Einflusses des OSAS auf die CaMKII-Expression. Es ist ein signifikanter Unterschied ( $p=0,019$ ) zwischen den Gruppen erkennbar.

Nach dem PSM waren die Unterschiede in den Mittelwerten bis auf Alter und Raucherstatus zwischen den beiden Gruppen ausgeglichen (s. Tab. 3.5A).

Daraufhin konnte als Treatmenteffekt ein signifikanter Unterschied ( $p=0,019$ ) der CaMKII-Expression zwischen der Gruppe der Patienten ohne und mit OSAS nachgewiesen werden. Aus dem resultierenden positiven Koeffizienten ist zu entnehmen, dass bei Patienten mit OSAS eine höhere Expression der CaMKII vorliegt (s. Tab. 3.5B).

### 3.3.4 Statistische Analysen der Autophosphorylierung der CaMKII an Threonin 287

Als nächstes wurde mit den Western-Blot-Versuchen die Autophosphorylierung der CaMKII an Threonin 287 als Zeichen für deren Aktivität ermittelt (Abb. 3.11). Dabei ist der Anteil der phosphorylierten CaMKII an der gesamten, in der Probe vorhandenen CaMKII-Proteinmenge die entscheidende Kenngröße. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden anschließend auf ihren Zusammenhang zum AHI und OSAS analysiert.

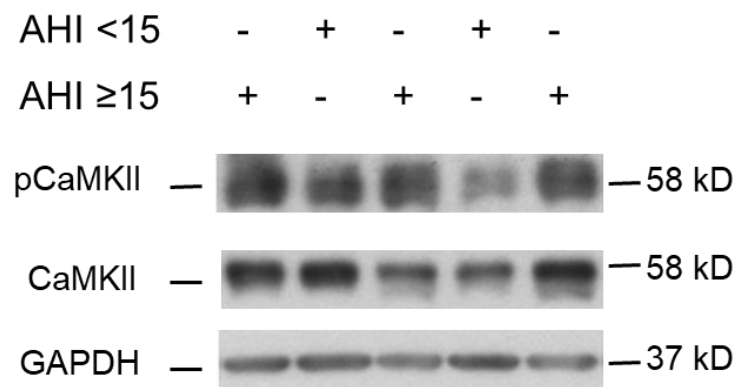


Abb.3.11: Originalregistrierungen der autophosphorylierten pCaMKII, CaMKII-Gesamtexpression und GAPDH

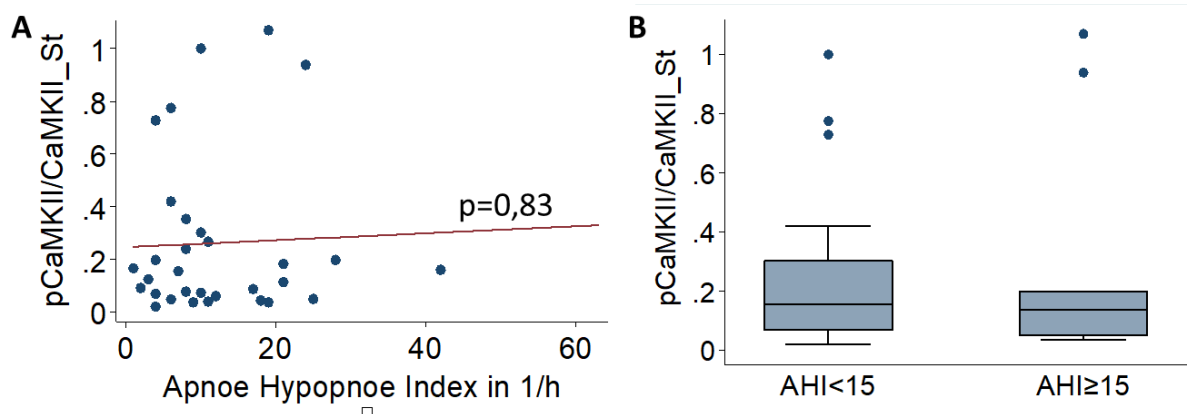


Abb. 3.12: CaMKII -Autophosphorylierung (pCaMKII/CaMKII), standardisiert (St),  
**A:** Beziehung zwischen AHI und dem Quotienten pCaMKII/CaMKII. Die Gerade zeigt die lineare Regression  $f(x) = 0,001x + 0,246$ ; Standardfehler = 0,001;  $p=0,83$   
**B:** Die CaM-Kinase-Phosphorylierung in den Patientengruppen ohne (AHI <15) und mit OSAS (AHI ≥15). Dargestellt sind der Median, der Interquartilsabstand und Extremwerte. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

In der untersuchten Patientenkohorte ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Autophosphorylierung der CaMKII zwischen Patienten mit und ohne OSAS feststellen. Mit einem p-Wert von 0,83 ist die Annahme einer signifikanten Erhöhung der Autophosphorylierung der CaMKII bei Erhöhung des AHI abzulehnen (s. Abb. 3.12).

Zur Ergänzung wurde die im PSM berücksichtigten, klinischen Charakteristika auf einen Zusammenhang zur CaMKII-Autophosphorylierung untersucht. Die resultierenden Ergebnisse sind in Abb. 3.13 dargestellt.

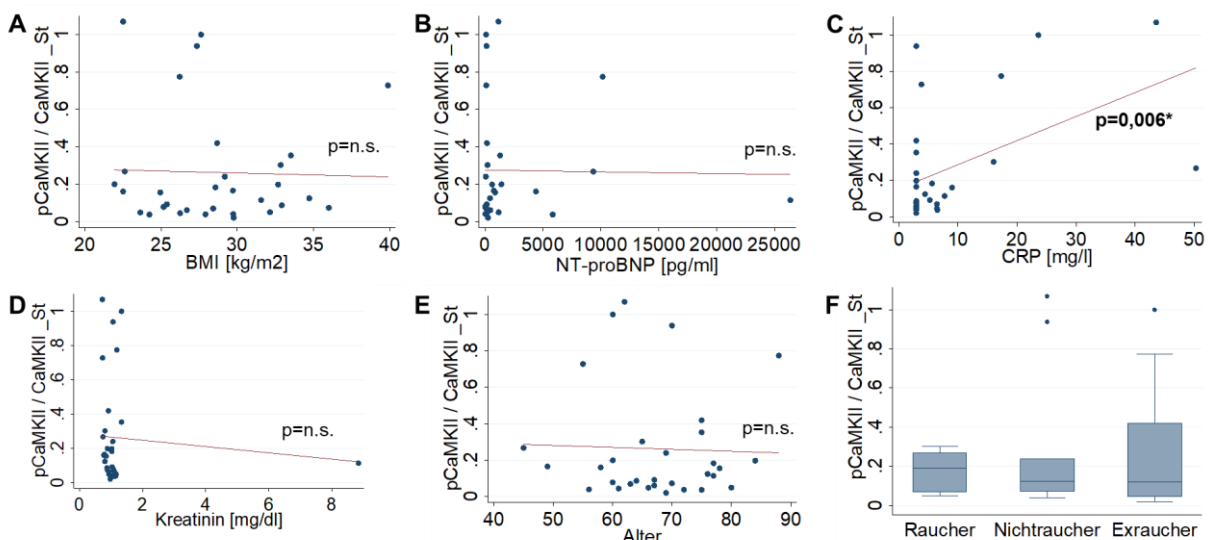


Abb. 3.13: Die klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus in Relation zur CaMKII-Autophosphorylierung (normalisiert und standardisiert)

Bei der Analyse der Zusammenhänge zwischen der CaMKII-Autophosphorylierung und klinischen Parametern ergab sich eine signifikante positive Korrelation zum CRP ( $p=0,006$ ).

Basierend auf den Werten für BMI, NT-proBNP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus ließ sich hingegen keine Beziehung zur autophosphorylierten CaMKII nachweisen.

Auch für den Vergleich der beiden Gruppen mit und ohne OSAS bezüglich der CaMKII-Autophosphorylierung sollte der Einfluss der klinischen Parameter verringert werden. Dazu wurde erneut das PSM angewandt und die Parameter BMI, NT-pro-BNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus berücksichtigt.

Die somit ermittelte Verteilung des Propensity Scores ist in Abb. 3.14 zu sehen. Dabei musste eine Messung ausgeschlossen werden, die aufgrund ihres extremen Propensity Scores nicht in das Matching einbezogen werden konnte.

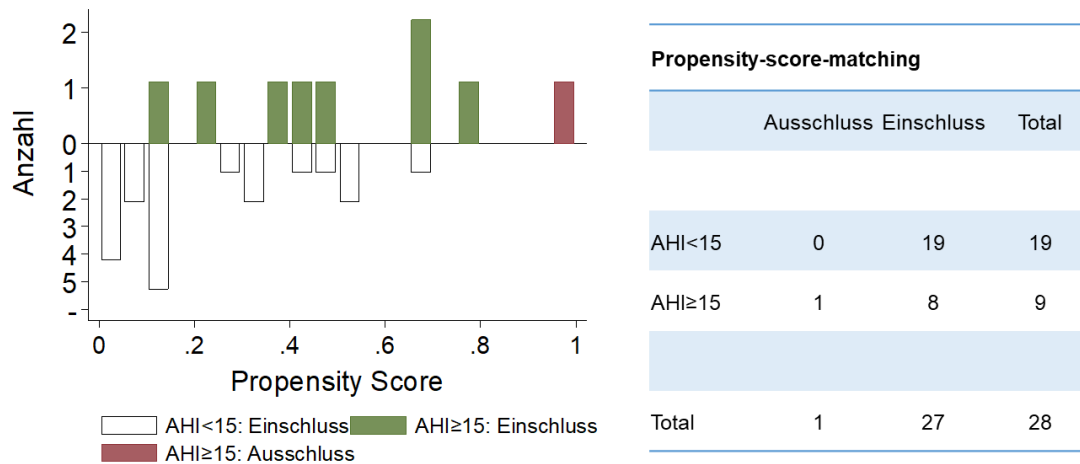


Abb. 3.14: Propensity Score Matching

Dargestellt ist der Propensity Score, der anhand der klinischen Daten (BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter, Raucher) ermittelt wurde. Es erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen (AHI<15 und AHI≥15). Für das PSM wurde in der Gruppe mit AHI≥15 eine Messung ausgeschlossen.

Variable	Unmatched (U) Matched (M)	Mittelwert		p-Wert
		AHI<15	AHI≥15	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	U M	28,15 29,24	29,89 28,32	<b>0,04</b> <b>0,58</b>
NTproBNP [pg/ml]	U M	946 552	2481 1198	<b>0,02</b> <b>0,39</b>
CRP [mg/l]	U M	7,81 2,90	10,15 9,21	<b>0,30</b> <b>0,22</b>
Kreatinin [mg/dl]	U M	1,03 1,00	1,38 1,00	<b>0,04</b> <b>0,92</b>
Alter [Jahre]	U M	66,54 70,86	71,03 71,63	<b>0,02</b> <b>0,84</b>
Raucher [relativer Zahlenwert]*	U M	1,95 3,00	2,00 2,50	<b>0,69</b> <b>0,08</b>

Tab. 3.6: Propensity Score Matching und Treatmenteffekt.

**A:** Mittels PSM wurde der Einfluss verschiedener Variablen auf die CaMKII-Phosphorylierung verringert. Nach Matching zeigten die Mittelwerte in den zwei Gruppen keinen signifikanten Unterschied mehr ( $p > 0,05$ ).

\*relativer Zahlenwert für Modus Raucher: Nichtraucher=1, Exraucher=2, Raucher=3

B Treatmenteffekt (AHI≥15 vs. AHI<15) auf pCaMKII/CaMKII			
Koeffizient	Standardfehler	P-Wert	95%-Konfidenzintervall
0,188	0,092	<b>0,041</b>	[0,007; 0,370]

**B:** Der Treatmenteffekt wurde als Maß des Einflusses des OSAS auf die CaMKII-Phosphorylierung verwendet. Es ist ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,041$ ) zwischen den Gruppen erkennbar.

Durch das PSM wurde der Einfluss der klinischen Parameter auf das Vorliegen eines OSAS reduziert und die Mittelwerte zeigten in den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr (s. Tab. 3.6A).

Mittels des PSM wurde nun eine Analyse des Treatmenteffekts auf die CaMKII-Phosphorylierung zwischen den Gruppen ohne und mit OSAS durchgeführt (s. Tab. 3.6B). Mit einem p-Wert von 0,041 ist dabei ein signifikanter Unterschied der CaMKII-Autophosphorylierung in Abhängigkeit des Vorliegens eines OSAS erkennbar. Der vorliegende positive Koeffizient lässt auf eine verstärkte pCaMKII in der Gruppe der OSAS-Patienten schließen.



### 3.3.5 Statistische Analysen der Oxidation der CaMKII an Methionin 281/282

Als weiterer Parameter für die Aktivierung der CaMKII wurde die Oxidation der CaMKII ermittelt und auf die Gesamtexpression an CaMKII in der Probe bezogen (Abb. 3.15).

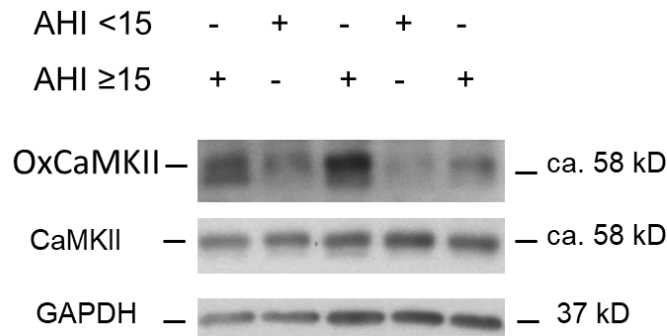


Abb. 3.15: Originalregistrierungen der oxidierten OxCaMKII, CaMKII und GAPDH

Die CaMKII-Oxidation wurde ins Verhältnis mit dem AHI gesetzt und ist in Abb. 3.16A dargestellt. Hierbei ist kein statistisch signifikanter Zusammenhang erkennbar. Auch im Vergleich der Gruppen mit AHI≥15 und AHI<15 ist kein signifikanter Unterschied feststellbar (Abb. 3.16B).

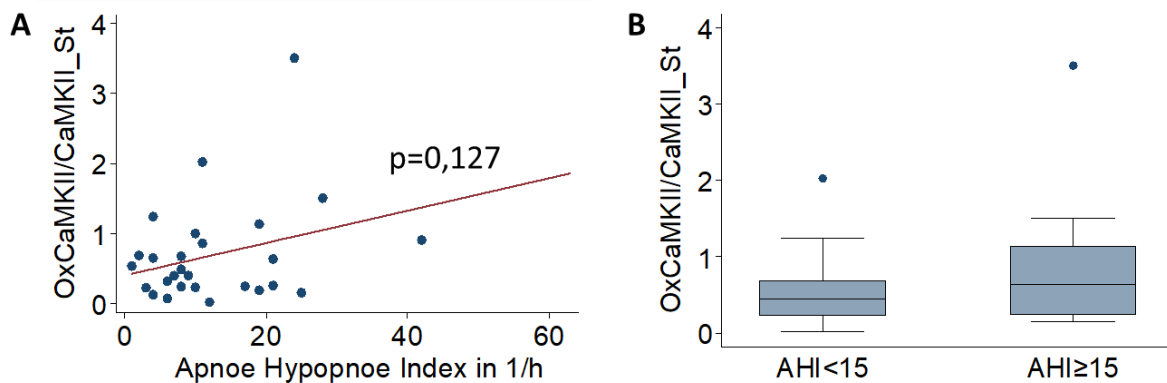


Abb. 3.16: CaMKII-Oxidation (OxCaMKII/CaMKII) standardisiert (St),  
**A:** Beziehung zwischen AHI und dem Quotienten OxCaMKII/CaMKII. Die Gerade zeigt die lineare Regression,  $f(x)=0,023x + 0,405$ ; Standardfehler= 0,014,  $p=0,127$   
**B:** Die CaM-Kinase-Oxidation in den Patientengruppen ohne (AHI<15) und mit OSAS (AHI≥15), dargestellt sind der Median, der Interquartilsabstand und Extremwerte. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Anschließend wurden klinische Parameter der Patienten auf ihren Bezug zur CaMKII-Oxidation in den Gewebeproben untersucht (Abb. 3.17). Hierbei ließ sich kein signifikanter Zusammenhang erkennen.

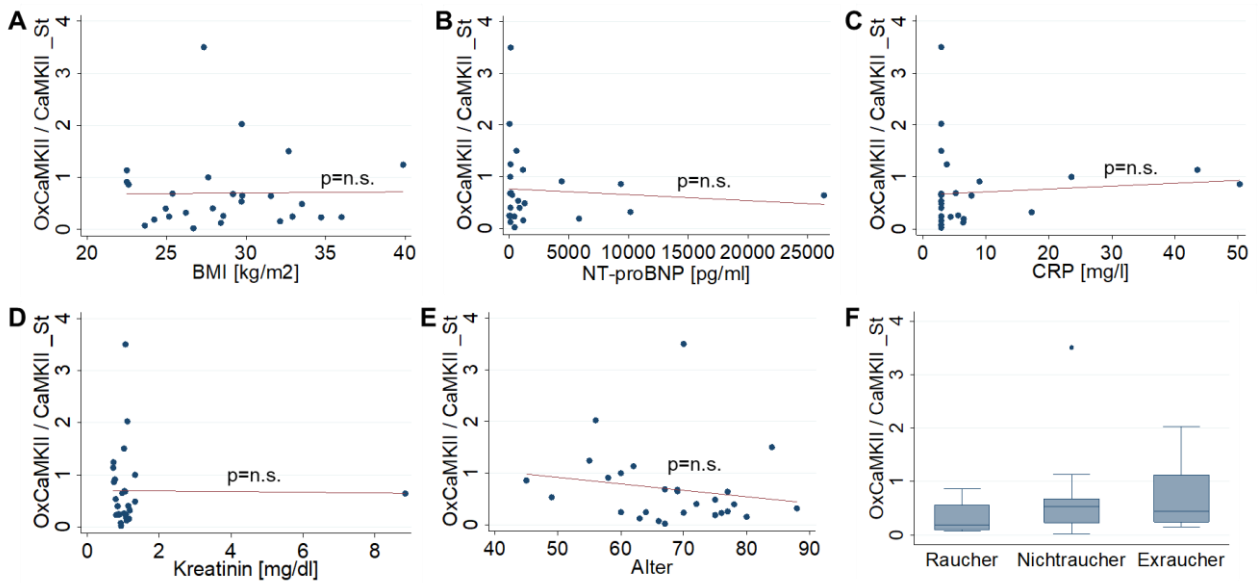


Abb. 3.17: Die klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus in Relation zur CaMKII-Oxidation (normalisiert und standardisiert)

Durch Einbeziehung der klinischen Parameter mittels PSM wurde analog zu den vorangegangenen Analysen der Einfluss der Störfaktoren berücksichtigt. Die Verteilung des Propensity Scores ist der Abb. 3.18 zu entnehmen.

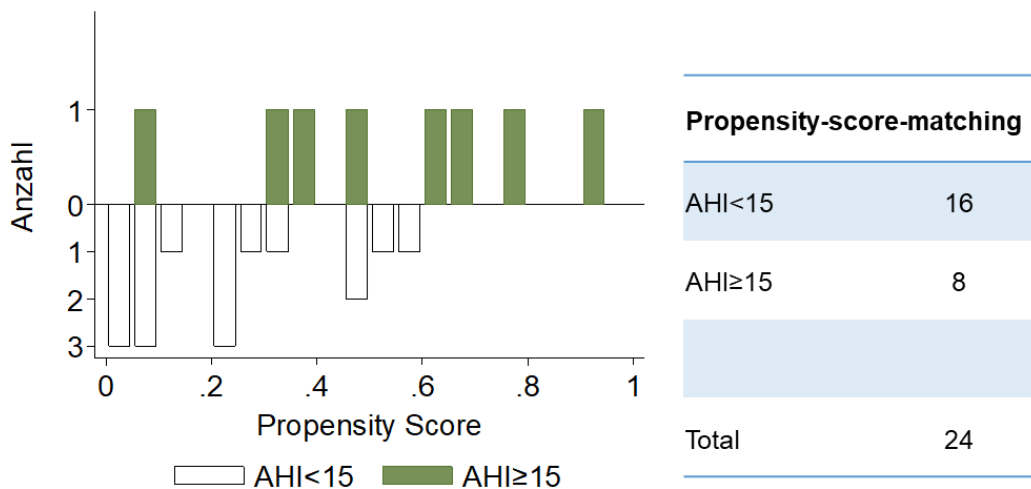


Abb. 3.18: Propensity Score Matching

Dargestellt ist der Propensity score, der anhand der klinischen Daten (BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter, Raucher) ermittelt wurde. Es erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen (AHI < 15 und AHI ≥ 15).

**A**

Variable	Unmatched (U) Matched (M)	Mittelwert		p-Wert
		AHI<15	AHI≥15	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	U M	28,15 28,28	29,89 28,98	<b>0,04</b> <b>0,68</b>
NTproBNP [pg/ml]	U M	946 5306	2481 4482	<b>0,02</b> <b>0,83</b>
CRP [mg/l]	U M	7,810 10,54	10,15 9,375	<b>0,30</b> <b>0,84</b>
Kreatinin [mg/dl]	U M	1,025 1,135	1,385 1,970	<b>0,04</b> <b>0,41</b>
Alter [Jahre]	U M	66,54 78,50	71,03 73,63	<b>0,02</b> <b>0,31</b>
Raucher [relativer Zahlenwert]*	U M	2,333 2,750	2,417 2,380	<b>0,60</b> <b>0,32</b>

**B** **Treatmenteffekt (AHI≥ 15 vs. AHI<15) auf OxCaMKII/CaMKII**

Koeffizient	Standard- fehler	P-Wert	95%- Konfidenzintervall
0,585	0,141	<b>0,000</b>	[0,308; 0,861]

Tab. 3.7: Propensity Score Matching und Treatmenteffekt

**A:** Mittels PSM wurde der Einfluss verschiedener Variablen auf die CaMKII-Oxidation verringert. Nach Matching zeigten die Mittelwerte in den zwei Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr ( $p>0,05$ ).

\*relativer Zahlenwert für Modus Raucher: Nichtraucher=1, Exraucher=2, Raucher=3

**B:** Der Treatmenteffekt als Maß des Einflusses des OSAS auf die CaMKII-Oxidation. Es ist ein signifikanter Unterschied ( $p=0,000$ ) zwischen den Gruppen erkennbar.

Nach dem Matching bestanden keine signifikanten Unterschiede der klinischen Daten mehr zwischen den Gruppen (s. Tab. 3.7A).

Nach dem PSM ließ sich hierbei als *Treatmenteffekt* ein signifikanter Einfluss ( $p=0,000$ ) des Vorliegens eines OSAS auf die CaMKII-Oxidation nachweisen (s. Tab. 3.6B). Der positive Koeffizient weist dabei auf eine vermehrte CaMKII-Oxidation bei Patienten mit OSAS hin.

### 3.3.6 Statistische Analysen der CaMKII-abhängige Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors Typ 2 an Serin 2814

Neben der CaMKII und ihrer Phosphorylierung und Oxidation sollte als wichtiger Vermittler des VHF der RyR untersucht werden.

Dazu wurde die Phosphorylierung des RyR an der Phosphorylierungsstelle der CaMKII an Serin 2814 auf die Gesamtproteinexpression des RyR bezogen (Abb. 3.19).

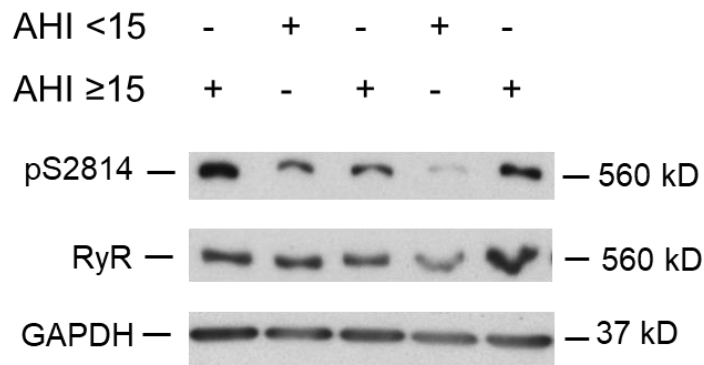


Abb. 3.19: Originalregistrierungen der Phosphorylierungsstelle S2814 des RyR, der RyR Gesamtexpression und GAPDH

Im Weiteren wurde die RyR-Phosphorylierung an Serin 2814 in Abhängigkeit des AHI betrachtet. Die so erhaltene Verteilung der Messwerte ist in Abb. 3.20 dargestellt. Ein signifikanter linearer Zusammenhang der RyR-Phosphorylierung mit dem AHI ist in diesen Daten nicht zu erkennen ( $p=0,21$ ). Darüber hinaus ist auch nach Aufteilung in die OSAS-Gruppen kein signifikanter Zusammenhang zu ermitteln.

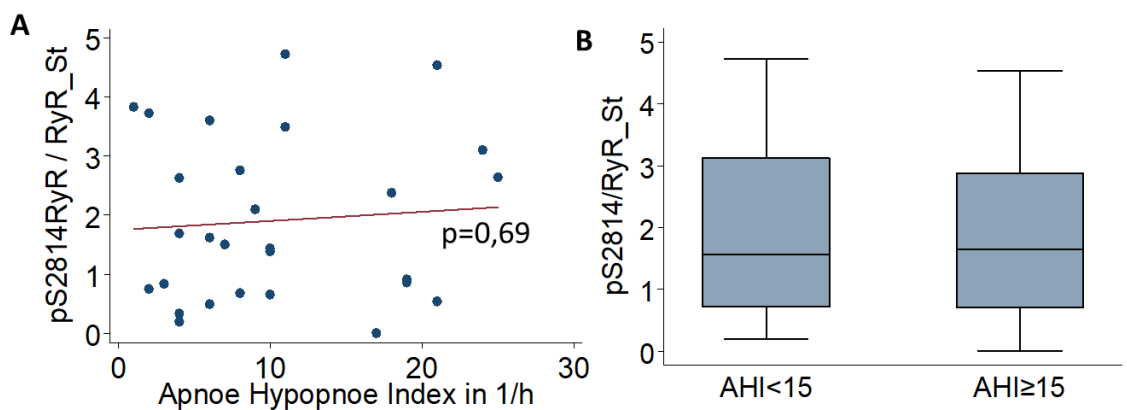


Abb. 3.20: RyR-Phosphorylierung ( $pS2814RyR/RyR$ ) standardisiert (St)

**A:** Beziehung zwischen AHI und dem Quotienten  $pS2814RyR/RyR$ . Die Gerade zeigt die lineare Regression,  $f(x)=0,015x+1,75$ ; Standardfehler = 0,038;  $p=0,69$

**B:** Die Ryanodinrezeptor-Phosphorylierung in den Patientengruppen ohne ( $AHI<15$ ) und mit OSAS ( $AHI\geq 15$ ). Dargestellt sind der Median, der Interquartilsabstand und Extremwerte. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Im nächsten Schritt wurde die RyR-Phosphorylierung auf einen Zusammenhang mit den klinischen Parametern geprüft.

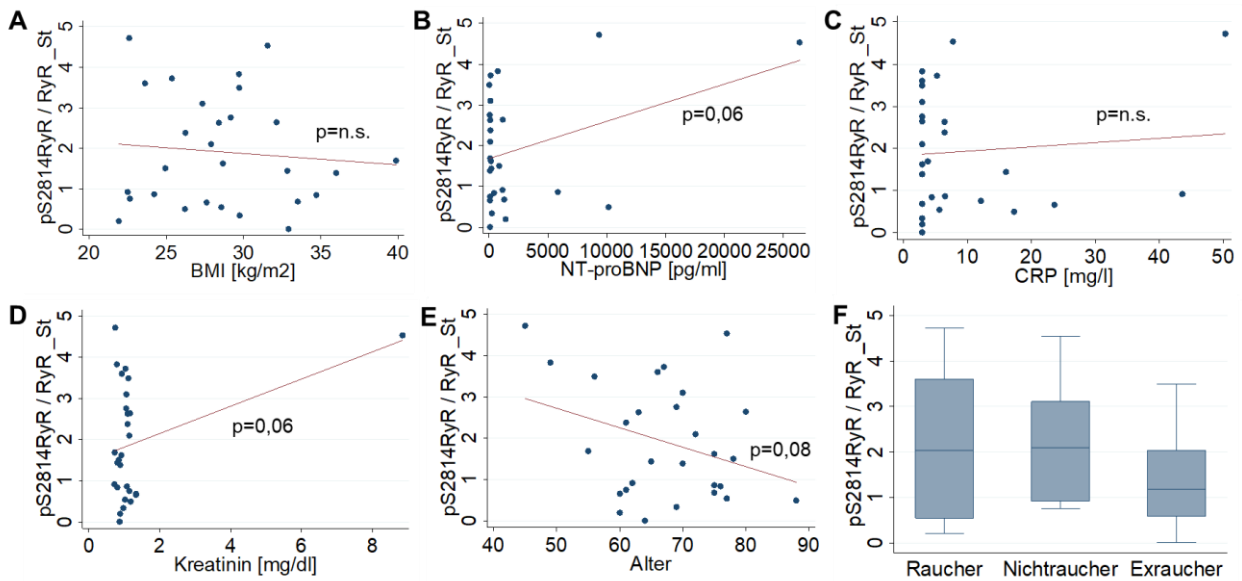


Abb. 3.21: Die klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus in Relation zur RyR-Phosphorylierung an S2814 (normalisiert und standardisiert)

Der BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und der Raucherstatus wurden in Relation zur RyR-Phosphorylierung an S2814 gesetzt. Für diese Faktoren ließen sich jedoch keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisen (Abb. 3.21).

Daraufhin wurde – wie in den Versuchen zuvor – das PSM zur Berücksichtigung der klinischen Charakteristika angewandt.

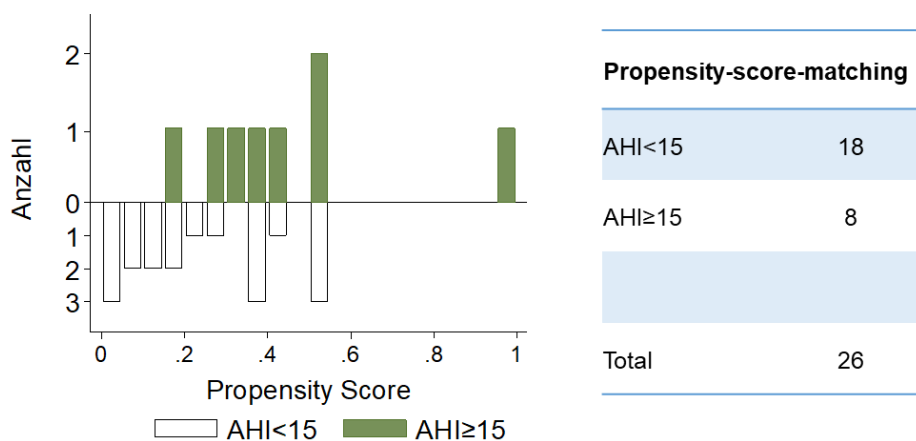


Abb. 3.22: Propensity Score Matching  
Dargestellt ist der Propensity Score, der anhand der klinischen Daten (BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter, Raucher) ermittelt wurde. Es erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen (AHI < 15 und AHI ≥ 15).

A Variable	Unmatched (U) Matched (M)	Mittelwert		p-Wert
		AHI<15	AHI≥15	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	U M	28,15 28,9	29,89 29,18	<b>0,04</b> <b>0,71</b>
NTproBNP [pg/ml]	U M	946 1542	2481 4417	<b>0,02</b> <b>0,42</b>
CRP [mg/l]	U M	7,81 11,21	10,15 9,81	<b>0,30</b> <b>0,82</b>
Kreatinin [mg/dl]	U M	1,03 1,14	1,38 1,98	<b>0,04</b> <b>0,41</b>
Alter [Jahre]	U M	66,54 69,75	71,03 70,75	<b>0,02</b> <b>0,82</b>
Raucher [relativer Zahlenwert]*	U M	2,33 2,63	2,42 2,38	<b>0,60</b> <b>0,45</b>

B Treatmenteffekt (AHI≥ 15 vs. AHI<15) auf pS2814RyR/RyR				
Koeffizient	Standard- fehler	P-Wert	95%-Konfidenzintervall	
0,754	0,325	<b>0,021</b>	0,116	1,392

Tab. 3.8: Propensity Score Matching und Treatmenteffekt  
**A:** Mittels PSM wurde der Einfluss verschiedener Variablen auf die Ryanodinrezeptor-Phosphorylierung berücksichtigt. Nach Matching zeigten die Mittelwerte in den zwei Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr.

**B:** Der Treatmenteffekt als Maß des Einflusses des OSAS auf die Ryanodinrezeptor-Phosphorylierung. Es ist ein signifikanter Unterschied ( $p=0,021$ ) zwischen den Gruppen erkennbar.

Die Verteilung der Propensity Scores in den beiden Gruppen ist in Abb. 3.22 gegenübergestellt. Nach dem anschließendem Matching waren die Unterschiede der klinischen Werte ausbalanciert (s. Tab. 3.8A).

Im Ergebnis der Treatmenteffekt-Analyse nach PSM (s. Tab. 3.8B) konnte ein signifikanter Unterschied der Phosphorylierung des RyR zwischen den Patienten mit und ohne OSAS nachgewiesen werden ( $p=0,021$ ), der zuvor keine statistische Relevanz hatte erkennen lassen. Anhand des positiven Koeffizienten (0,754) ist ferner erkennbar, dass in der Gruppe der Patienten mit OSAS eine stärkere Phosphorylierung des RyR vorliegt, als bei Patienten ohne OSAS.

### 3.3.7 Statistische Analysen der CaMKII-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban an Threonin 17

Zuletzt wurde die Phosphorylierung des PLB an Threonin 17, der Phosphorylierungsstelle der CaMKII, untersucht (Abb. 3.23).

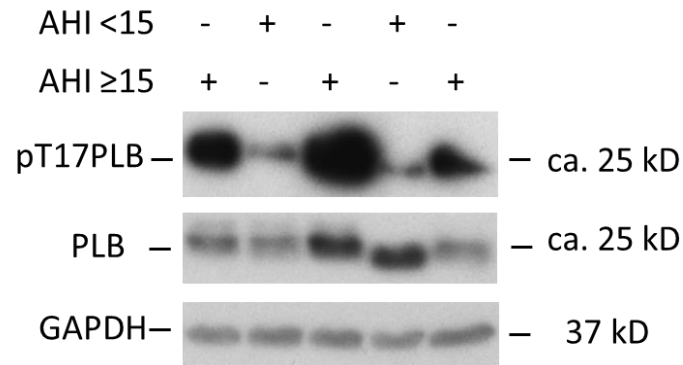


Abb. 3.23: Originalregistrierungen der Phosphorylierung von PLB an Threonin 17, der PLB Gesamtexpression und GAPDH

Die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB), im Verhältnis zur Gesamtproteinexpression an PLB zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem AHI ( $p=0,23$ ) (s. Abb. 3.24A).

Nach Aufteilung in zwei Gruppen (Abb. 3.24B), ohne und mit OSAS, konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der PLB-Phosphorylierung zwischen diesen Gruppen nachgewiesen werden.

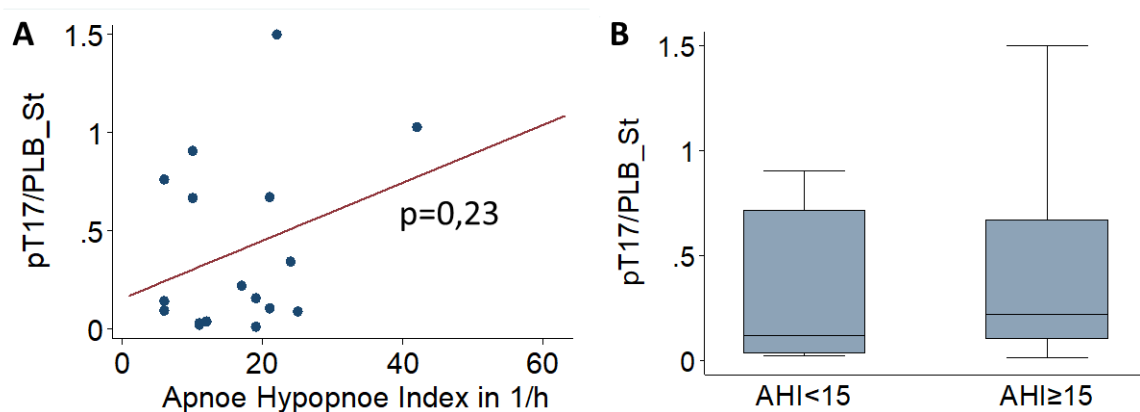


Abb. 3.24 Phospholamban-Phosphorylierung (pT17PLB/PLB), standardisiert (St)  
**A:** Beziehung zwischen AHI und dem Quotienten pT17PLB/PLB. Die Gerade zeigt die lineare Regression  $f(x)=0,015x+0,15$ ; Standardfehler= 0,011;  $p=0,23$   
**B:** Die Phospholamban-Phosphorylierung in den Patientengruppen ohne (AHI <15) und mit OSAS (AHI ≥15). Dargestellt sind der Median, der Interquartilsabstand und Extremwerte. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

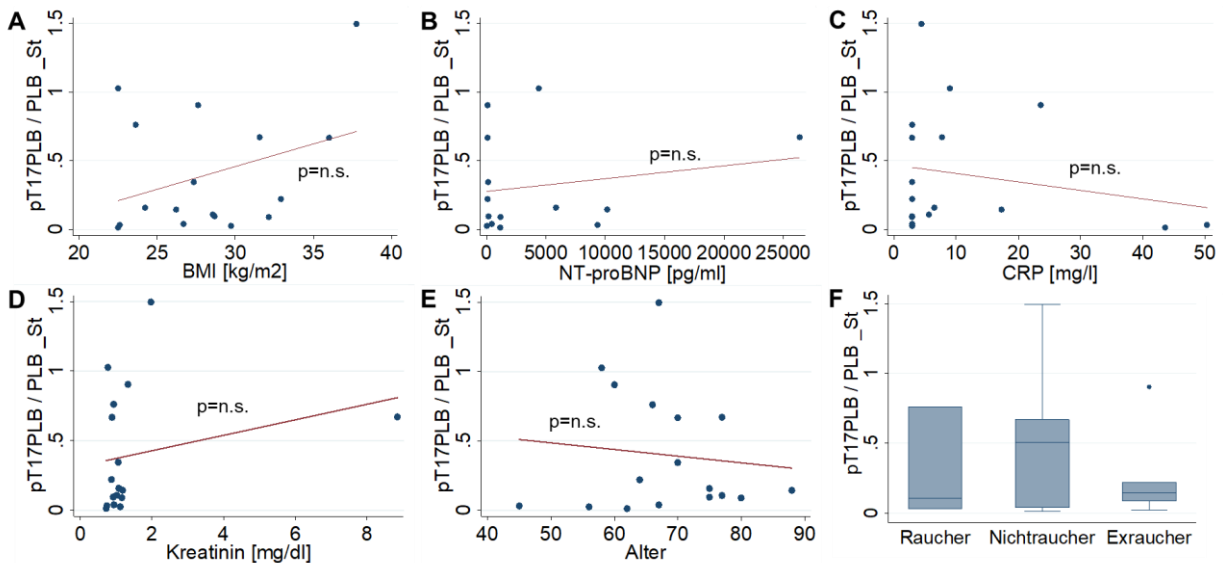


Abb. 3.25: Die klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus in Relation zur PLB-Phosphorylierung (normalisiert und standardisiert)

Danach wurden die klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus der Patienten auf ihren Bezug zur PLB-Phosphorylierung in den Gewebeproben untersucht. Auch bei dieser Analyse ließ sich kein signifikanter Zusammenhang feststellen (Abb. 3.25).

Anschließend wurde die Phosphorylierung des Phospholambans mittels PSM unter Einbeziehung klinischer Charakteristika analysiert.

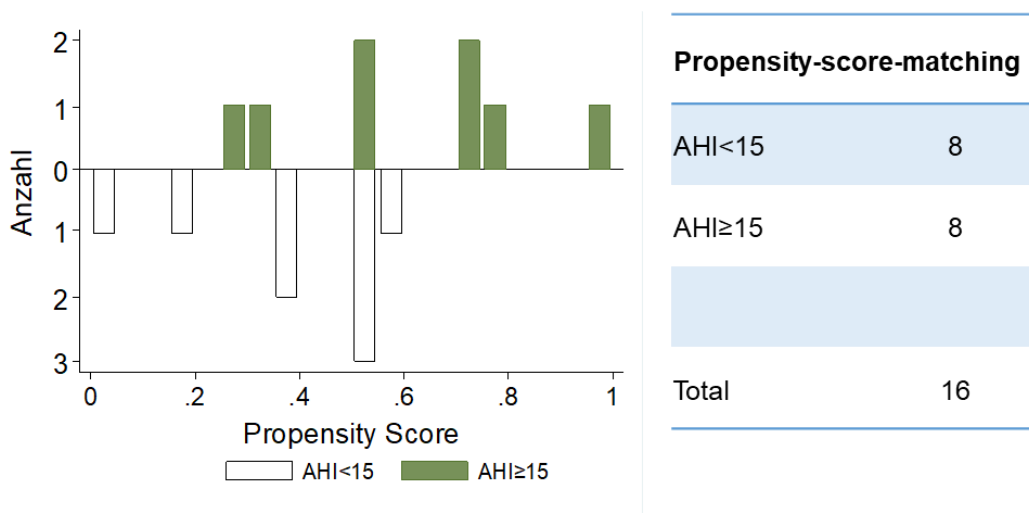


Abb. 3.26: Propensity Score Matching.

Dargestellt ist der Propensity score, der anhand der klinischen Daten (BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter, Raucher) ermittelt wurde. Es erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen (AHI < 15 und AHI ≥ 15).



**A**

Variable	Unmatched (U) Matched (M)	Mittelwert		P-Wert
		AHI<15	AHI≥15	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	U M	28,15 28,93	29,89 29,62	<b>0,04</b> <b>0,74</b>
NTproBNP [pg/ml]	U M	946 122	2481 4843	<b>0,02</b> <b>0,16</b>
CRP [mg/l]	U M	7,81 13,25	10,15 9,56	<b>0,30</b> <b>0,57</b>
Kreatinin [mg/dl]	U M	1,03 1,15	1,38 2,09	<b>0,04</b> <b>0,35</b>
Alter [Jahre]	U M	66,5 63,5	71,0 71,5	<b>0,02</b> <b>0,03</b>
Raucher [relativer Zahlenwert]*	U M	2,33 2,75	2,42 2,25	<b>0,60</b> <b>0,12</b>

**B** **Treatmenteffekt (AHI≥ 15 vs. AHI<15) auf pT17PLB/PLB**

Koeffizient	Standard- fehler	P-Wert	95%-Konfidenzintervall
-0,171	0,184	<b>0,354</b>	[-0,531; 0,190]

Tab. 3.9: Propensity Score Matching und Treatmenteffekt  
**A:** Mittels PSM wurde der Einfluss verschiedener Störvariablen auf die Phospholamban-Phosphorylierung berücksichtigt. Nach Matching zeigten die Mittelwerte in den zwei Gruppen, außer der Variable Alter, keinen signifikanten Unterschied mehr.

**B:** Der Treatmenteffekt als Maß des Einflusses des OSAS auf die Phospholamban-Phosphorylierung. Es ist kein signifikanter Unterschied ( $p=0,354$ ) zwischen den Gruppen erkennbar.

Wie in allen vorhergegangenen Versuchen wurde das PSM unter Einbeziehung der klinischen Parameter BMI, NT-proBNP, CRP, Kreatinin, Alter und Raucherstatus durchgeführt (Abb. 3.26).

Nach dem Matching zeigte sich auch weiterhin ein signifikanter Altersunterschied zwischen den Gruppen. Die weiteren klinischen Charakteristika waren ausbalanciert (s. Tab. 3.9A). Aber auch durch diese Einbeziehung der klinischen Parameter konnte keine signifikante Änderung der Phosphorylierung des PLB an Threonin 17 in der OSAS-Gruppe nachgewiesen werden ( $p=0.12$ ) (s. Tab. 3.9B).

## **4 Besprechung der Ergebnisse im Zusammenhang mit den Angaben in der Literatur**

In der vorliegenden Dissertation wurde zum ersten Mal die Expression und Aktivität der CaMKII bei Patienten mit OSAS im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Patienten ohne OSAS untersucht. Hierbei sollte ein möglicher molekularer Zusammenhang auf Proteinebene für die klinische Assoziation von OSAS und VHF aufgedeckt werden und als Hinweis auf die Pathogenese des VHF bei OSAS-Patienten dienen. Aus diesem Grund wurden neben der Expression der CaMKII die Autophosphorylierung und die Oxidation der CaMKII als Messgrößen für deren Aktivität untersucht, sowie die CaMKII-spezifische Phosphorylierung des RyR und PLB, als wichtige Vermittler bei der Arrhythmieentstehung. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass sowohl CaMKII-Expression, -Autophosphorylierung und -Oxidation als auch die RyR-Phosphorylierung bei Patienten mit OSAS - unabhängig von möglichen klinischen Einflussgrößen - erhöht sind. Als weitere Untersuchungsmethode der CaMKII-Aktivität bei OSAS-Patienten wurde das HDAC4-Bindungsassay verwendet. Mithilfe dieses Assays zeigte sich ebenfalls eine verstärkte Aktivität der CaMKII bei den Patienten mit OSAS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies liefert wichtige Hinweise auf eine Beteiligung der CaMKII in der Pathogenese von VHF bei OSAS-Patienten.

### **4.1 Die klinischen Charakteristika der untersuchten Studienkohorte im Vergleich**

Wie unter 2.4.1 beschrieben führten methodische Gründe zur endgültigen Stichprobenauswahl für diese Arbeit. Um deren Repräsentativität beurteilen zu können, sollen zunächst einmal die gebildeten Untergruppen auf Unterschiede in den klinischen Charakteristika verglichen werden. Daraufhin wird ein Vergleich der Studienpopulation mit anderen Studien vorgenommen.

#### **4.1.1 Vergleich der gebildeten Untergruppen**

Aus einer Gesamtzahl von 45 Studienteilnehmern wurden 34 Proben mittels Aktivitätsassay untersucht und 31 zur Proteinanalyse mittels Western Blot verwendet. Die Mittelwerte des AHI bei den Vergleichsgruppen kein OSAS (zwischen 6 und 7/h) und OSAS (23 und 24/h) unterscheiden sich zwischen den untersuchten Untergruppen nur geringfügig.

Es mag bereits aufgefallen sein, dass die Tabellen für die Baseline Charakteristiken (Tab. 3.1, 3.2 und 3.4) sich von den Tabellen unterscheiden, die die Charakteristika für das PSM beschreiben (Tab. 3.3A, 3.5A, 3.6A, 3.7A, 3.8A, 3.9A). Der Grund hierfür ist, dass bei den Baseline Charakteristika der Median mit Interquartilsabstand gewählt wurden und ein t-Test für die Ermittlung des p-Wertes durchgeführt wurde. Andererseits wurden für das PSM die Charakteristika mit Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Der p-Wert wurde ebenfalls anhand eines t-Test ermittelt, der jeweils vor dem Matching ungewichtet und nach dem Matching gewichtet durchgeführt wurde.

Sowohl im Vergleich aller Probanden, als auch in den beiden gebildeten Untergruppen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines OSAS und eines vergrößerten linken Herzvorhofs. In der gesamten Gruppe und der Untergruppe für die Western Blot Analysen war die linksventrikuläre Auswurffraktion bei den Patienten mit OSAS vermindert, in der Gruppe für das Aktivitätsassay führte der Vergleich zu keinem signifikanten Unterschied. Hingegen war in der Gesamt- und der Aktivitätsassaygruppe das durchschnittliche Alter bei den Personen mit OSAS signifikant höher. Die weiteren klinischen Charakteristika konnten nur Hinweise auf tendenzielle Unterschiede geben oder waren nur in einer Gruppe signifikant verschieden. So waren in allen Gruppen Tendenzen für ein erhöhtes NT-proBNP, häufigeres Vorliegen eines Vorhofflimmerns, einen höheren BMI, männliches Geschlecht und eine niedrigere GFR bei Patienten mit OSAS erkennbar.

Diese vorliegenden Unterschiede stellen zum Teil Risikofaktoren für das Auftreten eines OSAS dar (z.B. Alter, Übergewicht, männliches Geschlecht). Ein anderer Teil dieser Patientenmerkmale lässt auf die Auswirkungen des OSAS auf das Herz rückschließen. Darunter fallen die Vergrößerung des linken Vorhofs, sowie die Verschlechterung der Herzfunktion, gemessen an der EF - beides assoziiert mit einer NT-proBNP Erhöhung - und das Vorliegen eines VHF.

#### **4.1.2 Charakteristika von Patienten mit OSAS in anderen Studien**

In anderen Studien wird ebenso häufig eine Assoziation des OSAS mit Alter, BMI und männlichem Geschlecht beschrieben [3–5]. Zudem wird des Öfteren über die Assoziation des OSAS zu arterieller Hypertonie, Diabetes und Hyperlipidämie berichtet [5,11,14]. Schmidleitner et al. [113] konnten ebenso wie in dieser Arbeit eine geringere linksventrikuläre Auswurffraktion, ein erhöhtes NT-proBNP und zudem ein häufigeres

Vorliegen einer Herzinsuffizienz bei Patienten mit OSAS beobachten. Fisser et al. [114] beschreiben eine erhöhte linksventrikuläre Masse bei Patienten mit OSAS, was ebenfalls als Hinweis auf eine Belastung des Herzens bei diesen Patienten gewertet werden kann. Diese Ergebnisse deuten bereits auf einen klinischen Zusammenhang des OSAS mit der Herzinsuffizienz hin.

Diesen Zusammenhang bestätigt, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz eine deutlich höhere Prävalenz von schlafbezogenen Atemstörung (SDB, sleep disordered breathing) als in der Allgemeinbevölkerung beobachtet wurde. Ebenfalls korreliert die Schwere der Herzinsuffizienz mit dem Schweregrad beobachteter SDB [19,115,116]. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz treten neben dem OSAS insbesondere auch zentrale Apnoen als CSAS auf [115]. Das Vorliegen einer SDB hat zudem eine wichtige prognostische Bedeutung für die Herzinsuffizienz [19]. Man geht davon aus, dass sich Herzinsuffizienz und SDB gegenseitig negativ beeinflussen [19].

#### **4.1.3 Risikofaktoren und Zusammenhänge zwischen OSAS und Vorhofflimmern**

Für das Auftreten des VHF wurde bereits eine Vielzahl an Risikofaktoren identifiziert. Neben dem OSAS und Übergewicht [20,117,118], besteht eine Assoziation mit dem Alter, Geschlecht, Herzerkrankungen wie Herzklappenfehlern, KHK oder Kardiomyopathien, Diabetes mellitus, COPD und chronische Niereninsuffizienz [39,119,120]. Auch Rauchen scheint das Risiko zu erhöhen, ein VHF zu entwickeln [121]. Als ein wichtiger Prädiktor, der neben dem Vorliegen der Risikofaktoren, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das erstmalige Auftreten von VHF vorhersagt, wurde das NT-proBNP identifiziert [122,123]. Da diese Patientenmerkmale als Einflussfaktoren auf die Entstehung von VHF betrachtet werden, wird auch in Betracht gezogen, dass sie Einfluss auf die CaMKII als molekularer Vermittler des VHF nehmen. Um dem Geltung zu verschaffen, wurden bei der Analyse der erhobenen Daten auch solche Parameter berücksichtigt, die Unterschiede in den gebildeten Patientengruppen zeigen und in Verbindung mit dem VHF stehen.

## 4.2 Aktivierungsmechanismen der CaMKII bei Herzerkrankungen

### 4.2.1 Erhöhte CaMKII-Aktivität durch Autophosphorylierung

Wie bereits in der Einleitung erläutert kann die Aktivität des CaMKII durch verschiedene Aktivierungsmechanismen auf ein Vielfaches gesteigert werden und somit entscheidend in die Regulationsmechanismen des zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes eingreifen. Ein zentraler Mechanismus ist die Autophosphorylierung, die die CaMKII-Aktivität auf ein 700-faches steigert [90,124]. Primär wird die Autophosphorylierung ausgelöst durch hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, insbesondere bei hochfrequenter Stimulation [125]. Durch die Autophosphorylierung kann die erhöhte CaMKII-Aktivität jedoch auch bei diastolisch niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln durch den verstärkt gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex aufrechterhalten werden. Die diastolische Aktivität der CaMKII ist ein wichtiger Faktor bei der Regulation seiner Zielstrukturen wie dem RyR und PLB, der Entstehung des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks und somit dem Auftreten der DADs, die letztendlich zur Entstehung von Arrhythmien führen [45,124]. Diese Schlussfolgerungen werden bestätigt durch verschiedenen Arbeiten, die den Zusammenhang der CaMKII und Herzvorhofflimmern untersuchten, und hierbei eine Erhöhung der CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung nachweisen konnten [98,99].

### 4.2.2 Die Aktivität der CaMKII bei Vorhofflimmern

Neef et al. [98] zeigen, dass im humanen Herzvorhofgewebe von Patienten mit VHF eine verstärkte Expression und Autophosphorylierung der CaMKII vorliegt sowie eine erhöhte CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR. Ebenso konnte eine erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR beobachtet werden, die zu erhöhten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln führte. Durch CaMKII-Inhibition oder Hemmung des RyR mit Tetracain konnten diese Effekte vermindert werden. Vergleichbar mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte auch hier keine verstärkte Phosphorylierung von PLB festgestellt werden.

Voigt et al. [99] kamen zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der erhöhten CaMKII-Expression, -Phosphorylierung und der CaMKII-abhängigen Aktivierung des RyR mit resultierender erhöhter Offenwahrscheinlichkeit des RYR und spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bei der Untersuchung von Myozyten von Mäusen mit chronischem VHF. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung einer spezifischen

CaMKII-Blockierung mittels KN-93 die spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und RyR-Offenwahrscheinlichkeit abnehmen. Aus diesen Versuchen wurde auf eine direkte Verbindung zwischen dem durch die CaMKII fehlregulierten RyR und der Entstehung von VHF geschlossen.

Auch in Experimenten mit transgenen Mäusen war es möglich einen Zusammenhang zwischen der CaMKII und einer erhöhten diastolische SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung,  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Nachdepolarisationen und Entwicklung von VHF festzustellen, wobei sich diese Effekte durch Inhibition der CaMKII vermindern ließen [101,103,104].

In der vorliegenden Arbeit konnten die Veränderungen der CaMKII-Expression und Phosphorylierung und die verstärkte CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR nun auch für Patienten mit OSAS unter Berücksichtigung klinischer Merkmale der Patienten mittels PSM aufgezeigt werden.

#### **4.2.3 Die Aktivität der CaMKII bei anderen kardialen Erkrankungen**

Neben der Begünstigung der Entstehung von Vorhofflimmern wird davon ausgegangen, dass durch das CaMKII vermittelte sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck auch die Arrhythmieentstehung bei anderen kardialen Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz begünstigt wird [97].

Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass die CaMKII aufgrund der veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation und der Modulierung der elektromechanischen Kopplung eine Rolle bei der Entwicklung der kontraktilen Dysfunktion bei Herzinsuffizienz spielt [102].

In einer Reihe von Untersuchungen von Gewebe bei Patienten und Versuchstieren mit Herzinsuffizienz konnte eine erhöhte CaMKII-Expression nachgewiesen werden [100,126,127]. Ai et al. [100] konnten im Kaninchenmodell bei Herzinsuffizienz ebenfalls eine erhöhte CaMKII-Expression und -Autophosphorylierung, CaMKII-abhängige RyR-Phosphorylierung, sowie eine unveränderte CaMKII-abhängige PLB-Phosphorylierung nachweisen. Durch die Blockierung der CaMKII (nicht aber der PKA) wurde die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung vermindert und der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt erhöht.

Im Umkehrschluss zeigten sich bei transgener Überexpression der zytosolischen CaMKII $\delta$ c im Mausmodell erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparkfrequenzen trotz erniedrigtem SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts, die durch CaMKII-Inhibition normalisiert werden

konnte. Bei den transgenen Mäusen wurde zudem die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie beobachtet [102].

Die Rolle der CaMKII bei der Entstehung und Progression von Herzinsuffizienz ist für diese Arbeit insofern ebenfalls von Bedeutung, da wie bereits unter 4.1.2 beschrieben, sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Studien, bei Patienten mit OSAS neben dem gehäuftem Auftreten von Vorhofflimmern (s. Einleitung) auch ein Zusammenhang zur Herzinsuffizienz beobachtet werden konnte [14,115].

#### **4.2.4 CaMKII- Oxidation**

Neben der Aktivierung mittels Autophosphorylierung ist die CaMKII auch ein wichtiger Sensor für oxidativen Stress und wird durch Methionin-Oxidation an Methionin 281/282 aktiviert. Wie bei der Autophosphorylierung resultiert durch die Oxidation eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin unabhängige, gesteigerte Aktivität der CaMKII [92].

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), als Vermittler des oxidativen Stress, wurden als wichtige Akteure in der Entstehung von kardialen Pathologien identifiziert [128]. Wagner et al. [93] hatten nachgewiesen, dass die CaMKII ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von ROS-induzierten zellulären Arrhythmien ist. Bei deren Versuchen konnten durch Wasserstoffperoxid ausgelöste, erhöhte freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in Myozyten beobachtet werden, die wiederum zu einer verstärkten Oxidation und Autophosphorylierung der CaMKII führten. Zudem kam es im beobachteten Modell zu erhöhten zytoplasmatischen  $\text{Na}^{+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und Arrhythmien. Diese Effekte waren wiederum bei CaMKII-knockout-Mäusen vermindert.

Da es auch beim OSAS zu vermehrter ROS-Produktion kommt [28], wurde in den vorliegenden Versuchen die Oxidation der CaMKII untersucht und es konnte eine stärkere Methionin-Oxidation der CaMKII bei den Patienten mit OSAS nachgewiesen werden und somit eine verstärkte Aktivität der CaMKII.

Oxidativer Stress und die Produktion von ROS sind auch ein Teil der physiologischen Antwort auf entzündliche Prozesse [129]. Aus diesem Grund wurde als Indikator für Entzündungsvorgänge das CRP in den PSM-Analysen berücksichtigt. Aviles et al. konnten zudem das CRP als unabhängigen Prädiktor für ein erstmaliges Auftreten von VHF identifizieren [130]. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang des CRP mit der CaMKII-Oxidation nachgewiesen werden, interessanterweise zeigte sich

ein signifikanter Zusammenhang zwischen CRP und der Autophosphorylierung der CaMKII.

#### **4.2.5 CaMKII Aktivierung durch weitere Signale**

Eine Vielzahl an extrazellulären Faktoren kann zu Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  und zur ROS-Produktion führen und somit indirekt Einfluss auf die CaMKII-Aktivität nehmen. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich dabei ursprünglich um physiologische Prozesse, die eine Änderung der elektromechanischen Kopplung - z.B. im Rahmen der sogenannten „fight-and-flight-Reaktion“ bei Sympathikusaktivierung - bewirken. Diese Prozesse kommen jedoch auch bei Herzerkrankungen vor und führen dabei zu maladaptiven Prozessen [131].

Einer dieser Faktoren ist die  $\beta$ -adrenerge Stimulation über Katecholamine, die - unabhängig von der Proteinkinase A - aktivierend auf die CaMKII wirkt und zu Herzhypertrophie, dilatativer Kardiomyopathie und apoptotischem Zelltod führen kann [132,133]. Zudem gibt es Hinweise, dass die CaMKII bei der Entstehung von  $\beta$ -adrenerg getriggerten Arrhythmien eine wichtige Rolle spielt [95].

Angiotensin II ist ein weiterer Mediator der über Oxidation zu einer CaMKII-Aktivierung führt und hierdurch zur Arrhythmieentstehung beitragen kann [92,94].

Zudem gibt es Hinweise, dass bei hohen Glukosespiegeln eine autonome Aktivierung der CaMKII über die kovalente Bindung eines N-Acetylglukosamins erfolgt. Somit könnte insbesondere bei Diabetikern ein weiterer unabhängiger Aktivierungsmechanismus der CaMKII vorliegen [134].

Blutzuckerspiegel, Katecholamine und Angiotensin stellen folglich weitere mögliche Einflussfaktoren und somit Störgrößen auf die CaMKII-Aktivität dar. Dies konnte jedoch in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden.



### **4.3 Therapeutische Möglichkeiten für Patienten mit OSAS**

Da VHF ein erhöhtes Mortalitätsrisiko mit sich bringt und insbesondere das Risiko für das Auftreten eines Schlaganfalls erhöht [39], handelt es sich um ein erstrebenswertes Ziel bereits das Auftreten des VHF zu verhindern oder zumindest die Progression vom paroxysmalen zum permanenten Typ zu verhindern oder zu verlangsamen.

#### **4.3.1 Derzeitige Therapie des OSAS**

Ein möglicher Behandlungsansatz ist die Therapie von beeinflussbaren Risikofaktoren, wie dem OSAS. Neben allgemeinen Maßnahmen wie Gewichtsverlust oder Raucherentwöhnung ist die PAP (positive airway pressure)-Therapie die Therapie der Wahl beim OSAS. Die gängigsten Anwendungen der PAP-Therapie bei OSAS sind die CPAP- (continuous PAP) und BiPAP- (bilevel PAP) Therapie [135]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Anwendung der CPAP-Therapie die Wahrscheinlichkeit eines Wiederauftretens des VHF nach Kardioversion, Ablation oder Pulmonalvenenisolation positiv beeinflusst werden kann [136,137]. Die Patienten, die CPAP nutzten, blieben signifikant länger frei von erneuten VHF-Episoden als Patienten, die keine solche Therapie erhielten. Allerdings gibt es aus diesem Bereich bisher noch keine randomisierten Studien [138]. Auch wenn die CPAP-Nutzung positive Einflüsse auf das Auftreten von VHF bei Patienten mit OSAS hat, wird es häufig nicht gut von den Patienten toleriert und Studien zeigen eine schlechte Compliance im Langzeitverlauf an. Schoch et al. [139] begleiteten eine große Kohorte von OSAS-Patienten und stellten fest, dass nach 1 Jahr noch 74% der Patienten die PAP-Therapie fortsetzten, nach 5 Jahren waren es jedoch nur noch 55% und nach 10 Jahren 51%.

Weitere Therapiemöglichkeiten des OSAS wie Gaumenimplantate oder chirurgische Eingriffe an Gaumen, Uvula oder Rachen konnten bei der Verbesserung des OSAS bisher in den meisten Fällen nicht überzeugen [140,141].

#### **4.3.2 Therapie des zentralen Schlafapnoesyndroms**

Außer dem OSAS ist als schlafbezogene Atemstörung (SDB) das CSAS (zentrales Schlafapnoesyndrom) von Bedeutung. Es werden häufig Mischformen der SDB aus OSAS und CSAS beobachtet [18].

Das CSAS ist, wie das OSAS, mit dem Auftreten von VHF assoziiert, jedoch gibt es für diesen Zusammenhang keine so umfangreiche Datenlage [40,41].

Die Therapiemöglichkeiten des CSAS stellen sich schwieriger als beim OSAS dar. Hier kommt im Besonderen auch die Therapie der Grunderkrankung, meist der Herzinsuffizienz, in Frage [142], vor allem aufgrund der wechselseitigen Beeinflussung von CSAS und Herzinsuffizienz [19].

Als weitere Therapieoption besteht auch bei dem CSAS die nächtliche Verwendung eines PAP-Geräts. Die CANPAP Studie (Canadian Continuous Positive Airway Pressure for Patients with Central Sleep Apnea and Heart Failure) [143] konnte bei Patienten mit Herzinsuffizienz und CSAS unter CPAP-Therapie zwar eine Verbesserung der gemessenen zentralen Schlafapnoen feststellen, allerdings ließ sich kein positiver Effekt einer CPAP-Therapie auf den Endpunkt Überleben nachweisen.

Eine spezielle Variante der PAP-Therapie bei CSAS oder Mischformen von CSAS und OSAS ist die ASV-Therapie (adaptive servoventilation). Die hierfür verwendeten Geräte können sowohl bei obstruktiven Episoden einen positiven Atemdruck herstellen, als auch bei zentralen Apnoen eine beatmende Funktion übernehmen [144]. Die SERVE-HF Studie [145] wurde international und multizentrisch zur randomisierten Untersuchung der Auswirkungen einer ASV-Therapie auf Patienten mit CSAS bei Herzinsuffizienz durchgeführt. In dieser Studie zeigte sich unter der ASV-Therapie ebenfalls keine Veränderung der kardiovaskulären Mortalität. Allerdings war die Gesamtmortalität in der Therapiegruppe sogar erheblich erhöht, woraufhin die Studie abgebrochen werden musste.

Eine neue Therapie der CSAS bei Herzinsuffizienz ist die transvenöse Stimulation des Nervus phrenicus, die im Oktober 2017 in den USA zugelassen wurde. Für die Behandlung des OSAS oder Mischformen kommt diese Therapie nicht in Frage. Da es sich dabei um eine invasive Therapie für das CSAS handelt, ist seine Anwendung auf ausgewählte Patienten beschränkt [146,147].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung auf das Vorliegen eines Schlafapnoesyndroms, wie unter 2.1 beschrieben, das Screening-Gerät ApneaLink verwendet. Im Vergleich zum Goldstandard für die Diagnostik von SDB, der Polysomnographie in einem Schlaflabor, zeigte ApneaLink in verschiedenen Studien gute Ergebnisse in Bezug auf Sensitivität und Spezifität der Detektion von SDB bei

einfacher Handhabung [148–150]. Dennoch nehmen einige Autoren an, dass der AHI leicht über- [151] oder unterschätzt [116] wird. Arzt et al. [116] gehen zudem davon aus, dass mittels des Gerätes Apnea-Link keine ausreichende Unterscheidung zwischen OSAS und CSAS getroffen werden kann. Allerdings berichten Weinreich et al. [152] von einer differenzierteren Beurteilung des CSAS mittels ApneaLink durch Verwendung eines Algorithmus zur Mustererkennung, der für diese Arbeit allerdings nicht angewendet wurde. Deshalb ist davon auszugehen, dass in dieser Arbeit als obstruktiv deklarierte Atemstörungen durchaus mit zentralen Apnoen kombiniert sein könnten ohne dass dies für die Auswertung berücksichtigt wurde.

### **4.3.3 Therapieausblick: CaMKII-Inhibitoren**

Aufgrund der erläuterten Nachteile und Einschränkungen der CPAP-Therapie ist es erstrebenswert neue Therapiestrategien zu entwickeln, die auch Patienten mit OSAS als Alternative zur CPAP-Therapie angeboten werden können, um mögliche kardiale Komplikationen wie das VHF zu verhindern oder zumindest positiv beeinflussen zu können.

Nach den aktuellen Leitlinien der ESC (European Society of Cardiology) aus dem Jahr 2016 [153,153] besteht die Therapie des VHF insbesondere aus der Behandlung bestehender Risikofaktoren und Verringerung des Schlaganfallrisiko mittels oraler Antikoagulation. Zudem stehen sowohl medikamentöse als auch interventionelle Therapien zur Frequenz- und Rhythmuskontrolle zur Verfügung. Die dabei angewendeten Antiarrhythmika kommen sowohl im akuten Fall als auch zur längerfristigen Therapie zum Einsatz. Die elektrische Kardioversion und Katheterablation stellen als interventionelle Verfahren weitere Therapiemöglichkeiten dar [153].

Für das VHF werden bereits verschiedene neue Therapiestrategien untersucht, da die bisher angewandten Antiarrhythmika oft nicht die gewünschte Effektivität besitzen und mit ihrem proarrhythmischen Potential unerwünschten Arzneinebenwirkungen begünstigen [154]. Die Beeinflussung des  $Ca^{2+}$ -Haushalts scheint ein vielversprechender Therapieansatz zu sein. Insbesondere die CaMKII stellt hier eine mögliche Zielstruktur dar [106]. Aus diesem Grund werden CaMKII-Inhibitoren bereits auf ihre potentielle Anwendbarkeit zur Behandlung von Herzinsuffizienz und Arrhythmien wie VHF untersucht.

Laut Grandi et al. [155] sind viele der aktuell verfügbaren CaMKII-Inhibitoren, wie KN-93, aufgrund von eingeschränkter Wirksamkeit und ungenügender Subtypenspezifität nicht für die klinische Anwendung geeignet. Zudem lägen zwar viele Ergebnisse zur Anwendung von CaMKII-Inhibitoren *in vitro* vor, allerdings sei der antiarrhythmische Effekt der CaMKII-Inhibitoren *in vivo* bis dato nur in wenigen Studien getestet worden [155].

SMP-114 ist ein neu entwickelter CaMKII-Inhibitor, der bereits für die Therapie der rheumatoiden Arthritis in Phase II an menschlichen Probanden getestet wurde. Neef et al. [156] konnten mit SMP-114 eine Verringerung der spontanen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in humanen atrialen Kardiomyozyten und linksventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzversagen nachweisen, ohne dass es dabei zu einer Beeinträchtigung der systolischen Funktion oder der elektromechanischen Kopplung kam.

Ein weiterer, neuer CaMKII-Inhibitor in der Forschung ist AS105. Für diese Substanz konnte bereits *in vitro* eine effektive Senkung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks und eine Reduktion zellulärer Korrelate der Arrhythmieentstehung ohne negative Effekte auf die elektromechanische Kopplung nachgewiesen werden [157].

Der CaMKII-Inhibitor GS-680 zeigte *in vitro* ebenfalls vielversprechende Ergebnisse. Lebek et al. [158] testeten diesen ATP-kompetitiven und selektiven CaMKII-Inhibitor an humanem Herzvorhofgewebe und konnten eine Reduktion der pro-arrhythmischen Aktivität nachweisen. Zudem konnte mit GS-680 im versagenden humanen Ventrikelgewebe bei Herzinsuffizienz die Kontraktilität verbessert werden.

Diese Ergebnisse bieten aussichtsreiche Ansätze für die Einsetzbarkeit von CaMKII-Inhibitoren bei Patienten mit VHF. Es ist jedoch noch weitere Forschung nötig, um den klinischen Nutzen und die Anwendbarkeit zu evaluieren. Neben der Bioverfügbarkeit ist die Limitierung unerwünschter Arzneimittelwirkungen im zentralen Nervensystem auf neuronale CaMKII-Isoformen in der Entwicklung von CaMKII-Inhibitoren für die klinische Anwendung von zentraler Bedeutung [155].

Die Beeinflussung der CaMKII bei Patienten mit OSAS als möglichen therapeutischen Ansatzpunkt ist bisher noch nicht erforscht.

#### 4.3.4 Weitere mögliche Therapieansätze zur Beeinflussung der Entstehung von VHF bei Patienten mit OSAS

Neben der Therapie mit CaMKII-Inhibitoren stellt sich die Frage, ob eventuell auch ein noch selektiveres Vorgehen zur Beeinflussung der molekularen und zellulären Elektrophysiologie bei der Entstehung des VHF bei OSAS-Patienten möglich ist. Eine Vielzahl von Ionenkanälen im Herzen wurde in den letzten Jahren identifiziert, die Einfluss auf die kardiale Elektrophysiologie und Entstehung von Arrhythmien haben. Hierzu gehören beispielsweise verschiedene K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>2P</sub>3.1, Ca<sup>2+</sup>-aktivierte SK-Kanäle, I<sub>KUR</sub>) und unselektive Kationenkanäle, sogenannte TRP- (transient-receptor potential)- Kanäle [159].

In dieser Arbeit wurde die CaMKII-spezifische Phosphorylierung des RyR2 untersucht und diese zeigte sich bei Patienten mit OSAS erhöht. Dies deutet somit auf eine verstärkte Aktivität des RyR2 hin. Da der RyR eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des SR Ca<sup>2+</sup>-Lecks und der zellulären Arrhythmieentstehung einnimmt [81], besteht die Überlegung, ob die spezifische Blockierung des RyR2 als mögliche therapeutische Zielstruktur in Frage kommt. Es sind verschiedene Substanzen bekannt, die Einfluss auf die Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 nehmen und für die ein antiarrhythmischer Effekt nachgewiesen werden konnte. Allerdings besitzen diese Substanzen eine sehr unspezifische Wirkung und eine Reihe weiterer Kanäle oder Strukturen werden mit beeinflusst. Dazu gehört Dantrolen als Muskelrelaxans, das insbesondere RyR1 im Skelettmuskel blockiert, Tetracain, einige  $\beta$ -Blocker oder das Klasse Ic Antiarrhythmikum Flecainid, das im besonderen Na<sup>+</sup>-Kanäle blockiert [159]. Das Benzothiazepine-derivat K201 (JTV-519) wirkt spezifischer auf RyR2, zeigte sich in klinischen Studien allerdings als ineffektiv [160]. Der RyR2 kommt als mögliche Zielstruktur in Frage und wird auch bereits von herkömmlichen Antiarrhythmika mit beeinflusst. Somit hat er Bedeutung bei deren antiarrhythmischer Wirksamkeit. Allerdings existiert nach aktuellem Stand der Forschung noch keine Substanz die durch spezifische Beeinflussung des RyR2 eine effektive Reduktion von Arrhythmien *in vivo* bewirken könnte [159].

#### 4.4 Diskussion der Methoden und ihrer Limitationen

Abschließend soll noch auf Einschränkungen und Grenzen dieser Dissertation hingewiesen werden.

Durch die Art der Gewebegewinnung bedingt, stammten alle untersuchten Proben von Patienten mit einer bereits bestehenden Herzerkrankung. Zudem handelt es sich um eine inhomogene Patientengruppe, da sowohl Patienten mit Bypass-Operationen als auch Patienten, die einer Herzklappen-Operation unterzogen wurden, in die Studie aufgenommen wurden. Diese vorbestehenden kardialen Pathologien der Patienten hatten möglicherweise bereits Einfluss auf deren Proteinexpressions- und Phosphorylierungsmuster. Zudem konnten nicht alle entnommenen Proben des Herzgewebes in der Analyse berücksichtigt werden. Besonders die Druck- und Volumenbelastung der Vorhöfe bei Herzklappenfehlern stellen einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung von VHF dar [26,39]. Aus ethischen und methodischen Gründen kann keine Kohorte gesunder Patienten zur Analyse von humanem Herzvorhofgewebe herangezogen werden. Daher wäre ein weiterer möglicher Ansatz für eine Bias-Reduktion die Einschränkung der in die Studie eingeschlossenen Patienten auf solche Patienten mit einer Bypass-Operation aufgrund einer koronaren Herzerkrankung, um somit eine homogenere Studienpopulation zu erhalten.

Eine weitere Schwierigkeit stellte die Sicherstellung der Gewebequalität dar. Da sich stark fibrosiertes Gewebe nicht für die Untersuchung auf herzspezifische Proteine eignet [161], ist es wichtig bei der Gewebegewinnung darauf zu achten, dass es sich um Muskelgewebe handelt. Dies konnte hier vom Untersucher selbst nicht immer sichergestellt werden, besonders da Proben bereits in gefrorenem Zustand vorlagen und somit einer Evaluation auf ihre Qualität schwer möglich war. Dies war einer der Gründe für die sehr geringe Patientenzahl, die in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. Statistische Effekte konnten somit aufgrund der kleinen Stichprobe eventuell nicht zur Geltung kommen.

Des Weiteren ist die herkömmliche Western Blot-Methode normalerweise nur dafür vorgesehen eine vergleichbare Basis für die Proben eines einzigen Blots zu schaffen (heißt mit dem hier verwendeten Material 13 Proben). Da es sich bei den erhaltenen Zahlenwerten um relative Werte der Signalstärke im Vergleich der Proben des betreffenden Blots handelt, ist es nicht möglich die ermittelten Zahlenwerte verschiedener Western Blot in Relation zu setzen. Um dem zu entgehen wurden hier

alle Werte in Bezug auf eine einzige Probe gesetzt um somit einen vergleichbaren Standard zu schaffen. Die Validität des Verfahrens ließ sich in dieser Arbeit allerdings nicht überprüfen und somit sind eventuell Einflüsse auf die Präzision der ermittelten Ergebnisse nicht auszuschließen. Taylor et al. [162] beschreiben jedoch ein ähnliches Verfahren, bei dem alle Blots der Studie auf eine Kontrollprobe bezogen wurden, die als ein gepooltes Homogenat aus allen verwendeten Proben gewonnen wurde.

#### **4.5 Abschließende Schlussfolgerungen**

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf die Pathogenese des VHF bei Patienten mit OSAS und auf die Beteiligung der CaMKII und des RyR2 bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Arrhythmien auf zellulärer Ebene. Es sind aber weitere Untersuchungen nötig, um genauere Einblicke in die elektrophysiologischen Mechanismen der VHF-Entstehung bei OSAS-Patienten zu erlangen und daraus therapeutische Strategien entwickeln zu können. Zudem sollte überprüft werden, ob zukünftige Therapien für die Behandlung des VHF oder der Herzinsuffizienz, wie CaMKII-Inhibitoren, auch als frühzeitige oder präventive Therapiemöglichkeiten für Hochrisikopatienten - z.B. solche mit ausgeprägtem OSAS und mangelhafter CPAP-Therapie - zur Anwendung kommen könnten. Damit könnten die Entwicklung kardialer Pathologien und die bereits dem VHF vorausgehende Veränderungen, wie das elektrische und strukturelle Remodelling der Vorhöfe, günstig beeinflusst werden.

## 5 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren konnte zunehmend die Beteiligung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Kinase II $\delta$  (CaMKII) in Kardiomyozyten bei der Entstehung von Vorhofflimmern (VHF) nachgewiesen werden. Diese Kinase greift insbesondere regulierend in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt ein. Dabei sind unter anderem Phospholamban (PLB) und der kardiale Ryanodinrezeptor Typ 2 (RyR2) wichtige Zielstrukturen der CaMKII. Da bei Patienten mit obstruktivem Schlafapnoesyndrom (OSAS) ein gehäuftes Auftreten von VHF beobachtet wird, stellt sich die Frage, ob auch bei dieser Vorerkrankung die CaMKII bedeutend für die Entstehung des VHF ist. Pathophysiologisch kommt zudem eine Reihe von Vorgängen beim obstruktiven Schlafapnoesyndrom für die Aktivierung der CaMKII in Frage.

Die vorliegende Arbeit untersuchte deshalb die Expression der CaMKII sowie deren Autophosphorylierung und Oxidation als Ausdruck der CaMKII-Aktivität mittels Western Blot-Technik bei Patienten mit OSAS. Zudem wurden die CaMKII-spezifischen Phosphorylierungen des RyR2 und PLB als wichtige Vermittler bei der Arrhythmieentstehung analysiert. Hierbei wurde nachgewiesen, dass sowohl CaMKII-Expression, -Autophosphorylierung und -Oxidation als auch die RyR2-Phosphorylierung bei Patienten mit OSAS im Vergleich zu Patienten ohne OSAS unabhängig von möglichen klinischen Einflussgrößen erhöht sind. Als ergänzende Methode wurde ein HDAC4-CaMKII-Bindungsassay zur Bestimmung der CaMKII-Aktivität durchgeführt. Auch bei dieser Untersuchung konnte eine erhöhte CaMKII-Aktivität bei Patienten mit OSAS nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente liefern wichtige Hinweise auf eine Beteiligung der CaMKII in der Pathogenese von VHF bei Patienten mit OSAS. Es ist davon auszugehen, dass durch die erhöhte Aktivität der CaMKII und seiner Zielstrukturen, wie dem RyR2, Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Kardiomyozyten genommen wird und das Auftreten von Arrhythmie durch die Entstehung eines diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks aus dem sarkoplasmatischen Retikulum begünstigt wird. Auf diese Erkenntnisse aufbauend könnte eine spezifische Inhibition der CaMKII auch bei Patienten mit OSAS auf die maladaptiven Prozesse einwirken und somit die Entstehung oder das Fortschreiten von VHF günstig beeinflussen. Dadurch könnten sich vollkommen neue Therapiemöglichkeiten für Patienten mit OSAS eröffnen, um eine Wirkung auf Entstehung und Verlauf von Komplikationen wie dem VHF auszuüben.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Epstein LJ, Kristo D, Strollo PJ, Friedman N, Malhotra A, Patil SP, et al. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J Clin Sleep Med*. 2009;5(3):263–76. PubMed PMID: 19960649.
2. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med*. 1993;328(17):1230–5. doi: 10.1056/NEJM199304293281704. PubMed PMID: 8464434.
3. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol*. 2013;177(9):1006–14. doi: 10.1093/aje/kws342. PubMed PMID: 23589584.
4. Heinzer R, Vat S, Marques-Vidal P, Marti-Soler H, Andries D, Tobback N, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: The HypnoLaus study. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2015;3(4):310–8. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00043-0.
5. Abe H, Takahashi M, Yaegashi H, Eda S, Tsunemoto H, Kamikozawa M, et al. Efficacy of continuous positive airway pressure on arrhythmias in obstructive sleep apnea patients. *Heart Vessels*. 2010;25(1):63–9. doi: 10.1007/s00380-009-1164-z. PubMed PMID: 20091401.
6. Remmers JE, deGroot WJ, Sauerland EK, Anch AM. Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1978;44(6):931–8. PubMed PMID: 670014.
7. Hahn PY, Somers VK. Sleep Apnea and Hypertension. In: Lip GYH, Hall JE, editors. *Comprehensive hypertension*. Philadelphia, Pa: Mosby Elsevier; 2007. p. 939–46.
8. Chervin RD. Sleepiness, Fatigue, Tiredness, and Lack of Energy in Obstructive Sleep Apnea. *Chest*. 2000;118(2):372–9. doi: 10.1378/chest.118.2.372.
9. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med*. 2012;8(5):597–619. doi: 10.5664/jcsm.2172. PubMed PMID: 23066376.
10. Collop NA, Anderson WM, Boehlecke B, Claman D, Goldberg R, Gottlieb DJ, et al. Clinical guidelines for the use of unattended portable monitors in the diagnosis of obstructive sleep apnea in adult patients. Portable Monitoring Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med*. 2007;3(7):737–47. PubMed PMID: 18198809.
11. Bjornsdottir E, Keenan BT, Eysteinsdottir B, Arnardottir ES, Janson C, Gislason T, et al. Quality of life among untreated sleep apnea patients compared with the general population and changes after treatment with positive airway pressure. *J Sleep Res*. 2015;24(3):328–38. doi: 10.1111/jsr.12262. PubMed PMID: 25431105.
12. Lacasse Y, Godbout C, Sériès F. Health-related quality of life in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2002;19(3):499–503. PubMed PMID: 11936529.
13. Terán-Santos J, Jiménez-Gómez A, Cordero-Guevara J. The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. Cooperative Group Burgos-Santander. *N Engl J Med*. 1999;340(11):847–51. doi: 10.1056/NEJM199903183401104. PubMed PMID: 10080847.

14. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, et al. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation*. 2010;122(4):352–60. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.901801. PubMed PMID: 20625114.
15. Gami AS, Howard DE, Olson EJ, Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2005;352(12):1206–14. doi: 10.1056/NEJMoa041832. PubMed PMID: 15788497.
16. Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, Gottlieb DJ, Nawabit R, Kirchner HL, et al. Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(8):910–6. doi: 10.1164/rccm.200509-1442OC. PubMed PMID: 16424443.
17. Roche F, Xuong ANT, Court-Fortune I, Costes F, Pichot V, Duverney D, et al. Relationship among the severity of sleep apnea syndrome, cardiac arrhythmias, and autonomic imbalance. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2003;26(3):669–77. PubMed PMID: 12698666.
18. Muza RT. Central sleep apnoea-a clinical review. *J Thorac Dis*. 2015;7(5):930–7. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.04.45. PubMed PMID: 26101651.
19. Parati G, Lombardi C, Castagna F, Mattaliano P, Filardi PP, Agostoni P. Heart failure and sleep disorders. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(7):389–403. doi: 10.1038/nrcardio.2016.71. PubMed PMID: 27173772.
20. Gami AS, Hodge DO, Herges RM, Olson EJ, Nykodym J, Kara T, et al. Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(5):565–71. doi: 10.1016/j.jacc.2006.08.060. PubMed PMID: 17276180.
21. Gami AS, Pressman G, Caples SM, Kanagala R, Gard JJ, Davison DE, et al. Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2004;110(4):364–7. doi: 10.1161/01.CIR.0000136587.68725.8E. PubMed PMID: 15249509.
22. Bitter T, Langer C, Vogt J, Lange M, Horstkotte D, Oldenburg O. Sleep-disordered breathing in patients with atrial fibrillation and normal systolic left ventricular function. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(10):164–70. doi: 10.3238/arztebl.2009.0164. PubMed PMID: 19578392.
23. Bitter T, Nölker G, Vogt J, Prinz C, Horstkotte D, Oldenburg O. Predictors of recurrence in patients undergoing cryoballoon ablation for treatment of atrial fibrillation: the independent role of sleep-disordered breathing. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012;23(1):18–25. doi: 10.1111/j.1540-8167.2011.02148.x. PubMed PMID: 21895831.
24. Jongnarangsin K, Chugh A, Good E, Mukerji S, Dey S, Crawford T, et al. Body mass index, obstructive sleep apnea, and outcomes of catheter ablation of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2008;19(7):668–72. doi: 10.1111/j.1540-8167.2008.01118.x. PubMed PMID: 18363693.
25. Koshino Y, Villarraga HR, Orban M, Bruce CJ, Pressman GS, Leinveber P, et al. Changes in left and right ventricular mechanics during the Mueller maneuver in healthy adults: a possible mechanism for abnormal cardiac function in patients with obstructive sleep apnea. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010;3(3):282–9. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.109.901561. PubMed PMID: 20160141.
26. Tsai C-T, Chiang F-T, Tseng C-D, Yu C-C, Wang Y-C, Lai L-P, et al. Mechanical stretch of atrial myocyte monolayer decreases sarcoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase expression and increases susceptibility to

- repolarization alternans. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(20):2106–15. doi: 10.1016/j.jacc.2011.07.039. PubMed PMID: 22051334.
27. Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW, Scharf SM. Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(7):915–20. doi: 10.1164/rccm.200504-560OC. PubMed PMID: 15976378.
  28. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome?: An oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev.* 2003;7(1):35–51. doi: 10.1053/smr.2002.0261.
  29. Jeong E-M, Liu M, Sturdy M, Gao G, Varghese ST, Sovari AA, et al. Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2012;52(2):454–63. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.09.018. PubMed PMID: 21978629.
  30. Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):310–21. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.02.019. PubMed PMID: 16581043.
  31. Aon MA, Cortassa S, Marbán E, O'Rourke B. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(45):44735–44. doi: 10.1074/jbc.M302673200. PubMed PMID: 12930841.
  32. Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest.* 1995;96(4):1897–904. doi: 10.1172/JCI118235. PubMed PMID: 7560081.
  33. Morgan BJ, Denahan T, Ebert TJ. Neurocirculatory consequences of negative intrathoracic pressure vs. asphyxia during voluntary apnea. *J Appl Physiol.* 1993;74(6):2969–75. PubMed PMID: 8365996.
  34. Cutler MJ, Swift NM, Keller DM, Wasmund WL, Smith ML. Hypoxia-mediated prolonged elevation of sympathetic nerve activity after periods of intermittent hypoxic apnea. *J Appl Physiol.* 2004;96(2):754–61. doi: 10.1152/jappphysiol.00506.2003. PubMed PMID: 14555683.
  35. Chen P-S, Chen LS, Fishbein MC, Lin S-F, Nattel S. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ Res.* 2014;114(9):1500–15. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303772. PubMed PMID: 24763467.
  36. Rossi VA, Stradling JR, Kohler M. Effects of obstructive sleep apnoea on heart rhythm. *Eur Respir J.* 2013;41(6):1439–51. doi: 10.1183/09031936.00128412.
  37. Chami HA, Devereux RB, Gottdiener JS, Mehra R, Roman MJ, Benjamin EJ, et al. Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study. *Circulation.* 2008;117(20):2599–607. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.717892. PubMed PMID: 18458174.
  38. Dimitri H, Ng M, Brooks AG, Kuklik P, Stiles MK, Lau DH, et al. Atrial remodeling in obstructive sleep apnea: implications for atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2012;9(3):321–7. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.10.017. PubMed PMID: 22016075.
  39. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GYH, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2010;31(19):2369–429. doi: 10.1093/eurheartj/ehq278. PubMed PMID: 20802247.
  40. Leung RST, Huber MA, Rogge T, Maimon N, Chiu K-L, Bradley TD. Association between atrial fibrillation and central sleep apnea. *Sleep.* 2005;28(12):1543–6. PubMed PMID: 16408413.

41. Lavergne F, Morin L, Armitstead J, Benjafeld A, Richards G, Woehrle H. Atrial fibrillation and sleep-disordered breathing. *J Thorac Dis.* 2015;7(12):E575-84. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.12.57. PubMed PMID: 26793367.
42. Herold G. *Innere Medizin 2015: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis.* Köln: Selbstverl.; 2015. 1002 p. ger.
43. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res.* 2014;114(9):1483–99. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302226. PubMed PMID: 24763466.
44. Dobrev D, Voigt N, Wehrens XHT. The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: pathophysiological and therapeutic implications. *Cardiovasc Res.* 2011;89(4):734–43. doi: 10.1093/cvr/cvq324. PubMed PMID: 20943673.
45. Wakili R, Voigt N, Kääb S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest.* 2011;121(8):2955–68. doi: 10.1172/JCI46315. PubMed PMID: 21804195.
46. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ, et al. Pathophysiology and Prevention of Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2001;103(5):769–77. doi: 10.1161/01.CIR.103.5.769.
47. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev.* 2011;91(1):265–325. doi: 10.1152/physrev.00031.2009. PubMed PMID: 21248168.
48. Nattel S, Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Eur Heart J.* 2012;33(15):1870–7. doi: 10.1093/eurheartj/ehs079. PubMed PMID: 22507975.
49. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008;1(1):62–73. doi: 10.1161/CIRCEP.107.754564. PubMed PMID: 19808395.
50. Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2011;89(4):744–53. doi: 10.1093/cvr/cvq329. PubMed PMID: 20962103.
51. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 1999;44(1):121–31. PubMed PMID: 10615396.
52. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circulation Research.* 1997;81(4):512–25. PubMed PMID: 9314832.
53. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198–205. doi: 10.1038/415198a. PubMed PMID: 11805843.
54. Behrends JC. *Physiologie.* 2nd ed. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme; 2012. XIII, 830 S.
55. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 2002;415(6868):219–26. doi: 10.1038/415219a. PubMed PMID: 11805846.
56. Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Atrial Arrhythmogenesis in Patients With Paroxysmal Atrial Fibrillation. *CLINICAL PERSPECTIVE. Circulation.* 2014;129(2):145–56. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006641.

57. Venetucci LA, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA. The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):285–92. doi: 10.1093/cvr/cvm009. PubMed PMID: 18006483.
58. Hove-Madsen L, Llach A, Bayes-Genís A, Roura S, Rodriguez Font E, Arís A, et al. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation.* 2004;110(11):1358–63. doi: 10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87. PubMed PMID: 15313939.
59. Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks and Ca<sup>2+</sup> waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1996;270(1 Pt 1):C148-59. PubMed PMID: 8772440.
60. Schlotthauer K, Bers DM. Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release Causes Myocyte Depolarization: Underlying Mechanism and Threshold for Triggered Action Potentials. *Circ Res.* 2000;87(9):774–80. doi: 10.1161/01.RES.87.9.774.
61. Christ T, Kovács PP, Acsai K, Knaut M, Eschenhagen T, Jost N, et al. Block of Na(+)/Ca(2+) exchanger by SEA0400 in human right atrial preparations from patients in sinus rhythm and in atrial fibrillation. *Eur J Pharmacol.* 2016;788:286–93. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.06.050. PubMed PMID: 27373849.
62. Inui M, Chamberlain BK, Saito A, Fleischer S. The nature of the modulation of Ca<sup>2+</sup> transport as studied by reconstitution of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1986;261(4):1794–800. PubMed PMID: 2935532.
63. Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2000;32(12):2131–9. doi: 10.1006/jmcc.2000.1270. PubMed PMID: 11112989.
64. Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP. Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(29):22532–6. doi: 10.1074/jbc.C000253200. PubMed PMID: 10825152.
65. Santana LF, Kranias EG, Lederer WJ. Calcium Sparks and Excitation-Contraction Coupling in Phospholamban-Deficient Mouse Ventricular Myocytes. *The Journal of Physiology.* 1997;503(1):21–9. doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.021bi.x.
66. MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem.* 1991;196(3):725–34. PubMed PMID: 1849481.
67. El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, Carrier L, Knaut M, Ravens U, et al. Molecular determinants of altered Ca<sup>2+</sup> handling in human chronic atrial fibrillation. *Circulation.* 2006;114(7):670–80. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.636845. PubMed PMID: 16894034.
68. Priori SG. Clinical and Molecular Characterization of Patients With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation.* 2002;106(1):69–74. doi: 10.1161/01.CIR.0000020013.73106.D8.
69. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, et al. Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene (hRyR2) Underlie Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation.* 2001;103(2):196–200. doi: 10.1161/01.CIR.103.2.196.
70. Cerrone M. Bidirectional Ventricular Tachycardia and Fibrillation Elicited in a Knock-In Mouse Model Carrier of a Mutation in the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circulation Research.* 2005;96(10):e77-e82. doi: 10.1161/01.RES.0000169067.51055.72.

71. George CH, Higgs GV, Lai FA. Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes. *Circ Res.* 2003;93(6):531–40. doi: 10.1161/01.RES.0000091335.07574.86. PubMed PMID: 12919952.
72. Wehrens XHT, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:69–98. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.114521. PubMed PMID: 15709953.
73. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, et al. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol.* 2001;153(4):699–708. PubMed PMID: 11352932.
74. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, et al. PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *Cell.* 2000;101(4):365–76. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80847-8.
75. Sood S, Chelu MG, van Oort RJ, Skapura D, Santonastasi M, Dobrev D, et al. Intracellular calcium leak due to FKBP12.6 deficiency in mice facilitates the inducibility of atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2008;5(7):1047–54. doi: 10.1016/j.hrthm.2008.03.030. PubMed PMID: 18598963.
76. Vest JA, Wehrens XHT, Reiken SR, Lehnart SE, Dobrev D, Chandra P, et al. Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation.* 2005;111(16):2025–32. doi: 10.1161/01.CIR.0000162461.67140.4C. PubMed PMID: 15851612.
77. Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, et al. Dilated Cardiomyopathy and Sudden Death Resulting From Constitutive Activation of Protein Kinase A. *Circ Res.* 2001;89(11):997–1004. doi: 10.1161/hh2301.100003.
78. Bers DM, Despa S. Na/K-ATPase--an integral player in the adrenergic fight-or-flight response. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 2009;19(4):111–8. doi: 10.1016/j.tcm.2009.07.001. PubMed PMID: 19818946.
79. Rassow J. *Biochemie.* 3rd ed. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme; 2012.
80. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.* 2004;94(6):e61-70. doi: 10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2. PubMed PMID: 15016728.
81. Chelu MG, Wehrens XHT. Sarcoplasmic reticulum calcium leak and cardiac arrhythmias. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):952–6. doi: 10.1042/BST0350952. PubMed PMID: 17956253.
82. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:417–45. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.002221. PubMed PMID: 7778873.
83. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2002;34(8):919–39. PubMed PMID: 12234763.
84. Colomer JM, Mao L, Rockman HA, Means AR. Pressure overload selectively up-regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol.* 2003;17(2):183–92. doi: 10.1210/me.2002-0350. PubMed PMID: 12554746.
85. Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem.* 1989;264(30):17907–12. PubMed PMID: 2553697.

86. Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1221(1):89–101. PubMed PMID: 8130281.
87. Schulman H, Greengard P. Ca<sup>2+</sup>-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(11):5432–6. PubMed PMID: 214787.
88. Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*. 2002;364(Pt 3):593–611. doi: 10.1042/BJ20020228. PubMed PMID: 11931644.
89. Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H. Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(24):9497–501. PubMed PMID: 3467320.
90. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science*. 1992;256(5060):1199–202. PubMed PMID: 1317063.
91. Ishida A, Sueyoshi N, Shigeri Y, Kameshita I. Negative regulation of multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases: physiological and pharmacological significance of protein phosphatases. *Br J Pharmacol*. 2008;154(4):729–40. doi: 10.1038/bjp.2008.127. PubMed PMID: 18454172.
92. Erickson JR, Joiner M-IA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, et al. A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell*. 2008;133(3):462–74. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.048.
93. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, et al. Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II $\delta$  is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res*. 2011;108(5):555–65. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.221911. PubMed PMID: 21252154.
94. Purohit A, Rokita AG, Guan X, Chen B, Koval OM, Voigt N, et al. Oxidized Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Triggers Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2013;128(16):1748–57. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003313.
95. Curran J, Hinton MJ, Ríos E, Bers DM, Shannon TR. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res*. 2007;100(3):391–8. doi: 10.1161/01.RES.0000258172.74570.e6. PubMed PMID: 17234966.
96. Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao R-P, et al. Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res*. 2004;95(8):798–806. doi: 10.1161/01.RES.0000145361.50017.aa. PubMed PMID: 15375008.
97. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009;2(6):664–75. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.865279. PubMed PMID: 19919992.
98. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, et al. CaMKII-Dependent Diastolic SR Ca<sup>2+</sup> Leak and Elevated Diastolic Ca<sup>2+</sup> Levels in Right Atrial Myocardium of Patients With Atrial Fibrillation. *Circulation Research*. 2010;106(6):1134–44. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.203836.

99. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, et al. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak and increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 2012;125(17):2059–70. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306. PubMed PMID: 22456474.
100. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ Res*. 2005;97(12):1314–22. doi: 10.1161/01.RES.0000194329.41863.89. PubMed PMID: 16269653.
101. Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort RJ, Skapura DG, et al. Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1940–51. PubMed PMID: 19603549.
102. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res*. 2003;92(8):904–11. doi: 10.1161/01.RES.0000069685.20258.F1. PubMed PMID: 12676813.
103. Li N, Chiang DY, Wang S, Wang Q, Sun L, Voigt N, et al. Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model. *Circulation*. 2014;129(12):1276–85. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006611. PubMed PMID: 24398018.
104. Heijman J, Voigt N, Wehrens XHT, Dobrev D. Calcium dysregulation in atrial fibrillation: the role of CaMKII. *Front. Pharmacol*. 2014;5:30. doi: 10.3389/fphar.2014.00030. PubMed PMID: 24624086.
105. Mesubi OO, Anderson ME. Atrial remodelling in atrial fibrillation: CaMKII as a nodal proarrhythmic signal. *Cardiovasc Res*. 2016;109(4):542–57. doi: 10.1093/cvr/cvw002. PubMed PMID: 26762270.
106. Dobrev D, Wehrens XHT. Calmodulin kinase II, sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak, and atrial fibrillation. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2010;20(1):30–4. doi: 10.1016/j.tcm.2010.03.004. PubMed PMID: 20685575.
107. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76–85. PubMed PMID: 3843705.
108. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1853–64. doi: 10.1172/JCI27438. PubMed PMID: 16767219.
109. Zhang T, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, et al. CaMKII $\delta$  isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J Biol Chem*. 2007;282(48):35078–87. doi: 10.1074/jbc.M707083200. PubMed PMID: 17923476.
110. Yamaguchi N, Takahashi N, Le Xu, Smithies O, Meissner G. Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca release channel. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1344–53. doi: 10.1172/JCI29515. PubMed PMID: 17431507.
111. Kuss O, Blettner M, Bürgermann J. Propensity Score: an Alternative Method of Analyzing Treatment Effects. *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113(35-36):597–603. doi: 10.3238/arztebl.2016.0597. PubMed PMID: 27658473.



112. Baek S, Park SH, Won E, Park YR, Kim HJ. Propensity score matching: a conceptual review for radiology researchers. *Korean J Radiol.* 2015;16(2):286–96. doi: 10.3348/kjr.2015.16.2.286. PubMed PMID: 25741190.
113. Schmidleitner C, Arzt M, Tafelmeier M, Ripfel S, Fauser M, Weizenegger T, et al. Sleep-disordered breathing is associated with disturbed cardiac repolarization in patients with a coronary artery bypass graft surgery. *Sleep Med.* 2018;42:13–20. doi: 10.1016/j.sleep.2017.12.007. PubMed PMID: 29458741.
114. Fisser C, Marcinek A, Hetzenecker A, Debl K, Luchner A, Sterz U, et al. Association of sleep-disordered breathing and disturbed cardiac repolarization in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Sleep Med.* 2017;33:61–7. doi: 10.1016/j.sleep.2017.01.007. PubMed PMID: 28449908.
115. Oldenburg O, Lamp B, Faber L, Teschler H, Horstkotte D, Töpfer V. Sleep-disordered breathing in patients with symptomatic heart failure: A contemporary study of prevalence in and characteristics of 700 patients. *Eur J Heart Fail.* 2007;9(3):251–7. doi: 10.1016/j.ejheart.2006.08.003. PubMed PMID: 17027333.
116. Arzt M, Woehrle H, Oldenburg O, Graml A, Suling A, Erdmann E, et al. Prevalence and Predictors of Sleep-Disordered Breathing in Patients With Stable Chronic Heart Failure: The SchlaHF Registry. *JACC Heart Fail.* 2016;4(2):116–25. doi: 10.1016/j.jchf.2015.09.014. PubMed PMID: 26682790.
117. Frost L, Hune LJ, Vestergaard P. Overweight and obesity as risk factors for atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study. *Am J Med.* 2005;118(5):489–95. doi: 10.1016/j.amjmed.2005.01.031. PubMed PMID: 15866251.
118. Schoonderwoerd BA, Smit MD, Pen L, van Gelder IC. New risk factors for atrial fibrillation: causes of 'not-so-lone atrial fibrillation'. *Europace.* 2008;10(6):668–73. doi: 10.1093/europace/eun124. PubMed PMID: 18480076.
119. Laukkanen JA, Zaccardi F, Karppi J, Ronkainen K, Kurl S. Reduced kidney function is a risk factor for atrial fibrillation. *Nephrology (Carlton).* 2016;21(8):717–20. doi: 10.1111/nep.12727. PubMed PMID: 26780558.
120. Alonso A, Lopez FL, Matsushita K, Loehr LR, Agarwal SK, Chen LY, et al. Chronic kidney disease is associated with the incidence of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation.* 2011;123(25):2946–53. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.020982. PubMed PMID: 21646496.
121. Chamberlain AM, Agarwal SK, Folsom AR, Duval S, Soliman EZ, Ambrose M, et al. Smoking and incidence of atrial fibrillation: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Heart Rhythm.* 2011;8(8):1160–6. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.03.038. PubMed PMID: 21419237.
122. Asselbergs FW, van den Berg MP, Bakker SJ, Signorovitch JE, Hillege HL, van Gilst WH, et al. N-terminal pro B-type natriuretic peptide levels predict newly detected atrial fibrillation in a population-based cohort. *NHJL.* 2008;16(3):73–8. doi: 10.1007/BF03086122.
123. Svennberg E, Lindahl B, Berglund L, Eggers KM, Venge P, Zethelius B, et al. NT-proBNP is a powerful predictor for incident atrial fibrillation - Validation of a multimarker approach. *Int J Cardiol.* 2016;223:74–81. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.001. PubMed PMID: 27541645.
124. Maier LS, Bers DM. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007;73(4):631–40. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.11.005. PubMed PMID: 17157285.

125. Koninck P de, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science*. 1998;279(5348):227–30. PubMed PMID: 9422695.
126. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation Research*. 1999;84(6):713–21. PubMed PMID: 10189359.
127. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, et al. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circulation Research*. 2003;92(8):912–9. doi: 10.1161/01.RES.0000069686.31472.C5. PubMed PMID: 12676814.
128. Köhler AC, Sag CM, Maier LS. Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014;73:92–102. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.001. PubMed PMID: 24631768.
129. Luczak ED, Anderson ME. CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014;73:112–6. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.004. PubMed PMID: 24530899.
130. Aviles RJ, Martin DO, Apperson-Hansen C, Houghtaling PL, Rautaharju P, Kronmal RA, et al. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation*. 2003;108(24):3006–10. doi: 10.1161/01.CIR.0000103131.70301.4F. PubMed PMID: 14623805.
131. Anderson ME. Pathways for CaMKII activation in disease. *Heart Rhythm*. 2011;8(9):1501–3. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.04.027. PubMed PMID: 21699838.
132. Zhang R, Khoo MSC, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med*. 2005;11(4):409–17. doi: 10.1038/nm1215. PubMed PMID: 15793582.
133. Zhu W-Z, Wang S-Q, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, et al. Linkage of  $\beta$ 1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J Clin Invest*. 2003;111(5):617–25. doi: 10.1172/JCI200316326.
134. Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 2013;502(7471):372–6. doi: 10.1038/nature12537. PubMed PMID: 24077098.
135. Culebras A. Sleep apnea and stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015;15(1):503. doi: 10.1007/s11910-014-0503-3. PubMed PMID: 25407131.
136. Fein AS, Shvilkin A, Shah D, Haffajee CI, Das S, Kumar K, et al. Treatment of obstructive sleep apnea reduces the risk of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(4):300–5. doi: 10.1016/j.jacc.2013.03.052. PubMed PMID: 23623910.
137. Neilan TG, Farhad H, Dodson JA, Shah RV, Abbasi SA, Bakker JP, et al. Effect of sleep apnea and continuous positive airway pressure on cardiac structure and recurrence of atrial fibrillation. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(6):e000421. doi: 10.1161/JAHA.113.000421. PubMed PMID: 24275628.
138. Maeder MT, Schoch OD, Rickli H. A clinical approach to obstructive sleep apnea as a risk factor for cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2016;12:85–103. doi: 10.2147/VHRM.S74703. PubMed PMID: 27051291.
139. Schoch OD, Baty F, Niedermann J, Rüdiger JJ, Brutsche MH. Baseline predictors of adherence to positive airway pressure therapy for sleep apnea: a 10-year single-center observational cohort study. *Respiration*. 2014;87(2):121–8. doi: 10.1159/000354186. PubMed PMID: 24216720.

140. Steward DL, Huntley TC, Woodson BT, Surdulescu V. Palate implants for obstructive sleep apnea: Multi-institution, randomized, placebo-controlled study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;139(4):506–10. doi: 10.1016/j.otohns.2008.07.021. PubMed PMID: 18922335.
141. Mortimore IL, Bradley PA, Murray JA, Douglas NJ. Uvulopalatopharyngoplasty may compromise nasal CPAP therapy in sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(6 Pt 1):1759–62. doi: 10.1164/ajrccm.154.6.8970367. PubMed PMID: 8970367.
142. Bordier P. Sleep apnoea in patients with heart failure: Part II: therapy. *Arch Cardiovasc Dis.* 2009;102(10):711–20. doi: 10.1016/j.acvd.2009.06.005. PubMed PMID: 19913772.
143. Bradley TD, Logan AG, Kimoff RJ, Sériès F, Morrison D, Ferguson K, et al. Continuous positive airway pressure for central sleep apnea and heart failure. *N Engl J Med.* 2005;353(19):2025–33. doi: 10.1056/NEJMoa051001. PubMed PMID: 16282177.
144. Kazmierczak A, Krzesiński P, Krzyżanowski K, Gielerak G. Sleep-disordered breathing in patients with heart failure: New trends in therapy. *BioMed Research International.* 2013;2013:459613. doi: 10.1155/2013/459613. PubMed PMID: 23984365.
145. Cowie MR, Woehrle H, Wegscheider K, Angermann C, d'Ortho M-P, Erdmann E, et al. Adaptive Servo-Ventilation for Central Sleep Apnea in Systolic Heart Failure. *N Engl J Med.* 2015;373(12):1095–105. doi: 10.1056/NEJMoa1506459. PubMed PMID: 26323938.
146. Ponikowski P, Javaheri S, Michalkiewicz D, Bart BA, Czarnecka D, Jastrzebski M, et al. Transvenous phrenic nerve stimulation for the treatment of central sleep apnoea in heart failure. *Eur Heart J.* 2012;33(7):889–94. doi: 10.1093/eurheartj/ehr298. PubMed PMID: 21856678.
147. Ding N, Zhang X. Transvenous phrenic nerve stimulation, a novel therapeutic approach for central sleep apnea. *J Thorac Dis.* 2018;10(3):2005–10. doi: 10.21037/jtd.2018.03.59. PubMed PMID: 29707357.
148. Clark AL, Crabbe S, Aziz A, Reddy P, Greenstone M. Use of a screening tool for detection of sleep-disordered breathing. *J Laryngol Otol.* 2009;123(7):746–9. doi: 10.1017/S0022215109004794. PubMed PMID: 19222876.
149. Crowley KE, Rajaratnam SMW, Shea SA, Epstein LJ, Czeisler CA, Lockley SW. Evaluation of a single-channel nasal pressure device to assess obstructive sleep apnea risk in laboratory and home environments. *J Clin Sleep Med.* 2013;9(2):109–16. doi: 10.5664/jcsm.2400. PubMed PMID: 23372462.
150. Erman MK, Stewart D, Einhorn D, Gordon N, Casal E. Validation of the ApneaLink for the screening of sleep apnea: A novel and simple single-channel recording device. *J Clin Sleep Med.* 2007;3(4):387–92. PubMed PMID: 17694728.
151. Ragette R, Wang Y, Weinreich G, Teschler H. Diagnostic performance of single airflow channel recording (ApneaLink) in home diagnosis of sleep apnea. *Sleep Breath.* 2010;14(2):109–14. doi: 10.1007/s11325-009-0290-2. PubMed PMID: 19714380.
152. Weinreich G, Armitstead J, Töpfer V, Wang Y-M, Wang Y, Teschler H. Validation of ApneaLink as screening device for Cheyne-Stokes respiration. *Sleep.* 2009;32(4):553–7. PubMed PMID: 19413150.
153. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in

- collaboration with EACTS. *Eur Heart J*. 2016;37(38):2893–962. doi: 10.1093/eurheartj/ehw210. PubMed PMID: 27567408.
154. Dobrev D, Nattel S. New antiarrhythmic drugs for treatment of atrial fibrillation. *The Lancet*. 2010;375(9721):1212–23. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60096-7.
155. Grandi E, Dobrev D. Non-ion channel therapeutics for heart failure and atrial fibrillation: Are CaMKII inhibitors ready for clinical use? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2017. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.10.010. PubMed PMID: 29079077.
156. Neef S, Mann C, Zwenger A, Dybkova N, Maier LS. Reduction of SR Ca(2+) leak and arrhythmogenic cellular correlates by SMP-114, a novel CaMKII inhibitor with oral bioavailability. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(4):45. doi: 10.1007/s00395-017-0637-y. PubMed PMID: 28612156.
157. Neef S, Steffens A, Pellicena P, Mustroph J, Lebek S, Ort KR, et al. Improvement of cardiomyocyte function by a novel pyrimidine-based CaMKII-inhibitor. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018;115:73–81. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.12.015. PubMed PMID: 29294328.
158. Lebek S, Plößl A, Baier M, Mustroph J, Tarnowski D, Lücht CM, et al. The novel CaMKII inhibitor GS-680 reduces diastolic SR Ca leak and prevents CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018;118:159–68. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.03.020. PubMed PMID: 29614261.
159. Heijman J, Ghezelbash S, Dobrev D. Investigational antiarrhythmic agents: Promising drugs in early clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017;26(8):897–907. doi: 10.1080/13543784.2017.1353601. PubMed PMID: 28691539.
160. Heijman J, Voigt N, Ghezelbash S, Schirmer I, Dobrev D. Calcium Handling Abnormalities as a Target for Atrial Fibrillation Therapeutics: How Close to Clinical Implementation? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;66(6):515–22. doi: 10.1097/FJC.0000000000000253. PubMed PMID: 25830486.
161. McDonough AA, Veiras LC, Minas JN, Ralph DL. Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot.
162. Taylor SC, Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International*. 2014;2014(9):1–8. doi: 10.1155/2014/361590.

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt Prof. Dr. Stefan Wagner für die Überlassung dieses spannenden Themas und für die fachliche Betreuung meiner Arbeit, der sich viel Zeit für mich nahm um Versuche zu besprechen, die Ergebnisse und Graphiken zu entwickeln und auszuarbeiten.

Auch Prof. Lars Maier, als Direktor der Inneren Medizin II am UKR, möchte ich für das Ermöglichen dieser Doktorarbeit danken, in dessen Labor ich Ausstattung und Materialien zur Verfügung gestellt bekommen habe.

Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung an das Team aus dem Labor und meine Mitdoktoranten und Studenten und, dass ich in einer so netten und freundlichen Arbeitsgruppe unterkommen konnte und immer Ansprechpartner für die alltäglichen Laborproblemchen hatte. Mein besonderer Dank gilt hierbei Thomas Sowa, der mich bei der praktischen Umsetzung meiner Versuche und bei jeglichen technischen Problemen und Fragestellungen unterstützt hat. Herzlichen Dank an dieser Stelle auch an Dr. Karin Hammer, Dr. Stefan Neef, Felicia Radtke und Maria Baier.

Ich danke auch dem Team der Herzchirurgie für die gute Zusammenarbeit und das Überlassen der Gewebeproben.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Jonathan Jantsch für die Erstellung des Gutachtens und die mündliche Prüfung.

Zu guter Letzt gilt mein Dank natürlich auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser langen Zeit der Doktorarbeit und des Studiums immer unterstützt haben. Vielen Dank an meine Eltern auch für die sprachliche Korrektur meiner Arbeit. Herzlichsten Dank an Johannes Vogl, der mir immer zur Seite stand und mich unterstützte.