

Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin II
Prof. Dr. Lars Maier
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Auswirkungen zweier neuartiger, potenziell klinisch anwendbarer Inhibitoren
der Ca/Calmodulin-abhängigen Kinase II auf das diastolische Kalziumleck**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Plößl

2022

Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin II
Prof. Dr. Lars Maier
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Auswirkungen zweier neuartiger, potenziell klinisch anwendbarer Inhibitoren
der Ca/Calmodulin-abhängigen Kinase II auf das diastolische Kalziumleck**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Plößl

2022

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Wagner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Flörchinger
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Februar 2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung.....	11
1.1 Die zunehmende Prävalenz der Herzinsuffizienz erfordert neue therapeutische Strategien	11
1.2 Grundlagen der elektromechanischen Koppelung.....	13
1.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	15
1.4 Der kardiale Ryanodinrezeptor	19
1.4.1 Lokalisation, Struktur und assoziierte Proteine.....	19
1.4.2 Kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung und Sparktheorie.....	22
1.4.3 Regulation des RyR 2 durch PKA und CaMKII.....	24
1.5 Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II.....	26
1.5.1 Aufbau und Struktur	26
1.5.2 Regulation und Aktivierung	28
1.5.3 Substrate und Effekte.....	29
1.5.4 Pathophysiologische Rolle	32
1.5.5 CaMKII-Inhibition.....	34
1.6 Erörterung der Fragestellung	36
1.6.1 Zusammenfassung der pathophysiologischen Grundlagen.....	36
1.6.2 Ableitung der Hypothesen.....	37
2 Material und Methoden.....	38
2.1 Pharmakologie der Testsubstanzen.....	39
2.2 Charakterisierung der Studie mit Kardiomyozyten der Maus.....	41
2.2.1 „Transverse Aortic Constriction“ und Herzinsuffizienzmodell	41
2.2.2 Zeitlicher Ablauf <i>in vivo</i>	43
2.2.3 Zellisolation	44
2.3 Charakterisierung der Studie mit humanen Kardiomyozyten.....	46
2.3.1 Studienablauf	46
2.3.2 Gewinnung der Probe und Transport in kardiopleger Lösung.....	47
2.3.3 Reinigen und Waschen der Probe	48
2.3.4 Kalziumfreie Lösung und Kalziumparadox.....	50
2.3.5 Zellisolation mittels enzymatischen Gewebeverdaus	50
2.3.6 Aufreinigung der Zellsuspension.....	52
2.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	53
2.4.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie	53

2.4.2	Prinzipien und Aufbau des konfokalen Fluoreszenzmikroskops	54
2.4.3	Kalziummessung mit Fluo-4.....	56
2.4.4	Detektion von Kalziumsparks und Messung des SR-Kalziumgehalts	58
2.5	Analyse der Originalregistrierungen.....	60
2.6	Berechnung von Sparkfrequenz, SR-Kalziumleck und Kalziumtransienten	61
2.7	Statistische Methoden	63
3	Ergebnisse.....	64
3.1	Ergebnisse aus Versuchen mit RA654321 und GS-680 in humanen Kardiomyozyten.....	65
3.1.1	Klinische Charakteristika der Studienpopulation	66
3.1.2	RA654321 und GS-680 führen zu einer signifikanten Abnahme der Sparkfrequenz	69
3.1.3	RA654321 und GS-680 bewirken eine tendenzielle Reduktion des diastolischen SR-Kalziumlecks	73
3.1.4	Unter Einfluss von RA654321 und GS-680 zeigt der SR-Kalziumgehalt einen zunehmenden Trend.....	74
3.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit RA654321 und GS-680 in humanen Kardiomyozyten	77
3.2	Ergebnisse aus Versuchen mit RA654321 in Kardiomyozyten der Maus	79
3.2.1	Echokardiographische Entwicklung des Modells.....	80
3.2.2	Trotz echokardiographisch erwiesener Wirkung <i>in vivo</i> zeigen sich bei TAC <i>in vitro</i> ohne Nachweis signifikanter Effekte Sparkfrequenz und diastolisches Kalziumleck unverändert und der SR-Kalziumgehalt zunehmend	87
3.2.3	Nach RA654321 <i>in vivo</i> zeigt sich <i>in vitro</i> kein signifikanter Einfluss auf die Sparkfrequenz bei unverändertem SR-Kalziumleck und -gehalt	91
3.2.4	Aus der Applikation von RA654321 <i>in vitro</i> resultieren heterogene Ergebnisse	95
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit RA654321 in Kardiomyozyten der Maus	98
4	Diskussion	100
4.1	Einordnung in den medizinischen, pharmakologischen und wissenschaftlichen Kontext	100
4.1.1	Das Prinzip der CaMKII-Inhibition auf dem Weg in die Klinik	100
4.1.2	CaMKII-Inhibitoren können neben der etablierten medikamentösen Herzinsuffizienztherapie eine wichtige Rolle übernehmen.....	101
4.1.3	Anforderungen an Chemie, Selektivität und Sicherheit von RA654321 und GS-680.....	103
4.2	Interpretation der Ergebnisse.....	104
4.2.1	RA654321 verhindert den Progress einer Herzinsuffizienz <i>in vivo</i>	104
4.2.2	Die ausbleibenden Effekte von TAC auf Sparkfrequenz, SR-Kalziumleck und SR-Kalziumgehalt nach eindeutigen Veränderungen <i>in vivo</i> machen eine kritische Hinterfragung der Methodik <i>in vitro</i> nötig.....	107
4.2.3	Divergenz und eingeschränkte statistische Qualität der Ergebnisse nach Inkubation mit RA654321 <i>in vivo</i> wie auch <i>in vitro</i> erschweren die Ableitung einer Aussage	109

4.2.4	RA654321 und GS-680 adressieren mit einer Reduktion von Sparkfrequenz und diastolischem SR-Kalziumleck in humanen atrialen Kardiomyozyten die pathophysiologische Kernproblematik der CaMKII-Überexpression	110
4.2.5	Die Unterdrückung der „Leak-Load Relationship“ unterstreicht die Wirksamkeit von RA654321 und GS-680.....	112
4.2.6	Das therapeutische Potenzial der CaMKII-Inhibition erschließt sich aus der positiven Beeinflussung klinisch relevanter Parameter	113
4.3	Ausblick	116
5	Zusammenfassung	118
	Literaturverzeichnis	121

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Elektromechanische Koppelung in der Herzmuskelzelle	14
Abb. 2: Makromolekülkomplex aus Ryanodinrezeptor und assoziierten Proteinen	20
Abb. 3: Schematische Darstellung der Sparkentstehung.....	23
Abb. 4: Struktur, Regulation und Aktivierung der CaMKII	27
Abb. 5: Regulation und Effekte der CaMKII	32
Abb. 6: Strukturformel von RA654321	39
Abb. 7: Strukturformel von GS-680	40
Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der Mausversuchsreihe <i>in vivo</i>	43
Abb. 9: Zeitlicher Ablauf der Studie mit humanem Gewebe	46
Abb. 10: Aufbau eines konfokalen Lasermikroskops	55
Abb. 11: Chemische Struktur von Fluo-4, AM	57
Abb. 12: Vehikel	70
Abb. 13: RA654321 – 3 μ M	70
Abb. 14: RA654321 – 10 μ M	70
Abb. 15: GS-680 – 30 nM.....	70
Abb. 16: GS-680 – 100 nM.....	70
Abb. 17: GS-680 – 300 nM.....	70
Abb. 18: AIP – 1 μ M	71
Abb. 19: Die Sparkfrequenz nimmt unter GS-680 und RA654321 signifikant ab	71
Abb. 20: GS-680 und RA654321 bewirken eine tendenzielle Verringerung des diastolischen Kalziumlecks.....	73
Abb. 21: Vehikel	74
Abb. 22: GS-680 – 30 nM.....	75
Abb. 23: GS-680 – 100 nM.....	75
Abb. 24: GS-680 – 300 nM.....	75
Abb. 25: RA654321 – 3 μ M	75
Abb. 26: RA654321 – 10 μ M	75
Abb. 27: AIP – 1 μ M	75
Abb. 28: Es kommt unter GS-680 und RA654321 zu einem tendenziellen Anstieg des SR-Kalziumgehalts	76
Abb. 29: TAC bewirkt eine signifikante Abnahme der EF sowie eine signifikante Zunahme von IVS und LVEDD.....	81
Abb. 30: RA654321 erhält <i>in vivo</i> nach TAC die systolische Funktion und begrenzt möglicherweise die myokardiale Dilatation	84
Abb. 31: Sham Vehikel.....	87

Abb. 32: TAC Vehikel	87
Abb. 33: Wirkung von TAC auf die Sparkfrequenz	88
Abb. 34: Wirkung von TAC auf das diastolische SR-Kalziumleck.....	89
Abb. 35: Sham Vehikel.....	90
Abb. 36: TAC Vehikel	90
Abb. 37: Wirkung von TAC auf den SR-Kalziumgehalt.....	90
Abb. 38: Sham Vehikel	92
Abb. 39: Sham + RA654321 <i>in vivo</i>	92
Abb. 40: TAC Vehikel	92
Abb. 41: TAC + RA654321 <i>in vivo</i>	92
Abb. 42: Wirkung von RA654321 <i>in vivo</i> auf die Sparkfrequenz	93
Abb. 43: Wirkung von RA654321 <i>in vivo</i> auf das diastolische SR-Kalziumleck	94
Abb. 44: Wirkung von RA654321 <i>in vitro</i> auf die Sparkfrequenz	96
Abb. 45: Wirkung von RA654321 <i>in vitro</i> auf das diastolische SR-Kalziumleck	97

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Inhaltsstoffe der Lösung für die enzymatische Isolation von Mauskardiomyozyten	44
Tab. 2: Inhaltsstoffe der Lösung zum Abstoppen der enzymatischen Isolation von Mauskardiomyozyten.....	45
Tab. 3: Inhaltsstoffe des Storagemediums für den Kalziumaufbau bei Mauskardiomyozyten	45
Tab. 4: Inhaltsstoffe von Custodiol	48
Tab. 5: Inhaltsstoffe der Lösung für die enzymatische Isolation humaner Kardiomyozyten	49
Tab. 6: Inhaltsstoffe der Lösung zum Abstoppen der enzymatischen Isolation humaner Kardiomyozyten.....	52
Tab. 7: Inhaltsstoffe des Storagemediums für den Kalziumaufbau bei humanen Kardiomyozyten.....	52
Tab. 8: Inhaltsstoffe der Normaltyrode für die konfokale Kalziummessung	59
Tab. 9: Klinische Charakteristika der Studienpopulation.....	68

Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung	DM = Diabetes mellitus
ACB = Aortokoronarer Bypass	DMSO = Dimethylsulfoxid
ACE = Angiotensin Converting Enzyme	EAD = Early Afterdepolarization
AC3-I = Autocamtide-3-related Inhibitory Peptide	EC ₅₀ = Mittlere effektive Konzentration
AG = Arbeitsgruppe	EF = Ejection Fraction
aHTN = Arterieller Hypertonus	EKZ = Extrakorporale Zirkulation
AIP = Autocamtide-2-related Inhibitory Peptide	FDHM = Full Duration at Half Maximum
AKAP18δ = A-Kinase Anchoring Protein 18δ	FKBP12.6 = FK506-binding Protein12.6
AKE = Aortenklappenersatz	FS = Fractional Shortening
AM = Acetoxymethylester	FWHM = Full Width at Half Maximum
ANOVA = Analysis of Variants	G = Ga(u)ge
AP = Aktionspotenzial	GBD = Global Burden of Disease
AS/AI = Aortenklappenstenose/-insuffizienz	HDAC = Histondeacetylase
ATP = Adenosintriphosphat	HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
AT II = Angiotensin II	hERG = Human Ether-A-Go-Go Related Gene
BAPTA = 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetylsäure	HTK = Histidin, Tryptophan, Ketoglutarat
BCS = Bovine Calf Serum	I _{Ca} = Kalziumstrom
BDM = 2,3-Butandionmonoxim	I _f = Schrittmacherstrom
BMI = Body Mass Index	I _{K1} = Stabilisierender Kaliumstrom
CaM = Calmodulin	I _{to} = Repolarisierender Kaliumstrom
CaMKII = Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II	IC ₅₀ = Mittlere inhibitorische Konzentration
CaMKIIP = CaMKII-Phosphatase	IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry
cAMP = Zyklisches Adenosinmonophosphat	IVS = Interventrikuläres Septum
Ca _v 1.2 = Spannungsabhängiger Kalziumkanal	K _d = Dissoziationskonstante
CC ₅₀ = Mittlere zytotoxische Konzentration	KDIGO = Kidney Disease: Improving Global Outcomes
CDF = Calcium Dependent Facilitation	KG = Körpergewicht
CDI = Calcium Dependent Inactivation	KHK = Koronare Herzkrankheit
CICR = Calcium Induced Calcium Release	K _r 2.1 = Einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
CKD = Chronic Kidney Disease	K _m = Michaelis-Menten-Konstante
COPD = Chronic Obstructive Pulmonary Disease	K _v 1.4, K _v 4.2, K _v 4.3, K _v 11.1 = Spannungsabhängige Kaliumkanäle
CONSENSUS = Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study	LA = Linkes Atrium
DAD = Delayed Afterdepolarization	
DHPR = Dihydropyridinrezeptor	

LSM = Laser Scanning Microscopy
LTCC = Long Term Calcium Channel
LV = Linker Ventrikel
LVEDD = Left Ventricular Enddiastolic Diameter
mAKAP = Muscle A Kinase Anchoring Protein
MERIT-HF = Metoprolol CR/XL Randomised
Intervention Trial in Congestive Heart Failure
MS/MI = Mitralklappenstenose/-insuffizienz
MKE/MKR = Mitralklappenersatz/-rekonstruktion
MOPS = 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW = Mittelwert
NADPH = Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Na_v1.5 = Spannungsabhängiger Natriumkanal
NCX = Natrium-Kalzium-Austauschtransporter
NO(S) = Stickstoffmonoxid(-synthase)
NYHA = New York Heart Association
OP = Operation
P = Phosphat
PDE4D3 = Phosphodiesterase 4D3
PLB = Phospholamban
PKA = Proteinkinase A

PP = Peptidyl-/Proteinphosphatase
RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNS = Ribonukleinsäure
ROUT = Robust Regression and Outlier Removal
rpm = Rounds per Minute
RT = Relaxation Time
RyR = Ryanodinrezeptor
SD = Standard Deviation
SEM = Standard Error of the Mean
Ser = Serin
SERCA = Sarcoplasmatic Endoplasmatic
Reticulum Calcium ATPase
SGLT = Sodium Glucose Linked Transporter
SR = Sarkoplasmatisches Retikulum
Tab. = Tabelle
TAC = Transverse Aortic Constriction
TI = Trikuspidalklappeninsuffizienz
VHF = Vorhofflimmern
WMA = World Medical Association
ZNS = Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die zunehmende Prävalenz der Herzinsuffizienz erfordert neue therapeutische Strategien

Der medizinischen Forschung der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts sind wesentliche Zugewinne auf dem Gebiet der Therapie und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen zu verdanken. Beispielhaft sind hierbei etwa die Entwicklung der aortokoronaren Bypassoperation 1969 oder der perkutanen Koronarintervention mittels Herzkatheter 1977 zu nennen. In der Summe konnte die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen bis hinein ins 21. Jahrhundert um mehr als zwei Drittel reduziert werden (Nabel & Braunwald, 2012).

Auch im Bereich der Herzinsuffizienz konnten in dieser Zeit große Erfolge erzielt werden. Einerseits schritt die medikamentöse Therapie stetig voran, wobei insbesondere mit der Einführung der ACE-Hemmer und der Beta-Blocker im Rahmen namhafter Studien durchschlagende Effekte verzeichnet wurden. Enalapril verringerte im Rahmen der CONSENSUS-Studie nicht nur die Mortalität nach sechs Monaten im NYHA-Stadium IV um 40 %, sondern führte auch zu einer Abnahme der Herzgröße und des NYHA-Stadiums (CONSENSUS Trial Study Group, 1987). Die MERIT-HF-Studie bewies eine Reduktion des relativen Risikos verschiedener Endpunkte wie Mortalität und Hospitalisierung aufgrund der Verschlechterung einer Herzinsuffizienz durch Metoprolol (Hjalmarson et al., 2000).

Andererseits stellten sich Innovationen auf interventioneller und operativer Ebene ein. So bewirkte etwa die kardiale Resynchronisationstherapie neben einer Verringerung der Mortalität auch eine Abnahme der Hospitalisierungsrate, des kardialen „Remodelings“ und des NYHA-Stadiums sowie eine Zunahme der linksventrikulären Auswurfleistung und der körperlichen Leistungsfähigkeit (Ståhlberg et al., 2016).

Es gelang somit im Lauf der vergangenen Jahrzehnte auch die Prognose der Herzinsuffizienz zu verbessern. Orientiert man sich wiederum an der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts als Hochphase der großen therapeutischen Innovationen, so

verringerte sich die 5-Jahres-Mortalität in der Altersgruppe der 65- bis 74-Jährigen in diesem Zeitraum von 70 auf 59 % für Männer bzw. von 57 auf 45 % für Frauen (Mosterd & Hoes, 2007). Dennoch fällt ins Auge, dass dies nicht mit dem Ausmaß der Mortalitätsreduktion kardiovaskulärer Erkrankungen im Allgemeinen Schritt halten kann. Insbesondere zeichnete sich mit Beginn des 21. Jahrhunderts gemessen am 5-Jahres-Überleben kein wesentlicher Fortschritt in der Therapie der Herzinsuffizienz mehr ab (Gerber et al., 2015).

Überdies nimmt die Patientenzahl fortwährend zu. Laut „Global-Burden-of-Disease“-Studie lag die weltweite Prävalenz der symptomatischen Herzinsuffizienz 2010 bei 37,7 Millionen Fällen. Ursächlich waren hierbei zu 68,7 % ischämische Kardiomyopathie, COPD, hypertensive Kardiomyopathie und rheumatische Kardiomyopathie (Vos et al., 2012). In einer Analyse im Jahr 2017 wird die Prävalenz bereits mit 64,3 Millionen angegeben (GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2018). Im Allgemeinen betrifft die Herzinsuffizienz schätzungsweise 1 bis 2 % der Bevölkerung in Industrienationen und die Prävalenz wächst mit zunehmendem Alter (Ponikowski et al., 2016).

Hinzu gesellt sich eine enorme volkswirtschaftliche Bedeutung der Erkrankung, wobei die lebenslangen Therapiekosten eines einzelnen Patienten mit Herzinsuffizienz im Jahr um 120 000 US-Dollar geschätzt wurden (Dunlay et al., 2011; Lesyuk et al., 2018).

Angesichts der noch immer vergleichsweise hohen Mortalität und der zunehmenden Prävalenz sowie nicht zuletzt auch der ökonomischen Bedeutung wird die Notwendigkeit neuer therapeutischer Strategien deutlich.

Die vorliegende Dissertation soll einen Beitrag zur Weiterentwicklung der medikamentösen Herzinsuffizienztherapie liefern. Wie später noch erläutert stellt die gestörte Kalziumhomöostase des Kardiomyozyten in Verbindung mit einer Zunahme des sogenannten diastolischen Kalziumlecks des sarkoplasmatischen Retikulums einen der elementaren pathophysiologischen Mechanismen der Herzinsuffizienz dar. Im Zentrum des Geschehens steht hierbei die Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII), deren Hemmung langfristig als neues therapeutisches Prinzip etabliert werden soll. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden daher die Auswirkungen zweier neuartiger Inhibitoren der CaMKII auf den Kalziumhaushalt des Kardiomyozyten untersucht. Die Versuche fanden in Zellen statt, die aus humanem

Vorhofmyokard isoliert wurden, welches im Zuge herzchirurgischer Eingriffe mit extrakorporaler Zirkulation reseziert wurde. Überdies wurde die Wirkung einer der beiden Substanzen auch in Kardiomyozyten von Mäusen getestet, in welchen zum Teil ein Herzinsuffizienzmodell etabliert wurde.

1.2 Grundlagen der elektromechanischen Koppelung

Zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge erfolgt zu Beginn dieser Arbeit eine kurze Einführung in die elektromechanische Koppelung. Bei der Erregung der Herzmuskelzelle kommt es zu Ladungsverschiebungen an der Zellmembran, welche das Aktionspotenzial (AP) bilden. Die Kontraktion des Myokards hingegen beruht auf der Interaktion der Myofilamente des Sarkomers im Zuge des Querbrückenzyklus, der einen mechanischen Prozess darstellt. Es bedarf daher eines Bindeglieds zwischen Elektrik und Mechanik, der sogenannten elektromechanischen Koppelung (Bers, 2001), welche anhand Abb. 1 veranschaulicht werden soll.

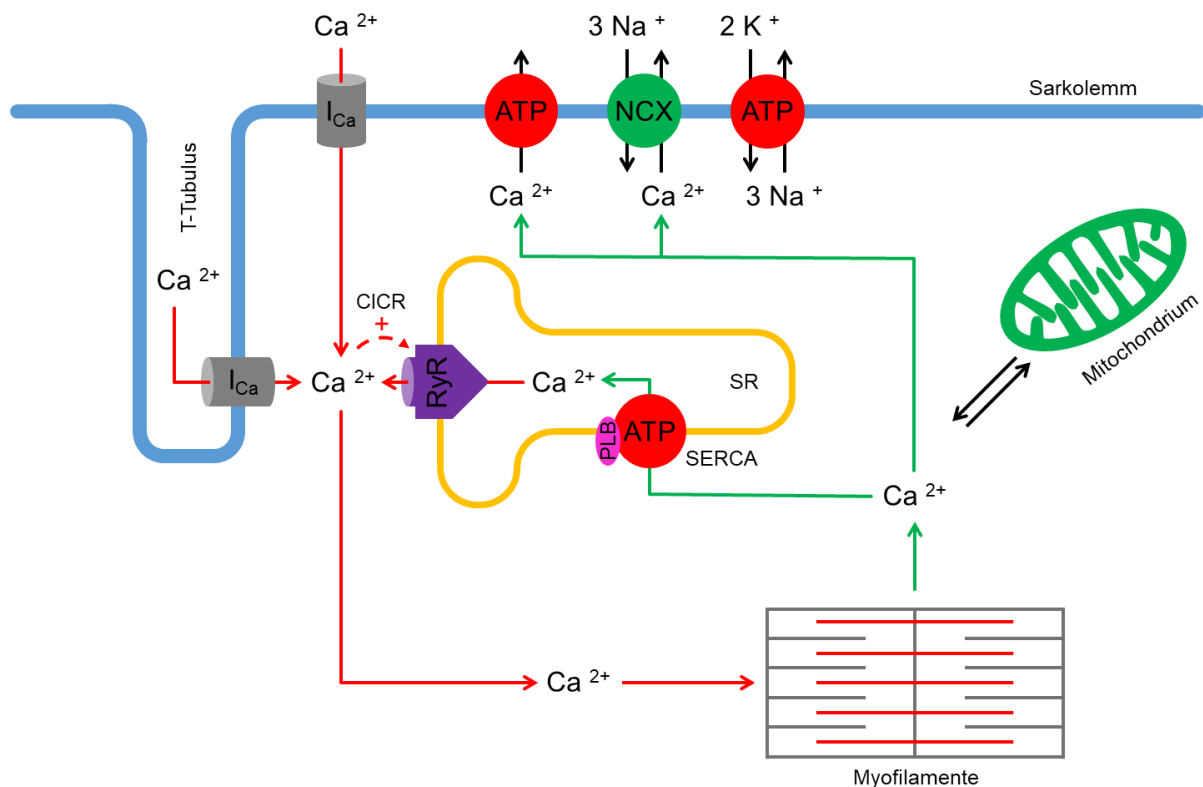


Abb. 1: Elektromechanische Koppelung in der Herzmuskelzelle

Kalziumeinströme in das Sarkoplasma sind rot, die Kalziumelimination grün dargestellt. Elektrische Erregung der Herzmuskelzelle führt zum Kalziumeinstrom über L-Typ-Kalziumkanäle (I_{Ca}). Dies bewirkt die Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanodinrezeptor (RyR). Kalzium bindet an Troponin C, welches daraufhin den Querbrückenzyklus der Myofilamente freigibt. Anschließend wird das Kalzium über die SR-Kalzium-ATPase (SERCA) sowie den Natrium-Kalzium-Austauscher und die Kalzium-ATPase des Sarkolems aus dem Sarkoplasma eliminiert. Hinzu kommen die Mitochondrien als Kalziumpuffer.

Quelle: eigene Abbildung. Nach Bers, 2002a.

Durch die Depolarisation der Zellmembran öffnen sich spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanäle (LTCC), sogenannte Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) (Bodi et al., 2005). Sie befinden sich insbesondere im Bereich der T-Tubuli, welche mit den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) in Form der Dyaden nahezu in Kontakt treten (F. Lu & Pu, 2020). Hier erfolgt die Aktivierung der Ryanodinrezeptoren (RyR) durch Bindung von Kalziumionen an eine entsprechende Bindungsstelle, woraufhin Kalzium aus dem SR ins Zytosol strömt (Bers, 2001).

Dieser zentrale von Fabiato und Fabiato beschriebene Mechanismus wird als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung („Calcium Induced Calcium Release“, CICR) bezeichnet (Fabiato, 1983; Fabiato & Fabiato, 1975) und folgt einem positiven Feedbackmechanismus (Bers, 2002a).

Der Kalziumanstieg im Sarkoplasma ermöglicht nun den Querbrückenzyklus der Myofilamente Aktin und Myosin. Kalzium bindet an Troponin C, was zur Umlagerung von Troponin I führt. Dadurch bewegt sich der Komplex aus Troponin T und Tropomyosin tiefer in eine Rille des Aktinfilaments, womit dessen Myosinbindungsstelle freigegeben wird. Der Querbrückenzyklus kann dann so lange ablaufen bis das Kalzium infolge abfallender sarkoplasmatischer Kalziumkonzentrationen wieder vom Troponin C abdissoziiert (Bers, 2001).

Dieser Konzentrationsabfall setzt zunächst eine Terminierung des Kalziumeinstroms in das Sarkoplasma voraus. Der Einstrom aus dem Extrazellulärraum über den L-Typ-Kalziumkanal ist dabei im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus vor allem von der steigenden intrazellulären Kalziumkonzentration und damit von der zunehmenden Kalziumfreisetzung aus dem SR abhängig (Sipido et al., 1995).

Für die Terminierung des CICR durch den RyR existieren nach Bers verschiedene Mechanismen (Bers, 2002b). Dem lokalen Abfall der Kalziumkonzentration und dem stochastisch determinierten Verschluss der Kanäle werden zwar Beiträge eingeräumt, diese jedoch nicht als hinreichender Mechanismus gesehen.

Hauptverantwortlich für die Terminierung des RyR-Flusses gelten einerseits eine Inaktivierung der Kanäle mit steigender Kalziumkonzentration (Sham et al., 1998) und andererseits eine Adaptation mit abnehmender Offenwahrscheinlichkeit (S. Györke & Fill, 1993).

Abschließend bedarf es für die Relaxation des Kardiomyozyten verschiedener Mechanismen der Kalziumelimination aus dem Sarkoplasma. Diese umfassen die Kalzium-ATPase des SR (SERCA), den sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX), die sarkolemmale Kalzium-ATPase und den mitochondrialen Kalzium-Transporter (Bers, 2002a).

Bei der SR-Kalzium-ATPase handelt es sich um den Subtyp SERCA2a. Sie leistet ATP-abhängig den Hauptteil der Kalziumelimination (Inesi et al., 2008). Für die Regulation der SERCA ist das Protein Phospholamban (PLB) verantwortlich, welches die SERCA-Aktivität hemmt. Die cAMP-abhängige PLB-Phosphorylierung bewirkt in diesem Zusammenhang eine Hemmung von PLB und somit eine Enthemmung der SERCA (MacLennan & Kranias, 2003).

Weiterhin gelangt Kalzium im Austausch gegen Natrium sekundär-aktiv über den Natrium-Kalzium-Austauschtransporter NCX aus der Zelle. Der Transporter folgt hierbei einer 3:1-Stöchiometrie, wobei ein Kalziumion gegen drei Natriumionen ausgetauscht wird. Nach der SERCA übernimmt der NCX mit etwa 30 % den zweitgrößten Anteil der Kalziumelimination aus dem Sarkoplasma (Shigekawa & Iwamoto, 2001).

Neben den beiden genannten Mechanismen sind die sarkolemmale Kalzium-ATPase und der mitochondriale Kalzium-Transporter quantitativ von untergeordneter Bedeutung. Sie werden im Zuge der Kalziumelimination als „langsame Systeme“ bezeichnet und sind zusammen für etwa 1 % der Kalziumelimination verantwortlich (Bers, 2001).

1.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Gemäß Definition der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie handelt es sich bei der Herzinsuffizienz um ein „klinisches Syndrom, [...] das in einer verminderten kardialen Auswurfleistung und/oder erhöhten intrakardialen Drücken in Ruhe oder

unter Belastung resultiert.“ Ferner werde es durch typische Symptome (z. B. Atemnot, Erschöpfung) und Zeichen (z. B. Jugularvenenstauung, periphere Ödeme) charakterisiert, welche durch strukturelle oder funktionelle kardiale Abnormalitäten ausgelöst würden (Ponikowski et al., 2016, S. 2136).

Die Ätiopathogenese der Herzinsuffizienz ist vielfältig und spiegelt sich in den mannigfaltigen Möglichkeiten ihrer Einteilung nach Ejektionsfraktion, Herzzeitvolumen, betroffener Herzkammer und zeitlichem Verlauf wider (Herold, 2018; Ponikowski et al., 2016).

Global gesehen mündet die große Bandbreite möglicher das Syndrom Herzinsuffizienz auslösender Grunderkrankungen klinisch in drei Phänomenen. Diese können parallel, isoliert oder nacheinander auftreten und sich gegenseitig sowohl bedingen als auch verstärken (Herold, 2018; Jessup & Brozena, 2003):

1. Infolge einer myokardialen Kontraktionsschwäche oder aufgrund einer erhöhten Wandspannung durch Volumen- oder Druckbelastung kommt es zur systolischen Ventrikelfunktionsstörung.
2. Durch Herzhypertrophie oder Behinderung der Ventrikelfüllung tritt eine diastolische Ventrikelfunktionsstörung auf.
3. Herzrhythmusstörungen und Blockierungen des physiologischen Reizleitungssystems können auslösend oder im Krankheitsverlauf aggravierend wirken.

Auf molekularer Ebene liegen dem verschiedenste pathobiochemische und pathophysiologische Veränderungen zugrunde, welche im Rahmen von Modellen betrachtet werden können. Deren dysfunktionale Veränderungen werden als sogenanntes „kardiales Remodeling“ bezeichnet und wurden 2013 von Eugene Braunwald zusammenfassend dargestellt (Braunwald, 2013).

Die genannten Volumen- und Druckbelastungen rufen morphologische Anpassungen des Myokards hervor. Die Kardiomyozyten begegnen diesem Zustand mit einer Hypertrophie, da dies auf Grundlage des Gesetzes von Laplace zu einer Reduktion der Wandspannung führt und die Kontraktilität somit zunächst aufrecht erhalten werden kann (Massie, 1983). Weiterhin kommt es zur Fibrose, basierend auf einer Vermehrung von Fibroblasten und einer Zunahme der extrazellulären Matrix (Kong et al., 2014; Travers et al., 2016). Die Folge sind eine erhöhte Steifigkeit und verminderte Dehnbarkeit des Myokards (Borbély et al., 2005; Ohtani et al., 2012),

resultierend in einer gestörten Kontraktion und Relaxation als Grundlage des hämodynamischen Modells (Braunwald, 2013).

Das kardioresnale Modell umfasst die Salz- und Wasserretention (Braunwald, 2013) und beruht wesentlich auf einer Hochregulierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), das im Zuge einer Abnahme der Herzauswurfleistung aktiviert wird. Die hierdurch vermehrt gebildeten Substanzen Angiotensin II, Vasopressin und Aldosteron haben vielfältige Effekte wie eine Vasokonstriktion, Sympathikusaktivierung und erhöhte renale Natrium- und Wasserreabsorption, welche wiederum zu einer Zunahme der kardialen Druck- und Volumenbelastung und somit zum Progress der Herzinsuffizienz führen (Hartupee & Mann, 2017).

Die Hormone und Mediatoren des RAAS werden überdies als humorale Komponente des neurohumoralen Modells gesehen, dessen neuronale Komponente dem sympathischen Nervensystem zukommt (Braunwald, 2013). Infolge einer abnehmenden kardialen Auswurfleistung entstehen Verschiebungen im Zusammenspiel kardiovaskulärer Reflexe. Die Einflüsse sympathikushemmender Reflexe wie des Barorezeptorreflexes nehmen ab, die Einflüsse etwa des aktivierenden kardialen sympathischen afferenten sowie des arteriellen Chemorezeptorreflexes hingegen zu. Zudem bewirkt das vom RAAS gebildete Angiotensin II eine Sympathikusaktivierung (Watson et al., 2006). Dies führt zur Aufrechterhaltung des Schlagvolumens und des arteriellen Perfusionsdrucks, führt jedoch im Sinne eines Circulus vitiosus wiederum zu einer Erhöhung der Volumen- und Druckbelastungen des Herzens und somit zu einem Fortschreiten der Erkrankung (Triposkiadis et al., 2009).

Einen weiteren pathogenetischen Faktor stellt der im Krankheitsverlauf progrediente Zelltod von Kardiomyozyten durch Apoptose, Nekrose und Autophagie dar (Konstantinidis et al., 2012), ausgelöst durch beispielsweise sympathische Überaktivität, Inflammation, oxidativen Stress, Alkohol oder andere Toxine (Braunwald, 2013).

Das genetische Modell der Herzinsuffizienz stellt eine vielfältige Ebene dar und umfasst einerseits die zugrundeliegenden Gendefekte verschiedener Kardiomyopathien, andererseits aber auch die genetischen Grundlagen von Risikofaktoren wie Diabetes mellitus oder arterieller Hypertonie. In jüngerer Zeit rückt

zudem die Rolle regulatorischer RNS in den Fokus der Forschung (Braunwald, 2013).

Abschließend wird noch, ausgehend von den Erläuterungen zur elektromechanischen Koppelung, auf das Modell der veränderten Kalziumzirkulation eingegangen, dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit die größte Bedeutung zukommt. Die zentralen pathophysiologischen Veränderungen umfassen eine Zunahme des RyR-abhängigen diastolischen Kalziumlecks sowie eine Abnahme der SERCA-abhängigen Kalziumwiederaufnahme in das SR (Bers, 2014; Fischer, Maier & Sossalla, 2013; Zima et al., 2014).

Die Regulation des RyR 2 erfolgt wesentlich durch Proteinkinasen an verschiedenen Serinresten. Die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) findet hauptsächlich am Serin 2808 (Huke & Bers, 2008) statt, die CaMKII agiert vornehmlich am Serin 2814 (Wehrens et al., 2004; Wehrens, 2011). Beide Enzyme bewirken eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, was in einer Zunahme der diastolischen Kalziumfreisetzung aus dem SR, des sogenannten diastolischen Kalziumlecks, resultiert (Bovo et al., 2017; Neef et al., 2010; Shan, Betzenhauser et al., 2010; Wehrens, 2011).

Weiterhin liegt eine verminderte Expression (La Bastie et al., 1990) und Aktivität der SERCA vor, wodurch die diastolische Kalziumwiederaufnahme in das SR abnimmt (Denniss et al., 2020). Die Phosphorylierung von PLB durch PKA am Serin 16 und CaMKII am Threonin 17 legt zwar zunächst eine Entthemmung der SERCA nahe (Mattiuzzi & Kranias, 2014). Aufgrund der abnehmenden SERCA-Expression verschiebt sich jedoch das Verhältnis zwischen SERCA und PLB zu Ungunsten der SERCA, was sich negativ auf die Kalziumwiederaufnahme auswirkt (Denniss et al., 2020).

Das im Rahmen der Herzinsuffizienz vergrößerte diastolische Kalziumleck und die verminderte Kalziumelimination aus dem Sarkoplasma führen zu einem reduzierten Kalziumgehalt des SR und einer Kalziumüberladung des Sarkoplasma (Fischer, Maier & Sossalla, 2013), woraus drei Konsequenzen erwachsen:

1. Es steht weniger Kalzium zur Verfügung, welches das SR im Zuge der elektromechanischen Koppelung verlassen kann. Die Amplitude des Kalziumtransienten fällt, was die myokardiale Kontraktilität und somit die systolische Funktion beeinträchtigt (Bers, 2014).

2. Die Relaxation der myokardialen Myofilamente setzt ein Absinken der sarkoplasmatischen Kalziumkonzentration voraus. Durch die Kalziumüberladung wird dies erschwert. Es resultiert eine Relaxationsstörung und somit diastolische Dysfunktion (Bers, 2014).
3. Weiterhin führt das vergrößerte Kalziumleck zu arrhythmogenen Schwankungen der diastolischen Kalziumkonzentration, sogenannten Kalziumwellen. Die erhöhte sarkoplasmatische Kalziumkonzentration führt zudem zu einer Flussverstärkung des bei Herzinsuffizienz ohnehin vermehrt exprimierten NCX. Hierdurch können verspätete Nachdepolarisationen („Delayed Afterdepolarizations“, DADs) mit ebenfalls arrhythmogenem Potenzial ausgelöst werden (Landstrom et al., 2017).

1.4 Der kardiale Ryanodinrezeptor

1.4.1 Lokalisation, Struktur und assoziierte Proteine

Der kardiale Ryanodinrezeptor 2 ist vornehmlich im Bereich der Dyaden, an denen Sarkolemm und terminale Zisternen des SR in Kontakt treten, lokalisiert. Er ist dort in „Clustern“ von teils über hundert Rezeptoren mit einem Durchmesser von bis zu 200 nm organisiert. Die Ryanodinrezeptoren eines Clusters bilden eine funktionelle Einheit mit ca. 10 bis 25 Dihydropyridinrezeptoren, sogenannte „Couplons“ (Bers, 2002a).

Es handelt sich um ein porenbildendes Homotetramer mit einer Gesamtmasse von ca. 2200 kDa, entsprechend einer Masse von etwa 565 kDa pro Monomer, wobei rund 10 % jedes Monomers eine Transmembrandomäne bilden, während der Rest Teil der sarkoplasmatischen Domäne ist (Zalk et al., 2007). Die Monomere beteiligen sich mit jeweils sechs bis acht Transmembransegmenten an der Pore (Du et al., 2002).

Darüber hinaus bildet der RyR einen Makromolekülkomplex mit einer Reihe funktionsmodulierender Proteine (Kushnir & Marks, 2010; Yano et al., 2009; Zalk et al., 2007), der in Abb. 2 schematisch dargestellt ist.

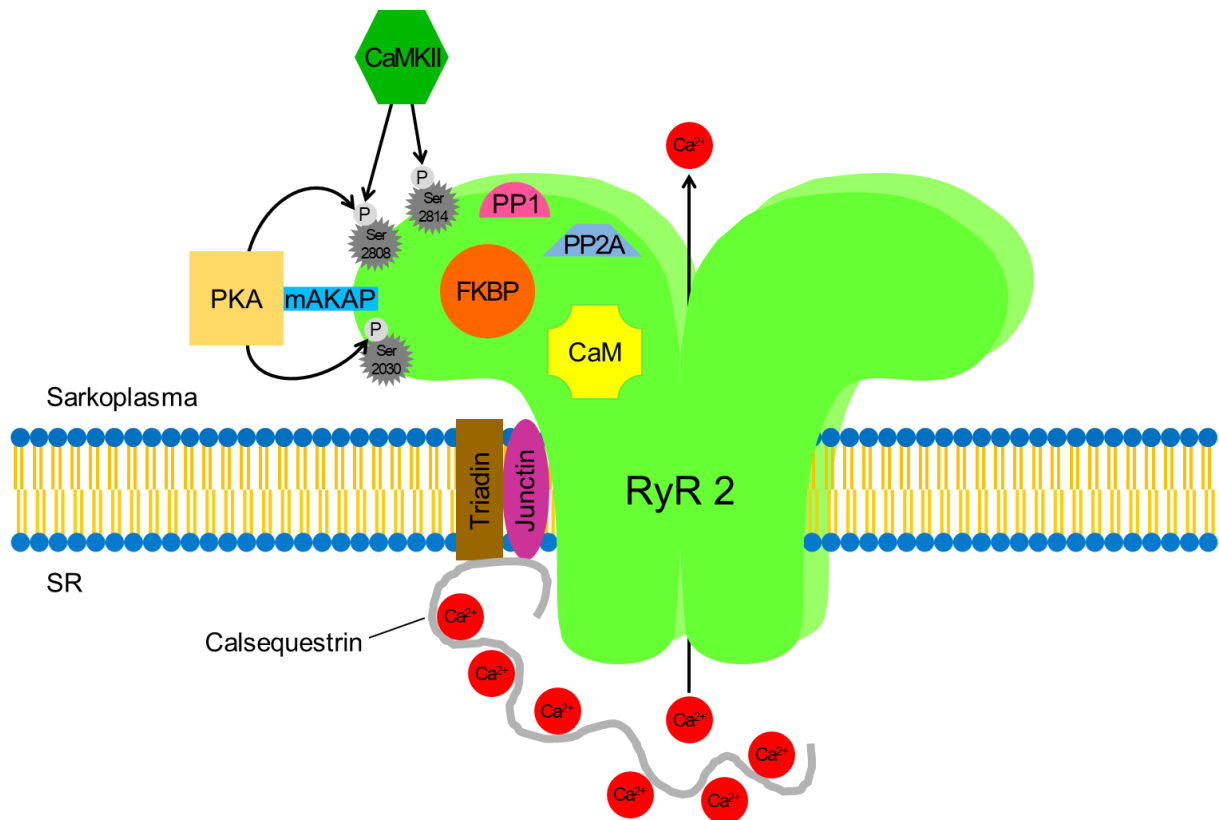


Abb. 2: Makromolekülkomplex aus Ryanodinrezeptor und assoziierten Proteinen

Der Ryanodinrezeptor (RyR) ist ein porenbildendes Homotetramer in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Es dient der Kalziumfreisetzung aus dem SR im Zuge der elektromechanischen Koppelung.

Die Funktion des Rezeptors wird durch verschiedene assoziierte Proteine reguliert, mit welchen er einen Makromolekülkomplex bildet. FKBP (FK506-binding Protein12.6, FKBP12.6 = Calstabin 2) und Calmodulin (CaM) reduzieren seine Offenwahrscheinlichkeit, während sie durch die Proteinkinase A (PKA, verankert über mAKAP = Muscle A kinase anchoring protein) und die Ca/Calmodulinabhängige Kinase II (CaMKII) erhöht wird. Die beiden Peptidylphosphatasen PP1 und PP2A dephosphorylieren den RyR an den Angriffspunkten von PKA und CaMKII. Calsequestrin bindet Kalzium in der Nähe der inneren Kanalpore und ist über die beiden integralen Membranproteine Triadin und Juncitin an den RyR gebunden.

Quelle: eigene Abbildung. Nach Yano et al., 2009 und Kushnir & Marks, 2010.

Calstabin 2 (FK506-binding Protein12.6, FKBP12.6) ist ein Protein mit Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität (Zalk et al., 2007), dem vermutlich eine RyR-stabilisierende Wirkung, insbesondere im geschlossenen Zustand, zukommt. Dies wird dadurch gestützt, dass in Abwesenheit von Calstabin 2 eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR beobachtet wurde (Brillantes et al., 1994). Jedes RyR-Monomer bindet ein Calstabin-2-Molekül (Jayaraman et al., 1992). Die genaue Bindungsstelle liegt im Bereich der Schale des Rezeptors, die je Monomer von vier α -Solenoiden gebildet wird (Santulli et al., 2018).

Calmodulin bindet wie Calstabin 2 in 1:1-Stöchiometrie an jedes Monomer und hemmt den Ryanodinrezeptor (Zalk et al., 2007). Es zeigte sich, dass Calmodulin die

Offenwahrscheinlichkeit des Kanals vor allem bei zytosolischen Kalziumkonzentrationen unter 10 μM hemmt und somit möglicherweise am Schließmechanismus des Kanals beteiligt ist (Xu & Meissner, 2004).

Die Phosphodiesterase 4D3 (PDE4D3) bindet wie die Proteinkinase A über das „Muscle A Kinase Anchoring Protein“ (mAKAP) an den RyR (Lehnart et al., 2005). Sie spaltet cAMP, reguliert dessen lokal vorherrschende Konzentration und vermag diese stellenweise erhöht zu halten (Zaccolo & Pozzan, 2002). Eine Phosphorylierung durch die PKA aktiviert die PDE4D3 (Alvarez et al., 1995) und erhöht deren Affinität zu mAKAP. Dies scheint ein negativer Feedbackmechanismus nach cAMP-abhängiger Aktivierung der PKA zu sein (Carlisle Michel et al., 2004).

Auch die Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A) binden über zwischengeschaltete Proteine, Spinophilin und PR130, an den RyR (Kushnir & Marks, 2010). Sie vermögen den Rezeptor an den Serinresten 2808 und 2814, den Angriffspunkten von PKA und CaMKII, zu dephosphorylieren und erfüllen somit eine regulatorische Funktion (Huke & Bers, 2008).

Mit Sorcin bindet ein weiteres Protein mit hemmendem Einfluss an den RyR. *In vitro* reduzierte es die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals signifikant. Diese Wirkung konnte nach Phosphorylierung von Sorcin durch die katalytische Untereinheit der PKA wiederum signifikant abgeschwächt werden (Lokuta et al., 1997).

Im Gegensatz zu den bisher genannten RyR-assoziierten und -modulierenden Proteinen, die im Bereich der N-terminalen, sarkoplasmatischen Domäne mit dem Rezeptor interagieren, bilden Calsequestrin 2, Junctin und Triadin einen Komplex mit der C-terminalen SR-luminalen Domäne des RyR (Kushnir & Marks, 2010). Junctin und Triadin sind integrale Proteine der SR-Membran, die Calsequestrin am RyR verankern (L. Zhang et al., 1997). Calsequestrin interagiert überdies auch direkt mit dem RyR (Handhke et al., 2016). Es ist das wichtigste kalziumbindende Protein des SR und bildet filamentäre Strukturen in RyR-Nähe, wodurch eine hohe Kalziummenge an der luminalen Seite des Kanals gespeichert wird (Gaburjakova et al., 2013). Die Speicherkapazität beträgt 800 bis 900 nmol Kalzium pro mg Protein, entsprechend bis zu 40 Kalziumionen pro Molekül (Mitchell et al., 1988). Neben dieser Puffereigenschaft gilt Calsequestrin als Kalziumsensor. Luminales Kalzium soll hierbei die Wechselwirkungen zwischen Calsequestrin, Triadin und Junctin beeinflussen, womit eine Regulation des RyR stattfindet (Gaburjakova et al., 2013).

1.4.2 Kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung und Sparktheorie

Während die Kalziumfreisetzung aus dem SR in der Skelettmuskelzelle auf einer direkten mechanischen Interaktion zwischen sarkolemalem Kalziumkanal und RyR basiert, ist der zugrundeliegende Mechanismus in der Herzmuskelzelle eine kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung ohne mechanische Komponente (Bers, 2002a; Fabiato, 1983; Fabiato & Fabiato, 1975; Zalk et al., 2007).

In diesem Zusammenhang gilt der Einstrom über den sarkolemalem L-Typ-Kalziumkanal als bedeutendster Trigger. Die Öffnung bereits eines Kanals mit dem Einstrom von nur zwei bis vier Kalziumionen und deren Bindung an einen RyR reichen aus, um die Kalziumfreisetzung aus dem SR in einem Couplon zu aktivieren (Bers, 2002a).

Die Folge der Öffnung eines RyR eines Clusters wiederum ist die Aktivierung und konsekutive Öffnung der benachbarten Rezeptoren, was zu lokalen Kalziumfreisetzungseignissen führt. Diese stellen die fundamentale Einheit der Kalziumfreisetzung dar und werden als „Kalziumsparks“ bezeichnet (Cheng et al., 1993; Cheng & Lederer, 2008). Ein einzelner Kalziumspark basiert dabei in der Regel auf der Öffnung von 6 bis 20 Ryanodinrezeptoren (Bers, 2002b).

Anhand fluoreszenzmikroskopischer Messungen unter Zuhilfenahme kalziumbindender Farbstoffe können die Ausmaße von Sparks bestimmt werden. Ihre Amplitude bewegt sich im Bereich einer relativen Zunahme der basalen Fluoreszenz um 0,2 bis 4, ihre Breite, die üblicherweise im Bereich der halbmaximalen Amplitude bestimmt wird, beträgt etwa 2 μm . Die maximale Fluoreszenz wird nach etwa 10 ms erreicht, bevor sie innerhalb von etwa 20 ms wieder auf die Hälfte abfällt (Cheng & Lederer, 2008).

Korrespondierend zur Kalziumerhöhung auf der sarkoplasmatischen Seite kommt es auf der luminalen Seite der SR-Membran zu einem lokalen Abfall der Kalziumkonzentration, die als Kalziumblink bezeichnet wird (Brochet et al., 2005). Es zeigte sich, dass die Freisetzung eines Kalziumsparks bei einem Absinken der SR-luminalen Kalziumkonzentration auf etwa 60 % der diastolischen Kalziumkonzentration terminiert wird (Zima et al., 2008). Die Sparkentstehung soll anhand Abb. 3 veranschaulicht werden.

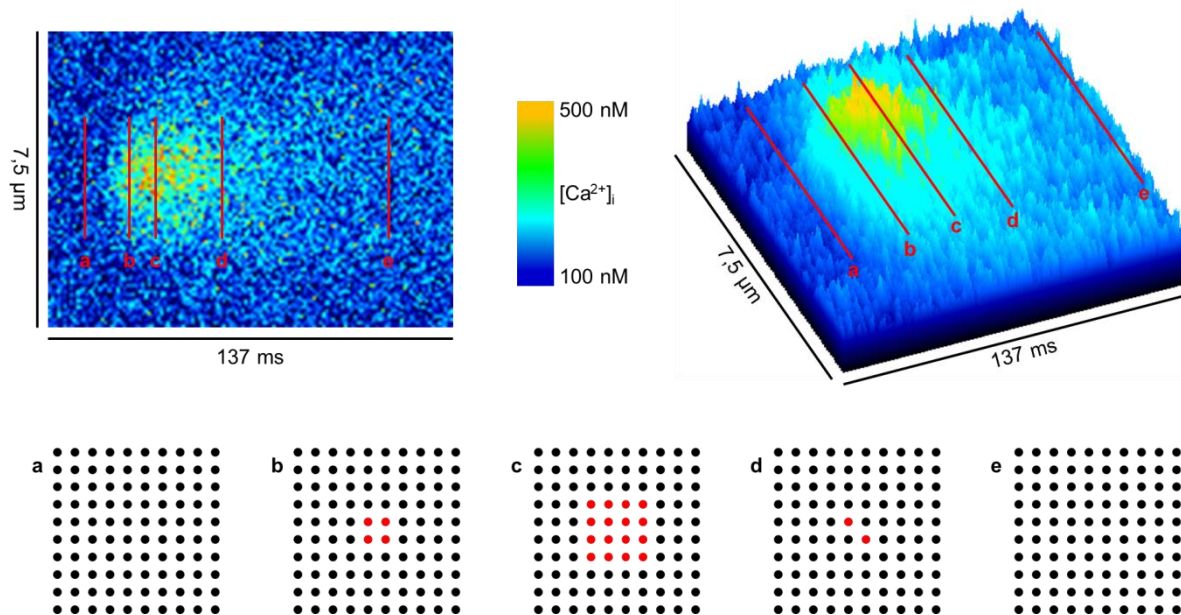


Abb. 3: Schematische Darstellung der Sparkentstehung

Die Abbildung zeigt einen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektierten Kalziumspark in zwei- (links oben) bzw. dreidimensionaler Darstellung (rechts oben). Der mittig dargestellte Farbverlauf des Fluoreszenzsignals sowie die Amplitude in der dreidimensionalen Darstellung entsprechen einer zunehmenden lokalen Kalziumkonzentration mit basalen diastolischen Kalziumwerten ($[Ca^{2+}]_i$) von 100 nM bzw. Spitzenwerten von 500 nM für den Spark.

Weiterhin symbolisieren die quadratisch angeordneten Punkte einen Cluster an Ryanodinrezeptoren. Bereits die Öffnung eines Rezeptors reicht aus, um Nachbarrezeptoren zu aktivieren und somit einen Kalziumspark zu generieren. Vor Beginn des Sparks sind alle Rezeptoren des Clusters geschlossen (a). Nun werden nach und nach Rezeptoren aktiviert (b), bis der Spark in der Regel mit der Öffnung von 6 bis 20 Ryanodinrezeptoren sein Maximum erreicht (c). Danach gehen die Rezeptoren wieder in den inaktiven Zustand über (d), sodass der Spark nach Schließen aller beteiligten Rezeptoren terminiert wird (e).

Quelle: eigene Abbildung. Nach Bers, 2002a und Zalk et al., 2007.

Kommt es im Zuge der Depolarisation zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration im Bereich der terminalen Zisternen auf 2 bis 5 μM , so nimmt die Offenwahrscheinlichkeit aller Ryanodinrezeptoren der Zelle stark zu. Es resultiert ein Transient, bestehend aus mehreren 10 000 Sparks, wobei jeder Spark etwa 2 bis 3 $\times 10^{-19}$ mol Kalzium, entsprechend 12 000 bis 18 000 Kalziumionen enthält (Bers, 2002b). Das Ergebnis ist die Kontraktion des Kardiomyozyten, ausgelöst durch die nachfolgenden Vorgänge der elektromechanischen Koppelung.

Eine generalisierte synchrone Öffnung aller Ryanodinrezeptoren ist pharmakologisch auch mit Kaffein zu erreichen, was im Rahmen der vorliegenden Dissertation auch zur Quantifizierung des SR-Kalziumgehalts genutzt wird (Bers, 2001).

Unter Ruhebedingungen treten Sparks physiologischerweise nur vereinzelt und auf ein Couplon begrenzt auf. Bei erhöhten Kalziumkonzentrationen in Sarkoplasma oder SR kann die Kalziumfreisetzung jedoch auf die ganze Terminalzisterne und von

dort auf benachbarte Zisternen übergreifen. Dadurch entstehen sogenannte Kalziumwellen, die sich mit einer Geschwindigkeit von 100 $\mu\text{m/s}$ über die gesamte Zelle hinwegbewegen können (Bers, 2002a).

Im erkrankten Myokard, insbesondere im Fall einer Herzinsuffizienz, nehmen die Offenwahrscheinlichkeit des RyR und damit die Sparkfrequenz zu (Kushnir & Marks, 2010), was zur Vergrößerung des diastolischen Kalziumlecks mit den bereits erläuterten Konsequenzen eines abnehmenden SR-Kalziumgehalts und einer zunehmenden diastolischen Kalziumkonzentration im Sarkoplasma führt. Dies resultiert schließlich in einer Abnahme der Kontraktilität, einer Verzögerung der Relaxation und der Entstehung arrhythmogener Kalziumwellen sowie verzögerter Nachdepolarisationen (Bers, 2014; Fischer, Maier & Sossalla, 2013; Landstrom et al., 2017).

1.4.3 Regulation des RyR 2 durch PKA und CaMKII

Bislang sind drei Phosphorylierungsstellen des RyR bekannt. Ein Serinrest in Position 2808 wurde zunächst als Angriffspunkt der CaMKII identifiziert (Witcher et al., 1991), in der Folge erwies sich diese Stelle jedoch auch als Ziel der Proteinkinase A (PKA) (Rodriguez et al., 2003). Darüber hinaus konnte den beiden Kinasen auch eine jeweils eigene Phosphorylierungsstelle zugeordnet werden. Die CaMKII agiert zusätzlich am Serin 2814 (Wehrens et al., 2004), während die PKA den RyR am Serin 2030 (Xiao et al., 2005) phosphoryliert.

Vermittelt durch das mAKAP ist die PKA Teil des RyR-Makromolekülkomplexes. Infolge PKA-abhängiger Phosphorylierung wird die Bindung des stabilisierenden Calstabin 2 unterbunden und die Offenwahrscheinlichkeit des RyR wie auch seine kalziuminduzierte Aktivierbarkeit nehmen zu (Marx et al., 2000).

In diesem Zusammenhang erfüllt die PKA eine wichtige Rolle in der kardialen „Fight-or-Flight“-Antwort. Mäuse, bei denen eine PKA-abhängige RyR-Phosphorylierung am Serin 2808 nach Austausch gegen Alanin („S2808A“) nicht möglich war, entwickelten nach β 1-Stimulation eine verminderte inotrope und chronotrope Antwort im Vergleich zum Wildtyp (Shan, Kushnir et al., 2010).

Im genannten S2808A-Mausmodell konnten nach Auslösung eines Myokardinfarktes im Wildtyp nach vier Wochen sowohl eine signifikant geringere kardiale

Auswurfraction als auch erhöhte endsystolische linksventrikuläre Diameter gezeigt werden (Wehrens et al., 2006), während sich in einer anderen Studie, die sich desselben Modells und Studienaufbaus bediente, keine signifikanten Unterschiede fanden (H. Zhang et al., 2012).

Insofern wird der Beitrag einer PKA-abhängigen Hyperphosphorylierung des RyR zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz kontrovers diskutiert. Auch wenn eine Hyperphosphorylierung des Serin 2808 in der Herzinsuffizienz gezeigt wurde (Marx & Marks, 2002), scheint fraglich, ob dies auch kausal zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beiträgt (Houser, 2014).

Auch im Fall der CaMKII ist, basierend auf Immunopräzipitationsanalysen (T. Zhang et al., 2003), bereits lange bekannt, dass sie Teil des RyR-Makroproteinkomplexes ist. Vor kurzem wurde nun auch ein Protein detektiert, das die CaMKII am RyR verankert und ihre Wirkung auf den Rezeptor reguliert. AKAP18δ (A-Kinase Anchoring Protein 18δ) besitzt zwei CaMKII-Bindungsregionen und vermag die Phosphorylierung des RyR am Serin 2814 nach ersten Erkenntnissen in Abhängigkeit davon, ob es mit seiner N- oder C-terminalen Region an das Enzym bindet, zu hemmen bzw. zu fördern (Carlson et al., 2022).

Nach Wehrens (Wehrens et al., 2004) bewirkt eine CaMKII-abhängige RyR-Phosphorylierung am Serin 2814 in isolierten Kardiomyozyten von Ratten eine Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Dieser Effekt war bei höherer sarkoplasmatischer Kalziumkonzentration stärker ausgeprägt und erwies sich unter CaMKII-Inhibition reversibel. Weiterhin zeigte sich nach elektrischer Stimulation eine Verdoppelung des Phosphorylierungsgrades am Serin 2814. Dies konnte in herzinsuffizienten Ratten nicht nachgewiesen werden, sodass die Vermutung besteht, dass der RyR einer frequenzabhängigen Regulation durch die CaMKII unterliegt, welche in der Herzinsuffizienz nicht mehr funktioniert.

Einhergehend mit der gezeigten erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des RyR waren nach CaMKII-abhängiger Phosphorylierung des RyR auch erhöhte Kalziumsparkfrequenzen messbar (Guo et al., 2006), woraus sich ableiten lässt, dass die CaMKII auf diese Weise zu einer Zunahme des SR-Kalziumlecks führt.

Ebendies konnten Fischer et al. zeigen (Fischer, Herting et al., 2013). In humanem Myokard explantierter Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz war der

Phosphorylierungsgrad des Serin 2814 um etwa 300 % erhöht. Die Kalziumsparkfrequenz und das diastolische SR-Kalziumleck waren dabei verdoppelt. Parallel zeigte sich eine unveränderte Phosphorylierung des Serin 2808, wodurch die Rolle der PKA in der Herzinsuffizienz wie bereits erwähnt weiter schrumpft, während die der CaMKII wächst.

1.5 Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II

Im folgenden Abschnitt wird die Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) vorgestellt. In der vorliegenden Dissertation stellt dieses Enzym mit seiner Bedeutung für die Pathogenese der Herzinsuffizienz und kardialer Arrhythmien sowie der Möglichkeit seiner pharmakologischen Inhibition das zentrale Element dar. Daher sollen zunächst Struktur, Regulation und Effekte der CaMKII erläutert werden. Danach erfolgt eine Einordnung in die Elektrophysiologie des Herzens. Abschließend wird auf ihre Rolle bei der Entstehung der Herzinsuffizienz und des Vorhofflimmerns eingegangen und ein Überblick über bisher bekannte Inhibitoren gegeben.

1.5.1 Aufbau und Struktur

Die CaMKII ist als Produkt von vier verschiedenen Genen als α -, β -, γ - und δ -Form in einer Vielzahl von Geweben und Organen des Körpers anzutreffen, wobei die α - und β -Form im Gehirn vorkommen (Hudmon & Schulman, 2002), während im Herz die γ - und δ -Form auftreten und Letztere hier dominiert (Tobimatsu & Fujisawa, 1989). Durch alternatives Splicing im Zuge der Proteinbiosynthese existieren von allen vier Formen wiederum Isoformen. Im Myokard sind dies insbesondere zwei Splicevarianten der CaMKII δ , zum einen die eher zytosolisch angesiedelte δ C-Variante und zum anderen die vornehmlich im Zellkern zu findende δ B-Variante (Banyasz et al., 2011). Die nukleäre Lokalisation der CaMKII δ B beruht auf einer elf Aminosäuren langen Kernlokalisationssequenz (Srinivasan et al., 1994).

Strukturell handelt es sich um ein Dodekamer, welches in Gestalt zweier ringförmig aufeinander liegender Hexamere radähnlich angeordnet ist (Kolodziej et al., 2000; Pellicena & Schulman, 2014). Jedes Monomer besteht von N- nach C-terminal aus

einer katalytischen, einer regulatorischen und einer Assoziationsdomäne (Hudmon & Schulman, 2002; Pellicena & Schulman, 2014; T. Zhang & Brown, 2004; vgl. Abb. 4).

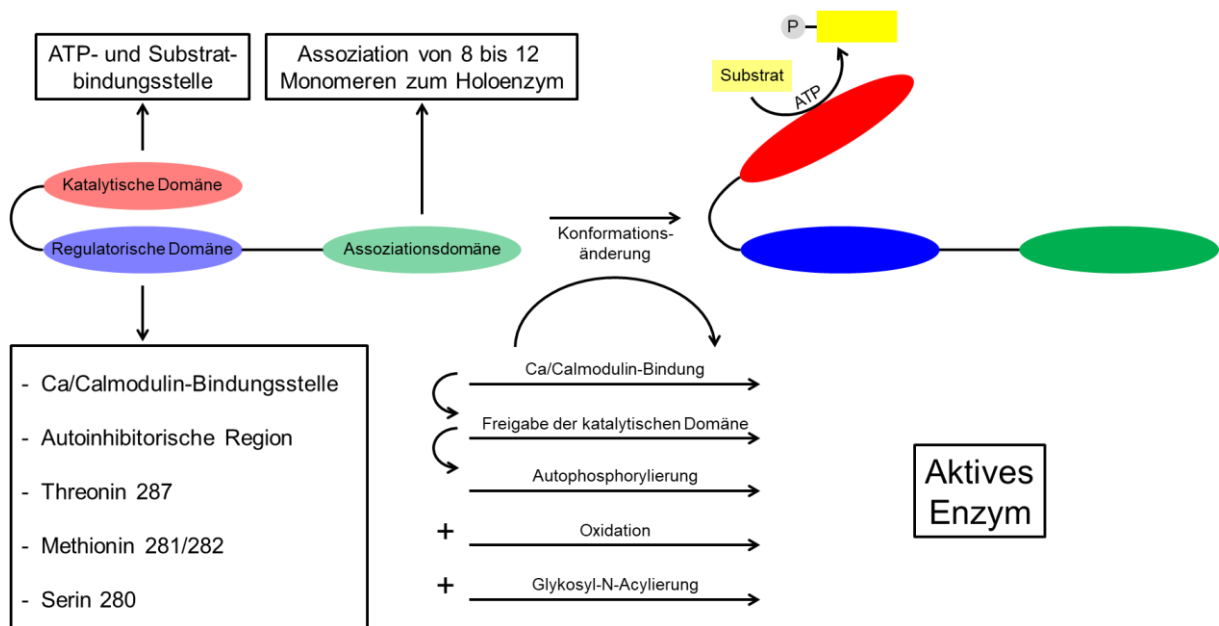


Abb. 4: Struktur, Regulation und Aktivierung der CaMKII

Zu sehen ist ein CaMKII-Monomer im inaktiven (links) und aktiven (rechts) Zustand. Jedes Monomer besitzt drei Domänen. Die regulatorische Domäne (blau) enthält die Ca/Calmodulin-Bindungsstelle, die autoinhibitorische Region und verschiedene modifizierbare Aminosäurereste. Im Zuge der Aktivierung bindet zunächst Ca/Calmodulin, woraufhin es zu einer Umlagerung der autoinhibitorischen Region mit Freigabe der katalytischen Domäne (rot) kommt. Dies ermöglicht sowohl die Phosphorylierung der Substrate als auch die Autophosphorylierung am Threonin 287, womit das Enzym in seiner aktiven Form vorliegt. Weitere Aktivierungsvorgänge umfassen die Oxidation der Methionine 281 und 282 sowie die Glykosyl-N-Acylierung des Serin 280. Über die Assoziationsdomäne (grün) lagern sich 8 bis 12 Monomere zum Holoenzym zusammen.
 Quelle: eigene Abbildung. Nach Erickson et al., 2008 und Maier, 2014.

Die katalytische Domäne beinhaltet die ATP- sowie die Substratbindungsstelle des Enzyms und ist somit der Ort der ATP-abhängigen Phosphorylierung der Zielmoleküle (Banyasz et al., 2011; Hudmon & Schulman, 2002; T. Zhang & Brown, 2004).

In der regulatorischen Domäne befinden sich vier für die Regulation entscheidende Aminosäuren. Im Einzelnen sind dies ein Serin in Position 280, zwei Methionine in Position 281 und 282 und ein Threonin in Position 287 (Hudmon & Schulman, 2002; Pellicena & Schulman, 2014). Darüber hinaus enthält die regulatorische Domäne eine Bindungsstelle für Ca/Calmodulin und eine autoinhibitorische Region (Hudmon & Schulman, 2002; Pellicena & Schulman, 2014; T. Zhang & Brown, 2004).

Die C-terminale Assoziationsdomäne erlaubt den Monomeren die Zusammenlagerung zum Holoenzym (Hudmon & Schulman, 2002; Pellicena & Schulman, 2014; T. Zhang & Brown, 2004).

1.5.2 Regulation und Aktivierung

Dem Namen entsprechend ist Ca/Calmodulin das zentrale aktivierende Element der CaMKII (Banyasz et al., 2011). Im inaktiven Zustand interagiert die autoinhibitorische Region der regulatorischen Domäne über eine α -Helix mit der ATP- und Substratbindungsstelle der katalytischen Domäne (Pellicena & Schulman, 2014; T. Zhang & Brown, 2004). Es verhindert dabei als Pseudosubstrat die Bindung des echten Substrats, sodass sich die Aktivität des Enzyms etwa hundert- bis tausendfach unterhalb des Maximums bewegt (Hudmon & Schulman, 2002).

Im Zuge der Bindung von Ca/Calmodulin kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, wodurch die katalytische Domäne der ATP- und Substratbindung zugänglich wird (Pellicena & Schulman, 2014). Außerdem ermöglicht der Vorgang die Autophosphorylierung des Threonin 287 in der regulatorischen Domäne durch benachbarte Untereinheiten des Holoenzym (Hanson et al., 1994). Durch die Autophosphorylierung bleibt die CaMKII unabhängig von Ca/Calmodulin aktiv (T. Zhang & Brown, 2004).

Betaadrenerge Stimulation bewirkt, vermittelt durch die PKA, eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dies führt zur Bildung von Ca/Calmodulin und somit über die erläuterten Mechanismen zum Übergang der CaMKII in den aktiven Zustand (R. Zhang et al., 2005).

Zusätzlich konnte unter Beta-Stimulation eine NO-abhängige Aktivierung der CaMKII gezeigt werden. Durch die NO-Synthase (NOS) gebildetes NO führt hierbei zur S-Nitrosylierung von Cysteinresten (Gutierrez et al., 2013).

Weitere Aktivierungsmechanismen stellen Modifikationen am Serin 280 und an den Methioninen in Position 281 und 282 dar (Pellicena & Schulman, 2014). Am Serin 280 findet unter Hyperglykämie eine kovalente Glykosyl-N-Acylierung der Hydroxylgruppe statt, woraus eine Ca/Calmodulin-unabhängige Aktivierung der CaMKII resultiert (Erickson et al., 2013).

Ähnlich verhält es sich mit dem Methionin 281/282. Hier ist eine oxidative Aktivierung des Enzyms durch reaktive Sauerstoffspezies möglich, die ebenfalls autonom erfolgt (Erickson et al., 2008). Darüber hinaus wird dieser Weg durch Angiotensin II (AT II) gefördert. Vermutlich über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase (Griendling et al., 1994) kommt es zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, wodurch sich die CaMKII vermehrt im oxidierten Zustand befindet (Purohit et al., 2013).

Abschließend zeigt sich auch in azidotischem Milieu eine erhöhte CaMKII-Aktivität. Dies ist auf eine unter Azidose zunehmende diastolische Kalziumkonzentration zurückzuführen, was in einer Ca/Calmodulin-abhängigen Aktivierung der CaMKII resultiert. Zusätzlich wird die Phosphatase 1 (PP 1)-abhängige Inaktivierung der CaMKII gehemmt (Mattiuzzi et al., 2007).

Eine Hemmung der CaMKII kann durch verschiedene Phosphatasen erfolgen. Neben der genannten Proteinphosphatase 1 sind dies die Proteinphosphatasen 2A (PP2A) und 2C (PP2C) sowie die CaMKII-Phosphatase (CaMKIIP) (Ishida et al., 2003).

1.5.3 Substrate und Effekte

Die CaMKII ist eine Serin/Threonin-Kinase. Befindet sie sich im aktivierten Zustand, ist sie im Stande, andere Moleküle durch ATP-abhängige Phosphorylierung zu beeinflussen (Banyasz et al., 2011).

Bei einigen dieser Zielproteine handelt es sich um sarkolemmale Ionenkanäle, wobei insbesondere die Effekte auf den L-Typ-Kalzium-Kanal, den Natrium-Kanal $Na_v1.5$ und auf Kalium-Kanäle gut untersucht sind (Banyasz et al., 2011; Bers & Grandi, 2009). Außerdem liegen mittlerweile Hinweise vor, dass dieser Aufzählung auch Chlorid-Kanäle anzufügen sind (Banyasz et al., 2011).

Wie bereits erläutert unterliegt der LTCC einer Ca/Calmodulin-abhängigen Inaktivierung („Calcium Dependent Inactivation“, CDI) im Sinne eines negativen Feedbacks (Bers, 2002a). Zugleich vermag Ca/Calmodulin durch Aktivierung der CaMKII jedoch auch den Kalziumstrom I_{CaL} zu verstärken und die Inaktivierung des Kanals zu verzögern (Hryshko & Bers, 1990). Man spricht hierbei von einer kalziumabhängigen Bahnung („Calcium Dependent Facilitation“, CDF) (Bers & Grandi, 2009). Dieser Effekt könnte zur Steigerung der kardialen Leistungsfähigkeit bei höheren Herzfrequenzen beitragen (Bers & Grandi, 2009). Vermutlich wird so der

Inaktivierung durch die direkte Wirkung von Ca/Calmodulin auf den LTCC entgegengewirkt (Bers & Grandi, 2009). Als molekularer Angriffspunkt der CaMKII wurde in diesem Zusammenhang die α_{1C} -Untereinheit des Kanals beschrieben (Hudmon et al., 2005).

Des Weiteren konnten Wagner et al. zeigen, dass auch der spannungsabhängige Natriumkanal $Na_v1.5$ durch die CaMKII phosphoryliert und so sein Inaktivierungsverhalten beeinflusst wird (Wagner et al., 2006). Es zeigte sich hierbei eine reduzierte Verfügbarkeit an aktiven Natriumkanälen unter CaMKII-Einfluss, welche sich nach Erhöhung der Kalziumkonzentration noch stärker ausprägte (Wagner et al., 2006). Die schnelle Inaktivierung, die innerhalb von 10 bis 20 ms nach Kanalöffnung stattfindet, war verlangsamt und es offenbarte sich eine Zunahme des späten Natriumstroms. Die sich im Laufe mehrerer hundert Millisekunden anschließende intermediäre Inaktivierung lief hingegen verstärkt ab. Zudem war die Refraktärzeit verlängert (Wagner et al., 2006). Als Angriffspunkte für die CaMKII am $Na_v1.5$ dienen hierbei wohl das Serin 516 und das Threonin 594, die sich in der ersten intrazellulären Schleife („Loop 1“) des Kanalproteins zwischen erster und zweiter der vier porenbildenden Transmembrandomänen befinden (Ashpole et al., 2012).

Neben den Effekten auf Kalzium- und Natriumkanäle sind auch die Einflüsse der CaMKII auf kardiale Kaliumströme untersucht (Colinas et al., 2006; Sergeant et al., 2005; Tessier et al., 1999; Wagner et al., 2009). Im Falle des für die Repolarisation essentiellen Kaliumstroms I_{to} (Bers & Grandi, 2009) bewirkt eine Hemmung der CaMKII eine Beschleunigung der Inaktivierung (Tessier et al., 1999). Im Umkehrschluss verzögert die CaMKII die Inaktivierung (Sergeant et al., 2005). In weiteren Arbeiten zeigte sich, dass die hierfür verantwortlichen Kanalproteine $K_v4.2$ und $K_v4.3$ Substrate der CaMKII sind, wobei deren Hemmung wiederum zu einer schnelleren Inaktivierung von I_{to} führte (Colinas et al., 2006). Dabei kamen die Einflüsse auf $K_v4.2$ jedoch erst bei erhöhten Kalziumkonzentrationen zum Tragen, während sich diese bei $K_v4.3$ schon unter Normalbedingungen äußerten (Colinas et al., 2006). Nach Differenzierung zwischen akuter und chronischer CaMKII-Exposition wurde offensichtlich, dass beides zu einer Zunahme der langsamen Komponente des I_{to} und einer gesteigerten Expression des verantwortlichen Kanals $K_v1.4$ führt, wohingegen die chronische Exposition zu einer Abnahme der schnellen Komponente

und der Expression des zugehörigen $K_{v4.2}$ führt (Wagner et al., 2009). Außerdem vermindert die CaMKII die Expression des $K_{ir2.1}$, welcher dem das Ruhemembranpotenzial stabilisierenden Kaliumstrom I_{K1} zugrunde liegt (Wagner et al., 2009). Korrespondierende Ergebnisse lieferten auch Li et al., die zeigten, dass unter chronischer CaMKII-Inhibition eine Hochregulation von I_{to} und I_{K1} erfolgt und dies mit einer Verkürzung der Aktionspotenzialdauer einhergeht (J. Li et al., 2006). Dies legt wiederum nahe, dass eine chronisch erhöhte CaMKII-Expression umgekehrt zu einer Verminderung von I_{to} und I_{K1} sowie zu einer Verlängerung der Aktionspotenzialdauer führt.

Neben den bereits gut erforschten Kalzium-, Natrium- und Kaliumkanälen des Herzens fristen Chloridkanäle ein vergleichsweise noch eher vernachlässigtes Dasein. Es ist dennoch zu vermuten, dass sie, auch über die Beteiligung am myokardialen Aktionspotenzial hinaus, einige Funktionen in den zellulären Vorgängen des Herzens erfüllen (Banyasz et al., 2011). Ein Einfluss der CaMKII auf Chloridkanäle konnte in anderen Geweben bereits vermutet werden (Hartzell et al., 2005), weshalb ein Effekt auf kardiale Chloridkanäle zumindest nicht ausgeschlossen werden und Gegenstand der zukünftigen Forschung sein sollte.

Wie bereits ausführlich erläutert (vgl. S. 24 ff.) beeinflusst die CaMKII auch die Aktivität des SR-Kalziumfreisetzungskanals RyR 2 entscheidend (Wehrens, 2011). Als Phosphorylierungsstelle wurde in diesem Zusammenhang ein Serin in Position 2814 ausfindig gemacht. Die CaMKII agiert hierbei als Teil des RyR-Makromoleküls. Es zeigten sich unter CaMKII-Einfluss eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR, eine erhöhte kalziumabhängige und eine herzfrequenzabhängig zunehmende Aktivierbarkeit des Rezeptors (Wehrens et al., 2004).

Die CaMKII ist nicht nur in der Lage die Kalziumfreisetzung aus dem SR über den RyR, sondern auch die Wiederaufnahme über die SERCA zu modulieren. Dieser Effekt wird durch Phosphorylierung von Phospholamban an einem Threonin in Position 17 vermittelt (Mattiuzzi & Kranias, 2014). Da es sich bei PLB um einen Inhibitor der SERCA handelt (James et al., 1989), bewirkt die CaMKII eine verstärkte Wiederaufnahme von Kalzium in das SR.

Schließlich bewirkt die CaMKII eine HDAC-Phosphorylierung und -Translokation (T. Zhang et al., 2007), was die Expression hypertrophie- und dilatationsfördernder Gene induziert (T. Zhang et al., 2002). Zudem wird die Expression des NCX

gefördert (Mani et al., 2010) und wie bereits erläutert auch die Expression von Kaliumkanälen durch die CaMKII beeinflusst (Wagner et al., 2009).

Regulation und Effekte der CaMKII sind zusammenfassend in Abb. 5 dargestellt.

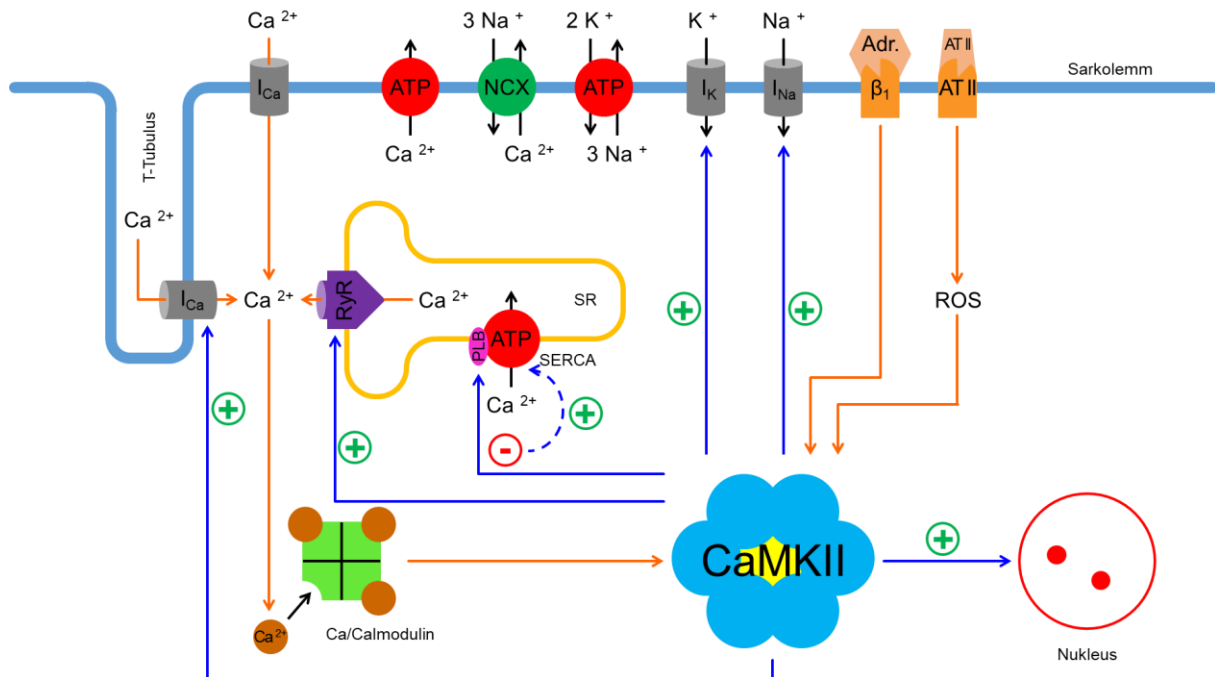


Abb. 5: Regulation und Effekte der CaMKII

Aktivierungswege sind orange, Effekte der CaMKII blau dargestellt. Zu sehen ist die Ca/Calmodulin-abhängige Aktivierung der CaMKII sowie die betaadrenerge und Angiotensin II-abhängige Stimulation des Enzyms. Zu den Zielstrukturen der CaMKII gehören der L-Typ-Kalziumkanal (I_{Ca}) und der Ryanodinrezeptor (RyR), deren Offenwahrscheinlichkeit erhöht wird. Durch Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) kommt es zu einer Entthemmung der $SERCA$. Weiterhin werden Natrium- und Kaliumkanäle in ihren Offenwahrscheinlichkeiten und die Transkription von Genen im Zellkern beeinflusst.

Quelle: eigene Abbildung. Nach Bers, 2002a und Heijman et al., 2014.

1.5.4 Pathophysiologische Rolle

Bei Betrachtung der CaMKII-Effekte fällt auf, dass sich diese in weiten Teilen konkordant zu den Veränderungen bei Herzinsuffizienz verhalten und dass die Expression der CaMKII (Grueter et al., 2007) sowie deren Ca/Calmodulin-unabhängige Aktivität hierbei zunehmen (Anderson et al., 2011). Sie fördert die Offenwahrscheinlichkeit des RyR und trägt zu einer Vergrößerung des diastolischen Kalziumlecks bei (Anderson et al., 2011). Wie bereits erläutert steht aufgrund der geringeren sarkoplasmatischen Kalziumkonzentration weniger Kalzium für den Kontraktionsvorgang in der Systole zur Verfügung, es resultiert eine systolische

Funktionsstörung mit beeinträchtigter Kontraktilität. Aufgrund der erhöhten sarkoplasmatischen Kalziumkonzentration zeigt sich die diastolische Kalziumelimination prolongiert, es resultiert eine diastolische Funktionsstörung mit beeinträchtigter Relaxation (Bers, 2014; Fischer, Maier & Sossalla, 2013).

Darüber hinaus besitzt die CaMKII auch arrhythmogenes Potenzial, begründet durch Schwankungen der erhöhten sarkoplasmatischen Kalziumkonzentration. Diese können zu arrhythmogenen Nachdepolarisationen der Zelle führen. Zu unterscheiden sind frühe („Early Afterdepolarizations“, EADs) und späte Nachdepolarisationen („Delayed Afterdepolarizations“, DADs; (Landstrom et al., 2017).

EADs entstehen vor der völligen Repolarisation der Zelle und in der Regel auf dem Boden einer verlängerten Aktionspotenzialdauer infolge einer LTCC-Aktivierung (Landstrom et al., 2017). Grundlage können eine direkte CaMKII-abhängige LTCC-Aktivierung (Benitah et al., 2010), in Verbindung mit späten Natriumströmen (Karagueuzian et al., 2017) oder NCX-Natriumströmen (Sipido et al., 2007) sein, aber auch verminderte Kaliumströme (Chiamvimonvat et al., 2017), die eine Abnahme der Refraktärzeit des LTCC bewirken. Darüber hinaus treten EADs auch bei AP-Verkürzung auf, ausgelöst durch NCX-Ströme bei gleichzeitig erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen. Typischerweise tritt dies unter anderem bei Vorhofflimmern auf (Patterson et al., 2006).

DADs hingegen entstehen nach der völligen Repolarisation als Konsequenz des diastolischen SR-Kalziumlecks. Ursache sind hier spontane diastolische Kalziumfreisetzungseignisse der Ryanodinrezeptoren in Form von Kalziumsparks (vgl. S. 22 ff.). Hierbei können benachbarte Ryanodinrezeptoren aktiviert werden, wodurch es zu sarkoplasmatischen Kalziumschwankungen kommt (Bers, 2014). Auch hier wirkt insbesondere ein forcierter NCX-Natriumeinstrom als Vermittler (Cheng & Lederer, 2008). Sie fallen umso stärker aus, je geringer das Ausmaß der stabilisierenden Kaliumströme ist (Sung et al., 2006).

In der Pathogenese des Vorhofflimmerns (VHF) als weltweit häufigster Herzrhythmusstörung (Chugh et al., 2014) spielen arrhythmogene Nachdepolarisationen eine wesentliche Rolle. Charakteristisch für das VHF ist eine verkürzte AP-Dauer (Yue et al., 1997), sodass hier vor allem DADs als Auslöser abnormer fokaler Aktivität zu sehen sind (Cheng & Lederer, 2008). Als pathophysiologischer Faktor für die Entstehung von DADs scheint hier die CaMKII

mit ihren Einflüssen auf den kardiomyozytären Kalziumhaushalt mit verantwortlich zu sein, welche bei VHF vermehrt exprimiert wird (Heijman et al., 2014). Die Aufrechterhaltung des VHF beruht dann auf Reentrymechanismen (Heijman et al., 2014). Mit Zunahme der Kalziumdysregulation und des diastolischen Kalziumlecks geht eine Hochregulation des NCX einher. Dies stellt einen wesentlichen Punkt in der Chronifizierung des VHF dar (Voigt et al., 2012).

Neben den elektrophysiologischen Veränderungen beeinflusst die CaMKII auch das strukturelle kardiale Remodeling durch Eingriff in die Proteinbiosynthese. Sie fördert insbesondere die Transkription von Faktoren, die eine myokardiale Hypertrophie bewirken (Anderson et al., 2011).

1.5.5 CaMKII-Inhibition

Nach Betrachtung der pathophysiologischen Bedeutung der CaMKII liegt es nahe, diese auch als Zielstruktur neuartiger Medikamente nutzen zu wollen. Die Inhibition des Enzyms erbrachte bereits erfolgversprechende Ergebnisse. Die bislang bekannten Substanzen sind jedoch auf den Einsatz in der Forschung beschränkt oder haben die Voraussetzungen einer breiten klinischen Anwendung nicht erfüllt. Da die Inhibition der CaMKII zentraler Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, soll hier ein kurzer Überblick erfolgen.

Im Wesentlichen sind als Mechanismen die kompetitive Inhibition durch Bindung des Moleküls an die ATP-Bindungsstelle der CaMKII von der allosterischen Inhibition durch Bindung außerhalb des katalytischen Zentrums zu unterscheiden (Pellicena & Schulman, 2014). Da die Struktur der katalytischen Region wohlbekannt ist, ist erstere Methode weit verbreitet, birgt aber angesichts der Vielzahl von Kinasen das Problem mangelnder Selektivität. Diese wäre bei der allosterischen Inhibition wesentlich besser gewährleistet, hier besteht die Herausforderung allerdings in der Identifikation geeigneter Bindungsstellen (Pellicena & Schulman, 2014). Schließlich muss auch die Selektivität für eine kardiale Wirkung gegeben sein, eine Wirkung beispielsweise im ZNS sollte unterbunden werden, da hierdurch die Rolle der CaMKII bei der Langzeitpotenzierung und somit Gedächtnisbildung affektiert werden könnte (Pellicena & Schulman, 2014).

Einen Überblick über die bisher bekannten Inhibitoren KN-93, KN-62, AC3I, AIP, CaMKIIN und einige kleine Moleküle lieferten Pellicena und Schulman (Pellicena & Schulman, 2014).

KN-62 (Tokumitsu et al., 1990) und seine Weiterentwicklung KN-93 (Sumi et al., 1991) wirken kompetitiv zu Ca/Calmodulin an dessen Bindungsstelle, was allerdings zugleich bedeutet, dass es keinerlei Wirkung auf die aktivierte Form der CaMKII zeigt (Pellicena & Schulman, 2014; Sumi et al., 1991; Tokumitsu et al., 1990). Beide Substanzen weisen eine ähnliche Struktur auf und beeinflussen neben der CaMKII auch andere Kinasen (Pellicena & Schulman, 2014; Sumi et al., 1991; Tokumitsu et al., 1990) und verschiedene Ionenkanäle (Pellicena & Schulman, 2014). KN-93 ist in der Grundlagenforschung weit verbreitet (Pellicena & Schulman, 2014).

Weitere in der Forschung gängige Substanzen imitieren die autoinhibitorische Domäne der CaMKII. Auf Basis der Peptide Autocamtide-2 und -3 (Hanson et al., 1989) entstanden die beiden Inhibitoren AIP („Autocamtide-2-related inhibitory peptide“; Ishida et al., 1995) und AC3-I („Autocamtide-3-related inhibitory peptide“; Braun & Schulman, 1995). Ihre Affinität zur CaMKII soll die zu anderen Kinasen um ein Vielfaches übersteigen (Pellicena & Schulman, 2014).

Den weiten Weg bis zur klinischen Anwendung schaffte auch in der Folgezeit keine Substanz. Chang et al. gelang mit CaMKIIN und dem verkürzten CaMKIINtide die Synthese endogener CaMKII-inhibierender Proteine (Chang et al., 1998; Pellicena & Schulman, 2014). Ähnlich sieht die Situation einer handvoll kleiner Moleküle aus, von denen es SMP-114 (Rimacalib) als Therapeutikum der rheumatoiden Arthritis immerhin in eine Phase-II-Studie schaffte (Pellicena & Schulman, 2014; Westra et al., 2010).

Mitstreiter auf dem Gebiet der CaMKII-Inhibition sind auch Sanofi R & D (Research & Development) und Gilead Sciences, die mit RA654321 und GS-680 zwei neue vielversprechende Moleküle identifizierten. Deren Wirkung auf das CaMKII-abhängige SR-Kalziumleck ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.6 Erörterung der Fragestellung

1.6.1 Zusammenfassung der pathophysiologischen Grundlagen

Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz kann nach Braunwald (Braunwald, 2013) in verschiedene Modelle, entsprechend parallel ablaufender Vorgänge auf verschiedenen Ebenen, eingeteilt werden. Eines dieser Modelle umfasst die Veränderungen in der Kalziumhomöostase des Kardiomyozyten.

Als zentrales Problem gilt hierbei das diastolische Kalziumleck des sarkoplasmatischen Retikulums (Fischer, Maier & Sossalla, 2013), welches zu einer Abnahme des Kalziumgehalts im SR und einer Zunahme im Sarkoplasma führt (Bers, 2014). Hieraus erwachsen drei Konsequenzen:

1. Im Rahmen der elektromechanischen Koppelung verlässt weniger Kalzium das SR, wodurch die myokardiale Kontraktilität abnimmt und die systolische Funktion beeinträchtigt wird (Bers, 2014).
2. Die erhöhte diastolische sarkoplasmatische Kalziumkonzentration führt zu einer verzögerten Kalziumelimination aus dem Sarkoplasma. Hieraus resultiert eine Relaxationsstörung mit diastolischer Dysfunktion (Bers, 2014).
3. Durch die diastolische Kalziumüberladung kommt es zu Kalziumwellen, Schwankungen der diastolischen Kalziumkonzentration, sowie verspäteten Nachdepolarisationen, die aus einer Flussverstärkung des NCX resultieren. Beide Phänomene besitzen arrhythmogenes Potenzial (Landstrom et al., 2017).

Elementare Grundlage des SR-Kalziumlecks sind spontane Kalziumfreisetzungseignisse aus dem SR, sogenannte Kalziumsparks, die auf einer Öffnung benachbarter Ryanodinrezeptoren basieren (Bers, 2002b).

Die Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II vermag den RyR am Serinrest 2814 zu phosphorylieren und somit dessen Offenwahrscheinlichkeit zu erhöhen (Wehrens et al., 2004).

In der Herzinsuffizienz erweisen sich die Offenwahrscheinlichkeit des RyR und dessen CaMKII-abhängiger Phosphorylierungsgrad am Serin 2814 erhöht (Fischer, Herting et al., 2013), woraus die Intention erwächst, mit einer CaMKII-Inhibition das diastolische SR-Kalziumleck zu verkleinern und dessen Folgen abzuschwächen.

1.6.2 Ableitung der Hypothesen

Die vorliegende Dissertation präsentiert die Ergebnisse aus Versuchen mit zwei neuartigen Inhibitoren der Ca/Calmodulin-abhängigen Kinase II. Es handelt sich hierbei um RA654321 und um GS-680.

Die Effekte beider Inhibitoren auf die Kalziumsparkfrequenz und das diastolische SR-Kalziumleck sowie den SR-Kalziumgehalt wurden *in vitro* in isolierten humanen Kardiomyozyten untersucht.

In diesem Zusammenhang bestanden folgende Hypothesen:

1. RA654321 und GS-680 führen zu einer Reduktion der Kalziumsparkfrequenz und konsekutiv des SR-Kalziumlecks.
2. RA654321 und GS-680 bewirken eine Zunahme des SR-Kalziumgehalts.

RA654321 wurde des Weiteren im Mausmodell getestet. Bei einem Teil der Tiere wurde eine Herzinsuffizienz mittels TAC („Transverse Aortic Constriction“) induziert. Zudem erhielt wiederum jeweils ein Teil der Tiere die Testsubstanz bereits *in vivo*. Nach Isolation der Kardiomyozyten wurde RA654321 *in vitro* und dessen Einfluss auf die Sparkfrequenz, das diastolische SR-Kalziumleck und den SR-Kalziumgehalt untersucht.

Zu erwarten waren hierbei folgende Effekte:

1. Nach Induktion einer Herzinsuffizienz mittels TAC nehmen die Sparkfrequenz und das SR-Kalziumleck zu, während der SR-Kalziumgehalt abnimmt.
2. Die Gabe von RA654321 *in vivo* antagonisiert diese Effekte und führt im Vergleich zum Vehikel zu einer Abnahme von Sparkfrequenz und SR-Kalziumleck, wohingegen nun der SR-Kalziumgehalt zunimmt.
3. Gleichermaßen soll es sich im Falle der *In-vitro*-Applikation von RA654321 verhalten. Zum einen sollen die unter 2. genannten Effekte verglichen mit Zellen, die nicht mit RA654321 inkubiert wurden, nachweisbar sein und zum anderen sollen sie verglichen mit Zellen von Mäusen, die RA654321 bereits *in vivo* erhielten, verstärkt sein.

2 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen zweier neuartiger CaMKII-Inhibitoren, zum einen RA654321 von Sanofi R & D und zum anderen GS-680 von Gilead Sciences, auf das diastolische SR-Kalziumleck in isolierten Kardiomyozyten untersucht.

Beide Substanzen wurden in humanen rechtsatrialen Zellen getestet. Die Akquirierung des humanen Probenmaterials erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg. Es handelte sich um Gewebe aus dem Bereich des rechten Vorhofohrs, das nach vorherigem Einverständnis der Patienten im Rahmen von Operationen am offenen Herzen mit externer Kardiozirkulation entfernt wurde. Zusätzlich wurden klinische Daten aus bereits vorliegenden medizinisch indizierten Untersuchungen eingeholt.

Zudem fanden im Fall von RA654321 auch Versuche mit Kardiomyozyten der Maus statt, da dies den Zugang zu ventrikulären Zellen bot, während ventrikuläres humanes Gewebe im klinischen Regelbetrieb nur selten zur Verfügung stand. Weiterhin ermöglichte das Mausmodell eine Standardisierung. Die vielfach vorhandenen Vorerkrankungen oder kardiovaskulären Risikofaktoren sowie das meist fortgeschrittene Alter der einbezogenen Patienten legen interindividuell beträchtliche Unterschiede nahe, welche bei den Mäusen ausgeschlossen werden konnten.

Außerdem wurde in den Mäusen ein Herzinsuffizienzmodell mittels „Transverse Aortic Constriction“ (TAC) etabliert. Dabei erhielten die Tiere der Versuchsgruppe in Vollnarkose nach Thorakotomie einen Ring um die Aorta ascendens, wodurch deren Durchmesser ab- und die kardiale Nachlast somit zunimmt. Um Störfaktoren etwa durch Narkose oder operative Maßnahmen zu vermeiden, wurde bei den Tieren der Vehikelgruppe eine Scheinoperation („Sham“) durchgeführt, die abgesehen von der Einengung der Aorta alle anderen Schritte umfasste.

Im Nachgang wurden die Tiere nach TAC- bzw. Sham-Prozedur erneut jeweils in zwei Gruppen unterteilt, von denen jeweils einer Gruppe RA654321 per Knopfkanüle verabreicht wurde, während die andere Gruppe die Substanz noch nicht erhielt.

Zur regelmäßigen kardialen Evaluation fanden mehrfache echokardiographische Untersuchungen prä- und postoperativ bis kurz vor Zellisolation statt.

Das myokardiale Gewebe der Mäuse wie auch die humanen Proben wurden enzymatischen Zellisoliationsverfahren unterzogen und die Zellen abzentrifugiert. Da dies in kalziumfreien bzw. -armen Medien stattfand, schloss sich hinterher eine schrittweise Erhöhung der Kalziumkonzentration an.

Danach wurden die Zellen mit dem kalziumbindenden Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4, AM inkubiert. Da sich dessen Fluoreszenzsignal proportional zur vorliegenden Kalziumkonzentration verhält, konnte diese in den Kardiomyozyten nun mittels Konfokalmikroskopie quantifiziert werden.

Zum einen wurden spontane diastolische Kalziumfreisetzungseignisse, die bereits erwähnten Kalziumsparks, untersucht. Zum anderen wurde der SR-Kalziumgehalt nach kompletter Entleerung infolge von Kaffeinapplikation bestimmt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm „ImageJ“, die statistische Verarbeitung mit „GraphPad Prism“.

Die vorliegende Dissertation entstand nach den ethischen Grundsätzen der WMA-Deklaration von Helsinki 1964 bzw. ihrer aktuellen Fassung von 2013.

2.1 Pharmakologie der Testsubstanzen

Der erste der beiden getesteten CaMKII-Inhibitoren ist RA654321 von Sanofi-Aventis R & D. Die Strukturformel der Substanz zeigt Abb. 6.

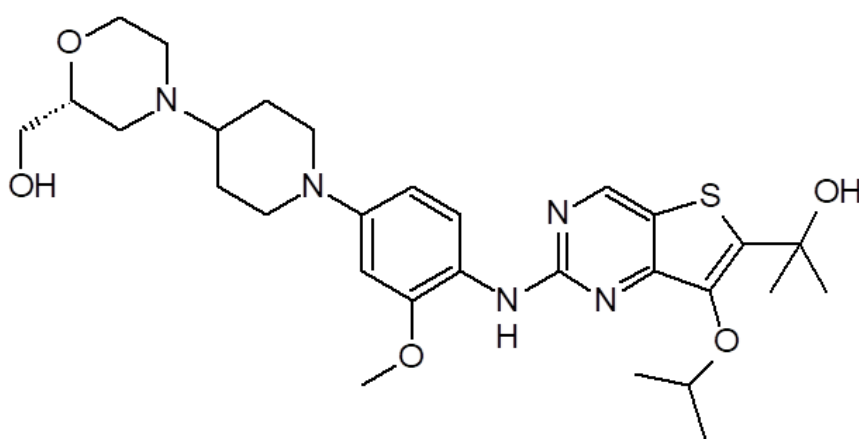


Abb. 6: Strukturformel von RA654321

Das Molekül basiert auf einem Thienopyrimidingerüst.

Quelle: eigene Abbildung. Nach Beauverger et al., 2020.

Das Molekulargewicht von RA654321 beträgt 571,1 kDa. Analysen zur Potenz mittels enzymatischer Assays erbrachten im Fall der vier CaMKII-Isoformen bei ATP-Konzentrationen im Bereich der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) der Enzyme mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC_{50}) für die Isoformen δ , γ , α und β von 15, 25, 61 und 420 nM. Zudem zeigte sich das kompetitive Verhalten von RA654321 gegenüber ATP bei Analysen mit ATP-Konzentrationen der zehnfachen K_m . Auch im radioaktiven Assay wurde die Selektivität für die CaMKII gegenüber einer Vielzahl anderer kleiner Moleküle bestätigt, die IC_{50} für die δ - und γ -Isoform betrug hier < 3 nM. Für die Phosphorylierung von PLB am Threonin 17 wurde im Immunoblot eine IC_{50} von 140, 205 und 220 nM für Kardiomyozyten von Ratte, Maus und Mensch ermittelt. Weiterhin konnte mittels Patch-Clamp-Technik auch eine im Vergleich zum in der Forschung etablierten CaMKII-Inhibitor KN-93 vielfach höhere IC_{50} im Falle wichtiger kardialer Ionenkanäle gezeigt werden. Schließlich lag die orale Bioverfügbarkeit in Mäusen bei nahezu 100 % und es bestand eine lange Eliminationshalbwertszeit von fünf Stunden (Beauverger et al., 2020).

Bei dem zweiten Inhibitor handelt es sich um die Substanz GS-680 von Gilead Sciences, Inc., deren voller, den Nomenklaturregeln der IUPAC entsprechender Name (S)-(3-aminopyrrolidin-1-yl)(2-(thiophen-2-yl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-3-yl)pyridin-4-yl)methanon lautet (Lebek et al., 2018). Ihre Strukturformel ist in Abb. 7 dargestellt.

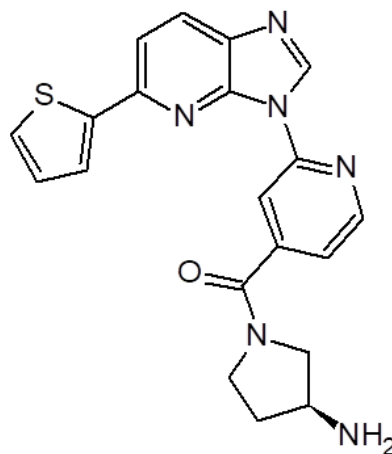


Abb. 7: Strukturformel von GS-680

Es handelt sich hierbei nach IUPAC um das Molekül (S)-(3-aminopyrrolidin-1-yl)(2-(thiophen-2-yl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-3-yl)pyridin-4-yl)methanon.

Quelle: eigene Abbildung. Nach Lebek et al., 2018.

Die Auswahl von GS-680 als potenziellen CaMKII-Inhibitor basierte zunächst auf einem Screening der hauseigenen Datenbank kleiner Moleküle von Gilead Sciences. Darauf folgende Analysen erbrachten eine deutliche Selektivität für die kardial vorherrschende CaMKII δ . Die IC₅₀ betrug $2,3 \pm 0,2$ nmol/l gegenüber $15,9 \pm 1,3$ nmol/l für die Isoform CaMKII α . GS-680 wies hierbei für die CaMKII-Isoformen γ , α und β eine 3,1-, 8,7- bzw. 22,5-fach reduzierte Potenz verglichen mit der δ -Isoform auf. Weiterhin gab es Hinweise auf eine Gewebsspezifität. In ventrikulären Kardiomyozyten neonataler Ratten lag die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) bei $98,9 \pm 8,1$ nmol/l gegenüber 9005 ± 6127 nmol/l in Neuronen. Als EC₅₀ für die Inhibition des spannungsabhängigen Kaliumkanals hERG K_V11.1 stellte sich 3000 nmol/l heraus. In Hinblick auf eine später zu gewährleistende Patientensicherheit wurde für weitere Experimente im Verhältnis 1:10 als höchste Konzentration 300 nmol/l gewählt. Die mittlere zytotoxische Konzentration (CC₅₀) bewegte sich zwischen 2,5 und 21,4 μ mol/l (Lebek et al., 2018).

2.2 Charakterisierung der Studie mit Kardiomyozyten der Maus

Der CaMKII-Inhibitor RA654321 wurde zunächst in Kardiomyozyten der Maus getestet, da hierbei im Gegensatz zu den humanen Gewebeproben ventrikuläre Zellen zur Verfügung standen und in Abwesenheit von Vorerkrankungen und Alter der Patienten als Störfaktoren eine Standardisierung möglich war. Zudem konnte mit „Transverse Aortic Constriction“ (TAC) ein etabliertes Herzinsuffizienzmodell angewandt werden (Patten & Hall-Porter, 2009).

2.2.1 „Transverse Aortic Constriction“ und Herzinsuffizienzmodell

Für die Versuchsreihe wurden 10-14 Wochen alte Mäuse vom Typ C57BL/6 verwendet und einer TAC- oder Sham-Operation unterzogen. Das TAC-Modell wurde vor etwa dreißig Jahren entwickelt, um hypertoniebedingte kardiale Veränderungen auch *in vivo* untersuchen zu können (Rockman et al., 1991). Im Rahmen des Eingriffs wird nach Narkoseeinleitung eine Thorakotomie durchgeführt und ein Faden

um die Aorta gelegt, wodurch sich deren Durchmesser verringert und die kardiale Nachlast erhöht (deAlmeida et al., 2010; Rockman et al., 1991).

Im Anschluss an die TAC-Operation konnten bereits nach sechs Stunden erhöhte linksventrikuläre systolische Druck- und Wandspannungsverhältnisse gemessen werden (Toischer et al., 2010). Nach einer Woche waren im Sinne einer echokardiographisch nachweisbaren Zunahme der Septumdicke sowie einer Zunahme des linksventrikulären wie auch des gesamten Herzgewichtes deutliche Hypertrophiezeichen ersichtlich (Toischer et al., 2010; Toischer et al., 2013), wobei sich die linksventrikuläre Auswurfleistung zu diesem Zeitpunkt noch erhalten präsentierte (Toischer et al., 2013).

Bereits nach zwei Wochen stellte sich eine Abnahme der linksventrikulären Auswurfleistung von 63 auf 47 % und nach drei Wochen weiter auf 35 % ein (Mustroph et al., 2020).

Nach fünf Wochen konnte echokardiographisch eine Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Diameters um 12 % (Toischer et al., 2013) und nach sechs Wochen eine zunehmende diastolische Relaxationsstörung im Gewebedoppler (Schnelle et al., 2018) gemessen werden.

Zusammenfassend kann im Falle des TAC-Modells somit von einer konzentrischen Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer Auswurfleistung in den ersten ein bis zwei Wochen gesprochen werden. Spätestens nach zwei Wochen beginnt die Auswurfleistung abzunehmen, bevor sich schließlich nach fünf bis sechs Wochen eine linksventrikuläre Dilatation mit zunehmender diastolischer Funktionsstörung einstellt.

Neben den genannten morphologischen und funktionellen Veränderungen war zusätzlich nach 24 Stunden, sieben Tagen (Toischer et al., 2010) und drei Wochen (Mustroph et al., 2020) eine erhöhte Aktivität der CaMKII nachweisbar.

Die Sham-Operation hingegen ist lediglich eine Scheinoperation. Es werden alle Operationsschritte der TAC-Operation durchgeführt ohne dass ein Faden um die Aorta gebunden wird. Somit können Operation und Narkose an sich als beeinflussende Variablen ausgeschlossen werden.

Die perioperative Analgesie wurde mit Metamizol (1,33 mg/ml im Trinkwasser, zwei Tage prä- bis sieben Tage postoperativ) und Buprenorphin (60 µg/kg KG subkutan eine Stunde präoperativ; 0,1 mg/kg KG postoperativ) durchgeführt. Die

Narkoseeinleitung umfasste die intraperitoneale Applikation von Medetomidin (0,5 mg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG). Die Eröffnung des Situs erfolgte über einen 1 bis 1,5 cm langen Querschnitt oberhalb des Brustbeins und nach Freilegung des Aortenbogens wurde ein chirurgischer Faden (Größe: 6-0) um die Aorta gelegt. Die Standardisierung des Stenosedurchmessers war mit Anlegen einer 27 G-Kanüle gewährleistet. Nach Verschluss des Schnitts wurde die Narkose durch wiederum intraperitoneale Applikation von Atipamezol (2,5 mg/kg KG) und Flumazenil (0,5 mg/kg KG) aufgehoben und das Tier bis zum Aufwachen auf einer Wärmeplatte gewärmt.

2.2.2 Zeitlicher Ablauf *in vivo*

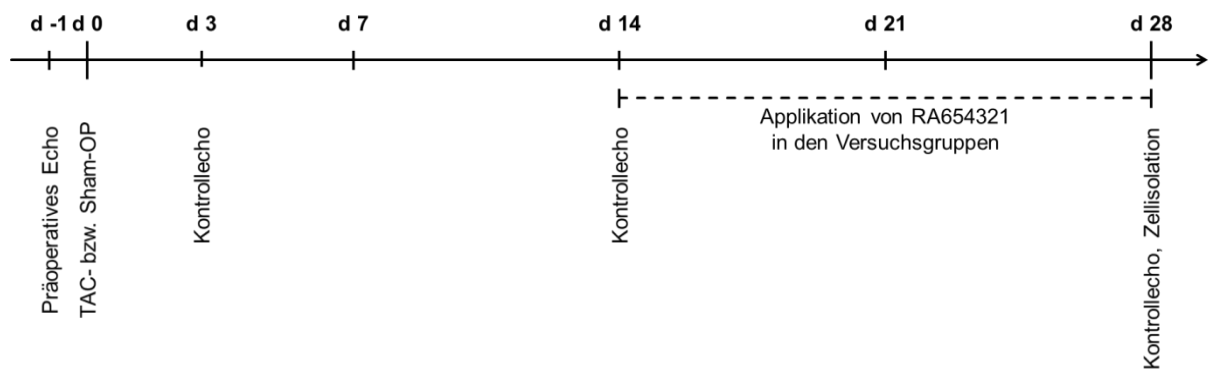


Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der Mausversuchsreihe *in vivo*

Der Zeitraum erstreckt sich vom OP-Tag (Tag 0) über vier Wochen bis zum Tag der Zellisolation (Tag 28). Die kardiale Funktion wurde einen Tag präoperativ, drei und vierzehn Tage postoperativ sowie abschließend am Isolationstag echokardiographisch evaluiert. In der dritten und vierten Woche erhielten die Versuchsgruppen RA654321 über eine Knopfkanüle, nicht jedoch die Vehikelgruppen.

Den zeitlichen Ablauf *in vivo* verdeutlicht Abb. 8. Tag 0 entspricht dem OP-Tag, Tag 28 dem Zeitpunkt der Zellisolation nach vier Wochen. Ab der dritten postoperativen Woche bis zum Versuchsende nach vier Wochen erhielt jeweils die Hälfte der TAC- bzw. der Sham-Mäuse täglich die Testsubstanz (30 mg/kg) während der jeweils anderen Hälfte das Vehikel ohne weitere Zusätze verabreicht wurde. Die Applikation erfolgte oral über eine Knopfkanüle. Zur Evaluation der kardialen Funktion wurde zudem einen Tag vor der Operation und postoperativ nach drei Tagen, zwei und vier Wochen eine Echokardiographie durchgeführt, deren Resultate dem Ergebnisteil dieser Arbeit zu entnehmen sind (vgl. S. 80 ff.). Es ergeben sich hieraus vier

Gruppen, zwei Sham- und zwei TAC-Gruppen, wovon wiederum jeweils eine Gruppe einer *In-vivo*-Exposition der Testsubstanz bzw. des Vehikels ausgesetzt wurde.

2.2.3 Zellisolation

Die Zellisolation aus den Mäuseherzen erfolgte mittels eines Langendorff-Systems. Nach Betäubung der Tiere mit Isofluran und anschließender zervikaler Dislokation wurde das Herz entnommen, gewogen und gespült sowie die Vorhöfe entfernt. Nun konnte die Aorta kanüliert und der retrograde Verdau der Ventrikel über das Koronarsystem durchgeführt werden. Dieser fand über siebeneinhalb Minuten bei pH 7,46 (37 °C) in 20 ml Isolationslösung (Inhalt vgl. Tab. 1) statt, wobei eine Liberase und Trypsin verwendet wurden und eine Kalziumkonzentration von 0,0125 mmol/l vorherrschte.

Substanz	Molarität (mmol/l)	Hersteller
NaCl	113	Carl Roth
KCl	4,7	Carl Roth
KH ₂ PO ₄	0,6	Carl Roth
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,6	Carl Roth
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2	Carl Roth
NaHCO ₃	12	Carl Roth
KHCO ₃	10	Carl Roth
HEPES	10	Carl Roth
Taurin	30	Carl Roth
BDM	10	Sigma-Aldrich
Glukose	5,5	Carl Roth
CaCl ₂	0,0125	Sigma-Aldrich
+ Liberase (Liberase TM, 05401127001, Roche, 35 µg/ml Isolationslösung) + Trypsin (Trypsin 2,5 %, 15090-046, Gibco, 4,25 µl/ml Isolationslösung) • pH 7,46 (37 °C) mit NaOH (Carl Roth) • in Aqua bidest. (B. Braun)		

Tab. 1: Inhaltsstoffe der Lösung für die enzymatische Isolation von Mauskardiomyozyten

Der enzymatische Verdau wurde dann durch Zugabe einer Stopplösung (Inhalt vgl. Tab. 2) mit Kälberserum („Bovine Calf Serum“, BCS) beendet.

Substanz	Molarität (mmol/l)	Hersteller
CaCl ₂	0,0125	Sigma-Aldrich
+ BCS (Sigma-Aldrich, 10 %, entsprechend einer Proteinmenge von 0,7 mg/ml Stopplösung) <ul style="list-style-type: none"> • CaCl₂ und BCS wurden zunächst in kalziumfreier Isolationslösung gelöst und dann der Enzymlösung zum Abstoppen zugegeben (Konzentrationen beziehen sich auf die endgültige Lösung) 		

Tab. 2: Inhaltsstoffe der Lösung zum Abstoppen der enzymatischen Isolation von Mauskardiomyozyten

Anschließend wurde das Myokard noch mechanisch zerkleinert, die Lösung gefiltert und in ein Röhrchen verbracht, wo sich die Zellen über sieben Minuten am Boden absetzen konnten. Nach Entfernung des Überstands mittels Pasteurpipette erfolgte die Resuspension in einem Storagemedium (Inhalt vgl. Tab. 3), in welchem nun der Kalziumaufbau beginnend mit 0,1 mmol/l stattfand. Dieser Schritt wiederholte sich mehrfach über 0,2 und 0,4 hin zu 0,8 mmol/l. Für die Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff, auf die später noch eingegangen wird, wie auch für die mikroskopischen Messungen waren die Zellen dann einer Kalziumkonzentration von 1 mmol/l ausgesetzt.

Substanz	Molarität (mmol/l)	Hersteller
CaCl ₂	Entspr. Kalziumaufbau	Sigma-Aldrich
+ BCS (Sigma-Aldrich, 5 %, entsprechend einer Proteinmenge von 0,35 mg/ml Stopplösung) <ul style="list-style-type: none"> • BCS wurde zunächst in kalziumfreier Isolationslösung gelöst und CaCl₂ dann der Lösung entsprechend des Kalziumaufbauschemas zugegeben (Konzentrationen beziehen sich auf die endgültige Lösung) 		

Tab. 3: Inhaltsstoffe des Storagemediums für den Kalziumaufbau bei Mauskardiomyozyten

Die Vorarbeiten im Zusammenhang mit dem Mausmodell, welche die Operation, die Echokardiographie, die Verabreichung der Testsubstanz *in vivo* und die Zellisolation umfassten, wurden freundlicherweise von anderen Mitarbeitern der AG Prof. Dr. Maier durchgeführt, sodass für die Versuche die fertig isolierten Zellen übernommen werden durften.

Haltung, Behandlung und Exekution der Tiere waren stets artgerecht und standen im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz. Ein entsprechender genehmigter Tierversuchsantrag liegt vor.

2.3 Charakterisierung der Studie mit humanen Kardiomyozyten

2.3.1 Studienablauf

Das für die Studie verwendete humane Myokard entstammte dem rechten Vorhofohr. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg nach der rechtsatrialen Kanülierung im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe mit extrakorporaler Zirkulation (EKZ) entfernt. Eine Übersicht über den Studienablauf vermittelt Abb. 9.

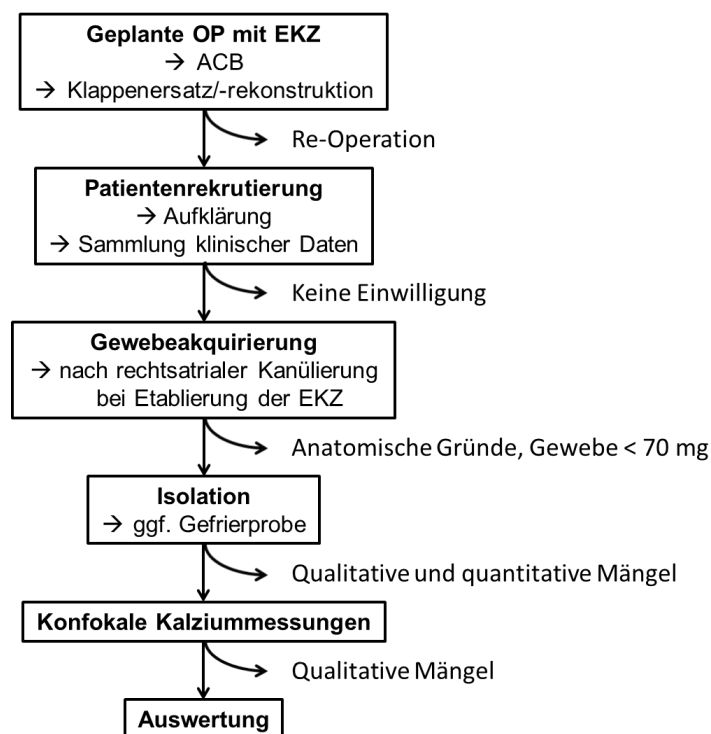


Abb. 9: Zeitlicher Ablauf der Studie mit humanem Gewebe

Für die Studie kamen Patienten infrage, die sich einer aortokoronaren Bypassoperation (ACB) oder einem Herzklappeneingriff mit extrakorporaler Zirkulation (EKZ) unterziehen mussten. Von den Studienteilnehmern wurden präoperativ nach erfolgter Aufklärung klinische Daten eingeholt. Im Zuge der rechtsatrialen EKZ-Kanülierung entferntes myokardiales Gewebe vom rechten Vorhofohr wurde sodann für die Zellisolation und anschließende konfokale Kalziummessungen übernommen.

Ausschlusskriterien waren Revisionseingriffe, fehlende Einwilligung, anatomische Gründe, die einer Resektion im Wege standen, zu geringe Gewebemenge sowie qualitative und quantitative Mängel der isolierten Zellen.

Eingeschlossen wurden somit alle Patienten, die sich einer Operation mit Herz-Lungen-Maschine, also aortokoronarer Bypassoperation (ACB) oder operativem Herzklappenersatz, unterzogen und sich zuvor zur Studienteilnahme bereit erklärt

hatten. Die Aufklärung der Patienten fand am Vortag durch hierfür zugelassene Ärzte der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg statt.

Patienten mit bereits stattgehabtem und nun erneutem Eingriff mit Herz-Lungen-Maschine wurden nicht eingeschlossen, da in diesen Fällen das infrage kommende rechtsatriale Gewebe bereits beim ersten Eingriff entfernt worden war und somit nicht mehr zur Verfügung stand.

Überdies wurden klinische Daten aus bereits vorhandenen präoperativ durchgeführten Untersuchungen wie etwa Echokardiographie, Elektrokardiogramm oder laborchemischen Blutanalysen gesammelt (vgl. S. 66 ff.). Da sich im Lauf der Arbeiten ein signifikanter Zusammenhang zwischen zu geringer Gewebemenge und erhöhter Kalziumsparkfrequenz herausstellte, wurde nach Korrelation der beiden Größen eine Masse von 70 mg als Grenze gewählt und entsprechende Daten ausgeschlossen bzw. fortan nicht mehr für die Sparkmessung verwendet.

Ein weiteres Ausschlusskriterium stellten qualitative Mängel der Zellen nach der Isolation sowie während der Kalziummessungen unter dem Konfokalmikroskop dar. Diese umfassten insbesondere eine verstrichene Querstreifung, das Vorhandensein von Vakuolen und eine übermäßige Farbstoffbeladung.

Die Studie wurde auf der Grundlage eines vorliegenden Ethikvotums durchgeführt.

2.3.2 Gewinnung der Probe und Transport in kardiopleger Lösung

Das für die Versuche verwendete Gewebe des rechten Vorhofohrs wurde bei offenen herzchirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation nach erfolgter rechtsatrialer Kanülierung gewonnen und zum Zeitpunkt der Resektion direkt in ein eisgekühltes Gefäß mit etwa 20 ml Custodiol (Inhalt vgl. Tab. 4) verbracht. Hierbei handelt es sich um eine kardioplege Lösung, die auch unter den Synonymen Bretschneider- und HTK-Lösung (entsprechend der Inhaltsstoffe Histidin, Tryptophan und Ketoglutarat) bekannt ist (Edelman et al., 2013; Viana et al., 2013). Als Zusatz war zudem BDM (2,3-Butandionmonoxim) enthalten. Es schloss sich der unverzügliche Transport ins Labor und die Weiterverarbeitung wie nachfolgend geschildert an.

Substanz	Konzentration (mmol/l)	Hersteller
NaCl	15,0	Als Fertiglösung bezogen (Custodiol, Dr. Franz Köhler Chemie)
KCl	9,0	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	4,0	
Histidinhydrochlorid-Monohydrat	18,0	
Histidin	180,0	
Tryptophan	2,0	
Mannitol	30,0	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,015	
Kaliumhydrogen-2-oxopentandioat	1,0	
<ul style="list-style-type: none"> • sonstige Bestandteile: Wasser für Injektionszwecke, KOH-Lösung 2 % • Osmolalität 290 mosmol/kg 		
+ BDM (Sigma-Aldrich, 20 mmol/l)		

Tab. 4: Inhaltsstoffe von Custodiol

Das Custodiol wurde als Fertiglösung bezogen und mit BDM versetzt.

Durch die Verwendung von Eis zur Kühlung und einer kardioplegischen Substanz wie Custodiol sollte der Zellstoffwechsel herabgesetzt werden (Voigt et al., 2015).

Der niedrigen Natrium- und Kalziumkonzentration entsprechend ist Custodiol den sogenannten intrazellulären Kardioplegien zuzuordnen, die zur Hyperpolarisation der Zellmembran und in der Folge zum Stillstand der Kardiomyozyten führen (Edelman et al., 2013). Histidin dient der Abpufferung von H⁺-Ionen, die im Zuge des anaeroben Zellstoffwechsels anfallen, Tryptophan wirkt stabilisierend auf die Zellmembran, Ketoglutarat unterstützt die ATP-Produktion nach Reperfusion des Gewebes, wie sie im Zuge kardiochirurgischer Eingriffe stattfindet, und Mannitol wirkt der Wassereinlagerung in der Zelle entgegen sowie als Radikalfänger (Edelman et al., 2013).

2.3.3 Reinigen und Waschen der Probe

Nun wurde das Gewebestück zunächst mittels Schere und Pinzette von Fett und Bindegewebe befreit, sodass möglichst nur reines Myokard in den Isolationsprozess Eingang fand. Bei ausreichend großen Stücken erfolgte an dieser Stelle die Sicherung einer Gefrierprobe. Das verbleibende Gewebe wurde zu Dokumentationszwecken gewogen. Das Isolationsgewicht des reinen Myokards

sollte dabei nach eigener Erfahrung über 100 mg, keinesfalls jedoch unter 70 mg betragen, wobei andere Quellen noch wesentlich höhere Idealgewichte von 150 bis 450 mg (Voigt et al., 2015) oder gar 200 bis 600 mg (Voigt et al., 2013) angeben, die unter den gegebenen Bedingungen bei Weitem nicht erreicht wurden.

Die folgenden Schritte liefen in 37 °C warmer kalziumfreier Isolationslösung (Inhalt vgl. Tab. 5), welche einen pH-Wert von 7,2 aufwies, ab.

Substanz	Molarität (mmol/l)	Hersteller
NaCl	100	Carl Roth
KCl	10	Carl Roth
MgCl ₂	5	Carl Roth
KH ₂ PO ₄	1,2	Carl Roth
Taurin	50	Carl Roth
MOPS	5	Sigma-Aldrich
BDM	10	Sigma-Aldrich
Glukose	20	Carl Roth
CaCl ₂ (nach 10 min)	0,002	Sigma-Aldrich
+ Kollagenase (Collagenase I, M2C13334, Worthington, 370 u/mg, 0,77 mg/ml Isolationslösung) + Protease (Proteinase Typ XXIV, P8038, Sigma-Aldrich, 0,40 mg/ml Isolationslösung, nach 10 min) <ul style="list-style-type: none"> • pH 7,2 (37 °C) mit NaOH (Carl Roth) • in Aqua bidest. (B. Braun) 		

Tab. 5: Inhaltsstoffe der Lösung für die enzymatische Isolation humaner Kardiomyozyten

Die Tabelle gibt die Zusammensetzung der Lösung zum Zeitpunkt des enzymatischen Verdauens nach Zugabe von Kalzium und der Protease zehn Minuten nach Beginn des ersten Schritts wieder. Zum Zeitpunkt des Waschens und Reinigens der Probe war die Lösung kalziumfrei und enthielt noch keine Enzyme.

Gemäß des Prinzips einer sogenannten „Chunk Isolation“ musste das Gewebe in ca. 1 mm³ kleine Stücke geschnitten werden, da die verdauenden Enzyme hierbei im Gegensatz zur Perfusionsmethode lediglich von außen auf das Gewebe einwirken können (Voigt et al., 2015).

Es folgten drei je etwa dreiminütige Waschschrte in jeweils 20 ml der erwähnten kalziumfreien Isolationslösung, wie auch in den folgenden Verdauenschritten unter permanenter Aufwirbelung durch einen Magnetrührer und unter Begasung mit hundertprozentigem Sauerstoff. Mit dem Waschen des Gewebes sollte eine Reduktion von Erythrozyten und anderem Fremdmaterial im anschließenden Versuchsprozess erreicht werden (Voigt et al., 2015).

2.3.4 Kalziumfreie Lösung und Kalziumparadox

Die initiale Kalziumfreiheit der Isolationslösung scheint verantwortlich für die Lösung der Zell-Zell-Kontakte an den Glanzstreifen (Yates & Dhalla, 1975) und führt zudem zu einer elektromechanischen Entkoppelung (Mines, 1913).

Jedoch besteht im Zusammenhang mit kalziumfreien Lösungen ein Problem, das bereits 1966 von Zimmerman und Hülsmann als „Kalziumparadox“ (Zimmerman & Hülsmann, 1966) beschrieben wurde. Sie erkannten, dass es bei anschließender Reperfusion mit kalziumhaltiger Lösung nach kurzzeitiger Wiederherstellung der elektromechanischen Koppelung zum endgültigen Verlust von mechanischer und auch elektrischer Aktivität kommt (Zimmerman & Hülsmann, 1966). Grund sind eine initiale Hyperkontraktilität und daraus resultierende massive Schädigung der Kardiomyozyten (Chapman & Tunstall, 1987; Piper, 2000).

Diesem Vorgang soll durch eine behutsame, schrittweise Erhöhung der Kalziumkonzentration im Anschluss an die Zellisolation entgegengewirkt werden. Ebenfalls protektiv gegen eine mögliche Hyperkontraktion wirkt BDM, das den Querbrückenzyklus blockiert (Gwathmey et al., 1991). Auch die Dauer, über welche die Zellen der kalziumfreien Lösung ausgesetzt sind, hat Einfluss auf die Auswirkungen des Kalziumparadoxes. Diese fallen geringer aus, wenn diese Zeitspanne kurz gehalten wird. Gleichzeitig muss eine gewisse Mindestzeit eingehalten werden, um die angesprochene Wirkung auf die Glanzstreifen zu erzielen (Nánási et al., 1993).

2.3.5 Zellisolation mittels enzymatischen Gewebeverdaus

Der eigentliche enzymatische Verdau des Gewebes schloss sich nun an (Inhalt der Isolationslösung: vgl. S. 49, Tab. 5). Hierbei zeigen sich individuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen, was Dauer und Anzahl der Arbeitsschritte angeht (Bustamante et al., 1982; J.-Q. He et al., 2011; Hove-Madsen et al., 2004; Nánási et al., 1993; Sossalla, Kallmeyer et al., 2010; Voigt et al., 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll mit zwei Verdauschritten verwendet, wobei im ersten Schritt über 45 Minuten eine Kollagenase zusammen mit einer Protease und im zweiten Schritt bis zur Lösung einzelner Kardiomyozyten aus

dem Gewebeverband die Kollagenase alleine zum Einsatz kam. In diesen Eckdaten war der Ablauf mit dem von Sossalla et al. (Sossalla, Kallmeyer et al., 2010) vergleichbar.

Im ersten Schritt wirkte über den gesamten Zeitraum die angesprochene Kollagenase und ab zehn Minuten nach Beginn zusätzlich die Protease, die zeitgleich mit 40 µl einer 10 mM Kalziumlösung zugegeben wurde. Die Kalziumkonzentration in der Lösung betrug hiermit 2 µmol/l.

Der enzymatische Verdau von Myokard gelingt dabei nur im Zusammenspiel beider Enzymklassen (Kono, 1969; Voigt et al., 2015). Der Aufschluss der Kollagenfibrillen der extrazellulären Matrix erfolgt zunächst durch die spezifische Kollagenase, die die triplehelikale Struktur der Kollagenfibrillen mittels Hydrolyse andaut (Rawlings & Salvesen, 2013), bevor die unspezifischere Protease ihre Wirkung entfalten kann (Voigt et al., 2015).

Im zweiten Schritt kam lediglich noch die Kollagenase zum Einsatz, die dieses Mal sofort in kalziumhaltiger Lösung zugegeben wurde, wobei Volumen der Lösung, Menge der Kollagenase und Kalziumkonzentration identisch mit dem ersten Verdau Schritt waren. Allerdings wurden nun durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette (Voigt et al., 2015) und durch „Zerschneiden“ der Lösung mit der Präparationsschere in ein- bis zweiminütigen Abständen Scherkräfte erzeugt. Diese dienten dem zusätzlichen mechanischen Verdau des Gewebes im Sinne einer zum enzymatischen Abbau synergistisch wirkenden zweiten Komponente (Nánási et al., 1993).

Entscheidend für den Isolationserfolg war das rechtzeitige Abstoppen des zweiten Verdau Schritts. Erfolgte dies zu früh, litt die Zellquantität, da sich die einzelnen Kardiomyozyten noch nicht aus dem Gewebeverband gelöst hatten. Ein zu langer Verdau hingegen schadete durch die proteolytische Wirkung der Kollagenase der Qualität der Zellen, was die anschließende Messung beeinträchtigte oder gar unmöglich machte. Der richtige Moment war hierbei durch regelmäßige optische Kontrolle der Zellsuspension unter dem Lichtmikroskop abzupassen (Voigt et al., 2015).

Der Abbruch des Verdau wurde wie bei der Isolation von Mausmyokard mittels einer Kälberserum enthaltenden Stopplösung herbeigeführt (Inhalt vgl. Tab. 6).

Substanz	Molarität (mmol/l)	Hersteller
BDM	20	Sigma-Aldrich
+ BCS (Sigma-Aldrich, 2 %, entsprechend einer Proteinmenge von 1,3 mg/ml Stopplösung)		
<ul style="list-style-type: none"> • BDM und BCS werden zunächst in kalziumfreier Isolationslösung gelöst und dann der Enzymlösung zum Abstoppen zugegeben (Konzentrationen beziehen sich auf die endgültige Lösung) 		

Tab. 6: Inhaltsstoffe der Lösung zum Abstoppen der enzymatischen Isolation humaner Kardiomyozyten

2.3.6 Aufreinigung der Zellsuspension

Wie auch beim Lösungswechsel zwischen allen bereits beschriebenen Schritten wurden die verbliebenen soliden Gewebestücke abgefiltert (Porengröße ca. 0,5 mm) und die Isolationslösung unverändert für zehn Minuten bei 5000 rpm und 40 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mithilfe einer Pasteurpipette vorsichtig entfernt und verworfen, während das Zellpellett in einem Storamedium (Inhalt vgl. Tab. 7) resuspendiert wurde.

Substanz	Molarität (mmol/l)	Hersteller
KCl	30	Carl Roth
KH ₂ PO ₄	10	Carl Roth
MgCl ₂	1	Carl Roth
HEPES	10	Carl Roth
Glukose	11	Carl Roth
Taurin	20	Carl Roth
Glutamat	70	Carl Roth
BDM	20	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	Entspr. Kalziumaufbau	Sigma-Aldrich
+ BCS (Sigma-Aldrich, 2 %, entsprechend einer Proteinmenge von 1,3 mg/ml Storamedium)		
<ul style="list-style-type: none"> • pH 7,4 (Raumtemperatur) mit KOH (Sigma-Aldrich) • in Aqua bidest. (B. Braun) 		

Tab. 7: Inhaltsstoffe des Storamediums für den Kalziumaufbau bei humanen Kardiomyozyten

Im nun folgenden Kalziumaufbau wurden die Zellen zunächst einer Kalziumkonzentration von 0,2 mmol/l ausgesetzt, die nach zehn Minuten auf 0,3 mmol/l erhöht wurde. Durch die auch in den anschließenden Arbeitsschritten schrittweise ansteigende Konzentration sollten sich die Zellen an die

Kalziumexposition gewöhnen und die Auswirkungen des Kalziumparadoxes möglichst vermieden werden. Unterstützt wurde dies durch die Anwesenheit von BDM, das wie bereits dargelegt einer Hyperkontraktion der Zellen vorbeugen sollte.

2.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Grundsätzlich kann ein konfokales Fluoreszenzmikroskop als ein Lichtmikroskop betrachtet werden, welches um die Prinzipien der Fluoreszenz- sowie der Konfokalmikroskopie erweitert wurde.

Der Aufbau des herkömmlichen Lichtmikroskops sei an dieser Stelle als bekannt vorausgesetzt. Von diesem Punkt aus soll der Bogen hin zum konfokalen Fluoreszenzmikroskop gespannt werden.

2.4.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Grundlage der Fluoreszenzmikroskopie ist das physikalische Prinzip der Fluoreszenz. Fällt Licht auf ein Objekt, so können dessen Moleküle Photonen absorbieren. Den Molekülen wird hierdurch Energie zugeführt, wodurch sich Elektronen der Atome, aus denen die Moleküle bestehen, auf ein energetisch höheres Niveau begeben. Die Moleküle befinden sich nun in einem angeregten Zustand, der jedoch nur von kurzer Dauer ist. Durch Rückkehr der Elektronen auf ihr ursprüngliches energetisches Niveau erreicht das Molekül wieder seinen Grundzustand. Bei diesem Prozess wird Energie frei, die in Form von Licht längerer Wellenlänge abgegeben wird. Aus dem emittierten Licht entsteht nun für den Betrachter ein Bild (Semwogerere & Weeks, 2005).

An dieser Stelle sei kurz auf das Epifluoreszenzmikroskop als Grundbauart eines Fluoreszenzmikroskops verwiesen. Das entscheidende Bauelement ist der dichroische (= dichromatische) Spiegel. Dieser vermag Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge zu reflektieren, während längerwelliges Licht passieren kann. Das Licht einer anregenden Lichtquelle wird durch den dichroischen Spiegel auf das Objektiv und die darunter befindliche Probe umgelenkt. Das emittierte Fluoreszenzlicht kann dann wiederum durch das Objektiv und aufgrund seiner

größeren Wellenlänge auch durch den dichroischen Spiegel hindurchtreten, um dann auf einen Detektor zu fallen, wo schließlich ein Bild des gesamten Objekts entsteht (Semwogerere & Weeks, 2005).

2.4.2 Prinzipien und Aufbau des konfokalen Fluoreszenzmikroskops

Zum besseren Verständnis der Funktionsweise eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops bietet es sich an, zunächst ein einfaches Modell zu Hilfe zu nehmen. Betrachtet man eine Sammellinse, wie sie dem Objektiv eines Mikroskops entspricht, so bildet sich ein auf der einen Seite der Linse gelegener Punkt F auf der anderen Seite der Linse in seinem Bildpunkt F' ab. Andere Punkte, die außerhalb von F liegen, bilden sich hingegen nicht in F' ab. F und F' sind konfokal zueinander (Semwogerere & Weeks, 2005).

Bei einem Konfokalmikroskop werden nun immer nur zwei zueinander konfokale Punkte betrachtet. Indem viele solcher in einer Ebene gelegenen Punkte nacheinander fokussiert werden, kann anschließend aus den Einzelpunkten durch einen Computer ein Bild erstellt werden. Man bezeichnet dies als „Point by Point Imaging“ (Semwogerere & Weeks, 2005).

Die Einbringung zweier Aperturblenden in den Strahlengang dient der Optimierung des konfokalen Prinzips. Die erste Blende bündelt das Licht der Lichtquelle, sodass in der Probe tatsächlich immer nur ein Punkt beleuchtet wird. Die zweite Blende ist dem Detektor vorgeschaltet, sodass nur Fluoreszenzlicht, das aus dem beleuchteten Punkt stammt, auf den Detektor trifft. Aus anderen Ebenen der Probe emittiertes Streulicht wird von der Blende abgehalten (Semwogerere & Weeks, 2005).

Der Strahlengang eines konfokalen Laserfluoreszenzmikroskops und die konkrete Umsetzung der erläuterten Prinzipien sollen nun anhand des in Abb. 10 gezeigten Bauplans dargestellt werden.

Das anregende Licht (grün) entstammt heutzutage einem Laser, der durch eine erste Aperturblende punktförmig gebündelt wird. Das Licht wird über einen dichroischen Spiegel reflektiert und in Richtung der Probe umgelenkt. Gebündelt durch das Objektiv trifft das Licht auf diese und führt zur Emission längerwelligeren Lichts (rot). Dieses wird durch das Objektiv ebenfalls gebündelt und passiert den dichroischen Spiegel. Bevor das emittierte Licht den Detektor erreicht, ist die zweite Aperturblende

zwischengeschaltet. Diese ist nur für Licht aus dem fokussierten Punkt durchlässig und hindert Streulicht aus anderen Ebenen am Durchtritt, womit das Prinzip der Reduktion des Streulichts erfüllt ist (Claxton et al., 2005).

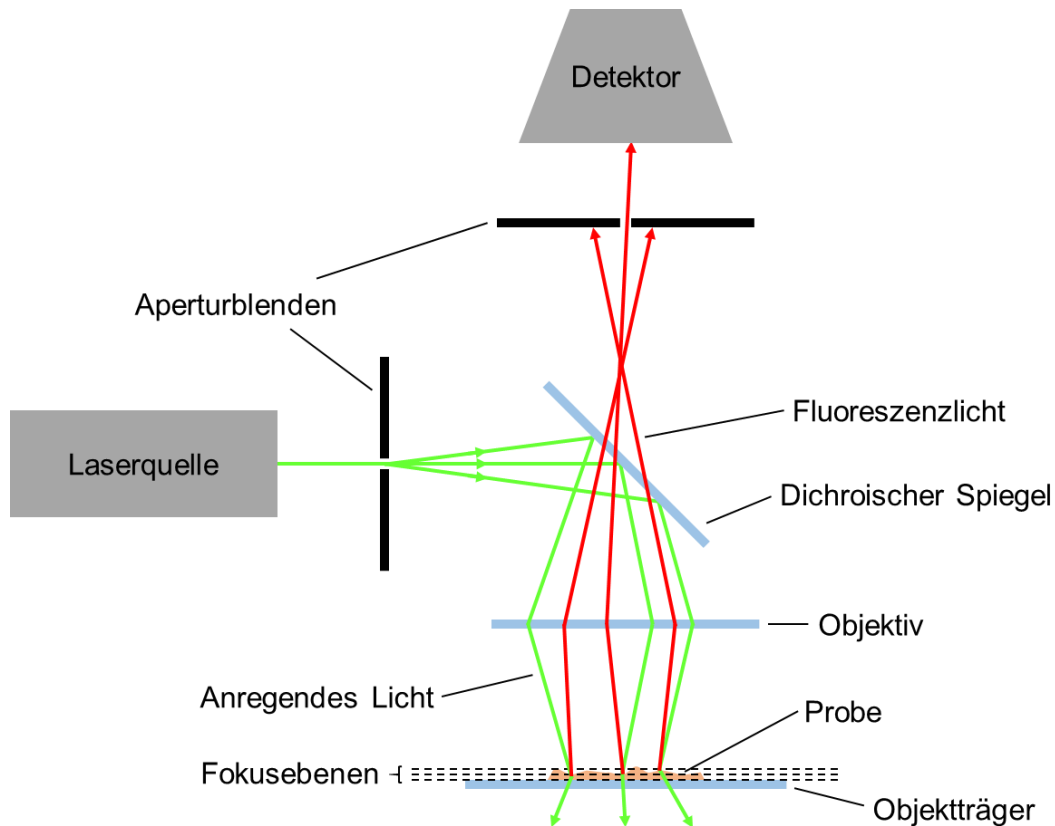


Abb. 10: Aufbau eines konfokalen Lasermikroskops

Das der Laserquelle entstammende anregende Licht (grün) tritt durch eine erste Aperturblende und wird über einen dichroischen Spiegel auf die Probe umgelenkt, während das emittierte Fluoreszenzlicht (rot) den Spiegel durchdringt. Die zweite Aperturblende gewährleistet, dass nur die Fluoreszenz des Punktes, der genau in der fokussierten Ebene liegt, auf den Detektor trifft. Streulicht wird somit herausgefiltert.

Quelle: eigene Abbildung. Nach Claxton et al., 2005.

Ein wesentliches Element, das aus Gründen der Übersichtlichkeit in der Abbildung nicht enthalten ist, ist die Einheit zweier zusätzlicher Spiegel, die das anregende Licht zweidimensional lenken können und so das Abrastern der Probe ermöglichen (Claxton et al., 2005).

Des Weiteren ist die an den Detektor angeschlossene Einheit aus Computer und Bildschirm nicht zu sehen, in der schließlich das fertige Bild errechnet und dargestellt wird. So erfährt auch das Prinzip des „Point by Point Imaging“ seine praktische Umsetzung.

In modernen konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopen sind die anregende und detektierende Einheit mit den zugehörigen Lasern, Blenden und Spiegeln in einem großen Bauteil enthalten, auf dessen komplexen Aufbau aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen werden soll (Claxton et al., 2005).

2.4.3 Kalziummessung mit Fluo-4

Die physikalischen Grundlagen der Fluoreszenz wurden bereits im vorangegangenen Abschnitt erläutert. Da das im Zentrum des Interesses stehende Kalzium an sich keine fluoreszierenden Eigenschaften aufweist, behilft man sich eines kalziumbindenden Farbstoffs, der diese Anforderung erfüllt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten die Messungen mit Fluo-4, AM.

Die Molekularstruktur (vgl. Abb. 11) kalziumbindender Farbstoffe besteht im Allgemeinen aus einem Kalziumchelator und einem Fluorophor (Minta et al., 1989), sodass Kalziumbindung und Fluoreszenz in einem festen proportionalen Verhältnis stehen.

Die Funktion des Kalziumchelators übernimmt im Fall der Fluo-Farbstofffamilie BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetylsäure), für die fluoreszierenden Eigenschaften ist ein Xanthenringsystem verantwortlich (Minta et al., 1989).

Da Fluo-4 als hydrophiles Molekül nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu passieren, ist die Veresterung mittels eines Acetoxymethylesters (AM) nötig, man spricht nun von Fluo-4, AM (Schneidereit et al., 2016). Nach der so ermöglichten Membranpassage erfolgt intrazellulär die Hydrolyse des Esters und die Freisetzung des fluoreszierenden Fluo-4 (Takahashi et al., 1999).

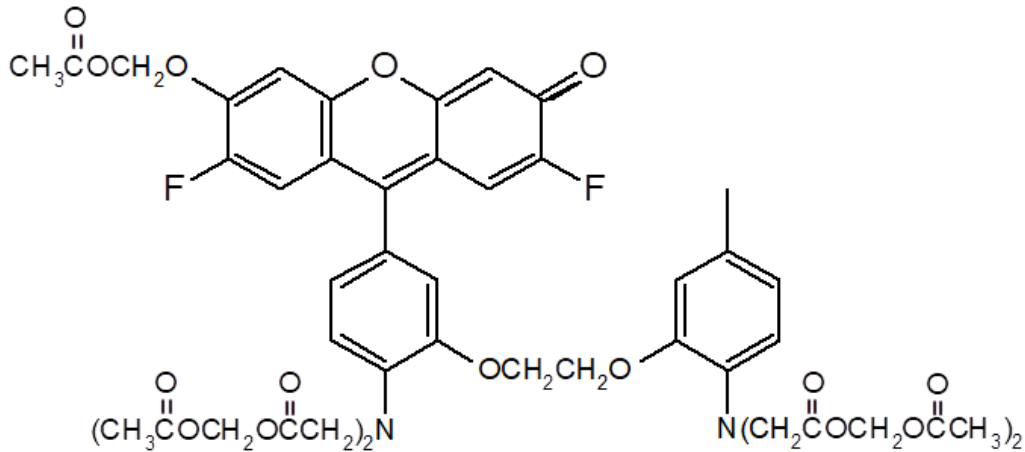


Abb. 11: Chemische Struktur von Fluo-4, AM

Das zentrale fluoreszierende Xanthenringsystem ist zur Ermöglichung der Membranpassage mit einem Acetoxymethylester verestert. Die Kalziumbindung erfolgt über den symmetrisch aufgebauten BAPTA-Komplex. Quelle: eigene Abbildung. Nach Gee et al., 2000.

Hinsichtlich seiner Eigenschaften wie Spektralbereich, Stabilität, Dissoziationskonstante, Umgänglichkeit oder Ausmaß des Fluoreszenzanstiegs bei Kalziumbindung ähnelt Fluo-4 seinem Vorgänger Fluo-3 (Gee et al., 2000). Durch geringfügige strukturelle Modifikation weist Fluo-4 jedoch eine etwa doppelt so starke Absorbanz bei 488 nm auf, sodass es besser für die Anregung durch einen Argonlaser geeignet ist (Gee et al., 2000). Des Weiteren zeigt sich bei gleichen Konzentrationen eine um ca. 60 % stärkere Emission (Gee et al., 2000). Dadurch können die Konzentration des potenziell zytotoxischen Farbstoffs vermindert oder aber die Intensität des anregenden Lasers mit dem Vorteil eines verringerten Ausbleichens des Farbstoffs in den Zellen reduziert werden (Gee et al., 2000). Schließlich erreicht die Fluoreszenz bei Fluo-4 auch nach kürzerer Beladungszeit von etwa 20 bis 30 Minuten gegenüber 40 Minuten bei Fluo-3 einen Sättigungswert (Gee et al., 2000).

Das als Pulver vertriebene Fluo-4, AM (Life Technologies) wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts zunächst entsprechend einer Konzentration von 1 mmol/l in dem apolaren Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) gelöst. Aus dieser bei - 18 °C gelagerten Vorratslösung wurde am Versuchstag eine frische Farbstofflösung hergestellt, die Fluo-4, AM in einer Konzentration von 10 µmol/l in Normaltyrode (Inhalt vgl. S. 59, Tab. 8) für humane und 4 µmol/l für Mauskaridiomyozyten enthielt. Zudem wurde der Lösung Pluronic (Life Technologies)

zugegeben (Endkonzentration in der Lösung: 0,04 %). Dieses wirkt als Detergens und verbessert so die Löslichkeit von Fluo-4, AM (Takahashi et al., 1999). Darüber hinaus waren bereits die jeweils zu untersuchende Substanz sowie Kalzium in einer Konzentration von 1 mmol/l enthalten.

Die Inkubationszeit, die sich an das dreißigminütige Absetzen der Zellen am Boden der Messkammer anschloss, betrug wiederum 30 Minuten, was sich mit den bereits dargestellten Erkenntnissen zur Fluoreszenzsättigungskurve bei Fluo-4 deckt.

Anschließend wurde die Farbstofflösung gegen Normaltyrode ausgetauscht und es folgte nochmals eine Wartezeit von 15 Minuten. In dieser Zeit sollte die möglichst vollständige Hydrolyse des Fluo-4, AM stattfinden, um einem artifiziellen Fluoreszenzanstieg im Lauf der Messung vorzubeugen. Zudem waren die Zellen ab diesem Zeitpunkt der jeweiligen Testsubstanz, GS-680 oder RA654321, bzw. dem Referenzinhibitor AIP, ausgesetzt.

Aufgrund der schon angesprochenen Toxizität des Farbstoffs erfolgte die Inkubation gestaffelt. Dabei fanden die Lösungswechsel in den einzelnen Kammern so statt, dass die Inkubations- und Wartezeiten für alle Gruppen gleich und die Zellen keiner Gruppe übermäßig lange dem schädigenden Einfluss des Farbstoffs ausgesetzt waren.

Alle genannten Schritte wurden, um mögliche tageslichtinduzierte Einflüsse zu vermeiden, in einer Dunkelkammer durchgeführt.

2.4.4 Detektion von Kalziumsparks und Messung des SR-Kalziumgehalts

Der Messablauf gestaltete sich als Wechselspiel zwischen lichtmikroskopischer Zellauswahl und konfokaler Kalziumdetektion. Die Zellauswahl richtete sich hierbei nach morphologischen Kriterien wie dem Erhalt von Zellmembran und Querstreifung sowie der Abwesenheit von Vakuolen als Ausdruck des beginnenden Zelluntergangs. Zudem wurde auf eine gleichmäßige und vergleichbare Farbstoffbeladung im fluoreszenzmikroskopischen Bild Wert gelegt.

Daran schloss sich die Kalziumdetektion entlang einer digital festgelegten Linie an, welche durch den Laser des Mikroskops (Anregung bei 488 nm, Emission bei 505 bis 530 nm, Verwendung eines 505 nm Long-path-Filter zur Ablenkung des emittierten

Signals) vielfach abgetastet wurde. Im zeitlichen Verlauf entstand hierbei ein zweidimensionales Bild, der sogenannte „Line Scan“.

Während des gesamten Prozederes unterlagen die Messkammern der kontinuierlichen Perfusion mit kalziumhaltiger Normaltyrode (Inhalt vgl. Tab. 8), welche über eine Absaugvorrichtung auf der anderen Seite der Kammer entfernt wurde.

Substanz	Molarität (mmol/l)	Hersteller
NaCl	136	Carl Roth
KCl	4	Carl Roth
NaH ₂ PO ₄	0,33	Carl Roth
NaHCO ₃	4	Carl Roth
MgCl ₂	1,6	Carl Roth
HEPES	10	Carl Roth
Glukose	20	Carl Roth
CaCl ₂	2	Sigma-Aldrich
+ GS-680 oder RA654321 in der jeweiligen Dosierung bzw. AIP (AnaSpec, 1 µmol/l) als Referenzinhibitor + DMSO (Sigma-Aldrich, 1 µl/ml) • pH 7,4 (Raumtemperatur) mit NaOH (Carl Roth) • in Aqua bidest. (B. Braun)		

Tab. 8: Inhaltsstoffe der Normaltyrode für die konfokale Kalziummessung

Die Normaltyrode enthielt die Testsubstanzen GS-680 und RA654321 in den entsprechenden Konzentrationen bzw. AIP (AnaSpec) als Referenzinhibitor in der Konzentration 1 µmol/l.

Da die Inhibitoren in DMSO gelöst der Normaltyrode zugegeben wurden, enthielt die Tyrode aller Zellgruppen während der Messungen zur Standardisierung eine identische Menge DMSO.

Weiterhin erfolgte die elektrische Stimulation der Zellen (1 Hz, 20 V). Diese wurde zur Simulation der Diastole bei der Aufnahme der Line Scans ausgesetzt.

Es fanden nun zweierlei Arten von Experimenten statt. Zum einen wurden Kalziumsparks detektiert. Es handelt sich hierbei um spontane Freisetzungen von Kalzium aus dem SR über die Ryanodinrezeptoren, deren Entstehung bereits auf S. 22 ff. erläutert wurde. Anschließend kann aus der Summe der Kalziumsparks das diastolische Kalziumleck abgeschätzt werden (vgl. S. 61 f.).

Zum anderen wurde der Kalziumgehalt des SR bestimmt. Dies wurde durch die Applikation von Koffein erreicht, welches die synchrone Öffnung aller Ryanodinrezeptoren einer Zelle bewirkt (Bers, 2001). Es strömt somit das gesamte Kalzium aus dem SR in das Sarkoplasma und der dadurch entstehende Transient kann somit als Maß für den Kalziumgehalt des SR dienen.

Für alle Line Scans wurde ein Zellareal von 49,9 μm vermessen. Die Scans umfassten dabei 10 000 Zyklen über 7,26 s im Falle der Spark- bzw. 30 000 Zyklen über 21,78 s im Falle der Koffeinmessungen.

Bei den Versuchen kam ein Mikroskop vom Typ Zeiss LSM5 zur Anwendung.

2.5 Analyse der Originalregistrierungen

Die Auswertung der Line Scans fand für die Kalziumsparks wie für die Koffeintransienten gleichermaßen mit dem frei erhältlichen Programm ImageJ statt, das 1987 erschien und von Wayne Rasband zur Analyse wissenschaftlicher Bilddateien entwickelt wurde (Schneider et al., 2012).

Für die Sparkanalyse stellte zunächst Cheng (Cheng et al., 1999) ein Programm vor, auf dessen Basis dann Picht das in ImageJ agierende Plug-in „SparkMaster“ (Picht, Zima et al., 2007) entwickelte. Mit dem SparkMaster erfolgte auch die Auswertung der Kalziumsparks im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Der Erkennung von Sparks in den Line Scans liegt ein spezieller Algorithmus (Picht, Zima et al., 2007) zugrunde.

Der SparkMaster bildet aus der Fluoreszenz aller Pixel des Scans den Mittelwert und die Standardabweichung („Standard Deviation“, SD), um anschließend aus Werten innerhalb von 1,5 SD eine Baseline zu generieren. Pixel mit Fluoreszenzsignalen oberhalb von 2 SD wurden primär als potenzielle Sparks erkannt, woraufhin Mittelwert und SD jedoch nochmals ohne diese vorläufigen Sparks berechnet wurden. Endgültig als Sparks wurden nun Bereiche mit Fluoreszenzwerten oberhalb von 2 SD erkannt, die zusätzlich Pixel mit Werten enthielten, die größer als ein Referenzwert waren. Dieser errechnete sich durch Multiplikation der SD mit einem individuell festlegbaren Faktor („Criterion“, im vorliegenden Fall 3,8) und

nachfolgender Summierung des Ergebnisses mit dem Mittelwert (Picht, Zima et al., 2007).

Nun lieferte der SparkMaster für jeden einzelnen Spark unter anderem dessen Amplitude, FWHM und FDHM (Picht, Zima et al., 2007). Die Amplitude wird als F/F_0 angegeben. Dieser Wert bezeichnet den Spitzenfluoreszenzwert als Vielfaches der Hintergrundfluoreszenz des gesamten Line Scans (Picht, Zima et al., 2007). Unter FWHM („Full Width at Half Maximum Amplitude“) und FDHM („Full Duration at Half Maximum Amplitude“) ist die Breite bzw. Dauer des Sparks zu dem Zeitpunkt zu verstehen, an dem die Fluoreszenz die Hälfte des Maximalwerts erreicht hat und wird in Mikrometer (μm) bzw. Millisekunden (ms) angegeben (Picht, Zima et al., 2007).

Der andere Teil der Auswertung umfasste die Kaffeintransienten. Hierbei wurde die Fluoreszenz mittels einer Funktion in ImageJ über den gesamten Line Scan hinweg graphisch dargestellt. Man erhielt dadurch zunächst einen der Fluoreszenz proportionalen absoluten Wert („Gray Value“), der gegen die Scanlänge (in μm) aufgetragen war.

2.6 Berechnung von Sparkfrequenz, SR-Kalziumleck und Kalziumtransienten

Auf die Bildanalyse folgten die Berechnung des Kalziumflusses eines einzelnen Sparks und hieraus des diastolischen Kalziumlecks. Als Programme kamen Excel und GraphPad Prism (Version 6) zum Einsatz.

Vorab war die Kalibrierung der sarkoplasmatischen Kalziumkonzentration aus dem Farbstoffsignal mithilfe der folgenden Pseudokalibrierung nötig (Cheng et al., 1993):

$$[\text{Ca}]_i = K_d \times (F/F_0) / [((K_d / [\text{Ca}]_d) + 1) - F/F_0]$$

$[\text{Ca}]_i$ = sarkoplasmatische Kalziumkonzentration

K_d = Dissoziationskonstante von Kalzium für Fluo-4, AM = 1,1 $\mu\text{mol/l}$

$[\text{Ca}]_d$ = diastolische Kalziumkonzentration = 100 nmol/l

Nachdem die sarkoplasmatische Kalziumkonzentration auf diese Weise festgesetzt wurde, konnte nun der Kalziumfluss eines einzelnen Sparks errechnet werden (Cheng et al., 1993):

$$J = B \times \Delta[\text{Ca}] \times V \times T^{-1}$$

J = Kalziumfluss eines einzelnen Sparks [mol/s]

B = Pufferkapazität einer Zelle (freigesetztes Kalzium [$\mu\text{mol/l}$]/Anstieg von $[\text{Ca}]_i$ [$\mu\text{mol/l}$]) = 150

$\Delta[\text{Ca}]$ = Konzentrationsveränderung an Kalzium während eines Sparks [$\mu\text{mol/l}$]

V = Volumen eines Sparks = 10 fl

T = Zeit des Kalziumanstiegs während eines Sparks = 10 ms

Zur abschließenden Abschätzung des diastolischen Kalziumlecks mussten die Kalziumflüsse der Sparks integriert werden, woraus man die aus dem SR freigesetzte Kalziummenge für jeden einzelnen Spark erhielt. Die Kalziummengen aller Sparks eines Scans wurden summiert und auf das sarkoplasmatische Zellvolumen ohne Zellkern und Mitochondrien sowie die Scan-Zeit bezogen. Das sarkoplasmatische Zellvolumen wurde als etwa 65 % des Gesamtvolumens mit ungefähr 105,5 fl geschätzt (Bers, 2001). Durch Division des nunmehr vorliegenden Werts durch die Scandauer von 7,26 s resultierte als Endergebnis das diastolische SR-Kalziumleck pro Zeit mit der Einheit [$\mu\text{mol/l}$ Zytosol/s].

Als Surrogatparameter des SR-Kalziumlecks wurde des Weiteren aus der absoluten Sparkzahl pro Line Scan durch Bezug auf die Fläche eines Line Scans die Kalziumsparkfrequenz in [$1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$] angegeben.

Für die weitere Auswertung der Kaffeintransienten wurde die Spitzenfluoreszenz ins Verhältnis zur basalen Fluoreszenz (F/F_0) gesetzt. Angegeben wurde schließlich der Wert $\Delta F/F_0$ ($= F/F_0 - 1$) zur Betonung der Fluoreszenzzunahme gegenüber der basalen Fluoreszenz, welche proportional zur Menge des ins Sarkoplasma freigesetzten Kalziums ist.

Um die Kinetik der Kalziumelimination aus dem Sarkoplasma näher zu charakterisieren, wurden überdies die Zeitpunkte berechnet, zu denen $\Delta F/F_0$ des Transienten um 50 bzw. 80 % (RT 50 % bzw. RT 80 %, „Relaxation Time“) gefallen

ist, was als Korrelat der Zeitpunkte einer Elimination von 50 bzw. 80 % der Kalziummenge aus dem Sarkoplasma verwendet wird.

2.7 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit GraphPad Prism (Version 6).

Zur Elimination extremer Ergebnisse wurde zunächst der ROUT („Robust Regression and Outlier Removal“)-Ausreißer-Test angewandt ($Q = 10\%$).

Zur Überprüfung des Vorliegens einer Gauß'schen Normalverteilung kam dann der Shapiro-Wilk-Test zum Einsatz ($\alpha = 0,05$).

Nun konnte die Varianzanalyse der Daten mittels Ein-Wege-ANOVA („Analysis of Variance“) stattfinden ($\alpha = 0,05$).

Abschließend wurden signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten durch den Sidak-Test („Sidak's Multiple Comparisons Test“) errechnet ($\alpha = 0,05$).

Die Angabe der Ergebnisse erfolgte nun als Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM = „Standard Error of the Mean“).

3 Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation erörtert die Auswirkungen zweier neuartiger CaMKII-Inhibitoren auf das diastolische SR-Kalziumleck in Kardiomyozyten. Die ausführlichen pathophysiologischen Grundlagen sind der Einleitung dieser Arbeit zu entnehmen und werden hier zur Rekapitulation nochmals kurz dargestellt, bevor im Folgenden ihre Ergebnisse präsentiert werden.

Das diastolische Kalziumleck des sarkoplasmatischen Retikulums beruht auf einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des kardialen Ryanodinrezeptors, wie man sie insbesondere im Zuge der Herzinsuffizienz findet.

Es geht mit drei wesentlichen Konsequenzen einher:

- Der SR-Kalziumgehalt ist vermindert, wodurch weniger Kalzium für die Kontraktion des kontraktile Apparats der Zelle zur Verfügung steht und eine systolische Dysfunktion entsteht.
- Die diastolische sarkoplasmatische Kalziumkonzentration ist erhöht, wodurch sich die Kalziumelimination und hierdurch die Relaxation der Zelle prolongiert gestaltet und eine diastolische Dysfunktion resultiert.
- Die diastolische Kalziumfreisetzung führt zu arrhythmogenen Schwankungen der sarkoplasmatischen Kalziumkonzentration. Zudem bewirkt die diastolische Kalziumüberladung eine Flusszunahme des NCX, was das Auftreten verspäteter Nachdepolarisationen („Delayed Afterdepolarizations“, DADs) begünstigt.

Ein wichtiger Modulator, der im insuffizienten Herzen eine Hochregulation erfährt, ist die CaMKII. Ihr kommt eine zentrale Rolle in der kardialen Kalziumhomöostase zu und sie vermag unter anderem den RyR zu phosphorylieren, dessen Offenwahrscheinlichkeit somit zu erhöhen und dadurch schließlich das diastolische SR-Kalziumleck zu vergrößern.

Hieraus erwächst die Idee, das SR-Kalziumleck und seine Folgen mittels CaMKII-Inhibition zu reduzieren, was im Rahmen dieser Dissertation mithilfe der beiden Substanzen RA654321 und GS-680 versucht wurde.

Isolierte Kardiomyozyten wurden nach Inkubation mit dem kalziumbindenden Farbstoff Fluo-4, AM konfokalmikroskopisch untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die Registrierung elementarer spontaner diastolischer Kalziumfreisetzungseignisse aus dem SR, sogenannter Kalziumsparks. Diese zeichnen in der Summe

hauptsächlich für das SR-Kalziumleck, welches aus der Sparkfrequenz abgeschätzt werden kann.

Darüber hinaus wurden koffeininduzierte Kalziumtransienten gemessen. Da Koffein eine generalisierte Öffnung aller Ryanodinrezeptoren des SR einer Zelle bewirkt, gilt dies als Maß für den SR-Kalziumgehalt.

Die genannten Messungen fanden einerseits in Kardiomyozyten der Maus und andererseits in humanen Kardiomyozyten statt. Ein Teil der Zellen wurde bei der Inkubation mit dem Farbstoff zusätzlich mit RA654321 bzw. GS-680 versetzt und somit die Auswirkungen der Pharmaka getestet. Neben diesen *In-vitro*-Versuchen erhielt ein Teil der Mäuse RA654321 auch *in vivo*. Darüber hinaus wurde im Mausmodell ein Herzinsuffizienzmodell mittels TAC („Transverse Aortic Constriction“) induziert.

Die folgenden Ergebnisse stellen zunächst die Effekte von RA654321 und GS-680 auf die Kalziumsparkfrequenz, das diastolische SR-Kalziumleck und den SR-Kalziumgehalt in humanen Kardiomyozyten *in vitro* dar. Weiterhin werden die Auswirkungen von TAC und RA654321 auf die genannten Parameter im Mausmodell nach Sham und TAC *in vitro* präsentiert und zudem um echokardiographische *In-vivo*-Daten ergänzt.

3.1 Ergebnisse aus Versuchen mit RA654321 und GS-680 in humanen Kardiomyozyten

Die Arbeit mit humanem Myokard impliziert eine heterogene Studienpopulation, sodass eine Standardisierung wie im Tiermodell nicht gewährleistet werden kann. Weiterhin ist ein spezielles Modell wie TAC beim Menschen nicht zu etablieren.

Wie den erfassten klinischen Daten (vgl. S. 66 ff.) zu entnehmen ist, weisen die Studienteilnehmer diverse Vorerkrankungen auf. Bei einem Großteil der eingeschlossenen Personen lagen etwa eine koronare Herzkrankheit, ein arterieller Hypertonus oder ein Diabetes mellitus Typ 2 vor.

Zudem sind den echokardiographischen Befunden etwa Unterschiede hinsichtlich systolischer und diastolischer Funktion oder auch verschiedener Klappenpathologien zu entnehmen, wobei überwiegend eine erhaltene Ejektionsfraktion und zu einem Drittel eine diastolische Dysfunktion zu verzeichnen war. Da es sich beim

untersuchten Gewebe um Myokard des rechtsatrialen Vorhofohrs handelte, ist in diesem Zusammenhang etwa auch das Vorhandensein einer Trikuspidalklappeninsuffizienz bei 55,9 % der Studienteilnehmer zu erwähnen, bei denen das untersuchte Gewebe infolge der rechtsatrialen Regurgitation höheren hämodynamischen Belastungen ausgesetzt war als im Fall einer kompetenten Trikuspidalklappe.

Schließlich besteht in der humanen Studienpopulation auch eine heterogenere Altersstruktur als in der Mäusepopulation.

Angesichts dieser verkomplizierenden Faktoren erscheint ein Wirkungsnachweis im humanen Modell überzeugender als im Tiermodell.

Hinzu gesellt sich die Tatsache, dass es sich bei RA654321 und GS-680 um CaMKII-Inhibitoren handelt, die in Zukunft potenziell beim Menschen anwendbar sein sollen. Insofern stellt die Untersuchung in humanem Gewebe, wenn auch noch *in vitro*, verglichen mit dem Tiermodell einen Schritt Richtung Klinik dar.

In humanen Kardiomyozyten wurden konfokale Sparkmessungen und Messungen von Kaffeintransienten durchgeführt. Von den Ergebnissen wurde erwartet, dass es unter CaMKII-Inhibition mittels RA654321 und GS-680 *in vitro* zu einer Reduktion der Kalziumsparkfrequenz und in der Folge auch des diastolischen SR-Kalziumlecks sowie konsekutiv zu einer Zunahme des SR-Kalziumgehalts kommt.

3.1.1 Klinische Charakteristika der Studienpopulation

Im Zuge der Patientenrekrutierung wurden klinische Daten gesammelt, welche in Tab. 9 dargestellt und der Präsentation der Ergebnisse vorangestellt sind. Es handelt sich hierbei um allgemeine Daten wie Alter, Geschlecht und Body-Mass-Index (BMI), Vorerkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Vorhofflimmern, Diabetes mellitus, chronische Nierenerkrankung und arterieller Hypertonus, welche insbesondere das kardiovaskuläre Risikoprofil charakterisieren, sowie echokardiographische Daten. Zudem sind die durchgeführten Operationen aufgeführt, in deren Rahmen die Gewebeproben entnommen wurden.

Kategorie	Wert
Gesamtzahl	42
Männliches Geschlecht	82,5 %
Alter (Jahre)	MW: 66,65 ; SD: 11,16 ; SEM: 1,77
BMI (kg/m²)	MW: 27,43 ; SD: 3,36 ; SEM: 0,54 - Normal (> 18,5 – 25): 28,2 % - Präadipositas (> 25 – 30): 46,2 % - Adipositas Grad I (> 30 – 35): 23,1 % - Adipositas Grad II (> 35 – 40): 2,6 % - Adipositas Grad III (> 40): 0,0 %
Herzrhythmus	
Sinusrhythmus	80,0 %
Paroxysmales VHF	10,0 %
Permanentes VHF	7,5 %
VHF, nicht näher bezeichnet	2,5 %
Echokardiographie	
EF (%)	MW: 56,26 ; SD: 11,80 ; SEM: 1,91 - Normal (≥ 50): 78,9 % - Leichtgradig reduziert (40 – 49): 15,8 % - Mittelgradig reduziert (30 – 39): 0,0 % - Hochgradig reduziert (< 30): 5,3 %
LA-Dilatation	60,0 %
LV-Hypertrophie	70,4 %
LV-Dilatation	17,4 %
Diastolische Dysfunktion	31,6 %
AS	- AS I°: 23,5 % - AS II°: 32,4 % - AS III°: 0,0 %
AI	51,4 %
MS	3,7 %
MI	- MI I°: 55,3 % - MI II°: 15,8 % - MI III°: 7,9 %
TI	55,9 %
Vorerkrankungen	
KHK	85,0 %
aHTN	80,0 %
DM Typ II	69,2 %
CKD (Stadium nach KDIGO)	- 1 (GFR ≥ 90 ml/min): 22,5 % - 2 (GFR 60 – 89 ml/min): 50,0 % - 3a (GFR 45 – 59 ml/min): 12,5 % - 3b (GFR 30 – 44 ml/min): 7,5 % - 4 (GFR 15 – 29 ml/min): 7,5 % - 5 (GFR < 15 ml/min): 0,0 %
Operation	
ACB	52,5 %
ACB + Klappenoperation	25,0 %
Klappenoperation	22,5 %

Tab. 9: Klinische Charakteristika der Studienpopulation

Die Untersuchung der beiden CaMKII-Inhibitoren fand an einer Gruppe von 42 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 66,65 Jahren statt. Die Daten charakterisieren die Population hinsichtlich Herzrhythmus, echokardiographischer Befunde und weit verbreiteter Vorerkrankungen wie KHK (Koronare Herzkrankheit), DM Typ 2 (Diabetes mellitus) und aHTN (Arterielle Hypertonie) sowie einer höhergradig eingeschränkten Nierenfunktion ab Stadium 3 nach KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes). Zudem sind die durchgeführten Operationen angegeben, wobei die aortokoronare Bypassoperation (ACB) deutlich dominiert.

AS/AI = Aortenklappenstenose/-insuffizienz, BMI = Body-Mass-Index, CKD = Chronic Kidney Disease (Chronische Nierenerkrankung), EF = Ejektionsfraktion, GFR = Glomeruläre Filtrationsrate, LA = linkes Atrium, LV = linker Ventrikel, MS/MI = Mitralklappenstenose/-insuffizienz, MW = Mittelwert, SEM = Standard Error of the Mean (Standardabweichung des Mittelwerts), SD = Standard Deviation (Standardabweichung), TI = Trikuspidalklappeninsuffizienz, VHF = Vorhofflimmern.

In die Studie gingen insgesamt 42 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 66,65 \pm 11,16 (SD) Jahren ein, wovon 82,5 % männlich waren. Der durchschnittliche BMI berechnete sich mit 27,43 \pm 3,36 (SD) kg/m², nach allgemein üblicher Einteilung einer Präadipositas entsprechend.

Nach Auswertung des präoperativen Elektrokardiogramms und Durchsicht der in der ärztlichen Korrespondenz angegebenen Vordiagnosen bestand bei 20 % ein Vorhofflimmern.

Aufgrund der routinemäßigen Durchführung einer transthorakalen Echokardiographie vor kardiochirurgischen Eingriffen standen auch diese Daten regelhaft zur Verfügung. Die meisten Patienten (78,9 %) verfügten hierbei über eine erhaltene Ejektionsfraktion von mindestens 50 %, im Durchschnitt betrug diese 56,26 \pm 11,80 (SD) %.

Hypertrophiezeichen zeigten visuell oder nach Vermessung von Septum oder Hinterwand des linken Ventrikels 70,4 % der Patienten. Bei 17,4 % fand sich visuell oder nach Vermessung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters (LVEDD) eine linksventrikuläre Dilatation, auf linksatrialer Ebene lag diese zu 60,0 % vor.

Da Angaben zur Wandhypertrophie oder zur Dilatation der Herzhöhlen nur unregelmäßig in den gesichteten Befunden enthalten waren, spiegeln diese Zahlen nur eine Tendenz wider. Bei der Ableitung von Aussagen über das Ausmaß einer Herzinsuffizienz muss dies entsprechend berücksichtigt werden.

Regelmäßiger fanden sich erfreulicherweise Angaben zur diastolischen Dysfunktion, welche bei 31,6 % vorlag, sowie zur Ejektionsfraktion, die bei 94,7 % normal oder nur leichtgradig reduziert war, und somit in den meisten Fällen auch keine fortgeschrittene systolische Dysfunktion suggeriert.

Unter den erfassten relevanten Vorerkrankungen waren bei 85,0 % der Patienten eine koronare Herzkrankheit, bei 80,0 % ein arterieller Hypertonus, bei 69,2 % ein Diabetes mellitus Typ 2 und bei 27,5 % eine fortgeschrittene Niereninsuffizienz ab Stadium 3 nach KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) nachweisbar. Abschließend sind die Operationen aufgelistet, aus denen die akquirierten Gewebeproben stammten. Hierbei erweist sich der aortokoronare Bypass (ACB) isoliert oder in Kombination mit einem Klappeneingriff als am häufigsten.

3.1.2 RA654321 und GS-680 führen zu einer signifikanten Abnahme der Sparkfrequenz

Zunächst soll der Fokus auf den Effekten von RA654321 und GS-680 auf die Kalziumsparkfrequenz liegen. Der Arbeitshypothese entsprechend soll sich eine Reduktion der Sparkfrequenz unter CaMKII-Inhibition einstellen.

Exemplarische Originalregistrierungen konfokaler Sparkmessungen zeigen Abb. 12 bis Abb. 18, wobei es sich bei Abb. 12 um das mit DMSO inkubierte Vehikel handelt, während Abb. 13 und Abb. 14 Originalregistrierungen von mit RA654321 und Abb. 15 bis Abb. 17 von mit GS-680 inkubierten Kardiomyozyten darstellen. Abb. 18 ist die AIP-Referenz.

Die Scans entstehen aus dem vielfachen konfokalmikroskopischen Abrastern einer digital festgelegten Linie im Randbereich der Kardiomyozyten, wo sich die bevorzugte Lokalisation der Dyaden, der Kontaktstellen zwischen terminalen SR-Zisternen und T-Tubuli der Zellmembran, befindet. Im zeitlichen Verlauf entstehen zweidimensionale Strukturen wie Kalziumsparks und -transienten. Ein Scan besteht hierbei aus 10 000 Scanzyklen, die sich über 7,26 Sekunden erstrecken. Zugunsten einer größeren Darstellung werden im Folgenden halbierte Scans präsentiert. Bei dem verwendeten Farbfilter entspricht der Farbverlauf von blau über grün hin zu gelb und orange einer zunehmenden Fluoreszenz bzw. Kalziumkonzentration. Somit stellen die punktuellen Fluoreszenzanstiege Kalziumsparks dar.

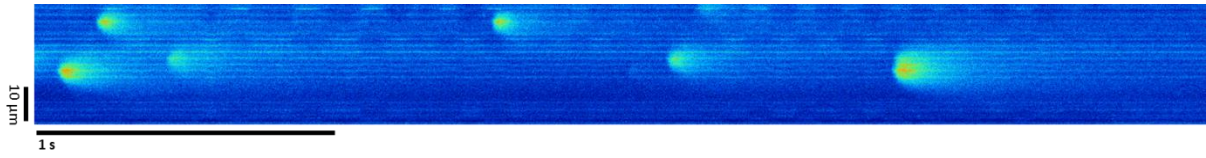


Abb. 12: Vehikel

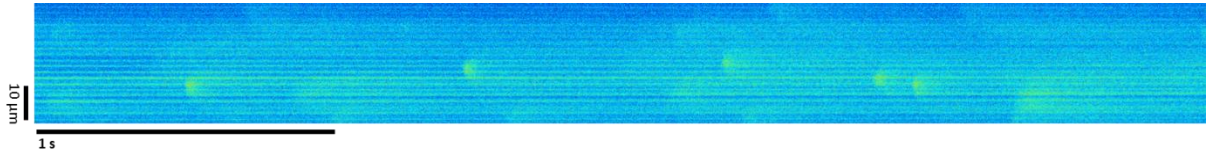


Abb. 13: RA654321 – 3 μM

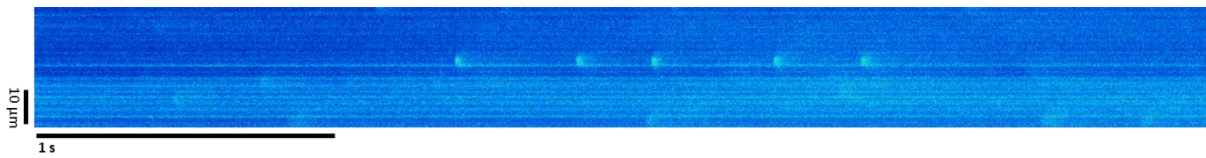


Abb. 14: RA654321 – 10 μM

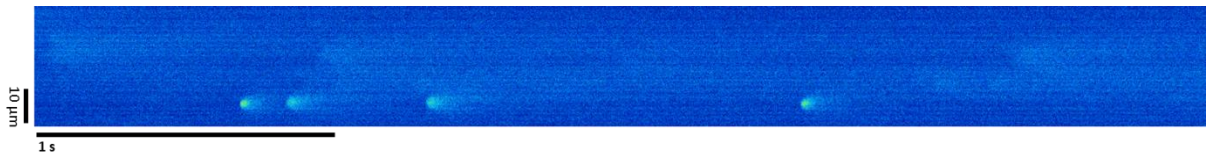


Abb. 15: GS-680 – 30 nM

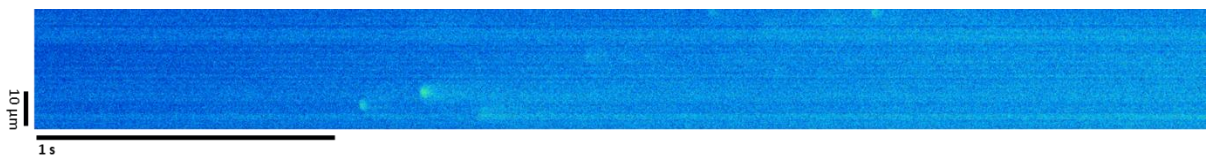


Abb. 16: GS-680 – 100 nM



Abb. 17: GS-680 – 300 nM

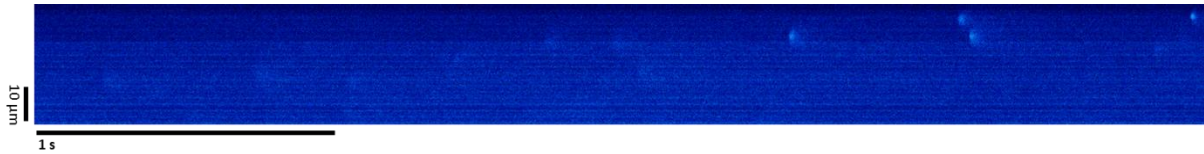


Abb. 18: AIP – 1 μM

Auf den ersten Blick fällt ein heterogeneres Fluoreszenzmuster und -ausmaß als etwa bei den später gezeigten Originalregistrierungen von Kardiomyozyten der Maus auf, wie speziell der Vergleich von Abb. 13 und Abb. 18 zeigt. Auch findet sich eine teils ausgeprägtere basale Fluoreszenz, insbesondere bei Abb. 12 bis Abb. 14, wo die Scans von Fluoreszenzstreifen durchgezogen sind. Darüber hinaus imponiert eine höhere Sparkneigung als bei Mäusezellen, wobei die Morphologie der Sparks zudem stärker divergiert und insbesondere deren Schärfe und Abgrenzbarkeit den praktischen Erfahrungen im Entstehungsprozess dieser Dissertation nach mit der qualitativen Beschaffenheit der Zelle zu korrelieren scheint.

Die Ergebnisse zur Sparkfrequenz [$1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$] sind in Abb. 19 als Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwerts graphisch dargestellt.

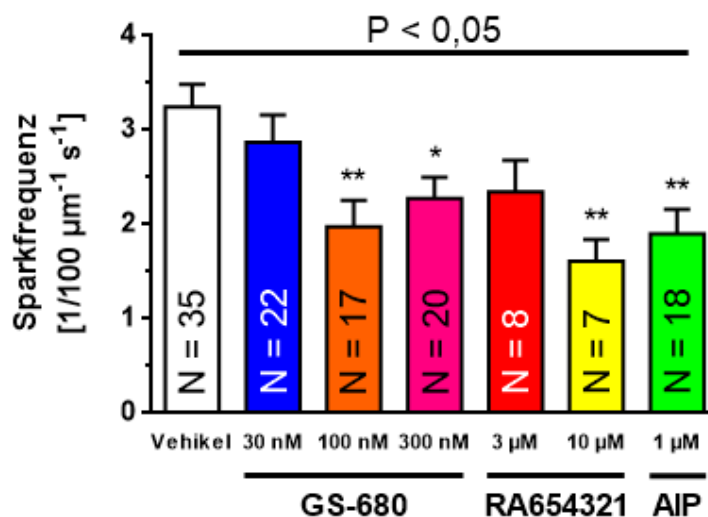


Abb. 19: Die Sparkfrequenz nimmt unter GS-680 und RA654321 signifikant ab

Sparkfrequenz in $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$; Mittelwerte mit SEM. GS-680 (30 nM, blau; 100 nM, orange; 300 nM, rosa) und RA654321 (3 μM , rot; 10 μM , gelb) werden mit dem Vehikel (weiß) sowie mit AIP (1 μM , grün) verglichen.

Für GS-680 findet sich eine Reduktion der Sparkfrequenz, die am stärksten unter 100 nM ausfällt und sich hier wie auch unter 300 nM als signifikant (Sidak's Multiple Comparisons Test; $\alpha = 0,05$) erweist. Auch RA654321 führt zu einer unter 10 μM signifikanten Verringerung der Sparkfrequenz, die sogar stärker als unter dem ebenfalls signifikant wirksamen Referenzinhibitor AIP ausfällt.

Eine Normalverteilung ist nach Shapiro-Wilk-Test ($\alpha = 0,05$) in allen Gruppen gegeben, ebenso wird der ANOVA ($\alpha = 0,05$) erfüllt.

Die Abbildung zeigt die drei mit GS-680 und die beiden mit RA654321 inkubierten Gruppen, flankiert vom Vehikel in weiß zur Linken und AIP in grün zur Rechten.

Beide CaMKII-Inhibitoren erzielen eine signifikante Reduktion (Sidak's Multiple Comparisons Test, $\alpha = 0,05$) der Sparkfrequenz des Vehikels ($3,247 \pm 0,238$).

Während sich für GS-680 in der niedrigsten Konzentration 30 nM mit einer Sparkfrequenz von $2,872 \pm 0,289$ lediglich ein Trend abzeichnet, finden sich für 100 nM ($P = 0,0033$) und 300 nM ($P = 0,0299$) signifikante Ergebnisse. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass der größte und stärkste Effekt nicht etwa für die höchste getestete Konzentration 300 nM, sondern für 100 nM vorliegt. Die Abnahme der Sparkfrequenz beträgt 29,9 % auf $2,276 \pm 0,226$ bzw. 39,1 % auf $1,976 \pm 0,281$. GS 100 nM bewegt sich hierbei im Bereich von AIP ($1,900 \pm 0,260$), das ebenfalls ein signifikantes Ergebnis liefert ($P = 0,0012$).

Ähnlich wie bei GS-680 findet sich auch für RA654321 in der niedrigeren getesteten Konzentration 3 μM nur ein Trend ($2,348 \pm 0,335$). Bei 10 μM liegt schließlich eine hochsignifikante Abnahme der Sparkfrequenz auf $1,612 \pm 0,230$ ($P = 0,0087$), entsprechend einer Reduktion um 50,3 %, vor, die auch den Effekt des AIP übersteigt.

Somit bestätigen beide CaMKII-Inhibitoren die Erwartungen hinsichtlich einer Verringerung der Sparkfrequenz.

Alle Gruppen erfüllen die Kriterien einer Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$) sowie die Anforderungen des ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Über die allgemeine Betrachtung der Ergebnisse zur Sparkfrequenz hinausgehend wurde auch untersucht, ob sich Auffälligkeiten nach Selektion bezüglich des Vorhandenseins eines Diabetes mellitus Typ 2, eines Vorhofflimmerns oder einer höhergradigen chronischen Niereninsuffizienz ergeben. Da dies nicht der Fall war und sich lediglich die bereits vorhandenen Trends bestätigten, wird auf eine ausführliche Präsentation dieser Ergebnisse verzichtet.

3.1.3 RA654321 und GS-680 bewirken eine tendenzielle Reduktion des diastolischen SR-Kalziumlecks

Analog zur Präsentation der Ergebnisse zur Sparkfrequenz zeigt Abb. 20 die Resultate zum diastolischen SR-Kalziumleck [$\mu\text{mol/l}$ Zytosol/s]. Nach Inkubation mit RA654321 und GS-680 soll es zu einer Verkleinerung des Lecks kommen.

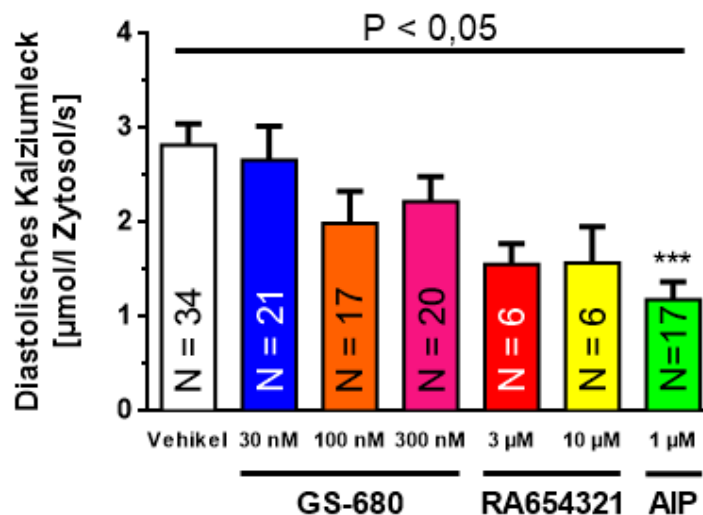


Abb. 20: GS-680 und RA654321 bewirken eine tendenzielle Verringerung des diastolischen Kalziumlecks

Diastolisches Kalziumleck in $\mu\text{mol/l}$ Zytosol/s; Mittelwerte mit SEM. GS-680 (30 nM, blau; 100 nM, orange; 300 nM, rosa) und RA654321 (3 μM , rot; 10 μM , gelb) werden mit dem Vehikel (weiß) sowie mit AIP (1 μM , grün) verglichen.

GS-680 bewirkt eine tendenzielle Verkleinerung des diastolischen Kalziumlecks, welche unter 100 nM am stärksten ausfällt. Ähnlich verhält es sich für RA654321 mit vergleichbaren Werten für 3 und 10 μM . Signifikante Effekte (Sidak's Multiple Comparisons Test; $\alpha = 0,05$) finden sich hier jedoch nicht und sind lediglich für AIP nachweisbar.

Für alle Gruppen kann eine Normalverteilung angenommen werden (Shapiro-Wilk-Test; $\alpha = 0,05$), der ANOVA ($\alpha = 0,05$) fällt signifikant aus.

Auf den ersten Blick bietet sich ein ähnliches Bild wie soeben bereits für die Sparkfrequenz. Beide Inhibitoren führen visuell zu einer Abnahme des Kalziumlecks, was mit der Tatsache in Einklang zu bringen ist, dass die Summe der Sparks mit der Größe des Lecks korreliert.

Für GS-680 findet sich die stärkste Reduktion um 29,3 % wiederum bei 100 nM, wo sich das Leck bei $1,993 \pm 0,340$ gegenüber dem Vehikel mit $2,820 \pm 0,228$ bewegt. Dennoch handelt es sich hierbei nur um eine ausgeprägte Tendenz, da das Signifikanzniveau nicht erreicht wird (Sidak's Multiple Comparisons Test, $\alpha = 0,05$).

Etwas weniger deutlich findet sich dieser Trend bei 300 ($2,221 \pm 0,264$) und minimal auch bei 30 nM ($2,662 \pm 0,360$).

Auch RA654321 erzielt keine signifikanten Ergebnisse, jedoch zeigt sich auch hier die tendenzielle Abnahme des diastolischen Kalziumlecks unter CaMKII-Inhibition. 3 und 10 μM liegen hierbei mit $1,559 \pm 0,218$ bzw. $1,571 \pm 0,386$ nahezu gleich auf, was einer Verringerung um 44,7 bzw. 44,3 % entspricht.

Einzig AIP bewirkt eine signifikante Reduktion des SR-Kalziumlecks um 68,2 % auf $1,180 \pm 0,192$ ($P = 0,0002$).

Auch wenn signifikante Ergebnisse für RA654321 und GS-680 ausbleiben, kann die Hypothese des abnehmenden SR-Kalziumlecks unter CaMKII-Inhibition in beiden Fällen zumindest durch eindeutige Trends gestützt werden.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass für GS 300 nM und aufgrund der zu geringen Individuenzahl auch für RA654321 keine Normalverteilung angenommen werden kann (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$), während der ANOVA ($\alpha = 0,05$) von allen Gruppen erfüllt wird.

3.1.4 Unter Einfluss von RA654321 und GS-680 zeigt der SR-Kalziumgehalt einen zunehmenden Trend

Abschließend werden noch die Ergebnisse zum SR-Kalziumgehalt, gemessen an der Transientenamplitude nach Kaffeinapplikation, beleuchtet. Erwartungsgemäß soll der SR-Kalziumgehalt unter CaMKII-Inhibition zunehmen.

Originalregistrierungen der Kaffeinversuche sind nachfolgend dargestellt (vgl. Abb. 21 bis Abb. 27), wobei erneut nur die erste Hälfte der Transienten gezeigt wird. Die Gesamtscandauer umfasst 21,78 s bzw. 30 000 Scanzyklen.

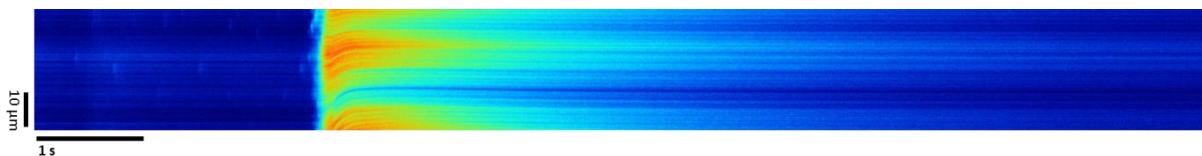


Abb. 21: Vehikel

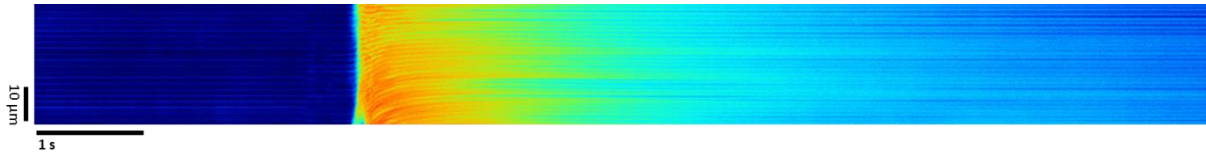


Abb. 22: GS-680 – 30 nM

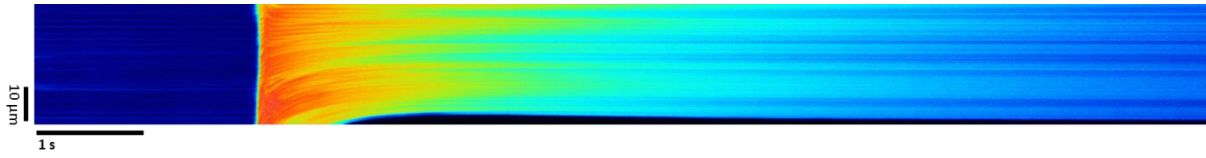


Abb. 23: GS-680 – 100 nM

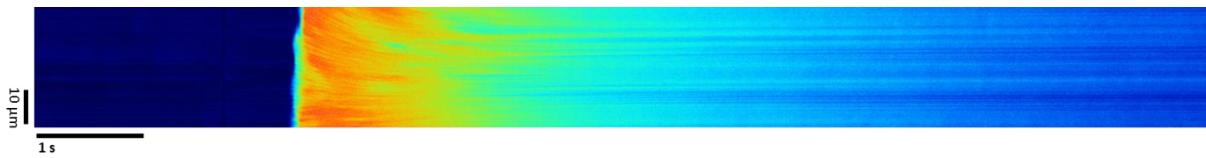


Abb. 24: GS-680 – 300 nM

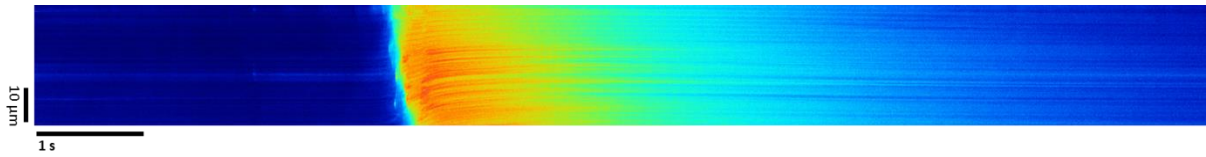


Abb. 25: RA654321 – 3 μM

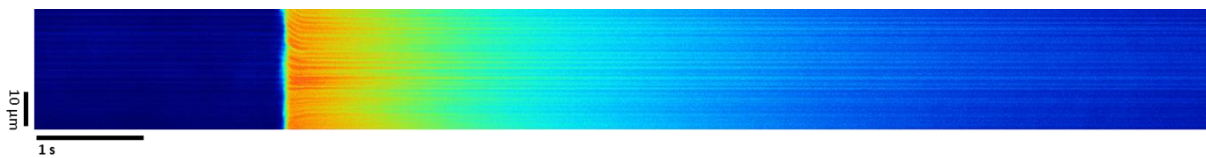


Abb. 26: RA654321 – 10 μM

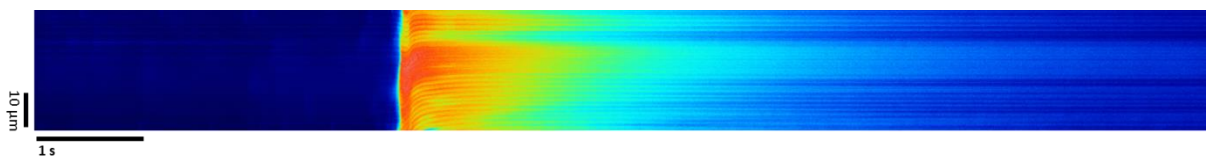


Abb. 27: AIP – 1 μM

Wie bereits erläutert, entspricht der Farbverlauf von blau über grün, gelb und orange einer ansteigenden Kalziumkonzentration. Darauf basierend weisen die gezeigten Originalregistrierungen eine recht ähnliche basale Fluoreszenz vor dem Transienten auf. Bei Betrachtung des Vehikels fällt eine tendenziell etwas schwächere Farbgebung des Transienten im Sinne geringerer Orangeanteile im Vergleich zu den übrigen, unter CaMKII-Inhibition registrierten, Transienten auf. Diese rein visuelle Analyse der ausgewählten Transienten ließe sich mit der Forderung einer zunehmenden Transientenamplitude bzw. eines zunehmenden SR-Kalziumgehalts vereinbaren.

Abb. 28 stellt die Transientenamplitude in der Form $\Delta F/F_0$ graphisch dar, Anordnung und Farbgebung bleiben wie bereits von Sparkfrequenz und Kalziumleck bekannt erhalten.

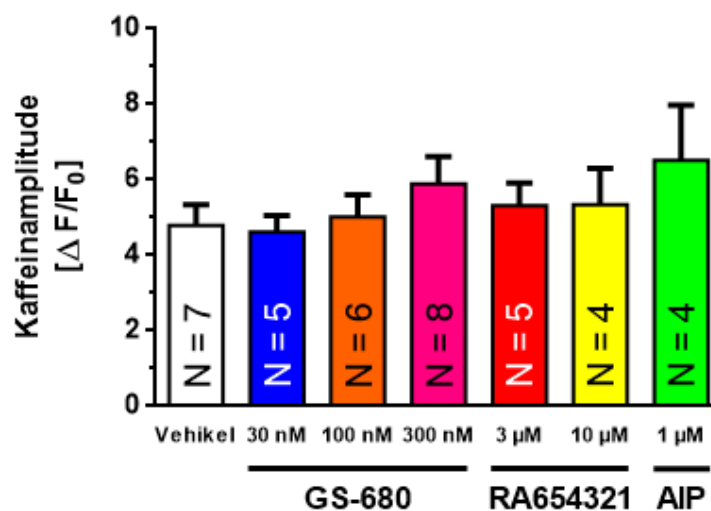


Abb. 28: Es kommt unter GS-680 und RA654321 zu einem tendenziellen Anstieg des SR-Kalziumgehalts Transientenamplitude nach Kaffeinapplikation als $\Delta F/F_0$; Mittelwerte mit SEM. GS-680 (30 nM, blau; 100 nM, orange; 300 nM, rosa) und RA654321 (3 μ M, rot; 10 μ M, gelb) werden mit dem Vehikel (weiß) sowie mit AIP (1 μ M, grün) verglichen.

Für den SR-Kalziumgehalt ergibt sich sowohl für GS-680 als auch für RA654321 eine leicht zunehmende Tendenz. Signifikante Effekte sind hier für beide Substanzen nicht nachweisbar (Sidak's Multiple Comparisons Test, $\alpha = 0,05$), auch muss einschränkend erwähnt werden, dass aufgrund der teils kleinen Gruppengröße nicht immer eine Normalverteilung berechnet werden kann (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$) und der ANOVA ($\alpha = 0,05$) nicht erfüllt wird.

Bei ausbleibender Signifikanz (Sidak's Multiple Comparisons Test, $\alpha = 0,05$) zeigt sich der leichte Trend einer Zunahme der Transientenamplitude unter Inhibitoreinfluss.

Für GS-680 ergibt sich unter 30 nM mit $4,619 \pm 0,432$ ein dem Vehikel ($4,790 \pm 0,554$) sehr ähnlicher Wert, bevor die Amplitude unter 100 und insbesondere 300 nM mit $5,015 \pm 0,592$ bzw. $5,889 \pm 0,727$ eine ansteigende Tendenz einschlägt. Ohne zu vergessen, dass es sich um nicht signifikante Ergebnisse handelt, soll angemerkt werden, dass sich somit das deutlichste Ergebnis im Gegensatz zu Sparkfrequenz und Kalziumleck nicht unter 100, sondern unter 300 nM einstellt.

RA654321 liegt wie schon beim Kalziumleck in beiden Konzentrationen nahezu gleichauf, wobei sich unter 3 μM eine durchschnittliche Transientenamplitude von $5,322 \pm 0,600$ und unter 10 μM von $5,337 \pm 0,964$ errechnet.

Den stärksten Trend erzielt der Referenzinhibitor AIP ($6,513 \pm 1,466$).

Angesichts ausbleibender Signifikanzen kann die Hypothese eines zunehmenden SR-Kalziumgehalts unter CaMKII-Inhibition in den Kaffeeversuchen nicht gänzlich untermauert werden. Immerhin findet sich aber eine Tendenz, die diesen Erwartungen entspricht.

Aufgrund der geringen Gruppengrößen kann eine Normalverteilung wieder nur teilweise errechnet werden (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$), ebenso kann der ANOVA ($\alpha = 0,05$) hier nicht erfüllt werden.

Neben dem SR-Kalziumgehalt wurden auch die RT 50 % und die RT 80 % (RT = „Relaxation Time“) bestimmt, die ein Maß für die Geschwindigkeit der Kalziumelimination aus dem Sarkoplasma darstellen. Diese zeigten sich entsprechend einer größeren sarkoplasmatischen Kalziummenge unter CaMKII-Inhibition zunehmend. Da es sich hierbei nur um Tendenzen handelt, soll auf eine ausführliche Präsentation verzichtet werden.

3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit RA654321 und GS-680 in humanen Kardiomyozyten

Im Rahmen der vorliegenden Studie zur Erprobung der beiden CaMKII-Inhibitoren RA654321 und GS-680 wurden nach deren Aufklärung und Einwilligung zunächst klinische Daten von Patienten gesammelt, welchen ein operativer Eingriff am Herzen mit extrakorporaler Zirkulation bevorstand. Bei der atrialen Kanülierung anfallendes Myokard des rechten Vorhofohrs wurde sodann als Probenmaterial verwendet. Nach Isolation einzelner Kardiomyozyten konnten die Auswirkungen der Substanzen auf

die Kalziumsparkfrequenz, das diastolische Kalziumleck und den SR-Kalziumgehalt mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie erforscht werden.

Die Studienpopulation wies ein Durchschnittsalter von 66,65 Jahren auf und bei einem Großteil lagen Vorerkrankungen wie eine koronare Herzkrankheit, ein arterieller Hypertonus oder ein Diabetes mellitus Typ 2 vor. Zudem bestand bei den meisten Teilnehmern und auch im Schnitt eine Präadipositas. Neben einer durchschnittlichen linksventrikulären Ejektionsfraktion von 56,26 % fand sich auch bei 31,6 % der Fälle eine diastolische Dysfunktion.

Auf Boden der pathophysiologischen Ausführungen zu Beginn dieser Arbeit wurden die Hypothesen abgeleitet, dass es unter CaMKII-Inhibition zu einer Abnahme der Kalziumsparkfrequenz und des diastolischen SR-Kalziumlecks sowie zu einer Zunahme des SR-Kalziumgehalts kommen würde.

Diesbezüglich konnten in humanen Kardiomyozyten nicht nur stützende Tendenzen, sondern sogar signifikante Effekte nachgewiesen werden.

Die Sparkfrequenz erfährt sowohl unter GS-680 in den Konzentrationen 100 und 300 nM als auch unter RA654321 in der Konzentration 10 µM eine signifikante Reduktion, während dieser Trend in den jeweils niedrigeren Konzentrationen 30 nM bzw. 3 µM bereits angedeutet wird. Die weitere Evaluation der Daten nach Aufteilung hinsichtlich des Vorliegens eines Diabetes mellitus Typ 2, eines Vorhofflimmerns und einer höhergradigen chronischen Niereninsuffizienz erbrachte keine zusätzlichen Erkenntnisse. Die bekannten Trends bestätigten sich auch hier und zeigten sich teilweise ebenfalls signifikant.

Obwohl signifikante Ergebnisse für das diastolische Kalziumleck nicht nachweisbar sind, liegt auch hier ein eindeutiger Trend hin zu einer Abnahme desselbigen unter CaMKII-Inhibition mit GS-680 und RA654321 vor. Da sich alle Tendenzen mit denen der Sparkfrequenz decken und die Sparkfrequenz als Surrogatparameter für das diastolische Kalziumleck gesehen werden kann, gewinnen diese Trends zusätzlich an Güte.

Bei der Analyse der Ergebnisse zu Sparkfrequenz und Kalziumleck nach Inkubation mit GS-680 fiel auf, dass die stärksten Effekte nicht unter der höchsten Konzentration 300 nM, sondern unter 100 nM zu verzeichnen waren.

Zu guter Letzt zeigt sich bei Betrachtung der Ergebnisse zum SR-Kalziumgehalt, gemessen an der Kaffeintransientenamplitude der Trend einer Zunahme unter

CaMKII-Inhibition. Einschränkend muss hier die geringe Gruppengröße erwähnt werden, dennoch zeichnet sich eine homogene Tendenz sowohl bei den Testsubstanzen GS-680 und RA654321 als auch bei der Referenzsubstanz AIP ab. Zusammenfassend ist somit festzuhalten, dass in humanen Kardiomyozyten ein eindeutiger Effekt der beiden neuartigen CaMKII-Inhibitoren nachgewiesen werden konnte. Vor allem die Hypothese einer Reduktion der Sparkfrequenz wurde mittels signifikanter Ergebnisse bestätigt und zudem mittels damit einhergehender homogener Trends im Fall des unter CaMKII-Inhibition abnehmenden diastolischen SR-Kalziumlecks untermauert. Die tendenzielle Zunahme des SR-Kalziumgehalts vermag dies auf pathophysiologischer Ebene sinnvoll zu ergänzen.

3.2 Ergebnisse aus Versuchen mit RA654321 in Kardiomyozyten der Maus

Wie bereits angesprochen bietet das Mausmodell die Möglichkeit der Standardisierung und Ausschaltung von Faktoren wie Alter und Vorerkrankungen, welche eine humane Studienpopulation natürlicherweise mit sich bringt.

Weiterhin kann hier ventrikuläres Gewebe verwendet werden, welches im humanen Bereich aufgrund der Seltenheit von Herztransplantationen oder der Implantation kardialer Unterstützungssysteme nur unzureichend zur Verfügung steht.

Schließlich besteht im Mausmodell die Möglichkeit der Simulation einer Herzinsuffizienz mittels TAC, wobei im Rahmen einer Operation ein Faden um die thorakale Aorta der Tiere gelegt wird, welcher den Gefäßquerschnitt verringert und die kardiale Nachlast erhöht. In der Folge kommt es unter zunächst myokardialer Hypertrophie und im Verlauf auch Dilatation zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz.

Hieraus ergeben sich eine TAC-Gruppe und eine als Kontrolle dienende Sham-Gruppe, in der abgesehen von der aortalen Konstriktion alle anderen Operationsschritte ebenfalls durchgeführt wurden, um deren Einflüsse zu nivellieren.

Da jeweils ein Teil der TAC- und Sham-Mäuse RA654321 bereits *in vivo* erhielt, sind die beiden Gruppen nochmals in je eine Vehikel- und eine „RA *in vivo*“-Gruppe zu unterteilen.

Die Entwicklung der Tiere wurde zur Evaluation der Einflussfaktoren TAC und RA654321 *in vivo* mittels Echokardiographien präoperativ sowie zwei und vier Wochen postoperativ dokumentiert.

Nach Isolation wurde je ein Teil der Zellen aller vier bereits bestehenden Gruppen entweder mit RA654321, mit dem Vergleichsinhibitor AIP oder mit einer äquivalenten Menge DMSO, in welchem die Pharmaka gelöst wurden, inkubiert, woraus sich abschließend zwölf Gruppen ergeben.

Um die Übersicht zu wahren, soll der Fokus auf drei sich aus dem Studienaufbau ergebenden Fragestellungen liegen:

1. Bewirkt TAC an sich einen Effekt und kann damit von einer erfolgreichen Anwendung des Modells ausgegangen werden?
2. Ist der Verabreichung von RA654321 *in vivo* ein Effekt zuzuschreiben?
3. Ist nach *In-vitro*-Applikation von RA654321 ein Effekt zu verzeichnen?

Das Vorliegen eines Effekts wird nun an signifikanten Veränderungen der Sparkfrequenz, des diastolischen Kalziumlecks und des SR-Kalziumgehalts festgemacht. Zudem werden die Ergebnisse mit den erhobenen Echokardiographiedaten in Relation gesetzt.

3.2.1 Echokardiographische Entwicklung des Modells

Durch Analyse der echokardiographischen Daten kann die Entwicklung der Versuchstiere *in vivo* auf kardialer Ebene skizziert werden. Dabei ist zunächst von Interesse, ob nach TAC ein Effekt zu verzeichnen ist. Dies soll anhand Abb. 29 veranschaulicht werden. Weiterhin stellt sich die Frage nach den Auswirkungen der Verabreichung von RA654321 *in vivo*, was in Abb. 30 zur Darstellung kommt. Betrachtet werden die Ejektionsfraktion (EF), die Septumdicke (IVS = Interventrikuläres Septum) sowie der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD) als charakteristische Parameter der globalen kardialen Funktion, der Hypertrophie beziehungsweise der Dilatation, jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung des Mittelwerts (SEM = „Standard Error of the Mean“).

Die echokardiographischen Untersuchungen der Mäuse wurden von anderen Mitarbeitern der AG Prof. Dr. Maier durchgeführt und dürfen an dieser Stelle zur

Einbettung der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation in den Zusammenhang präsentiert werden.

Als erstes soll der Effekt von TAC an sich beleuchtet werden. Zu diesem Zweck werden in Abb. 29 Daten der Sham- und TAC-Vehikel, also der Gruppen, die nach der Sham- bzw. TAC-Operation *in vivo* keinen weiteren Einflüssen in Form einer Applikation von RA654321 ausgesetzt waren, dargestellt.

Alle Gruppen zeigten sich im ANOVA ($\alpha = 0,05$) signifikant, des Weiteren fanden sich nach Anwendung des Sidak's Multiple Comparisons Test ($\alpha = 0,05$) signifikante Effekte, wie den nachfolgenden Ausführungen zu entnehmen ist. Eine Normalverteilung liegt bei TAC vor, bei Sham war die Berechnung angesichts der kleinen Gruppengröße nicht möglich (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$).

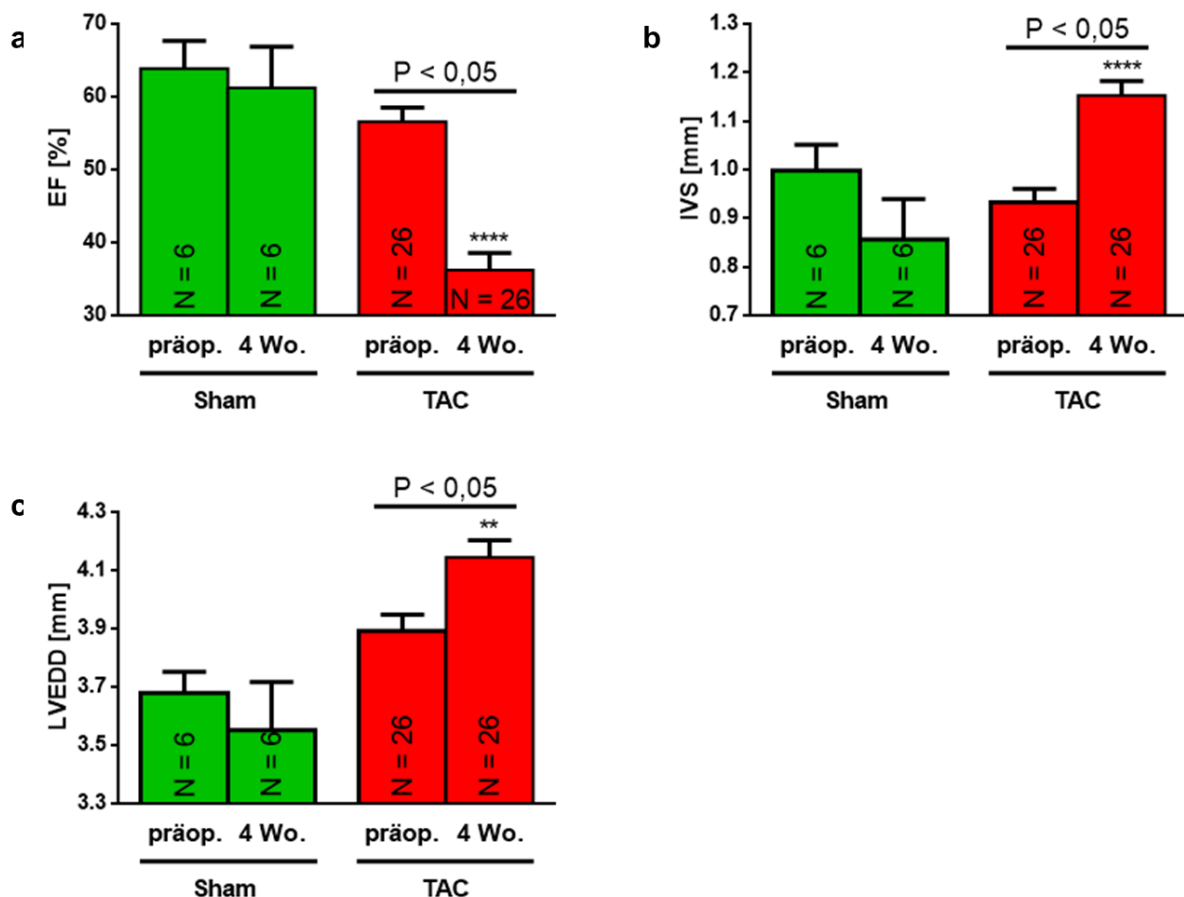


Abb. 29: TAC bewirkt eine signifikante Abnahme der EF sowie eine signifikante Zunahme von IVS und LVEDD

Es werden die Werte (Mittelwerte mit SEM) der a) Ejektionsfraktion (EF in %), des b) interventrikulären Septums (IVS in mm) und des c) linksventrikulären enddiastolischen Diameters (LVEDD in mm) präoperativ und in der Kontrollechokardiographie nach vier Wochen innerhalb des Sham- (grün) und des TAC-Vehikels (rot) verglichen.

Nach signifikantem ANOVA ($\alpha = 0,05$), stellten sich wie nachfolgend beschrieben signifikante Effekte heraus (Sidak's Multiple Comparisons Test, $\alpha = 0,05$). Eine Normalverteilung konnte für TAC angenommen werden, bei Sham war die Berechnung aufgrund der zu geringen Gruppengröße nicht möglich (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$).

a) Nach TAC kommt es zu einer hochsignifikanten Abnahme der EF, während diese sich im Sham Vehikel weitgehend unverändert zeigt.

b) Die Septumdicke nimmt nach TAC hochsignifikant zu, während sie bei Sham nicht signifikant abnimmt.

c) Auch der LVEDD erfährt nach TAC einen signifikanten Zuwachs, wohingegen sich bei Sham wiederum eine leichte nicht signifikante Reduktion einstellt.

Bereits auf den ersten Blick fällt auf, dass sich im Fall des TAC Vehikels bei allen drei Parametern hochsignifikante Veränderungen (Sidak's Multiple Comparisons Test) einstellten, weshalb TAC mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Effekt zugeschrieben werden kann. Demgegenüber sind bei Sham visuell zwar Unterschiede sichtbar, welche sich von einer statistischen Signifikanz jedoch deutlich entfernt zeigten.

Der ausgeprägteste Effekt entfällt auf die in Abb. 29 a dargestellte Ejektionsfraktion. Vor TAC wiesen die Tiere eine EF von $56,58 \pm 1,935$ % auf, kurz vor Zellisolation vier Wochen später war diese hochsignifikant ($P < 0,0001$) auf $36,21 \pm 2,340$ % gefallen, was einer Abnahme um 36,0 % entspricht. Das Sham Vehikel bewegte sich hingegen nach vier Wochen mit einer EF von $61,22 \pm 5,643$ % nach wie vor im Bereich der anfänglichen EF von $63,89 \pm 3,783$ %.

Weiterhin kam es nach TAC zu einer hochsignifikanten ($P < 0,0001$) Zunahme der Dicke des interventrikulären Septums (IVS) um 23,5 % von $0,933 \pm 0,028$ mm auf $1,152 \pm 0,030$ mm (vgl. Abb. 29 b). Nach Sham stellte sich hingegen eine erneut nicht signifikante Abnahme der Septumdicke von $1,000 \pm 0,053$ mm auf $0,856 \pm 0,083$ mm ein.

Der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD) steigerte sich nach TAC um 6,5 % von $3,892 \pm 0,056$ mm auf $4,145 \pm 0,058$ mm (vgl. Abb. 29 c). Auch hierbei handelte es sich um einen hochsignifikanten Effekt ($P = 0,0078$), während sich die visuell sichtbare Verringerung des LVEDD nach vier Wochen von $3,679 \pm 0,073$ mm auf $3,552 \pm 0,164$ mm wiederum als nicht signifikant herausstellte.

Somit können die Ausführungen zum TAC-Modell auf S. 41 f. unterstützt werden. Die Veränderungen mit Abnahme der EF und Zunahme von Septumdicke und LVEDD entsprechen den anhand der Publikationen anderer Autoren skizzierten Modellentwicklungen. Auch dort wurde eine systolische Funktionsstörung mit abnehmender EF beschrieben. Weiterhin zeigten sich auch eine Wandhypertrophie

sowie eine Dilatation der Herzkammern, hier repräsentiert durch die Zunahme der Septumdicke und des LVEDD.

Wie erläutert ist im Allgemeinen zunächst eine Hypertrophie und erst nach einigen Wochen eine Dilatation zu erwarten. Um diesen Verlauf detailliert zu untersuchen, wären mit Sicherheit regelmäßige und längerfristige echokardiographische Kontrollen nötig. Dennoch findet sich die Entwicklung ansatzweise auch im hier vorliegenden Modell wieder, wenn man ergänzend zu den in Abb. 29 gezeigten Daten nach vier Wochen die Werte von Septumdicke und LVEDD des TAC Vehikels nach zwei Wochen betrachtet. Zu diesem Zeitpunkt bewegt sich der LVEDD mit $3,959 \pm 0,050$ mm noch näher am Ausgangs- ($3,892 \pm 0,056$ mm) als am Endwert ($4,145 \pm 0,058$ mm) nach vier Wochen, wohingegen die Septumdicke nach zwei Wochen mit $1,206 \pm 0,041$ mm sogar einen höheren Wert als nach vier Wochen ($1,152 \pm 0,030$ mm) aufweist. Zudem könnte die Tatsache des im Fall der LVEDD-Zunahme nach vier Wochen noch höheren P-Werts ($0,0078$) verglichen mit der Zunahme der Septumdicke ($P < 0,0001$) darauf hinweisen, dass sich der Effekt der Dilatation, wenn auch bereits signifikant, in der Folge noch deutlicher ausgeprägt hätte, während die Hypertrophie, gemessen an der Septumdicke, bereits abgeschlossen gewesen sein könnte.

Um nun auch einen möglichen *In-vivo*-Effekt von RA654321 hervorzuheben, sind EF, Septumdicke und LVEDD in Abb. 30 für alle vier Gruppen im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Dieser umfasst zunächst die präoperative Untersuchung und die Kontrolle nach 14 Tagen. Anschließend wurde der Inhibitor verabreicht, sodass Auswirkungen in der Untersuchung nach vier Wochen zum Tragen kämen.

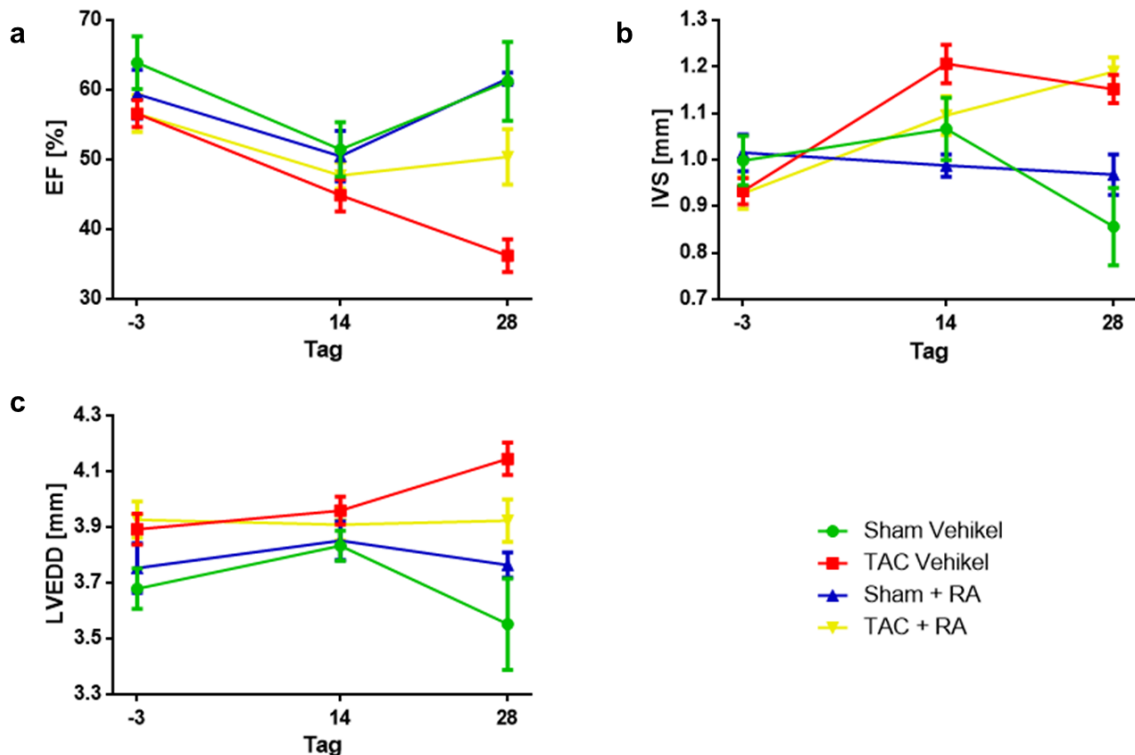


Abb. 30: RA654321 erhält *in vivo* nach TAC die systolische Funktion und begrenzt möglicherweise die myokardiale Dilatation

Zur Evaluation möglicher Effekte von RA654321 *in vivo* (ab Tag 15) werden a) Ejektionsfraktion (EF in %), b) Dicke des interventrikulären Septums (IVS in mm) und c) linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD in mm) im zeitlichen Verlauf beginnend mit der präoperativen Echokardiographie über die Verlaufsuntersuchung 14 Tage postoperativ bis zur abschließenden Kontrolle nach vier Wochen als Mittelwerte mit SEM gezeigt.

Den vier Gruppen sind die in der Legende definierten Farben zugeteilt. Die Vehikel sind dabei die Gruppen, die RA654321 nicht erhielten, während „Sham + RA“ und „TAC + RA“ für die Mäuse stehen, die den Inhibitor verabreicht bekamen.

a) Während die EF des TAC Vehikels kontinuierlich abnahm, wiesen die Mäuse, die RA654321 erhalten hatten, nach vier Wochen eine signifikant bessere EF auf als das TAC Vehikel (Sidak's Multiple Comparisons Test). Innerhalb Sham lagen nach vier Wochen nahezu identische Werte vor.

b) Nach divergierenden Verläufen liegen im Fall der Septumdicke nach vier Wochen nahezu gleiche Werte für TAC vor, bei Sham siedelt sich das Vehikel schließlich tendenziell unter der Gruppe an, die RA654321 erhielt. Signifikante Effekte sind in beiden Fällen nicht nachweisbar.

c) Auch bei Betrachtung des LVEDD bleiben Signifikanzen aus. Jedoch kann für TAC die leichte Tendenz einer Abschwächung der Zunahme des LVEDD unter RA654321 ausgemacht werden. Bei Sham scheint sich dies genau konträr zu verhalten, was aber angesichts des relativ großen SEM vorsichtig bewertet werden muss.

Abb. 30 a zeigt zunächst die bereits beschriebene deutliche Abnahme der EF für das TAC Vehikel (rot), die sich zusammen mit dem Wert nach 14 Tagen annähernd linear darstellt. Die Kurve der TAC-Mäuse, welche ab Tag 15 RA654321 erhielten (gelb), verläuft zunächst nahezu deckungsgleich mit der des TAC Vehikels. Schließlich wiesen sie jedoch nach vier Wochen mit $50,39 \pm 3,972$ % gegenüber $36,21 \pm 2,340$ % eine signifikant bessere EF auf ($P = 0,0007$, Sidak's Multiple Comparisons Test). Bei den Mäusen beider Sham-Gruppen findet sich demgegenüber über alle drei

Untersuchungen hinweg ein gleichartiger Verlauf, nach vier Wochen lagen mit $61,61 \pm 0,877$ % nach Inhibitorgabe (blau) und $61,22 \pm 5,643$ % für das Sham Vehikel (grün) nahezu identische Werte vor. Somit kann hier nach TAC ein Effekt von RA654321 *in vivo* angenommen werden, welcher sich in den Sham-Gruppen nicht wiederfindet.

Im Gegensatz zur EF bietet der Verlauf der Septumdicke (vgl. Abb. 30 b) divergierende Tendenzen. Noch bevor RA654321 zum Einsatz kam, erbrachte die Echokardiographie nach 14 Tagen unterschiedliche Werte für die beiden Sham- ($1,066 \pm 0,067$ mm für Sham Vehikel, $0,988 \pm 0,024$ mm für Sham + RA; Unterschiede nicht signifikant, $P < 0,05$, Sidak's multiple comparisons test) und TAC-Gruppen ($1,206 \pm 0,041$ mm für TAC Vehikel, $1,100 \pm 0,042$ mm für TAC + RA; Unterschiede nicht signifikant, $P < 0,05$, Sidak's Multiple Comparisons Test), obwohl sie sich bis dahin in der Behandlung nicht unterschieden.

Weiterhin nahm die Septumdicke des TAC Vehikels (rot) stärker als die der TAC-Mäuse zu, welche im weiteren Verlauf RA654321 erhalten sollten (gelb). Nach vier Wochen treffen sich beide Gruppen wieder auf ähnlichem Niveau ($1,152 \pm 0,030$ mm für TAC Vehikel, $1,189 \pm 0,030$ mm für TAC + RA; Unterschiede nicht signifikant, $P < 0,05$, Sidak's multiple comparisons test).

Im Fall der Sham-Mäuse fällt für das Vehikel (grün) nach 14 Tagen eine zunächst leicht zunehmende Tendenz der Septumdicke auf, um schließlich nach vier Wochen optisch deutlich unter den Wert der Sham-Gruppe zu fallen, die RA654321 erhielt (blau). Bei Letzterer nimmt die Septumdicke einen nahezu linearen und minimal abnehmenden Verlauf. Auch hier stellten sich nach vier Wochen keine signifikanten Unterschiede ein ($0,856 \pm 0,083$ mm für Sham Vehikel, $0,968 \pm 0,043$ mm für Sham + RA; $P < 0,05$, Sidak's Multiple Comparisons Test).

Ein *In-vivo*-Effekt von RA654321 kann somit für die Modulation der Septumdicke als Hypertrophieparameter weder innerhalb TAC noch innerhalb Sham angenommen werden.

Mit homogeneren Verläufen wartet hingegen die Entwicklung des LVEDD auf (vgl. Abb. 30 c). Die ersten beiden Untersuchungen, präoperativ und nach 14 Tagen, ergaben innerhalb der Sham- bzw. innerhalb der TAC-Gruppen jeweils sehr ähnliche Ergebnisse.

Ausgehend von diesem Stand kam es beim TAC Vehikel (rot) nach vier Wochen zu einer deutlichen Zunahme des LVEDD auf $4,145 \pm 0,058$ mm, welche unter RA654321 (gelb) ausblieb, wo der LVEDD abschließend $3,923 \pm 0,077$ mm betrug. Bei ausbleibender Signifikanz ($P < 0,05$, Sidak's Multiple Comparisons Test) kann hier aber lediglich von einer Tendenz gesprochen werden.

Ein hierzu konträres Bild zeichnet sich innerhalb der Sham-Gruppen ab. Hier nahm der LVEDD des Vehikels deutlich auf $3,552 \pm 0,164$ mm, nach Verabreichung von RA654321 (blau) nur leicht auf $3,764 \pm 0,045$ mm ab. Auch diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant ($P < 0,05$, Sidak's Multiple Comparisons Test). Sofern es angesichts der vergleichsweise großen Standardabweichung und des großen Standardfehlers des Mittelwerts des Sham Vehikels nach vier Wochen (grün) in Erwägung gezogen werden darf, kann auch hier nur von einer Tendenz die Rede sein.

Ein signifikanter Effekt auf den LVEDD bzw. die Dilatation der Herzhöhlen kann RA654321 somit *in vivo* nicht zugeschrieben werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Herzinsuffizienzmodell nach TAC unter Berufung auf die echokardiographischen Verlaufsuntersuchungen erfolgreich induziert werden konnte. Das TAC Vehikel bot nach vier Wochen im Vergleich zur präoperativen Ausgangssituation eine signifikante Abnahme der EF sowie signifikante Zunahmen von Septumdicke und LVEDD als Indikatoren von systolischer Funktion, myokardialer Hypertrophie und Dilatation der Herzhöhlen. Derartige signifikante Entwicklungen blieben beim Sham Vehikel aus.

Bei der Evaluation der *In-vivo*-Wirkung von RA654321 konnte einzig ein deutlicher Erhalt der EF nach TAC verglichen mit dem TAC Vehikel signifikant nachgewiesen werden. Eine optische Tendenz bot sich für den LVEDD, der unter RA654321 nach TAC konstant blieb, während er beim TAC Vehikel zunahm. Jedoch blieben eindeutige und signifikante Effekte auf Hypertrophie und Dilatation aus.

3.2.2 Trotz echokardiographisch erwiesener Wirkung *in vivo* zeigen sich bei TAC *in vitro* ohne Nachweis signifikanter Effekte Sparkfrequenz und diastolisches Kalziumleck unverändert und der SR-Kalziumgehalt zunehmend

Zunächst soll nun der Frage nachgegangen werden, ob TAC an sich ein Effekt zugeschrieben werden kann. Hierzu wurde am Ende der Einleitung folgende Hypothese formuliert (vgl. S. 37 f.):

Nach Induktion einer Herzinsuffizienz mittels TAC nehmen die Sparkfrequenz und das diastolische SR-Kalziumleck zu, während der SR-Kalziumgehalt abnimmt.

Analog zur echokardiographischen Evaluation eines möglichen TAC-Effekts (vgl. S. 80 ff.) werden hierzu die beiden Vehikelgruppen verglichen, da diese abgesehen von der Sham- bzw. TAC-Operation keinem weiteren *In-vivo*-Einfluss unterlagen.

Entsprechend werden mit Abb. 31 und Abb. 32 wieder Originalregistrierungen von Kalziumsparks in Form von Line Scans gezeigt. Im Fall der Mäusezellen wurde aufgrund derer erfahrungsgemäß guten Stimulierbarkeit ein Kalziumtransient mit aufgezeichnet, bevor anschließend die elektrische Stimulation ausgeschaltet und somit die Diastole simuliert wurde.



Abb. 31: Sham Vehikel

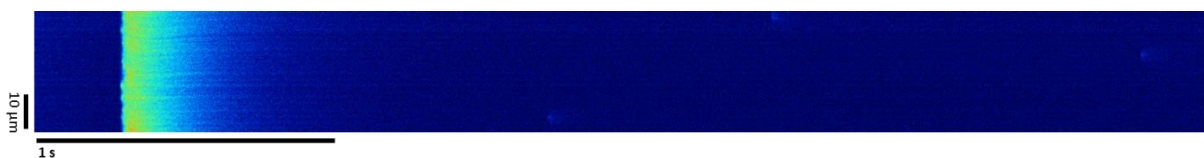


Abb. 32: TAC Vehikel

Es handelt sich hierbei um Zellen des Sham bzw. TAC Vehikels, also Zellen, die nach der Isolation weder mit RA654321 noch mit AIP, sondern aus

Standardisierungsgründen lediglich mit einer äquivalenten Menge DMSO inkubiert wurden.

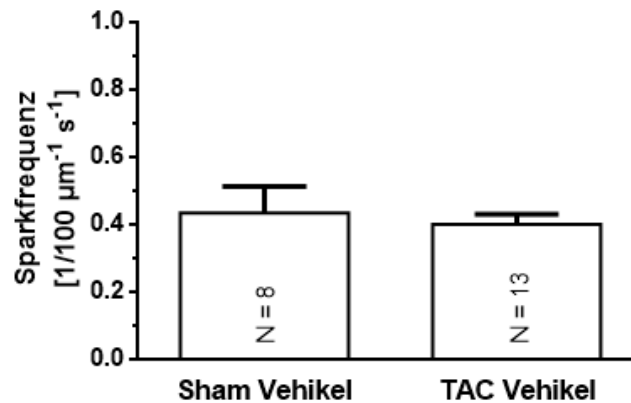


Abb. 33: Wirkung von TAC auf die Sparkfrequenz

Sparkfrequenz in $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$; Mittelwerte mit SEM.

Es zeigt sich im TAC Vehikel keine wesentliche Veränderung der Sparkfrequenz.

Eine Normalverteilung liegt nur im Fall des TAC Vehikels vor (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$), der ANOVA ($\alpha = 0,05$) sowie der Sidak's Multiple Comparisons Test ($\alpha = 0,05$) liefern keine signifikanten Ergebnisse.

Die Mittelwerte der Sparkfrequenzen ($1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$) von Sham Vehikel und TAC Vehikel sind mit ihrem Standardfehler (SEM) in Abb. 33 graphisch dargestellt. Es fällt hinsichtlich der durchschnittlichen Sparkfrequenzen optisch kein wesentlicher Unterschied auf, was durch die genauen Werte von $0,434 \pm 0,079$ für das Sham Vehikel und $0,400 \pm 0,030$ für das TAC Vehikel unterstrichen wird. Der etwas größere SEM des Sham Vehikels kann mit der höheren Zahl an Versuchstieren ($N = 13$ versus $N = 8$) plausibel erklärt werden.

Signifikante Unterschiede sind nicht festzustellen (Sidak's Multiple Comparisons Test, $\alpha = 0,05$). Einschränkend muss auch erwähnt werden, dass nach Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests ($\alpha = 0,05$) nur im Fall des TAC Vehikels eine Gauß'sche Normalverteilung angenommen werden kann und sich der ANOVA-Test als nicht signifikant erweist ($\alpha = 0,05$), weshalb es auch schwerfällt, von einem validen Trend zu sprechen.

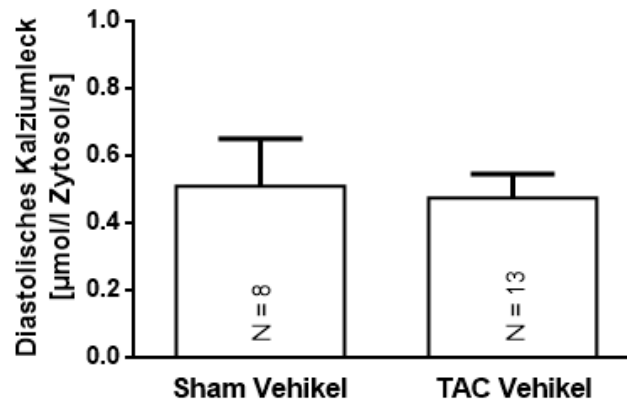


Abb. 34: Wirkung von TAC auf das diastolische SR-Kalziumleck

Diastolisches Kalziumleck in $\mu\text{mol/l}$ Zytosol/s; Mittelwerte mit SEM.

Das Kalziumleck von Sham Vehikel und TAC Vehikel bewegt sich in einem vergleichbaren Bereich.

In beiden Fällen liegt eine Normalverteilung vor (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$). Für ANOVA ($\alpha = 0,05$) und Sidak's Multiple Comparisons Test ($\alpha = 0,05$) ergeben sich keine Signifikanzen.

Nachdem Sparks wie bereits erläutert (vgl. S. 22 f.) als elementare Kalziumfreisetzungseignisse aus dem SR in ihrer Summe wesentlich zum diastolischen SR-Kalziumleck ($\mu\text{mol/l}$ Zytosol/s) beitragen, ergibt sich für Letzteres in Abb. 34 nun ein recht ähnliches Bild. Auch hier liegen die Werte optisch wie numerisch nahe beieinander, mit $0,411 \pm 0,114$ siedelt sich das Sham Vehikel erneut minimal über dem TAC Vehikel mit $0,382 \pm 0,057$ an und liefert auch wieder einen höheren SEM bei kleinerer Individuenzahl ($N = 8$ versus $N = 13$).

Auch wenn nun für beide Gruppen eine Normalverteilung angenommen werden kann (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$), fällt der ANOVA ($\alpha = 0,05$) erneut negativ aus und die Ergebnisse unterscheiden sich nicht signifikant (Sidak's Multiple Comparisons Test, $\alpha = 0,05$).

Insofern kann die Erwartung, dass es nach TAC zu einer Zunahme der Sparkfrequenz und des diastolischen Kalziumlecks kommt, durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Der zweite Teil der Hypothese bezieht sich auf den SR-Kalziumgehalt. Zur Abschätzung wurde wiederum die Fluoreszenzamplitude von Kalziumtransienten nach Applikation von Koffein gemessen.

Erneut sind den Ergebnissen zwei beispielhafte Originalregistrierungen des Sham Vehikels (vgl. Abb. 35) und des TAC Vehikels (vgl. Abb. 36) vorangestellt. Die

Scanlänge beträgt wie bereits bei den Kaffeinversuchen mit humanen Kardiomyozyten 30 000 Zyklen bzw. 21,78 Sekunden.



Abb. 35: Sham Vehikel



Abb. 36: TAC Vehikel

Es findet sich zunächst ein kleinerer, durch elektrische Stimulation hervorgerufener Transient, gefolgt von einem großen Kaffeintransienten, der hier beim Sham Vehikel mit den dominanteren Orangeanteilen größer auszufallen scheint als beim TAC Vehikel. Dessen Fluoreszenzamplitude gegenüber der basalen Fluoreszenz dient als Maß für den SR-Kalziumgehalt.

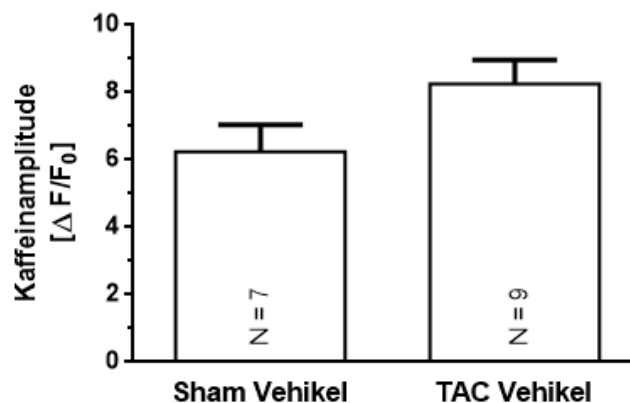


Abb. 37: Wirkung von TAC auf den SR-Kalziumgehalt

Transientenamplitude nach Kaffeinapplikation; Mittelwerte mit SEM.

Es zeigt sich eine Zunahme der Transientenamplitude und somit des SR-Kalziumgehalts des TAC Vehikels.

Die Daten beider Gruppen entsprechen einer Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$), signifikante Ergebnisse bleiben in ANOVA ($\alpha = 0,05$) und Sidak's Multiple Comparisons Test ($\alpha = 0,05$) aus.

Nach Auswertung der Daten bietet sich folgendes Bild (vgl. Abb. 37). Entgegen der Vermutung einer Abnahme des SR-Kalziumgehalts nach TAC ergibt sich für das TAC Vehikel mit $8,256 \pm 0,709$ eine höhere durchschnittliche Amplitude als für das Sham Vehikel mit $6,247 \pm 0,796$.

Eine Normalverteilung liegt für beide Gruppen vor (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$), der ANOVA ($\alpha = 0,05$) zeigt sich jedoch wiederum negativ, ebenso bleiben Signifikanzen aus (Sidak's Multiple Comparisons Test, $\alpha = 0,05$).

Zusammenfassend kann die Hypothese einer Zunahme von Sparkfrequenz und Kalziumleck sowie einer Abnahme des SR-Kalziumgehalts somit nicht bestätigt werden. Kontrovers hierzu erscheinen die erhobenen echokardiographischen Daten (vgl. S. 80 ff.). Hier konnte angesichts hochsignifikanter Veränderungen von EF, Septumdicke und LVEDD von einer erfolgreichen Induktion des Herzinsuffizienzmodells nach TAC ausgegangen werden, zumal sich mit den genannten Parametern offensichtlich die systolische Funktion verschlechterte und es auch zur erwarteten Hypertrophie und Dilatation des Myokards kam. Betrachtet man ferner die nach TAC abgenommene EF als Surrogatparameter einer zunehmenden systolischen Funktionseinschränkung, so wäre auch von diesem Standpunkt her nach TAC ein abnehmender SR-Kalziumgehalt erwartbar gewesen, da in diesem Fall im Zuge der elektromechanischen Koppelung weniger Kalzium aus dem SR freigesetzt werden hätte können, was mit einer systolischen Funktionseinschränkung mit abnehmender EF vereinbar gewesen wäre.

So scheinen die aus den konfokalen Spark- und Transientenmessungen erhobenen Daten nicht mit den hochsignifikanten echokardiographischen Ergebnissen einherzugehen. Dieser Umstand wird daher Teil der Diskussion dieser Arbeit sein. Insbesondere sind die Arbeitsschritte *in vitro* und auch eine möglicherweise vorhandene Bias zu beleuchten und kritisch zu hinterfragen.

3.2.3 Nach RA654321 *in vivo* zeigt sich *in vitro* kein signifikanter Einfluss auf die Sparkfrequenz bei unverändertem SR-Kalziumleck und -gehalt

Nun werden die Auswirkungen von RA654321 *in vivo* beleuchtet. Diesbezüglich bestehen folgende Erwartungen (vgl. S. 37 f.):

RA654321 führt *in vivo* im Vergleich zum Vehikel zu einer Abnahme von Sparkfrequenz und SR-Kalziumleck, wohingegen der SR-Kalziumgehalt zunimmt. Zur Evaluation dieser Hypothese werden die Gruppen, denen RA654321 ab dem 15. Tag nach Sham- bzw. TAC-Operation verabreicht wurde und daher als „RA *in vivo*“ bezeichnet werden, den jeweiligen Vehikelgruppen gegenübergestellt. Daher folgen nun erneut Line Scans von Zellen des Sham Vehikels (vgl. Abb. 38) und TAC Vehikels (vgl. Abb. 40), jeweils gepaart mit Zellen der Gruppen, die bereits *in vivo* RA654321 erhielten (vgl. Abb. 39 und Abb. 41), aber *in vitro* ebenfalls nur mit DMSO inkubiert wurden.



Abb. 38: Sham Vehikel



Abb. 39: Sham + RA654321 *in vivo*



Abb. 40: TAC Vehikel

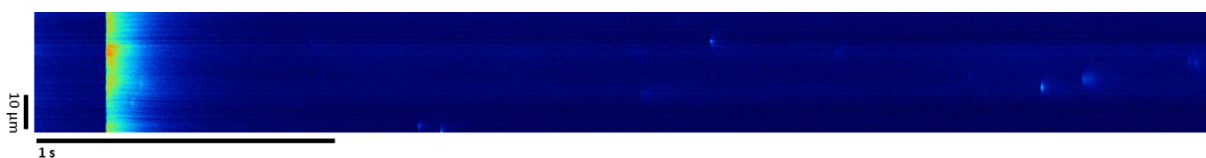


Abb. 41: TAC + RA654321 *in vivo*

Bei den abgebildeten Scans weisen die jeweiligen RA654321-*in-vivo*-Gruppen zumindest in den vorliegenden Scanausschnitten die höhere Sparkfrequenz auf. Dies würde einen Widerspruch zu den genannten Hypothesen bedeuten, der sich jedoch auch in den folgenden Ergebnissen fortsetzen wird.

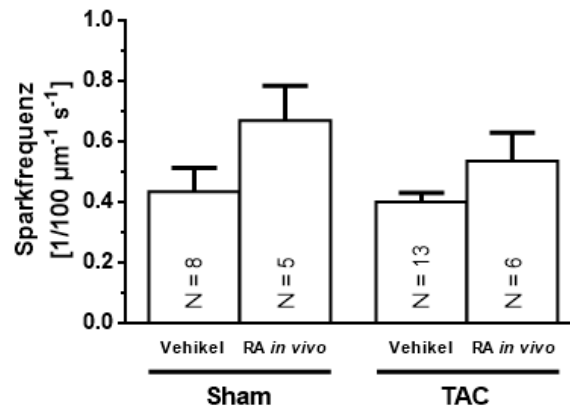


Abb. 42: Wirkung von RA654321 *in vivo* auf die Sparkfrequenz

Sparkfrequenz in $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$; Mittelwerte mit SEM. Zur Evaluation eines *in-vivo*-Effekts von RA654321 sind jeweils die Vehikelgruppe und die Gruppe, der RA654321 verabreicht wurde („RA *in vivo*“) innerhalb Sham bzw. TAC gegenübergestellt.

Während die beiden Vehikelgruppen ähnliche Werte aufweisen, kommt es in beiden Fällen zu einer Zunahme der Sparkfrequenz, nachdem die Tiere RA654321 erhielten.

Für das TAC Vehikel liegt eine Normalverteilung vor, für Sham + RA *in vivo* und TAC + RA *in vivo* sind die Gruppengrößen zu klein (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$). Im ANOVA ($\alpha = 0,05$) und Sidak's Multiple Comparisons Test ($\alpha = 0,05$) liegen keine Signifikanzen vor.

Hinsichtlich der Sparkfrequenzen ($1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$) kann anhand Abb. 42 festgestellt werden, dass es sowohl innerhalb Sham als auch innerhalb TAC zu einer Zunahme nach *In-vivo*-Gabe von RA654321 kommt. Es handelt sich um einen Anstieg von $0,434 \pm 0,079$ auf $0,669 \pm 0,114$ innerhalb Sham und von $0,400 \pm 0,030$ auf $0,536 \pm 0,094$ innerhalb TAC.

Von einer Normalverteilung kann für das TAC Vehikel ausgegangen werden, für Sham + RA *in vivo* und TAC + RA *in vivo* liegen zu kleine Gruppengrößen vor (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$). Bei negativem ANOVA ($\alpha = 0,05$) ergeben sich auch im Sidak-Test ($\alpha = 0,05$) keine Signifikanzen.

Möchte man die Anstiege der Sparkfrequenzen nach RA654321 *in vivo* dennoch als Tendenz werten, so muss anerkannt werden, dass sich diese konträr zur erwarteten Reduktion bewegt.

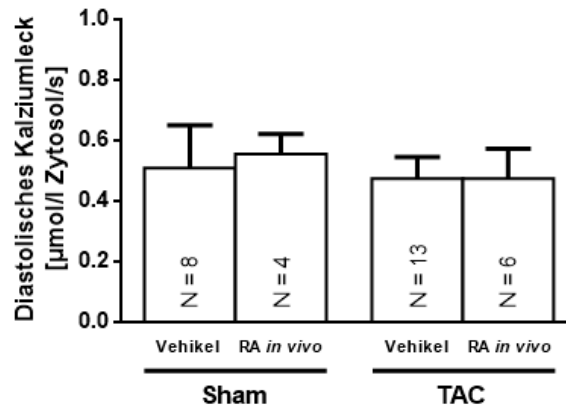


Abb. 43: Wirkung von RA654321 *in vivo* auf das diastolische SR-Kalziumleck

Diastolisches Kalziumleck in $\mu\text{mol/l}$ Zytosol/s; Mittelwerte mit SEM. Zur Evaluation eines *In-vivo*-Effekts von RA654321 sind jeweils die Vehikelgruppe und die Gruppe, der RA654321 verabreicht wurde („RA *in vivo*“) innerhalb Sham bzw. TAC gegenübergestellt.

Die Vehikelgruppen bieten ähnliche Werte. Darüber hinaus kommt es jedoch auch nach RA654321-Gabe nicht zu einer merklichen Veränderung.

Beide Vehikelgruppen entsprechen den Anforderungen einer Normalverteilung, die Gruppen, die den Inhibitor *in vivo* erhielten, umfassen für eine Berechnung zu wenige Individuen (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$). ANOVA ($\alpha = 0,05$) und Sidak's Multiple Comparisons Test ($\alpha = 0,05$) fallen nicht signifikant aus.

Das diastolische Kalziumleck ($\mu\text{mol/l}$ Zytosol/s) scheint sich nach RA654321 *in vivo* nahezu nicht zu verändern (vgl. Abb. 43). Während bei Sham ein minimaler Anstieg der Mittelwerte von $0,411 \pm 0,114$ auf $0,447 \pm 0,053$ zu verzeichnen ist, ergeben sich für das TAC Vehikel und für TAC + RA *in vivo* mit $0,382 \pm 0,057$ bzw. $0,382 \pm 0,079$ an sich identische Werte. Dies würde unter der Annahme einer tatsächlich existierenden Tendenz erneut nicht der vermuteten Abnahme des diastolischen Kalziumlecks nach *In-vivo*-Gabe von RA654321 entsprechen.

Die Anforderung einer Normalverteilung erfüllen die beiden Vehikelgruppen, während die Größe der Gruppen, deren Tiere RA654321 *in vivo* erhielten, zu klein für die Berechnung einer Normalverteilung ist (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 0,05$). Signifikante Ergebnisse in ANOVA ($\alpha = 0,05$) und Sidak-Test ($\alpha = 0,05$) bleiben aus.

Abschließend stünde noch der Vergleich der Vehikelgruppen und der mit RA654321 *in vivo* behandelten Gruppen bezüglich des SR-Kalziumgehalts, der wiederum aus der Transientenamplitude nach Kaffeinapplikation abgeschätzt wurde, aus. Da sich hierbei ebenfalls keine Trends erkennen ließen, Signifikanzen ausblieben und sich die Kaffeinamplitude nach RA654321 *in vivo* sowohl für Sham als auch für TAC nahezu identisch mit dem jeweiligen Vehikel zeigte, kann die unter CaMKII-Inhibition erwartete Zunahme des SR-Kalziumgehalts aus den vorhandenen Ergebnissen nicht

abgeleitet werden. Es wird daher auf eine ausführliche graphische Darstellung und die Präsentation weiterer Originalregistrierungen verzichtet.

Die Erwartungen an die Verabreichung von RA654321 *in vivo* können also nicht erfüllt werden, Sparkfrequenz und diastolisches Kalziumleck nehmen nicht ab, der SR-Kalziumgehalt zudem nicht zu. Einschränkend für die Validität der Ergebnisse muss die teils recht geringe Individuenzahl, die auch der Prüfung einer Normalverteilung im Wege steht, und die Verfehlung eines signifikanten Ergebnisses im ANOVA erwähnt werden.

Bei Betrachtung der echokardiographischen Daten (vgl. S. 80 ff.) würde die signifikant höhere EF von TAC + RA *in vivo* im Vergleich mit dem TAC Vehikel einer Verbesserung der systolischen Funktion entsprechen. Als Korrelat auf Ebene der zellulären Kalziumhomöostase wäre angesichts dessen zumindest eine Erfüllung der Hypothese innerhalb TAC erwartbar gewesen. Jedoch muss betont werden, dass auch auf echokardiographischer Ebene keine weiteren signifikanten Effekte von RA654321 *in vivo* nachweisbar waren und sich die Septumdicke und der LVEDD ohne eindeutige Tendenzen verhielten, sodass die *In-vivo*-Wirkung von RA654321 auch hier nicht so ausgeprägt sein dürfte wie die hochsignifikanten und einheitlichen Effekte des TAC-Modells an sich.

3.2.4 Aus der Applikation von RA654321 *in vitro* resultieren heterogene Ergebnisse

Abschließend sollen mögliche Effekte von RA654321 *in vitro* herausgestellt werden.

Diesbezüglich wurden diese Vermutungen angestellt (vgl. S. 37 f.):

Zum einen soll RA654321 *in vitro* im Vergleich mit Zellen, die nicht mit RA654321 inkubiert wurden, zu einer Abnahme von Sparkfrequenz und Kalziumleck sowie zu einer Zunahme des SR-Kalziumgehalts führen. Zum anderen sollen diese Effekte gegenüber Zellen derjenigen Mäuse, die RA654321 bereits *in vivo* erhielten, verstärkt sein.

Es zeigte sich bereits, dass sowohl das *in vivo* hochsignifikant wirksame TAC-Modell als auch die *In-vivo*-Gabe von RA654321 *in vitro* zu keiner signifikanten Veränderung von Sparkfrequenzen, Kalziumleck und SR-Kalziumgehalt führen. In der Konsequenz muss davon ausgegangen werden, dass daher auch nach Inkubation mit RA654321

in vitro keine soliden Effekte zu verzeichnen sein werden, zumal diese auf den vorherigen Ergebnissen aufbauen würden.

Abb. 44 und Abb. 45 zeigen daher die Ergebnisse zur Sparkfrequenz und zum diastolischen Kalziumleck in Form einer Synopse aller Gruppen. Die Ergebnisse erfüllen die Anforderungen einer Normalverteilung nicht und Signifikanzen in ANOVA und Sidak's Multiple Comparisons Test (jeweils $\alpha = 0,05$) bleiben aus. Daher soll an dieser Stelle auf eine ausführlichere Präsentation verzichtet und Daten aus Kaffeeversuchen wie auch weitere Originalregistrierungen nicht mehr gezeigt werden.

In beiden Grafiken findet sich der dreistufige Versuchsaufbau wieder, wobei zunächst zwischen Sham und TAC, weiterhin nach *in vivo* jeweils zwischen Vehikel und Verabreichung von RA654321 und schließlich nach *in vitro* applizierter Substanz unterschieden wird, also RA654321 für den getesteten Inhibitor und AIP für den verwendeten Referenzinhibitor. Das „*In-vitro*-Vehikel“ wird als „DMSO *in vitro*“ bezeichnet, entsprechend des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid, in welchem die CaMKII-Inhibitoren gelöst wurden und das dem „*In-vitro*-Vehikel“ zur Standardisierung in äquimolarer Menge zugesetzt wurde.

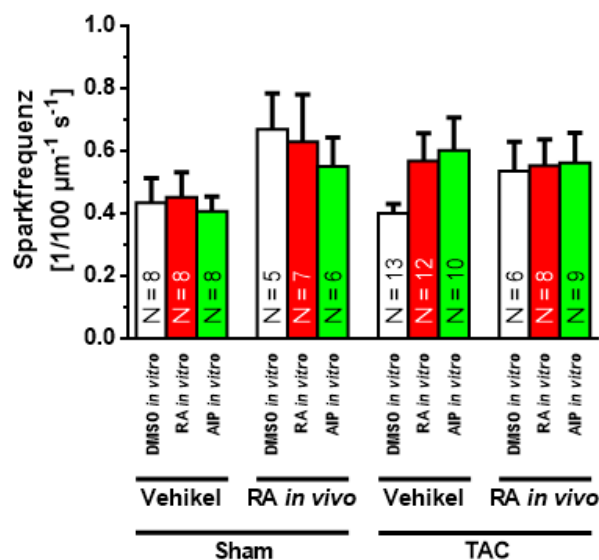


Abb. 44: Wirkung von RA654321 *in vitro* auf die Sparkfrequenz

Sparkfrequenz in 1/100 μm⁻¹ s⁻¹; Mittelwerte mit SEM. Zur Evaluation eines *In-vitro*-Effekts von RA654321 wird die betreffende Gruppe („RA *in vitro*“, 3 μM, rot) mit dem inhibitorfreien Vehikel („DMSO *in vitro*“, weiß) und mit AIP („AIP *in vitro*“, 1 μM, grün) verglichen. Dies erfolgt jeweils für das Vehikel sowie nach Verabreichung von RA654321 *in vivo* (RA *in vivo*“), sowohl nach Sham als auch nach TAC.

Eine abnehmende Tendenz stellt sich lediglich bei Sham nach RA654321 *in vivo* ein, was jedoch innerhalb der anderen Gruppen nicht bestätigt wird.

Nach Durchführung des Shapiro-Wilk-Tests ($\alpha = 0,05$) liegt eine Normalverteilung nur teilweise vor, Signifikanzen ergeben sich in ANOVA ($\alpha = 0,05$) und Sidak's Multiple Comparisons Test ($\alpha = 0,05$) nicht.

Abb. 44 offenbart die kontroversen Tendenzen im Falle der Sparkfrequenz ($1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$). Auf *In-vitro*-Ebene bewegen sich die Mittelwerte innerhalb des Sham Vehikels wie auch nach RA654321 *in vivo* im Falle des TAC-Modells in vergleichbaren Bereichen, während sich beim TAC Vehikel unter RA654321 und AIP *in vitro* sogar eine Zunahme zeigt. Einzig die abnehmende Sparkfrequenz nach RA654321 *in vivo* und Sham würde den Erwartungen entsprechen. Angesichts der statistischen Mängel ist hiermit jedoch kein Trend und umso mehr kein Effekt zu begründen, insbesondere bei ausbleibender Kontingenz der Ergebnisse zwischen den einzelnen Gruppen.

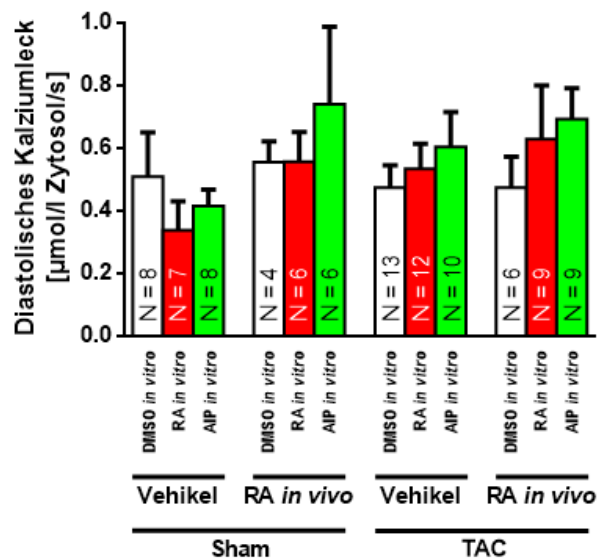


Abb. 45: Wirkung von RA654321 *in vitro* auf das diastolische SR-Kalziumleck

Diastolisches Kalziumleck in $\mu\text{mol/l}$ Zytosol/s; Mittelwerte mit SEM. Zur Evaluation eines *In-vitro*-Effekts von RA654321 wird die betreffende Gruppe („RA *in vitro*“, 3 μM , rot) mit dem inhibitorfreien Vehikel („DMSO *in vitro*“, weiß) und mit AIP („AIP *in vitro*“, 1 μM , grün) verglichen. Dies erfolgt jeweils für das Vehikel sowie nach Verabreichung von RA654321 *in vivo* (RA *in vivo*), sowohl nach Sham als auch nach TAC.

Ein tendenziell abnehmendes Kalziumleck findet sich lediglich im Sham Vehikel, während die anderen Gruppen eher eine zunehmende Tendenz aufweisen. Insgesamt stellt sich ein sehr heterogenes Bild dar.

ANOVA ($\alpha = 0,05$) und Sidak's Multiple Comparisons Test ($\alpha = 0,05$) erbringen keine Signifikanzen. Normalverteilungen ergeben sich nach Shapiro-Wilk-Test ($\alpha = 0,05$) in allen Gruppen mit Ausnahme von DMSO *in vitro* und RA *in vitro* nach RA654321 *in vivo* (TAC + RA *in vivo*).

Ein ähnliches Bild mit heterogenen Ergebnissen zeigt sich auch für das diastolische Kalziumleck ($\mu\text{mol/l}$ Zytosol/s, vgl. Abb. 45). Optisch suggeriert einzig das Sham Vehikel unter CaMKII-Inhibition *in vitro* eine Abnahme des Lecks, welche jedoch erneut einer statistischen Signifikanz entbehrt. Insofern kann auch hier kein Trend formuliert werden.

3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit RA654321 in Kardiomyozyten der Maus

Entsprechend des Studienaufbaus wurden die Ergebnisse zu den Versuchen mit RA654321 in Kardiomyozyten der Maus dargestellt, indem zunächst mögliche Effekte des TAC-Modells an sich sowie der Verabreichung von RA654321 *in vivo*, herausgearbeitet wurden. Dabei fand jeweils der Vergleich mit den erhobenen echokardiographischen Daten statt. Abschließend erfolgte die Beleuchtung möglicher Auswirkungen *in vitro* nach Inkubation der isolierten Zellen mit RA654321 im Vergleich mit AIP. Zudem wurde der Bezug zu den formulierten Hypothesen hergestellt.

Das TAC Vehikel wies in der echokardiographischen Evaluation signifikante Effekte gegenüber dem Sham Vehikel im Sinne einer reduzierten EF, eines vergrößerten LVEDD und einer Zunahme des IVS auf. Hierauf basierend konnte angenommen werden, dass das TAC-Modell erfolgreich etabliert wurde. Dennoch zeigten sich *in vitro* hinsichtlich Sparkfrequenz und diastolischem SR-Kalziumleck keine wesentlichen Unterschiede, während der SR-Kalziumgehalt im TAC Vehikel tendenziell sogar erhöht war.

Bei Vergleich der Vehikelgruppen mit den Gruppen, die RA654321 *in vivo* erhielten fiel sowohl bei Sham als auch bei TAC eine Zunahme der Sparkfrequenz, etwas ausgeprägter bei Sham, auf. Auf Ebene des diastolischen Kalziumlecks und des SR-Kalziumgehalts fanden sich keine Unterschiede. Im Gegensatz zu den deutlichen Effekten des TAC-Modells bewirkte RA654321 *in vivo* jedoch auch in den echokardiographischen Verlaufsuntersuchungen nicht so weitreichende und gleichsinnige Ergebnisse. Im Wesentlichen konnte unter RA654321 *in vivo* nur nach TAC eine signifikant höhere EF verglichen mit dem TAC Vehikel nachgewiesen

werden, was sich bei Sham nicht bestätigte. Auch auf LVEDD und IVS hatte RA654321 *in vivo* keine signifikanten Einflüsse.

Hinsichtlich möglicher *In-vitro*-Effekte von RA654321 wurden zunächst die Sham-Gruppen analysiert. Die Sparkfrequenz veränderte sich hierbei nach Inkubation mit RA654321 weder im Sham Vehikel noch nach vorheriger *In-vivo*-Exposition gegenüber der Substanz. Das diastolische SR-Kalziumleck erfuhr im Vehikel eine leichte Reduktion, bei Sham + RA *in vivo* zeigte sich kein Unterschied zur DMSO-Kontrolle. Auch im Fall des SR-Kalziumgehalts veränderte RA654321 *in vitro* im Sham Vehikel nichts, während es bei Sham + RA *in vivo* zu einer leichten Zunahme kam.

Nach TAC nahm die Sparkfrequenz im Vehikel unter RA654321 *in vitro* gegenüber der DMSO-Kontrolle leicht zu, während sie bei TAC + RA *in vivo* unverändert blieb. Das diastolische SR-Kalziumleck vergrößerte sich in TAC Vehikel wie auch TAC + RA *in vivo*, während der SR-Kalziumgehalt in beiden Fällen abnahm.

Nach Betrachtung dieser rein deskriptiven Darstellung der Ergebnisse ist zunächst festzustellen, dass sich keine einheitlichen Tendenzen oder gleichsinnigen Veränderungen finden. Der Versuch der differenzierten Evaluation möglicher Effekte des TAC-Modells an sich und von RA654321 *in vivo* oder *in vitro* schlägt somit fehl. Es kommt hinzu, dass die Daten die statistischen Anforderungen einer Normalverteilung nur teilweise erfüllen und signifikante Resultate nicht nur im Sidak-Test, sondern auch im ANOVA ausbleiben, sodass auch die Formulierung von Trends schwerfällt.

Nachdem das TAC-Modell in den echokardiographischen Verlaufsuntersuchungen eindeutige Effekte zeigte, konnte dies in den Konfokalmessungen nicht bestätigt werden. Weiterhin ergaben sich unter AIP *in vitro* als Referenzsubstanz zwar sowohl in den Sham- als auch in den TAC-Gruppen an mehreren Stellen Veränderungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Diese erwiesen sich jedoch nicht als signifikant und auch nicht gleichsinnig mit den Ergebnissen von RA654321 *in vitro*.

Daraus erwächst für den Diskussionsteil dieser Dissertation der Auftrag, die *In-vitro*-Arbeitsschritte kritisch zu hinterfragen. Überdies muss der Frage nach dem Vorhandensein eines möglichen Bias nachgegangen werden.

4 Diskussion

4.1 Einordnung in den medizinischen, pharmakologischen und wissenschaftlichen Kontext

4.1.1 Das Prinzip der CaMKII-Inhibition auf dem Weg in die Klinik

Nachdem Fabiato 1975 erstmals eine „kalziumgetriggerte Kalziumfreisetzung“ aus dem SR von Kardiomyozyten beschrieben hatte (Fabiato & Fabiato, 1975), verging ein weiteres Jahrzehnt bis der in diesem Zusammenhang postulierte Kalziumfreisetzungskanal mittels Ryanodin in den terminalen Zisternen des SR lokalisiert werden konnte (Fleischer et al., 1985). Zudem zeigte sich hier die Fixierung des Kanals im geöffneten Zustand durch Ryanodin.

Parallel konnte eine „Calmodulin-abhängige Proteinkinaseaktivität“ im Herzen nachgewiesen werden (Kloepper & Landt, 1984) und später auch, dass es sich hierbei um die Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II handelte (Jett et al., 1987).

Schließlich wurde erkannt, dass die CaMKII die Kalziumfreisetzung aus dem SR verstärkt (Bers et al., 1998) und die Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors erhöht (Wehrens et al., 2004).

Die weitere Forschung deckte zunehmend die pathophysiologische Rolle der CaMKII auf. Im Zuge der Herzinsuffizienz wird ein vergrößertes diastolisches SR-Kalziumleck mit vermindertem SR-Kalziumgehalt und erhöhten sarkoplasmatischen Kalziumkonzentrationen als Ergebnis des elektrophysiologischen Remodelings gesehen (Braunwald, 2013; Fischer, Maier & Sossalla, 2013). Die Folgen sind systolische und diastolische Dysfunktion sowie Arrhythmogenese (Bers, 2014). Aus der Tatsache, dass die CaMKII zur Vergrößerung des SR-Kalziumlecks in der Herzinsuffizienz beiträgt (Fischer, Herting et al., 2013), erwächst die Motivation, durch Inhibition des Enzyms dem elektrophysiologischen Remodeling mit Ausbildung des SR-Kalziumlecks entgegenzuwirken und dessen Folgen zu unterbinden.

Wie bereits im Rahmen der Einleitung dargelegt (vgl. S. 34 ff.) existieren eine Vielzahl von CaMKII-Inhibitoren (Pellicena & Schulman, 2014), jedoch blieb ein Großteil dieser Substanzen auf den Einsatz in der Grundlagenforschung beschränkt,

wobei insbesondere KN-93 (Sumi et al., 1991) und das auch in der vorliegenden Arbeit verwendete AIP (Ishida et al., 1995) zu erwähnen sind.

Klinische Anwendung fand bislang nur SMP-114 (Westra et al., 2010), das im Rahmen einer Studie zur Therapie der rheumatoiden Arthritis in Kombination mit Methotrexat verabreicht wurde. Dabei sollte ein Effekt verglichen mit einer reinen Methotrexattherapie nachgewiesen werden, was nach derzeitigem Stand jedoch in der klinischen Phase 2 scheiterte (Pellicena & Schulman, 2014; U.S. National Library of Medicine, 2009).

Eine CaMKII-Inhibition mittels SMP-114 vermochte auch in Kardiomyozyten die Sparkfrequenz und das diastolische Kalziumleck signifikant zu senken (Neef et al., 2017), im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis fand es in diesem Bereich aber noch keinen Eingang in die klinische Erprobung.

Mit RA123456 bewies bereits der Vorgänger von RA654321 sein Potenzial, indem er ebenfalls das diastolische Kalziumleck signifikant verkleinerte und überdies das Voranschreiten einer Herzinsuffizienz im TAC-Modell *in vivo* unterband (Mustroph et al., 2020).

Nun also liegen Ergebnisse zu zwei weiteren neuartigen Inhibitoren der CaMKII vor. RA654321 konnte die Progredienz einer Herzinsuffizienz im TAC-Modell *in vivo* ebenfalls verhindern. RA654321 und GS-680 bewirkten in humanen Kardiomyozyten eine signifikante Reduktion der Sparkfrequenz sowie eine deutliche Verkleinerung des diastolischen Kalziumlecks.

Auch wenn es sich bei Letzteren um *in vitro* generierte Daten handelt, darf betont werden, dass sie unter Verwendung humanen Gewebes gewonnen wurden. Dies kann als Vorstufe zur Testung *in vivo* dienen und einen Beitrag zur Einführung der CaMKII-Inhibition in die Klinik liefern.

4.1.2 CaMKII-Inhibitoren können neben der etablierten medikamentösen Herzinsuffizienztherapie eine wichtige Rolle übernehmen

Bei den getesteten Substanzen GS-680 und RA654321 handelt es sich als Inhibitoren der CaMKII um Angehörige einer neuen Substanzklasse. Zielpunkt im vorliegenden Zusammenhang ist die in kardialen Zellen anzutreffende CaMKII δ . Wie eingangs der Arbeit erläutert, kommt dieser Isoform eine wichtige Rolle in der

Pathophysiologie der Herzinsuffizienz sowie der Genese kardialer Arrhythmien, insbesondere des Vorhofflimmerns, zu (Maier, 2014).

Die nach Leitlinie etablierte medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz umfasst in Abhängigkeit von der klinischen Situation ACE-Hemmer bzw. Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten, Beta-Blocker, Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten, Diuretika, SGLT2-Inhibitoren, Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitoren, Digitalisglykoside und den I_f-Inhibitor Ivabradin (McDonagh et al., 2021).

Ziel der pharmakologischen Intervention ist die Verhinderung des kardialen Remodelings. Exemplarisch soll dazu auf die neurohumorale Ebene eingegangen werden, der mit Aktivierung von RAAS und sympathischem Nervensystem eine wichtige Rolle zukommt (Braunwald, 2013; Orsborne et al., 2017; Triposkiadis et al., 2009). Die Pathophysiologie zeigt, dass sich beide Systeme gegenseitig verstärken und miteinander verflochten sind, sodass eine medikamentöse Modulation immer auch beide Systeme betrifft.

Die RAAS-Aktivierung bewirkt Salz- und Wasserretention, Vasokonstriktion, oxidativen Stress und Sympathikusaktivierung. Dies wird durch eine Inhibition mittels ACE-Hemmern bzw. Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten nicht nur unterbunden, sondern zieht erwiesenermaßen auch einen prognostischen Nutzen nach sich (Orsborne et al., 2017). Weiterhin kann dies durch eine Hemmung der Peptidase Nepriylisin ergänzt werden, wodurch der Abbau natriuretischer Peptide verhindert und die Salz- und Wasserausscheidung gefördert wird (McMurray et al., 2013).

Beta-Blocker wirken negativ chronotrop und inotrop und reduzieren somit den myokardialen Sauerstoffbedarf. Zudem resultiert aus einer Verringerung des Gefäßtonus eine Senkung der kardialen Vor- und Nachlast, wodurch die Hypertrophie des Myokards verhindert wird. Auch hier ließ sich im Rahmen großer Studien ein Überlebensvorteil nachweisen (Kubon et al., 2011).

Diese Ausführungen sollen verdeutlichen, dass ein Eingreifen in die Vorgänge des kardialen Remodelings prognostische Vorteile mit sich bringt. Folglich liegt die Frage nahe, ob nicht auch eine Verhinderung des elektrophysiologischen Remodelings mit gestörtem Kalziumzyklus des Myokards einen derartigen Effekt bewirken kann. Die zentrale Position der CaMKII in diesem Zusammenhang wurde bereits erörtert. Wenn auch eine sympathikus- und angiotensinabhängige Aktivierung des Enzyms vorliegen und hieraus eine Hemmung durch RAAS- und Beta-Blockade resultieren

mag, bleibt festzuhalten, dass gegenwärtig keine Medikamente vorliegen, die direkt in das elektrophysiologische Remodeling eingreifen und insbesondere nicht direkt an der CaMKII angreifen.

Während in der Herzinsuffizienztherapie also bereits eine effektive Hemmung der neurohumoralen Anpassungen existiert, könnte die Rolle der CaMKII-Inhibition in der Zukunft in einer Ausweitung des Spektrums auf die elektrophysiologische Ebene bestehen.

4.1.3 Anforderungen an Chemie, Selektivität und Sicherheit von RA654321 und GS-680

Aus den drei Faktoren, dass es sich bei der CaMKII um ein intrazelluläres Ziel handelt, sie eine zentrale Rolle im kardiomyozytären Kalziumzyklus einnimmt und zudem in verschiedenen Geweben auftritt, erwachsen Anforderungen an die chemische Beschaffenheit und die Selektivität von CaMKII-Inhibitoren wie RA654321 und GS-680.

Die intrazelluläre Lokalisation erfordert die Überwindung der Zellmembran, weshalb es sich bei der Substanz in chemischer Hinsicht um ein lipophiles Molekül handeln muss (Seifert, 2018).

Des Weiteren hängt das Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil im Gegensatz zu Substanzen, die über membranständige Rezeptoren agieren, vom Vorhandensein des Zielmoleküls in verschiedenen Organen ab. Im Fall der CaMKII-Inhibition kann der intrazelluläre Angriffspunkt einen Zugewinn an Selektivität bedeuten, wenn die Struktur der kardial dominierenden δ -Isoform des Enzyms ausreichend genau adressiert werden kann. Bei unzureichender Kardioselektivität sind jedoch Einflüsse auf andere von Ca/Calmodulin-Kinasen abhängige Vorgänge denkbar. Insbesondere etwa spielt die CaMKII eine wichtige Rolle in der Langzeitpotenzierung bei Lern- und Gedächtnisprozessen (Lisman et al., 2012).

Darüber hinaus könnten sich unerwünschte Wirkungen aus der zentralen Stellung der CaMKII ergeben. Einerseits ermöglicht dies, das Problem des elektrophysiologischen Remodelings zentral und fundamental anzugehen. Andererseits resultiert hieraus die Tatsache, dass die CaMKII verschiedenste Ziele reguliert und diese nicht einheitlich auf eine Inhibition des Enzyms reagieren

könnten. Als Analogie sei auf den Reizhusten, der als häufige Nebenwirkung von ACE-Hemmern auftritt, hingewiesen. Ursächlich wird hierbei die Doppelrolle des ACE in RAAS und Bradykininstoffwechsel gesehen, wo eine Zunahme der Bradykininspiegel infolge verminderten Abbaus zum Reizhusten führt (Borghgi & Veronesi, 2019).

Abschließend hilft ein Rückblick auf die Pharmakologie von RA654321 und GS-680 (Beauverger et al., 2020; Lebek et al., 2018), die soeben gestellten Fragen der Selektivität und möglicher Nebenwirkungen einzuordnen (vgl. S. 39 ff.).

Beide Substanzen wiesen in den durchgeführten Assays hinsichtlich IC_{50} und EC_{50} nicht nur eine deutlich erhöhte Selektivität für die CaMKII gegenüber einer Vielzahl getesteter Kinasen und kleiner Moleküle auf. Darüber hinaus bestand auch die höchste Potenz innerhalb der CaMKII-Isoformen für die kardial dominierende δ -Variante. Im Falle von GS-680 konnte sogar eine 90-fach niedrigere EC_{50} für Kardiomyozyten gegenüber Neuronen nachgewiesen werden. Diese Daten können sicherlich als Hinweise auf eine vorhandene Kardioselektivität gewertet werden und lassen unerwünschte neuronale Wirkungen unwahrscheinlicher erscheinen.

Ein weiterer Aspekt ist die Sicherheit der beiden Substanzen. Für GS-680 wurde eine CC_{50} von 2,5 bis 21,4 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich die größte Reduktion der Kalziumsparkfrequenz unter der Konzentration 100 nM (vgl. S. 71, Abb. 19), die 25- bis 210-fach unterhalb der CC_{50} liegt. Zudem lagen die IC_{50} bzw. EC_{50} wichtiger kardialer Ionenkanäle deutlich über den Werten für die CaMKII, etwa im Falle von GS-680 und des $K_v11.1$ um den Faktor 30.

Hinsichtlich einer potenziellen klinischen Anwendbarkeit von RA654321 in der Zukunft ist noch die hohe orale Bioverfügbarkeit von nahezu 100 % erwähnenswert.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

4.2.1 RA654321 verhindert den Progress einer Herzinsuffizienz *in vivo*

Zu Beginn der Studie zu den Effekten von RA654321 in Mäusen wurde in einem Teil der Tiere ein Herzinsuffizienzmodell mittels TAC etabliert, während der andere Teil zur Standardisierung einer Sham-Operation unterzogen wurde.

In den echokardiographischen Verlaufsuntersuchungen des TAC Vehikels (vgl. S. 81, Abb. 29) zeigten sich nach vier Wochen jeweils signifikante Veränderungen mit einer Abnahme der linksventrikulären EF von 56,58 auf 36,21 % und einer Zunahme des IVS von 0,93 auf 1,15 mm sowie des LVEDD von 3,89 auf 4,15 mm. Demgegenüber stellten sich beim Sham Vehikel keine signifikanten Veränderungen ein, wobei exemplarisch die EF mit 61,22 % nahezu unverändert zum präoperativen Durchschnitt von 63,89 % blieb.

Auf dieser Basis kann somit ein Effekt des TAC-Modells angenommen werden, der auch mit den Ergebnissen anderer Autoren Schritt halten kann (vgl. hierzu auch S. 41 ff.). Eine Abnahme der EF von 53 auf 33 % sowie eine Zunahme des IVS von etwa 0,9 auf 1,1 mm und des LVEDD von etwa 3,5 auf 4,1 mm fünf Wochen nach TAC berichten beispielsweise Toischer et al. (Toischer et al., 2013). Weiteren Publikationen sind eine Reduktion der EF von 63 auf 35 % vor und drei Wochen nach TAC (Mustroph et al., 2020) oder auch eine EF von 40 % zwei Wochen nach TAC verglichen mit 81 % nach Sham (Q. He et al., 2019) zu entnehmen.

Zwei Wochen postoperativ erfolgte eine echokardiographische Verlaufskontrolle, bevor dann wiederum je ein Teil der Sham- und TAC-Mäuse RA654321 erhielt, um somit dessen Auswirkungen *in vivo* zu testen. Im TAC-Modell war hierbei ersichtlich, dass RA654321 das Voranschreiten einer systolischen Funktionsstörung zu verhindern vermochte (vgl. S. 84, Abb. 30). Während die EF im TAC Vehikel nach vier Wochen nur noch 36,21 % betrug, fiel diese unter RA654321 mit 50,39 % signifikant besser aus. Darüber hinaus bedeutet dies im Vergleich zu 47,71 % vor Beginn der Verabreichung von RA654321 nach zwei Wochen nicht nur einen Erhalt der EF, sondern sogar eine minimale Besserungstendenz.

Weiterhin konnte eine linksventrikuläre Dilatation unterbunden werden. Der LVEDD betrug vier Wochen nach der TAC-Operation im TAC Vehikel 4,15 mm, wohingegen er unter RA654321 nur bei 3,92 mm lag. Kein Einfluss ließ sich bei nahezu unveränderter Septumdicke auf die myokardiale Hypertrophie feststellen.

Zusammenfassend führte RA654321 *in vivo* somit zu einer signifikanten Besserung der EF und somit der systolischen Funktion und verhinderte mit deutlicher Tendenz ein Fortschreiten der linksventrikulären Dilatation.

Die Gegenüberstellung anderer Wege der CaMKII-Inhibition unterstreicht diese Effekte. Unter Einfluss des Alternativinhibitors KN-93 bewirkte die einwöchige

tägliche Injektion nach TAC eine Zunahme der EF von 40 auf 50 % und der Verkürzungsfraction („Fractional Shortening“, FS) von 19 auf 25 %. Interessanterweise fiel dies nahezu identisch mit den Ergebnissen nach nur einmaliger Injektion von KN-93 aus, wo sich eine Zunahme der EF von 41 auf 51 % und des FS von ebenfalls 19 auf 25 % zeigte (Q. He et al., 2019).

Eine CaMKII-Hemmung durch Inhibition von Calmodulin mittels DY-9836 bewirkte acht Wochen nach TAC und nach Verabreichung der Substanz über sechs Wochen eine Normalisierung der myokardialen Wanddicke, des linksventrikulären Diameters und des FS (Y.-M. Lu et al., 2011).

Weiterhin konnten Kreusser et al. in zwei verschiedenen CaMKII δ /CaMKII γ -Doppel-Knockout-Modellen, welche jeweils drei Wochen nach Sham- bzw. TAC-Operation induziert wurden, eine deutliche Reduktion von myokardialer Hypertrophie und Dilatation sowie eine Verbesserung der systolischen Funktion verzeichnen. 16 Wochen nach TAC ergab sich in einem der Doppel-Knockout-Modelle ein Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht von 7,0 mg/g verglichen mit 9,1 mg/g im TAC Vehikel. Überdies lagen eine Verkürzungsfraction von 55 % und ein LVEDD von 3,13 mm gegenüber initial 39 % bzw. 3,45 mm im Vehikel vor. Die Verkürzungsfraction und insbesondere der LVEDD glichen sich somit nahezu der Sham-Doppel-Knockout-Gruppe an (Kreusser et al., 2016).

Schließlich sind beim Vergleich von RA654321 mit dem Vorgänger RA123456 (Mustroph et al., 2020) ähnliche Effekte erkennbar. Im Rahmen eines vergleichbaren Studiendesigns mit TAC-Modell und *In-vivo*-Applikation der Testsubstanz für eine Woche nach der zweiten postoperativen Woche konnte die EF nach TAC mittels RA123456 erhalten werden und betrug 46,1 % im Vergleich zu einer EF von 47,2 % vor Beginn der Verabreichung des Inhibitors. Beim TAC Vehikel nahm die systolische Leistung dagegen kontinuierlich ab. Nach drei Wochen konnten lediglich 34,9 % vermessen werden, während nach zwei Wochen noch 47,0 % und vor TAC 62,6 % zu Buche standen. Außerdem verhinderte RA123456 wie RA654321 eine Zunahme des LVEDD, wohingegen die myokardiale Hypertrophie im Gegensatz zur Folgesubstanz unbeeinflusst blieb.

RA654321 wirkt somit der Progredienz einer Herzinsuffizienz *in vivo* entgegen, besteht im Vergleich mit anderen Inhibitoren und Inhibitionsprinzipien der CaMKII und kann zudem die Effekte seines Vorgängers RA123456 bestätigen.

4.2.2 Die ausbleibenden Effekte von TAC auf Sparkfrequenz, SR-Kalziumleck und SR-Kalziumgehalt nach eindeutigen Veränderungen *in vivo* machen eine kritische Hinterfragung der Methodik *in vitro* nötig

Vier Wochen nach der TAC- bzw. Sham-Operation wurden die Tiere schließlich durch zervikale Dislokation exekutiert und Kardiomyozyten mittels retrograden enzymatischen Verdaus über die Koronarien am Langendorff-System aus dem Gewebeverband isoliert. Anschließend konnten konfokalmikroskopisch die Auswirkungen von TAC und RA654321 auf Sparkfrequenz, diastolisches Kalziumleck und SR-Kalziumgehalt untersucht werden.

Zunächst standen die Einflüsse des TAC-Modells an sich im Fokus. Dabei blieben Sparkfrequenz und SR-Kalziumleck verglichen mit dem Sham Vehikel unverändert und der SR-Kalziumgehalt zeigte sich erhöht (vgl. S. 87 ff.), wobei es sich um nicht signifikante Tendenzen mit eingeschränkter statistischer Qualität handelt.

Die Hypothesen einer Zunahme von Sparkfrequenz und SR-Kalziumleck sowie einer Abnahme des SR-Kalziumgehalts erfüllten sich somit nicht.

Angesichts dessen, dass sich *in vivo* eindeutige echokardiographische Veränderungen im Sinne eines funktionierenden TAC-Modells gezeigt hatten (vgl. S. 80 ff.), scheint die Initiierung des Herzinsuffizienzmodells jedoch gelungen zu sein. Es müssen somit die Arbeitsschritte *in vitro* kritisch hinterfragt werden.

Bei der Betrachtung der Line Scans fällt dabei zunächst eine deutlich niedrigere Sparkfrequenz (in $1/100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$) der Mauszellen (vgl. S. 87 ff.) im Vergleich mit den humanen Zellen (vgl. S. 69 ff.) auf. Sham Vehikel und TAC Vehikel weisen Frequenzen um 0,4 auf, während sich die Werte bei den humanen Zellen zwischen 1,6 und 3,2 bewegen. Weiterhin zeigt sich bei der Recherche, dass auch bei Mäusen höhere Sparkfrequenzen gemessen wurden. Fünf Wochen nach TAC sind so Werte von etwa 2 (Toischer et al., 2013) und sechs Wochen nach Sham und TAC von 1,3 bzw. 2,4 (Ling et al., 2009) zu finden.

Es stellt sich daher die Frage, ob die Sparkfrequenz unterschätzt worden sein könnte. Ein möglicher Grund wäre eine mangelhafte Beladung der Zellen mit kalziumbindendem Farbstoff. Aus der subjektiven Sicht des Untersuchers erscheint dies jedoch nicht zuzutreffen und rückt zudem, da die Sparkerkennung mittels Auswertungssoftware kein Problem darstellte, eher in den Hintergrund.

Als weitere Erklärung ist die Perfusion der Messkammern mit einer zu geringen Kalziumkonzentration denkbar. Bei den Konfokalmessungen mit Kardiomyozyten der Maus wurde eine Tyrode mit 1 mM CaCl_2 verwendet, wohingegen die höheren Sparkfrequenzen bei den soeben genannten Autoren unter einer Kalziumkonzentration von 2 (Toischer et al., 2013) bzw. 1,8 mM (Ling et al., 2009) zustande kamen. Dennoch finden sich in anderen Publikationen Werte von 0,12 mmol/l (Huke et al., 2011) über 1 mmol/l (Picht, Desantiago et al., 2007) bis hin zu 1,8 mmol/l (Pereira et al., 2017; R. Zhang et al., 2005), sodass sich die gewählte Konzentration im üblichen Bereich zu bewegen scheint.

Weiterhin besteht Anlass zur Frage, ob die statistischen Mängel der Ergebnisse durch eine größere Kohorte vermeidbar gewesen wären. Planmäßig sollten alle vier Gruppen jeweils 10 Tiere umfassen. Durchschnittlich stand schließlich pro Gruppe und Parameter etwa $N = 8$ zu Buche, mit einer Bandbreite von $N = 4$ bis $N = 13$. Da sich im vorliegenden Fall jedoch noch keine Tendenzen abzeichneten, erscheint es fraglich, ob sich diese etwa nach Verdoppelung der Zahlen eingestellt hätten, insbesondere nachdem die Versuche mit RA654321 mit humanen Kardiomyozyten bereits bei vergleichbarer Kohortengröße signifikante Ergebnisse lieferten und der Inhibitor somit im weniger standardisierten Milieu seine Güte unter Beweis stellen konnte. Unabhängig hiervon bleibt zu bedenken, dass es sich um ein aufwendiges mehrwöchiges Versuchsprotokoll inklusive Operation und echokardiographischer Verlaufsuntersuchungen handelte. Die Realisierung größerer Versuchskohorten müsste daher in Zusammenschau mit den materiellen und personellen Ressourcen bewertet werden.

Da diese methodischen Überlegungen keine ausreichende Erklärung zu liefern scheinen, bleibt schließlich noch der Effekt eines möglichen Selektionsbias zu erwägen. Hierfür würde sprechen, dass die Zellauswahl unter dem Mikroskop subjektiv geprägt ist. Es war stets das Ziel, qualitativ hochwertige Kardiomyozyten auszuwählen, wobei etwa die Kriterien einer erhaltenen Querstreifung, einer scharf begrenzten Berandung im Sinne einer intakten Zellmembran sowie ein rhythmisches Kontraktionsmuster ausschlaggebend waren. Demgegenüber wurden Zellen, die diesen Ansprüchen nicht genügten, und insbesondere arrhythmische oder vakuolenhaltige Zellen nicht einbezogen. Hieraus könnte eine Überrepräsentation gesünderer Kardiomyozyten resultieren. Da eine höhere Sparkfrequenz wie bereits

erläutert im Allgemeinen als Zeichen einer größeren Erkrankungsschwere zu werten ist, würde hierfür insbesondere auch die soeben aufgeführte Tatsache sprechen, dass anderen Publikationen deutlich höhere Sparkfrequenzen bei Verwendung vergleichbarer Tiermodelle und Methoden zu entnehmen sind.

4.2.3 Divergenz und eingeschränkte statistische Qualität der Ergebnisse nach Inkubation mit RA654321 *in vivo* wie auch *in vitro* erschweren die Ableitung einer Aussage

Aus einer CaMKII-Inhibition mit RA654321 sollte nun *in vitro* eine Verringerung von Sparkfrequenz und diastolischem SR-Kalziumleck resultieren und der SR-Kalziumgehalt zunehmen.

Zunächst zeigte sich, dass sich diese Erwartungen in den Zellen der Mäuse, die RA654321 bereits *in vivo* erhielten (vgl. S. 91 ff.), nicht erfüllten. Die Sparkfrequenz war nach Sham und TAC erhöht, während sich diastolisches Kalziumleck und SR-Kalziumgehalt weitgehend unverändert präsentierten.

Auch nach Inkubation der isolierten Zellen mit RA654321 *in vitro* konnten diesbezüglich keine statistisch signifikanten Ergebnisse erzielt werden, die Daten präsentieren sich hier heterogen und divergierend (vgl. S. 95 ff.). Erschwerend kommt nun hinzu, dass auch AIP als Referenzinhibitor keine signifikanten Effekte hervorruft und auch keine Tendenz im Sinne der postulierten Hypothesen bewirkt.

Angesichts der statistischen Unzulänglichkeit der Ergebnisse kann hieraus jedoch keine fundierte wissenschaftliche Aussage abgeleitet werden. Weiterhin wurden für das TAC-Modell bereits die Diskrepanzen zwischen den Daten *in vivo* und *in vitro* dargelegt, die nahe legen, dass dieses nicht als stichhaltige Basis der weiterführenden *In-vitro*-Untersuchungen zur Wirksamkeit von RA654321 verwendet werden kann. Die diskutierten möglichen Ursachen, allen voran der Verdacht einer Selektionsbias, gelten auch hier.

4.2.4 RA654321 und GS-680 adressieren mit einer Reduktion von Sparkfrequenz und diastolischem SR-Kalziumleck in humanen atrialen Kardiomyozyten die pathophysiologische Kernproblematik der CaMKII-Überexpression

Die Effekte von RA654321 in den Versuchen mit humanem, atrialem Myokard präsentieren sich homogener als die Ergebnisse der Versuche mit Mauszellen. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Kalziumsparkfrequenz unter der höheren Konzentration 10 µmol/l (vgl. S. 69 ff.) und eine zwar nicht signifikante, jedoch überaus deutliche Tendenz hin zu einer Reduktion des diastolischen Kalziumlecks (vgl. S. 73 ff.). Der Inhibitor zeigt somit im weniger standardisierten und dem klinischen Einsatz näheren humanen Gewebe eine deutliche Wirksamkeit mit signifikanten Ergebnissen. Somit kann ein Effekt von RA654321 den heterogenen Resultaten des Mausmodells zum Trotz angenommen werden.

Ähnlich geartet sind die Ergebnisse bei GS-680. Die Sparkfrequenz fällt signifikant ab, wobei die stärkste Abnahme unter der mittleren Konzentration 100 nmol/l zu verzeichnen ist (vgl. S. 69 ff.). Das diastolische Kalziumleck erfährt wiederum eine nicht signifikante, aber klar sichtbare Reduktion (vgl. S. 73 ff.).

Die Bedeutung dieser Ergebnisse erwächst aus der Tatsache, dass eine erhöhte Sparkfrequenz und ein vergrößertes SR-Kalziumleck im Rahmen verschiedener kardialer Pathologien zu beobachten sind und im zentralen Zusammenhang mit einer CaMKII-Überexpression stehen (Kohlhaas et al., 2006).

Insbesondere fanden sich auch im TAC-Modell (Colomer et al., 2003) sowie bei Patienten mit Herzinsuffizienz eine erhöhte CaMKII-Expression (Hoch et al., 1999).

Darüber hinaus zeigte sich bei der Herzinsuffizienz im Tiermodell ein vergrößertes diastolisches SR-Kalziumleck (Shannon et al., 2003). Dies konnten Zima et al. (Zima et al., 2010) bestätigen und legten zusätzlich dar, dass es bei Herzinsuffizienz zu einem Anstieg der Kalziumsparkfrequenz und einer zunehmenden Abhängigkeit des SR-Kalziumlecks von RyR-abhängigen gegenüber RyR-unabhängigen Mechanismen kommt. In diesem Zusammenhang ist nochmals zu betonen, dass die CaMKII den RyR hauptsächlich am Serin 2814 phosphoryliert, wodurch sich dessen Offenwahrscheinlichkeit steigert (Wehrens et al., 2004), und dass ebenjener Phosphorylierungsgrad in der Herzinsuffizienz um 300 % erhöht ist (Fischer, Herting et al., 2013). Weiterhin scheint die CaMKII für das Voranschreiten einer

hypertensiven Herzerkrankung zur chronischen Herzinsuffizienz (Ling et al., 2009) verantwortlich und ging in Mäusen mit CaMKII δ -Überexpression mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz mit dilatativer Kardiomyopathie, einer Abnahme der linksventrikulären Verkürzungsfraction um bis zu 65 %, einer erhöhten RyR-Phosphorylierung und dem vorzeitigen Versterben der Tiere einher (T. Zhang et al., 2003).

Somit ergibt sich für die CaMKII-Inhibition nicht nur ein Nutzen in der Verhinderung der Folgeerscheinungen eines vergrößerten SR-Kalziumlecks, sondern auch ein in der pathophysiologischen Kausalkette wesentlich früher angesiedelter Effekt. Es wird bereits die Rolle der CaMKII in der Entstehung und Progredienz der Herzinsuffizienz adressiert. Dies scheint mit den Effekten auf Sparkfrequenz und SR-Kalziumleck zu korrelieren.

Überdies kann mit einer Hemmung der CaMKII auch der Entstehung kardialer Arrhythmien auf Boden des SR-Kalziumlecks und einer erhöhten Kalziumsparkfrequenz begegnet werden.

Untermauert wird dies durch Sag et al. (Sag et al., 2009), die die Rolle in der Entstehung kardialer Arrhythmien bei Mäusen mit CaMKII δ -Überexpression und Herzinsuffizienz beleuchteten. Kardiomyozyten dieser Tiere wiesen unter Beta-Stimulation eine Zunahme früher und später Nachdepolarisationen, spontaner Kalziumtransienten und Zellkontraktionen sowie der Kalziumsparkfrequenz und des diastolischen Kalziumlecks auf. Unter CaMKII-Inhibition mit KN-93 als auch im CaMKII-defizienten Knockout-Modell gelang eine signifikante Reduktion der spontanen arrhythmischen Ereignisse, der Sparkfrequenz und des Lecks. Abschließend konnten auch *in vivo* durch Beta-Stimulation erzeugte Arrhythmien mittels KN-93 reduziert werden.

An dieser Stelle sollen auch noch die Möglichkeiten der CaMKII-Inhibition in der Therapie des Vorhofflimmerns hervorgehoben werden. Dies erscheint vor allem auch vor dem Hintergrund sinnvoll, dass eine sich gegenseitig bedingende und verstärkende Beziehung zwischen Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern hergestellt werden kann (Denham et al., 2018) und solitäres Vorhofflimmern ohne Herzinsuffizienz selten auftritt (Kim et al., 2016).

Hove-Madsen et al. (Hove-Madsen et al., 2004) fanden signifikant erhöhte Kalziumsparkfrequenzen in rechtsatrialem Gewebe von Patienten mit

Vorhofflimmern. Zusätzlich detektierten sie globale diastolische Kalziumschwankungen, sogenannte „Calcium Waves“ und wiesen auf das arrhythmogene Potenzial hinsichtlich der Auslösung von Nachdepolarisationen hin. Dem wäre mit CaMKII-Inhibitoren wie RA654321 oder GS-680 und ihrer reduzierenden Wirkung auf die Sparkfrequenz zu begegnen.

In einer anderen Arbeit (Voigt et al., 2012) bewirkte die Blockade der CaMKII mit KN-93 eine Abnahme von SR-Kalziumleck und Sparkfrequenz bei Patienten mit Vorhofflimmern, während ein vergrößertes SR-Kalziumleck zu verspäteten Nachdepolarisationen infolge einwärts gerichteter NCX-Ströme führte. Als Grundlage wurde eine CaMKII-Überaktivität ausgemacht.

Und auch Neef et al. (Neef et al., 2010) unterstrichen das Potenzial einer CaMKII-Inhibition bei Vorhofflimmern, indem sie eine Normalisierung des SR-Kalziumlecks in atrialen Herzmuskelzellen von Patienten mit Vorhofflimmern mittels KN-93 auf das Niveau von Patienten mit Sinusrhythmus herbeiführten. Außerdem legten sie dar, dass das Leck hier vor allem einer CaMKII-abhängigen Phosphorylierung und damit Aktivierung des Ryanodinrezeptors zuzuschreiben ist.

4.2.5 Die Unterdrückung der „Leak-Load Relationship“ unterstreicht die Wirksamkeit von RA654321 und GS-680

Die Ergebnisse der Kaffeeversuche zeigen eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Zunahme der Transientenamplitude als Korrelat für den SR-Kalziumgehalt bei CaMKII-Inhibition mit RA654321 und GS-680 (vgl. S. 74 ff.). Diese Tendenz ist bei RA654321 unter 3 und 10 μM gleichermaßen leicht ersichtlich und zeigt sich bei GS-680 geringfügig unter 100 nM Konzentration und ist unter 300 nM deutlich sichtbar.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass gemeinhin eine positive Korrelation zwischen SR-Kalziumgehalt und -Leck angenommen wird. Eine Zunahme des SR-Kalziumgehalts ist mit einer Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors assoziiert (I. Györke & Györke, 1998). Shannon et al. (Shannon et al., 2002) postulierten schließlich die „Leak-Load Relationship“, nachdem sie den nichtlinearen Zusammenhang zwischen SR-Kalziumgehalt und -leck darlegten, der umso stärker ausfällt, je höher der SR-Kalziumgehalt ist. Bestätigt wurde dies von

Zima et al. (Zima et al., 2010). Sie zeigten wie bereits erwähnt zusätzlich einen Anstieg der Sparkfrequenz bei steigendem SR-Kalziumgehalt und eine damit zunehmende Sparkabhängigkeit des Lecks.

Demgegenüber nehmen das SR-Kalziumleck und die Kalziumsparkfrequenz bei gleichzeitiger Zunahme des SR-Kalziumgehalts unter Einfluss von RA654321 und GS-680 ab. Dies zeigte sich auch in der schon zitierten Studie von Sag et al. (Sag et al., 2009) unter KN-93, die dies als Hinweis auf eine Modulation der Kalziumfreisetzung aus dem SR werteten. Insofern kann dies auch RA654321 und GS-680 zugeschrieben werden und unterstreicht zudem ihr Potenzial, da sie offensichtlich in der Lage sind, die „Leak-Load Relationship“ zu unterdrücken.

4.2.6 Das therapeutische Potenzial der CaMKII-Inhibition erschließt sich aus der positiven Beeinflussung klinisch relevanter Parameter

Bei den gemessenen Größen Sparkfrequenz, diastolisches Kalziumleck und SR-Kalziumgehalt handelt es sich um Parameter der Grundlagenforschung. Bei der abschließenden Bewertung der Ergebnisse soll daher nochmals beleuchtet werden, inwiefern eine CaMKII-Inhibition hierauf aufbauend mit einer positiven Beeinflussung klinisch relevanter Parameter des kardialen Remodelings, etwa systolischer und diastolischer Dysfunktion, myokardialer Fibrose oder Induzierbarkeit und Auftreten von Vorhofflimmern und Arrhythmien, einhergeht.

Unter CaMKII-Inhibition mittels eines anderen neuartigen Inhibitors, AS105, zeigte sich unter den Umständen einer signifikant reduzierten Leak-Load Relationship mit erhöhtem SR-Kalziumgehalt und vergrößerten systolischen Kalziumtransienten eine signifikant verbesserte Kontraktilität in Kardiomyozyten von CaMKII δ C-überexprimierenden Mäusen, gemessen an der Verkürzungsfraktion der Zellen, welche sich von $4,04 \pm 0,17$ auf $4,66 \pm 0,16$ % verbesserte (Neef et al., 2018).

Ähnliches konnte auch in Myokardtrabekeln von Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden. Die Tiere wiesen eine Überaktivität der CaMKII aufgrund einer Phosphorylierung am Threonin 287 auf. Die entwickelte Kontraktionskraft sowie die jeweils als $\Delta F/\Delta t$ gemessene Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit der Trabekel waren eingeschränkt und unter KN-93 und AIP teilweise bzw. vollständig wiederherstellbar (Daniels et al., 2018).

Eine weitere Arbeit demonstrierte, dass die Veränderungen einer isoprenalininduzierten Herzinsuffizienz in Ratten unter chronischer CaMKII-Inhibition mit KN-93 rückgängig gemacht werden konnten (Y. Liu et al., 2021). Hierbei zeigten sich nicht nur die EF, sondern auch die invasiv gemessene linksventrikuläre Druck-Volumen-Schleife und das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht als Hypertrophiemarker auf das Kontrollniveau normalisiert. Weiterhin entsprachen die Noradrenalkonzentrationen im Plasma sowie die hämodynamische Antwort auf betaadrenerge Stimulation den Werten der Kontrolle, sodass auch das neurohumorale Remodeling umgekehrt wurde.

Eine signifikante Verbesserung der EF war wie bereits angesprochen auch unter RA123456, dem Vorgänger von RA654321, im TAC-Modell zu beobachten, welche echokardiographisch nachgewiesen wurde und wobei sich auch eine Reduktion von Sparkfrequenz und diastolischem Kalziumleck sowie eine Zunahme des SR-Kalziumgehalts zeigten (Mustroph et al., 2020).

Ähnlich wiesen Sossalla et al. (Sossalla, Fluschnik et al., 2010) dies unter KN-93 und AIP in humanem insuffizientem Myokard nach und zeigten hiermit einhergehend eine verbesserte Kraft-Frequenz-Beziehung in Myokardtrabekeln.

Als weiterer Aspekt war unter CaMKII-Inhibition ein vermindertes Auftreten von Arrhythmien ersichtlich. Die Auslösbarkeit atrialer und ventrikulärer Arrhythmien war in Mäusen mit CaMKII δ -Überexpression unter Inhibition mittels RA123456 signifikant reduziert (Mustroph et al., 2020).

Ebenso traten ventrikuläre Tachykardien im Herzinsuffizienzmodell seltener auf. Dies war sowohl in Mäusen nach TAC (Feng et al., 2017) als auch in Hasen nach operativer Induktion einer Aortenklappeninsuffizienz und späterer zusätzlicher abdomineller aortaler Konstriktion unter KN-93 nachweisbar (Hoeker et al., 2016).

Speziell zeigte sich auch die Inzidenz und Induzierbarkeit von Vorhofflimmern reduziert. Eine „Gain-of-Function“-Mutation des Serin 2814 führte im Mausmodell zur vermehrten CaMKII-abhängigen Phosphorylierung des RyR 2 und somit zu einer etwa sechsfach erhöhten Inzidenz von Vorhofflimmern im Vergleich zum Wildtyp. Nach medikamentöser CaMKII-Inhibition mittels KN-93 glich sich die Inzidenz an die des Wildtyps an. Zusätzlich verringerte sich die elektrische Induzierbarkeit von Vorhofflimmern nach genetischer Inhibition der CaMKII-abhängigen RyR-Phosphorylierung von 44 auf 7,7 % (Chelu et al., 2009).

Auch in einem Mausmodell mit FKBP12.6-Defizienz war in 53 % der Tiere Vorhofflimmern auslösbar, verglichen mit 13 % im Wildtyp, während erneut die genetische Inhibition der CaMKII-abhängigen RyR-Phosphorylierung des Serin 2814 zur Normalisierung der Inzidenz auf 15 % führte (N. Li et al., 2012).

Schließlich ging eine CaMKII-Inhibition auch mit einem reduzierten strukturellen kardialen Remodeling einher. Bei Vorliegen eines persistierenden Vorhofflimmerns fand sich echokardiographisch unter Einfluss des CaMKII-hemmenden Peptids CaMKIIN eine signifikant kleinere Vorhofgröße sowie eine signifikant verbesserte Vorhoffunktion, gemessen an der linksatrialen Auswurfleistung. Nach 14 Tagen zeigte sich zudem eine signifikant geringere Rate an apoptotischen und hypertrophen Zellen, nukleärer Hypertrophie sowie myokardialer Fibrose. Zudem zeigte sich eine reduzierte Phosphorylierung der hypertrophiefördernden HDAC4 (Z. Liu et al., 2019).

In einer weiteren Studie mit hyperthyreoten Mäusen konnten unter CaMKII-Inhibition mit AC3-I eine verminderte Induzierbarkeit von Arrhythmien und Vorhofflimmern und zudem ebenfalls positive Effekte auf das strukturelle Remodeling erwiesen werden. So fand sich eine signifikante Verminderung von atrialer Fibrose und ventrikulärer Hypertrophie. Damit einhergehend konnte erneut eine verminderte Aktivität hypertrophiefördernder Proteine wie der HDAC4 gezeigt werden (Nie et al., 2022).

Das mögliche therapeutische Potenzial der CaMKII-Inhibition wurde bereits aus der Überlegung hergeleitet, dass mit dem Eingreifen in das elektrophysiologische Remodeling die etablierte Herzinsuffizienztherapie um ein neues Feld erweitert werden könnte (vgl. S. 101 ff.). Dies wird nun durch die dargelegten Effekte der CaMKII-Inhibition auf klinisch fassbare und relevante Größen unterstrichen. Die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Einfluss von RA654321 und GS-680 gemessene Reduktion von Kalziumsparkfrequenz und SR-Kalziumleck sowie die Zunahme des SR-Kalziumgehalts werden plastisch untermauert und der Bogen Richtung klinische Anwendung geschlagen.

4.3 Ausblick

Die vorliegende Dissertation und ihre Ergebnisse machen aus Sicht des Verfassers das Potenzial einer CaMKII-Inhibition deutlich. Es wurden die Einflüsse zweier Substanzen auf das SR-Kalziumleck untersucht, dem arrhythmogenes Potenzial zugeschrieben wird, und beide Substanzen führten zu einer Reduktion des Lecks sowie der Sparkfrequenz als korrelierender Größe. Nun also auf in die Klinik?

Wie schon erwähnt sucht man Medikamente zur Behandlung von Herzerkrankungen, deren Wirkung auf einer CaMKII-Inhibition beruht, in den aktuellen therapeutischen Algorithmen vergeblich. Bereits 2006 fragte Anderson bezüglich der Rolle von Proteinkinasen als therapeutische Ansatzpunkte „Where are the drugs?“ (Anderson et al., 2006, S. 443) – und erhielt bislang keine Antwort.

In verschiedenen Übersichtsarbeiten wurde die pathophysiologische Rolle der CaMKII ausführlich beleuchtet und die daraus abgeleitete therapeutische Eignung betont (Anderson et al., 2011; Banyasz et al., 2011; Bers, 2010; Fischer, Neef & Maier, 2013; Maier, 2014; Nassal et al., 2020; Njagic et al., 2020; Pellicena & Schulman, 2014; Shahin et al., 2017). Die Autoren konnten abschließend nur zu weiterer Forschung ermuntern und nannten einschränkend Probleme wie unzureichende Selektivität und dass beispielsweise Nebenwirkungen auf die Langzeitpotenzierung im Rahmen von Lern- und Gedächtnisprozessen ein mögliches Hindernis darstellen könnten.

Somit sind für die Weiterentwicklung der getesteten Substanzen RA654321 und GS-680 weitere Studien nötig, zunächst im Labor und anschließend auch im klinischen Umfeld. Es bedarf einer Vergrößerung der Kohorten, um auch Einflüsse verschiedener Begleiterkrankungen und kardiovaskulärer Risikofaktoren aussagekräftig untersuchen zu können. Insbesondere die Auswirkungen einer CaMKII-Inhibition *in vivo* müssen Gegenstand der Forschung sein mit dem Ziel der Initiierung klinischer Studien.

Während die etablierte pharmakologische Herzinsuffizienztherapie vor allem in das neurohumorale Remodeling mit RAAS- und Sympathikusaktivierung eingreift, könnte der Vorteil der CaMKII-Inhibitoren wie bereits erwähnt (vgl. S. 101 ff.) darin bestehen, dass sie direkt im Zentrum des elektrophysiologischen Remodelings intervenieren und die therapeutische Phalanx somit verbreitern würden. Ähnlich gelang es auch

mit dem Neprilysin-Inhibitor Sacubitril die natriuretischen Peptide zu adressieren und der Herzinsuffizienz somit auf einer neuen Ebene zu begegnen (McMurray et al., 2013). Mittlerweile ist Sacubitril in Kombination mit Valsartan fester Bestandteil der Leitlinien (McDonagh et al., 2021). In dieser Weise wäre auch die Kombination eines CaMKII-Inhibitors mit einer bereits etablierten Substanz ein denkbare Szenario für den Eingang in die klinische Medizin.

Die Bemühungen um einen klinisch anwendbaren Inhibitor der Ca/Calmodulin-abhängigen Kinase II müssen daher in Zukunft offensiv vorangetrieben werden, sodass der entscheidende Unterschied und Vorteil gegenüber etablierten Medikamenten, nämlich der intrazelluläre, zentrale Angriffspunkt, direkt inmitten des Kalziumzyklus der Herzmuskelzelle, baldmöglichst therapeutisch genutzt und einer breiten Patientenmasse zugänglich gemacht werden kann.

5 Zusammenfassung

Die Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II spielt eine zentrale Rolle im Kalziumzyklus des Kardiomyozyten im Rahmen der elektromechanischen Koppelung. Sie vermag verschiedene regulatorische Proteine wie den Ryanodinrezeptor des SR, den L-Typ-Kalziumkanal und Phospholamban zu phosphorylieren und zu aktivieren. Im Zuge der Herzinsuffizienz kommt es, etwa sympathikus- oder RAAS-abhängig zu einer Hochregulation der CaMKII, was Veränderungen im Kalziumzyklus der Zelle nach sich zieht. Diese führen schließlich zu einer Zunahme des diastolischen SR-Kalziumlecks und zum vermehrten Auftreten von Kalziumsparks, spontaner Kalziumfreisetzungseignisse der Ryanodinrezeptoren mit arrhythmogenem Potenzial.

Die resultierende Abnahme des SR-Kalziumgehalts und Zunahme der diastolischen sarkoplasmatischen Kalziumkonzentration der Zelle führen zu einer Beeinträchtigung von Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit der Herzmuskelzelle und fördern die Entstehung von Nachdepolarisationen, denen ein entscheidender pathophysiologischer Beitrag zur Auslösung und Aufrechterhaltung von Arrhythmien zugeschrieben wird.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Wirkung der beiden neuartigen CaMKII-Inhibitoren RA654321 und GS-680. Die Hypothese besagte, dass sie durch Hemmung der Enzymaktivität zu einer Reduktion der Kalziumsparkfrequenz und des diastolischen SR-Kalziumlecks sowie zu einer Zunahme des SR-Kalziumgehalts führen sollen.

Die Auswirkungen von RA654321 wurden in Herzmuskelzellen von Mäusen untersucht, die durch retrograden enzymatischen Verdau des Myokards über die Koronargefäße gewonnen wurden. Im Vorfeld wurde die Mäusekohorte unterteilt. Je zur Hälfte durchliefen die Tiere eine TAC-Operation zur Induktion einer Herzinsuffizienz und eine Sham-Operation, welche die Kontrollgruppe darstellte. Innerhalb dieser beiden Gruppen wurde wiederum jeweils einem Teil der Tiere RA654321 bereits *in vivo* verabreicht, sodass auch ein möglicher längerfristiger Effekt untersucht werden konnte. Um mögliche Veränderungen *in vivo* zu erfassen, erhielten die Tiere echokardiographische Verlaufsuntersuchungen vor der Operation,

vor Beginn der Behandlung mit RA654321 *in vivo* und vor der Zellisolation am Ende des vierwöchigen Beobachtungszeitraums. Nach der Isolation wurden die Zellen mit dem kalziumbindenden Farbstoff Fluo-4, AM inkubiert und schließlich konfokalmikroskopisch untersucht.

Die echokardiographischen Ergebnisse zeigten signifikant auf, dass das Herzinsuffizienzmodell nach TAC funktioniert und sich eine Abnahme der linksventrikulären EF, eine myokardiale Hypertrophie und schließlich auch Dilatation eingestellt hatte. Zudem war ersichtlich, dass RA654321 *in vivo* die Progredienz der Herzinsuffizienz zu verhindern vermochte.

Dennoch fielen die Ergebnisse der konfokalen Kalziummessungen heterogen und divergierend aus. Die eindeutigen Veränderungen, die das TAC-Modell *in vivo* hervorgerufen hatte, konnten *in vitro* anhand der erhobenen Parameter nicht reproduziert werden. Weiterhin fand sich auch weder nach Applikation von RA654321 *in vivo* noch nach der Inkubation *in vitro* ein einheitlicher Trend. Da diese Ergebnisse im Kontrast zu den echokardiographischen Daten *in vivo* stehen und auch unter AIP kein Effekt in den konfokalen Messungen erkennbar war, wurde die *in vitro* angewandte Methodik kritisch hinterfragt. Eine Aussage über die Wirksamkeit des Inhibitors war letztlich auch aufgrund der eingeschränkten statistischen Wertigkeit der Daten nicht möglich.

Weiterhin erfolgte die Testung von RA654321 und zusätzlich auch eines zweiten CaMKII-Inhibitors, GS-680, in humanem rechtsatrialem Myokard. Das Gewebe entstammte dem rechten Vorhofrohr und wurde bei der Kanülierung im Rahmen von Herzoperationen mit extrakorporaler Zirkulation reseziert. Nach enzymatischem und mechanischem Verdau mittels „Chunk Isolation“ wurden die Zellen nach Inkubation mit Fluo-4, AM und den beiden CaMKII-Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen wiederum konfokalmikroskopisch analysiert.

Es zeigte sich hier, dass beide CaMKII-Inhibitoren zu einer signifikanten Reduktion der Sparkfrequenz sowie einer deutlichen Abnahme des diastolischen SR-Kalziumlecks führten. Weiterhin nahm der SR-Kalziumgehalt tendenziell zu. Diese Entwicklungen entsprechen den formulierten Erwartungen und decken sich auch mit den Ergebnissen des eingesetzten Referenzinhibitors AIP.

Dadurch konnte die „Leak-Load Relationship“, also die Hypothese, dass das SR-Kalziumleck mit zunehmendem SR-Kalziumgehalt ebenfalls ansteigt, ausgehebelt und die Wirksamkeit der Inhibition unterstrichen werden.

Abschließend blieb festzustellen, dass trotz ausgiebiger Erforschung der physiologischen und pathophysiologischen Grundlagen der CaMKII das Prinzip ihrer Inhibition noch immer nicht den Sprung in die klinische Herzinsuffizienztherapie vollziehen konnte. Dennoch scheint der Ansatz vielversprechend. Die etablierten Pharmaka agieren insbesondere im Bereich der hochregulierten neurohumoralen Systeme, während der Bereich des elektrophysiologischen Remodelings bislang nur peripher tangiert wird. Die Chance der CaMKII-Inhibitoren besteht daher in ihrem zentralen Angriffspunkt im Kalziumzyklus des Kardiomyozyten und ihrem daraus erwachsenden Potenzial, die pharmakologische Therapie der Herzinsuffizienz um dieses Feld zu erweitern.

Literaturverzeichnis

- Alvarez, R., Sette, C., Yang, D [Diana], Eglen, R. M., Wilhelm, R., Shelton, E. R. & Conti, M. (1995). Activation and selective inhibition of a cyclic AMP-specific phosphodiesterase, PDE-4D3. *Molecular pharmacology*, 48(4), 616–622.
- Anderson, M. E., Brown, J. H. & Bers, D. M. (2011). CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 51(4), 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.01.012>
- Anderson, M. E., Higgins, L. S. & Schulman, H. (2006). Disease mechanisms and emerging therapies: protein kinases and their inhibitors in myocardial disease. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, 3(8), 437–445. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0585>
- Ashpole, N. M., Herren, A. W., Ginsburg, K. S., Brogan, J. D., Johnson, D. E., Cummins, T. R., Bers, D. M. & Hudmon, A. (2012). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry*, 287(24), 19856–19869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322537>
- Banyasz, T., Szentandrassy, N., Toth, A., Nanasi, P. P., Magyar, J. & Chen-Izu, Y. (2011). Cardiac calmodulin kinase: a potential target for drug design. *Current medicinal chemistry*, 18(24), 3707–3713.
- Beauverger, P., Ozoux, M.-L., Bégis, G., Glénat, V., Briand, V., Philippo, M.-C., Daveu, C., Tavares, G., Roy, S., Corbier, A., Briand, P., Dorchies, O., Bauchet, A.-L., Nicolai, E., Duclos, O., Tamarelle, D., Pruniaux, M.-P., Muslin, A. J. & Janiak, P. (2020). Reversion of cardiac dysfunction by a novel orally available calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, RA306, in a genetic model of dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, 116(2), 329–338. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz097>
- Benitah, J.-P., Alvarez, J. L. & Gómez, A. M. (2010). L-type Ca²⁺ current in ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(1), 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.07.026>
- Bers, D. M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Springer Netherlands. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=3565908>
- Bers, D. M. (2002a). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a>
- Bers, D. M. (2002b). Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, d1697-711. <https://doi.org/10.2741/A873>
- Bers, D. M. (2010). CaMKII inhibition in heart failure makes jump to human. *Circulation research*, 107(9), 1044–1046. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.231902>

- Bers, D. M. (2014). Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: Basis and roles in cardiac dysfunction. *Annual review of physiology*, *76*, 107–127. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153308>
- Bers, D. M. & Grandi, E. (2009). Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. *Journal of cardiovascular pharmacology*, *54*(3), 180–187. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181a25078>
- Bers, D. M., Li, L., Satoh, H. & McCall, E. (1998). Factors that control sarcoplasmic reticulum calcium release in intact ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *853*, 157–177. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08264.x>
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S. E., Akhter, S. A. & Schwartz, A. (2005). The L-type calcium channel in the heart: The beat goes on. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(12), 3306–3317. <https://doi.org/10.1172/JCI27167>
- Borbély, A., van der Velden, J., Papp, Z., Bronzwaer, J. G. F., Edes, I., Stienen, G. J. M. & Paulus, W. J. (2005). Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*, *111*(6), 774–781. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000155257.33485.6D>
- Borghi, C. & Veronesi, M. (2019). Cough and ACE Inhibitors: The Truth Beyond Placebo. *Clinical pharmacology and therapeutics*, *105*(3), 550–552. <https://doi.org/10.1002/cpt.1040>
- Bovo, E., Huke, S., Blatter, L. A. & Zima, A. V. (2017). The effect of PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor on SR Ca²⁺ leak in ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *104*, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.01.015>
- Braun, A. P. & Schulman, H. (1995). A non-selective cation current activated via the multifunctional Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase in human epithelial cells. *The Journal of physiology*, *488* (Pt 1), 37–55. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020944>
- Braunwald, E. (2013). Heart failure. *JACC. Heart failure*, *1*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2012.10.002>
- Brillantes, A. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasová, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E. & Marks, A. R. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, *77*(4), 513–523. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90214-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90214-3)
- Brochet, D. X. P., Yang, D [Dongmei], Di Maio, A., Lederer, W. J., Franzini-Armstrong, C. & Cheng, H [Heping] (2005). Ca²⁺ blinks: Rapid nanoscopic store calcium signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(8), 3099–3104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500059102>
- Bustamante, J. O., Watanabe, T., Murphy, D. A. & McDonald, T. F. (1982). Isolation of single atrial and ventricular cells from the human heart. *Canadian Medical Association journal*, *126*(7), 791–793.
- Carlisle Michel, J. J., Dodge, K. L., Wong, W., Mayer, N. C., Langeberg, L. K. & Scott, J. D. (2004). PKA-phosphorylation of PDE4D3 facilitates recruitment of the mAKAP signalling complex. *The Biochemical journal*, *381*(Pt 3), 587–592. <https://doi.org/10.1042/BJ20040846>

- Carlson, C. R., Aronsen, J. M., Bergan-Dahl, A., Moutty, M. C., Lunde, M., Lunde, P. K., Jarstadmarken, H., Wanichawan, P., Pereira, L., Kolstad, T. R. S., Dalhus, B., Subramanian, H., Hille, S., Christensen, G., Müller, O. J., Nikolaev, V., Bers, D. M., Sjaastad, I., Shen, X., . . . Sejersted, O. M. (2022). AKAP18 δ Anchors and Regulates CaMKII Activity at Phospholamban-SERCA2 and RYR. *Circulation research*, 130(1), 27–44. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317976>
- Chang, B. H., Mukherji, S. & Soderling, T. R. (1998). Characterization of a calmodulin kinase II inhibitor protein in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10890–10895. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10890>
- Chapman, R. A. & Tunstall, J. (1987). The Calcium Paradox of the Heart. *Progress in Biophysics and molecular Biology*(50), 67–96.
- Chelu, M. G., Sarma, S., Sood, S., Wang, S., van Oort, R. J., Skapura, D. G., Li, N., Santonastasi, M., Müller, F. U., Schmitz, W., Schotten, U., Anderson, M. E., Valderrábano, M., Dobrev, D. & Wehrens, X. H. T. (2009). Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(7), 1940–1951. <https://doi.org/10.1172/jci37059>
- Cheng, H [Heping] & Lederer, W. J. (2008). Calcium sparks. *Physiological reviews*, 88(4), 1491–1545. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2007>
- Cheng, H [Heping], Lederer, W. J. & Cannell, M. B. (1993). Calcium sparks: Elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5134), 740–744. <https://doi.org/10.1126/science.8235594>
- Cheng, H [Heping], Song, L. S., Shirokova, N., González, A., Lakatta, E. G., Ríos, E. & Stern, M. D. (1999). Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: Theory and studies with an automatic detection method. *Biophysical journal*, 76(2), 606–617. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77229-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77229-2)
- Chiamvimonvat, N., Chen-Izu, Y., Clancy, C. E., Deschenes, I., Dobrev, D., Heijman, J., Izu, L., Qu, Z., Ripplinger, C. M., Vandenberg, J. I., Weiss, J. N., Koren, G., Banyasz, T., Grandi, E., Sanguinetti, M. C., Bers, D. M. & Nerbonne, J. M. (2017). Potassium currents in the heart: Functional roles in repolarization, arrhythmia and therapeutics. *The Journal of physiology*, 595(7), 2229–2252. <https://doi.org/10.1113/JP272883>
- Chugh, S. S., Havmoeller, R., Narayanan, K., Singh, D., Rienstra, M., Benjamin, E. J., Gillum, R. F., Kim, Y.-H., McAnulty, J. H., Zheng, Z.-J., Forouzanfar, M. H., Naghavi, M., Mensah, G. A., Ezzati, M. & Murray, C. J. L. (2014). Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: A Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*, 129(8), 837–847. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005119>
- Claxton, N. S., Fellers, T. J. & Davidson, M. W. (2005). *Laser Scanning Confocal Microscopy*. Department of Optical and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University. <http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf>

- Colinas, O., Gallego, M., Setién, R., López-López, J. R., Pérez-García, M. T. & Casis, O. (2006). Differential modulation of Kv4.2 and Kv4.3 channels by calmodulin-dependent protein kinase II in rat cardiac myocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 291(4), H1978-87. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01373.2005>
- Colomer, J. M., Mao, L., Rockman, H. A. & Means, A. R. (2003). Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(2), 183–192. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0350>
- CONSENSUS Trial Study Group (1987). Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *The New England journal of medicine*, 316(23), 1429–1435. <https://doi.org/10.1056/NEJM198706043162301>
- Daniels, L. J., Wallace, R. S., Nicholson, O. M., Wilson, G. A., McDonald, F. J., Jones, P. P., Baldi, J. C., Lamberts, R. R. & Erickson, J. R. (2018). Inhibition of calcium/calmodulin-dependent kinase II restores contraction and relaxation in isolated cardiac muscle from type 2 diabetic rats. *Cardiovascular diabetology*, 17(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0732-x>
- deAlmeida, A. C., van Oort, R. J. & Wehrens, X. H. T. (2010). Transverse aortic constriction in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.3791/1729>
- Denham, N. C., Pearman, C. M., Caldwell, J. L., Madders, G. W. P., Eisner, D. A., Trafford, A. W. & Dibb, K. M. (2018). Calcium in the Pathophysiology of Atrial Fibrillation and Heart Failure. *Frontiers in physiology*, 9, 1380. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01380>
- Denniss, A. L., Dashwood, A. M., Molenaar, P. & Beard, N. A. (2020). Sarcoplasmic reticulum calcium mishandling: Central tenet in heart failure? *Biophysical reviews*, 12(4), 865–878. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00736-y>
- Du, G. G., Sandhu, B., Khanna, V. K., Guo, X. H. & MacLennan, D. H. (2002). Topology of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 16725–16730. <https://doi.org/10.1073/pnas.012688999>
- Dunlay, S. M., Shah, N. D., Shi, Q., Morlan, B., VanHouten, H., Long, K. H. & Roger, V. L. (2011). Lifetime costs of medical care after heart failure diagnosis. *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes*, 4(1), 68–75. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.110.957225>
- Edelman, J. J. B., Seco, M., Dunne, B., Matzelle, S. J., Murphy, M., Joshi, P., Yan, T. D., Wilson, M. K., Bannon, P. G., Valletly, M. P. & Passage, J. (2013). Custodiol for myocardial protection and preservation: a systematic review. *Annals of cardiothoracic surgery*, 2(6), 717–728. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2225-319X.2013.11.10>
- Erickson, J. R., Joiner, M. A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C. V., Bartlett, R. K., Lowe, J. S., O'Donnell, S. E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M. C., Zimmerman, K., Ham, A.-J. L., Weiss, R. M., Spitz, D. R., Shea, M. A., Colbran, R. J., Mohler, P. J. &

- Anderson, M. E. (2008). A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*, 133(3), 462–474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.048>
- Erickson, J. R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., Copeland, R. J., Despa, F., Hart, G. W., Ripplinger, C. M. & Bers, D. M. (2013). Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*, 502(7471), 372–376. <https://doi.org/10.1038/nature12537>
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology*, 245(1), C1-14. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1>
- Fabiato, A. & Fabiato, F. (1975). Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *The Journal of physiology*, 249(3), 469–495. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1975.sp011026>
- Feng, Y., Cheng, J., Wei, B. & Wang, Y. (2017). CaMKII inhibition reduces isoproterenol-induced ischemia and arrhythmias in hypertrophic mice. *Oncotarget*, 8(11), 17504–17509. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15099>
- Fischer, T. H., Herting, J., Tirilomis, T., Renner, A., Neef, S., Toischer, K., Ellenberger, D., Förster, A., Schmitto, J. D., Gummert, J., Schöndube, F. A., Hasenfuss, G., Maier, L. S. & Sossalla, S. (2013). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human cardiac pathology. *Circulation*, 128(9), 970–981. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001746>
- Fischer, T. H., Maier, L. S. & Sossalla, S. (2013). The ryanodine receptor leak: How a tattered receptor plunges the failing heart into crisis. *Heart failure reviews*, 18(4), 475–483. <https://doi.org/10.1007/s10741-012-9339-6>
- Fischer, T. H., Neef, S. & Maier, L. S. (2013). The Ca-calmodulin dependent kinase II: A promising target for future antiarrhythmic therapies? *Journal of molecular and cellular cardiology*, 58, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.003>
- Fleischer, S., Ogunbunmi, E. M., Dixon, M. C. & Fleer, E. A. (1985). Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(21), 7256–7259. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.21.7256>
- Gaburjakova, M., Bal, N. C., Gaburjakova, J. & Periasamy, M. (2013). Functional interaction between calsequestrin and ryanodine receptor in the heart. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(16), 2935–2945. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1199-7>
- GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet (London, England)*, 392(10159), 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)

- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N., Bishop-Stewart, J., Gray, D. & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell calcium*, 27(2), 97–106. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0095>
- Gerber, Y., Weston, S. A., Redfield, M. M., Chamberlain, A. M., Manemann, S. M., Jiang, R., Killian, J. M. & Roger, V. L. (2015). A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA internal medicine*, 175(6), 996–1004. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.0924>
- Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D. & Alexander, R. W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, 74(6), 1141–1148. <https://doi.org/10.1161/01.RES.74.6.1141>
- Grueter, C. E., Colbran, R. J. & Anderson, M. E. (2007). CaMKII, an emerging molecular driver for calcium homeostasis, arrhythmias, and cardiac dysfunction. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 85(1), 5–14. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0125-6>
- Guo, T., Zhang, T., Mestril, R. & Bers, D. M. (2006). Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circulation research*, 99(4), 398–406. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000236756.06252.13>
- Gutierrez, D. A., Fernandez-Tenorio, M., Ogrodnik, J. & Niggli, E. (2013). NO-dependent CaMKII activation during β -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovascular Research*, 100(3), 392–401. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt201>
- Gwathmey, J. K., Hajjar, R. J. & Solaro, R. J. (1991). Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. *Circulation research*, 69(5), 1280–1292. <https://doi.org/10.1161/01.res.69.5.1280>
- Györke, I. & Györke, S. (1998). Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺ involves luminal Ca²⁺ sensing sites. *Biophysical journal*, 75(6), 2801–2810. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77723-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77723-9)
- Györke, S. & Fill, M. (1993). Ryanodine receptor adaptation: Control mechanism of Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in heart. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5109), 807–809. <https://doi.org/10.1126/science.8387229>
- Handhke, A., Ormonde, C. E., Thomas, N. L., Bralesford, C., Williams, A. J., Lai, F. A. & Zissimopoulos, S. (2016). Calsequestrin interacts directly with the cardiac ryanodine receptor luminal domain. *Journal of cell science*, 129(21), 3983–3988. <https://doi.org/10.1242/jcs.191643>
- Hanson, P. I., Kapiloff, M. S., Lou, L. L., Rosenfeld, M. G. & Schulman, H. (1989). Expression of a multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation. *Neuron*, 3(1), 59–70. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90115-3)
- Hanson, P. I., Meyer, T., Stryer, L. & Schulman, H. (1994). Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron*, 12(5), 943–956.

- Hartupee, J. & Mann, D. L. (2017). Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nature reviews. Cardiology*, 14(1), 30–38. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.163>
- Hartzell, C., Putzier, I. & Arreola, J. (2005). Calcium-activated chloride channels. *Annual review of physiology*, 67, 719–758. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.032003.154341>
- He, J.-Q., Vu, D. M., Hunt, G., Chugh, A., Bhatnagar, A. & Bolli, R. (2011). Human cardiac stem cells isolated from atrial appendages stably express c-kit. *PloS one*, 6(11), e27719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027719>
- He, Q., Cheng, J. & Wang, Y. (2019). Chronic CaMKII inhibition reverses cardiac function and cardiac reserve in HF mice. *Life sciences*, 219, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.010>
- Heijman, J., Voigt, N., Wehrens, X. H. T. & Dobrev, D. (2014). Calcium dysregulation in atrial fibrillation: the role of CaMKII. *Frontiers in pharmacology*, 5, 30. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00030>
- Herold, G. (2018). *Innere Medizin 2019: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Herold Gerd.
- Hjalmarson, A., Goldstein, S., Fagerberg, B., Wedel, H., Waagstein, F., Kjeksus, J., Wikstrand, J., El Allaf, D., Vítovec, J., Aldershvile, J., Halinen, M., Dietz, R., Neuhaus, K. L., János, A., Thorgeirsson, G., Dunselman, P. H., Gullestad, L., Kuch, J., Herlitz, J., . . . Deedwania, P. (2000). Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: The Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *JAMA*, 283(10), 1295–1302. <https://doi.org/10.1001/jama.283.10.1295>
- Hoch, B., Meyer, R., Hetzer, R., Krause, E. G. & Karczewski, P. (1999). Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation research*, 84(6), 713–721. <https://doi.org/10.1161/01.res.84.6.713>
- Hoeker, G. S., Hanafy, M. A., Oster, R. A., Bers, D. M. & Pogwizd, S. M. (2016). Reduced Arrhythmia Inducibility With Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Inhibition in Heart Failure Rabbits. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 67(3), 260–265. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000343>
- Houser, S. R. (2014). Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Protein kinase A-mediated hyperphosphorylation of the ryanodine receptor at serine 2808 does not alter cardiac contractility or cause heart failure and arrhythmias. *Circulation research*, 114(8), 1320–7; discussion 1327. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300569>
- Hove-Madsen, L., Llach, A., Bayes-Genís, A., Roura, S., Rodríguez Font, E., Arís, A. & Cinca, J. (2004). Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation*, 110(11), 1358–1363. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87>

- Hryshko, L. V. & Bers, D. M. (1990). Ca current facilitation during postrest recovery depends on Ca entry. *The American journal of physiology*, 259(3 Pt 2), H951-61. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.3.H951>
- Hudmon, A. & Schulman, H. (2002). Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Biochemical journal*, 364(Pt 3), 593–611. <https://doi.org/10.1042/BJ20020228>
- Hudmon, A., Schulman, H., Kim, J., Maltez, J. M., Tsien, R. W. & Pitt, G. S. (2005). CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *The Journal of cell biology*, 171(3), 537–547. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505155>
- Huke, S. & Bers, D. M. (2008). Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 376(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.084>
- Huke, S., Desantiago, J., Kaetzel, M. A., Mishra, S., Brown, J. H., Dedman, J. R. & Bers, D. M. (2011). SR-targeted CaMKII inhibition improves SR Ca²⁺ handling, but accelerates cardiac remodeling in mice overexpressing CaMKII δ C. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 50(1), 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.014>
- Inesi, G., Prasad, A. M. & Pilankatta, R. (2008). The Ca²⁺ ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum: Physiological role and relevance to diseases. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(1), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.161>
- Ishida, A., Kameshita, I., Okuno, S., Kitani, T. & Fujisawa, H. (1995). A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochemical and biophysical research communications*, 212(3), 806–812. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2040>
- Ishida, A., Shigeri, Y., Taniguchi, T. & Kameshita, I. (2003). Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: From biochemistry to pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*, 100(3), 291–305. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.09.003>
- James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M. & Carafoli, E. (1989). Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*, 342(6245), 90–92. <https://doi.org/10.1038/342090a0>
- Jayaraman, T., Brillantes, A. M., Timerman, A. P., Fleischer, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Marks, A. R. (1992). FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *The Journal of biological chemistry*, 267(14), 9474–9477.
- Jessup, M. & Brozena, S. (2003). Heart failure. *The New England journal of medicine*, 348(20), 2007–2018. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021498>
- Jett, M. F., Schworer, C. M., Bass, M. & Soderling, T. R. (1987). Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Archives of biochemistry and biophysics*, 255(2), 354–360. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90403-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90403-6)

- Karagueuzian, H. S., Pezhouman, A., Angelini, M. & Olcese, R. (2017). Enhanced Late Na and Ca Currents as Effective Antiarrhythmic Drug Targets. *Frontiers in pharmacology*, 8, 36. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00036>
- Kim, E.-J., Yin, X., Fontes, J. D., Magnani, J. W., Lubitz, S. A., McManus, D. D., Seshadri, S., Vasan, R. S., Ellinor, P. T., Larson, M. G., Benjamin, E. J. & Rienstra, M. (2016). Atrial fibrillation without comorbidities: Prevalence, incidence and prognosis (from the Framingham Heart Study). *American heart journal*, 177, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2016.03.023>
- Kloepper, R. F. & Landt, M. (1984). Protein substrate specificity of a calmodulin-dependent protein kinase isolated from bovine heart. *Cell calcium*, 5(4), 351–364. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(84\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0143-4160(84)90003-4)
- Kohlhaas, M., Zhang, T., Seidler, T., Zibrova, D., Dybkova, N., Steen, A., Wagner, S., Chen, L., Brown, J. H., Bers, D. M. & Maier, L. S. (2006). Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circulation research*, 98(2), 235–244. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000200739.90811.9f>
- Kolodziej, S. J., Hudmon, A., Waxham, M. N. & Stoops, J. K. (2000). Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase II α and truncated CaM kinase II α reveal a unique organization for its structural core and functional domains. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), 14354–14359. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14354>
- Kong, P., Christia, P. & Frangogiannis, N. G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(4), 549–574. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1349-6>
- Kono, T. (1969). Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues. *Biochimica et biophysica acta*, 178(2), 397–400. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90410-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90410-0)
- Konstantinidis, K., Whelan, R. S. & Kitsis, R. N. (2012). Mechanisms of cell death in heart disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(7), 1552–1562. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.224915>
- Kreusser, M. M., Lehmann, L. H., Wolf, N., Keranov, S., Jungmann, A., Gröne, H.-J., Müller, O. J., Katus, H. A. & Backs, J. (2016). Inducible cardiomyocyte-specific deletion of CaM kinase II protects from pressure overload-induced heart failure. *Basic research in cardiology*, 111(6), 65. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0581-2>
- Kubon, C., Mistry, N. B., Grundvold, I., Halvorsen, S., Kjeldsen, S. E. & Westheim, A. S. (2011). The role of beta-blockers in the treatment of chronic heart failure. *Trends in pharmacological sciences*, 32(4), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.01.006>
- Kushnir, A. & Marks, A. R. (2010). The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 59, 1–30. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(10\)59001-X](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(10)59001-X)

- La Bastie, D. de, Levitsky, D., Rappaport, L., Mercadier, J. J., Marotte, F., Wisnewsky, C., Brovkovich, V., Schwartz, K. & Lompré, A. M. (1990). Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca²⁺-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circulation research*, 66(2), 554–564. <https://doi.org/10.1161/01.res.66.2.554>
- Landstrom, A. P., Dobrev, D. & Wehrens, X. H. T. (2017). Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circulation research*, 120(12), 1969–1993. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310083>
- Lebek, S., Plößl, A., Baier, M., Mustroph, J., Tarnowski, D., Lücht, C. M., Schopka, S., Flörchinger, B., Schmid, C., Zausig, Y., Pagratis, N., Marchand, B., Koltun, D. O., Hung, W. K., Ahmadyar, S., Belardinelli, L., Maier, L. S. & Wagner, S. (2018). The novel CaMKII inhibitor GS-680 reduces diastolic SR Ca leak and prevents CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 118, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.03.020>
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H. T., Reiken, S., Warriar, S., Belevych, A. E., Harvey, R. D., Richter, W., Jin, S.-L. C., Conti, M. & Marks, A. R. (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*, 123(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.030>
- Lesyuk, W., Kriza, C. & Kolominsky-Rabas, P. (2018). Cost-of-illness studies in heart failure: A systematic review 2004-2016. *BMC cardiovascular disorders*, 18(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12872-018-0815-3>
- Li, J., Marionneau, C., Zhang, R., Shah, V., Hell, J. W., Nerbonne, J. M. & Anderson, M. E. (2006). Calmodulin kinase II inhibition shortens action potential duration by upregulation of K⁺ currents. *Circulation research*, 99(10), 1092–1099. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000249369.71709.5c>
- Li, N., Wang, T., Wang, W [Wei], Cutler, M. J., Wang, Q., Voigt, N., Rosenbaum, D. S., Dobrev, D. & Wehrens, X. H. T. (2012). Inhibition of CaMKII phosphorylation of RyR2 prevents induction of atrial fibrillation in FKBP12.6 knockout mice. *Circulation research*, 110(3), 465–470. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.253229>
- Ling, H., Zhang, T., Pereira, L., Means, C. K., Cheng, H [Hongqiang], Gu, Y., Dalton, N. D., Peterson, K. L., Chen, J., Bers, D. M., Brown, J. H. & Heller Brown, J. (2009). Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(5), 1230–1240. <https://doi.org/10.1172/JCI38022>
- Lisman, J., Yasuda, R. & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
- Liu, Y., Shao, Q., Cheng, H.-J., Li, T [Tiankai], Zhang, X [Xiaowei], Callahan, M. F., Herrington, D., Kitzman, D., Zhao, D. & Cheng, C.-P. (2021). Chronic Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Inhibition Rescues Advanced Heart Failure. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 377(3), 316–325. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000361>
- Liu, Z., Finet, J. E., Wolfram, J. A., Anderson, M. E., Ai, X. & Donahue, J. K. (2019). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II causes atrial structural remodeling associated

- with atrial fibrillation and heart failure. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, 16(7), 1080–1088. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2019.01.013>
- Lokuta, A. J., Meyers, M. B., Sander, P. R., Fishman, G. I. & Valdivia, H. H. (1997). Modulation of cardiac ryanodine receptors by sorcin. *The Journal of biological chemistry*, 272(40), 25333–25338. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.40.25333>
- Lu, F. & Pu, W. T. (2020). The architecture and function of cardiac dyads. *Biophysical reviews*, 12(4), 1007–1017. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00729-x>
- Lu, Y.-M., Huang, J., Shioda, N., Fukunaga, K., Shirasaki, Y., Li, X.-M. & Han, F. (2011). CaMKII δ B mediates aberrant NCX1 expression and the imbalance of NCX1/SERCA in transverse aortic constriction-induced failing heart. *PloS one*, 6(9), e24724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024724>
- MacLennan, D. H. & Kranias, E. G. (2003). Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), 566–577. <https://doi.org/10.1038/nrm1151>
- Maier, L. S. (2014). Experimental antiarrhythmic targets: CaMKII inhibition - ready for clinical evaluation? *Current medicinal chemistry*, 21(11), 1299–1307. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990171>
- Mani, S. K., Egan, E. A., Addy, B. K., Grimm, M., Kasiganesan, H., Thiyagarajan, T., Renaud, L., Brown, J. H., Kern, C. B. & Menick, D. R. (2010). beta-Adrenergic receptor stimulated Ncx1 upregulation is mediated via a CaMKII/AP-1 signaling pathway in adult cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(2), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.11.007>
- Marx, S. O. & Marks, A. R. (2002). Regulation of the ryanodine receptor in heart failure. *Basic research in cardiology*, 97 Suppl 1, I49-51. <https://doi.org/10.1007/s003950200029>
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemlit, N. & Marks, A. R. (2000). PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *Cell*, 101(4), 365–376. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80847-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80847-8)
- Massie, B. M. (1983). Myocardial hypertrophy and cardiac failure: A complex interrelationship. *The American journal of medicine*, 75(3A), 67–74. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)90121-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(83)90121-3)
- Mattiazzi, A. & Kranias, E. G. (2014). The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Frontiers in pharmacology*, 5, 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00005>
- Mattiazzi, A., Vittone, L. & Mundiña-Weilenmann, C. (2007). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase: A key component in the contractile recovery from acidosis. *Cardiovascular Research*, 73(4), 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.12.002>
- McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Crespo-Leiro, M. G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A. W., Jaarsma, T., Jankowska, E. A., . . . Kathrine Skibelund, A. (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European heart journal*, 42(36), 3599–3726. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>

- McMurray, J. J. V., Packer, M., Desai, A. S., Gong, J., Lefkowitz, M. P., Rizkala, A. R., Rouleau, J., Shi, V. C., Solomon, S. D., Swedberg, K. & Zile, M. R. (2013). Dual angiotensin receptor and neprilysin inhibition as an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic systolic heart failure: Rationale for and design of the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial (PARADIGM-HF). *European journal of heart failure*, 15(9), 1062–1073. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft052>
- Mines, G. R. (1913). On functional analysis by the action of electrolytes. *The Journal of physiology*, 46(3), 188–235. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1913.sp001588>
- Minta, A., Kao, J. P. & Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *The Journal of biological chemistry*, 264(14), 8171–8178.
- Mitchell, R. D., Simmerman, H. K. & Jones, L. R. (1988). Ca²⁺ binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *The Journal of biological chemistry*, 263(3), 1376–1381.
- Mosterd, A. & Hoes, A. W. (2007). Clinical epidemiology of heart failure. *Heart (British Cardiac Society)*, 93(9), 1137–1146. <https://doi.org/10.1136/hrt.2003.025270>
- Mustroph, J., Drzymalski, M., Baier, M., Pabel, S., Biedermann, A., Memmel, B., Durczok, M., Neef, S., Sag, C. M., Floerchinger, B., Rupprecht, L., Schmid, C., Zausig, Y., Bégis, G., Briand, V., Ozoux, M.-L., Tamarelle, D., Ballet, V., Janiak, P., . . . Wagner, S. (2020). The oral Ca/calmodulin-dependent kinase II inhibitor RA608 improves contractile function and prevents arrhythmias in heart failure. *ESC heart failure*, 7(5), 2871–2883. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12895>
- Nabel, E. G. & Braunwald, E. (2012). A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *The New England journal of medicine*, 366(1), 54–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1112570>
- Nánási, P. P., Varró, A. & Lathrop, D. A. (1993). Isolation of human ventricular and atrial cardiomyocytes: Technical note. *Cardioscience*, 4(2), 111–116.
- Nassal, D., Gratz, D. & Hund, T. J. (2020). Challenges and Opportunities for Therapeutic Targeting of Calmodulin Kinase II in Heart. *Frontiers in pharmacology*, 11, 35. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00035>
- Neef, S., Dybkova, N., Sossalla, S., Ort, K. R., Fluschnik, N., Neumann, K., Seipelt, R., Schöndube, F. A., Hasenfuss, G. & Maier, L. S. (2010). CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circulation research*, 106(6), 1134–1144. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.203836>
- Neef, S., Mann, C., Zwenger, A., Dybkova, N. & Maier, L. S. (2017). Reduction of SR Ca²⁺ leak and arrhythmogenic cellular correlates by SMP-114, a novel CaMKII inhibitor with oral bioavailability. *Basic research in cardiology*, 112(4), 45. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0637-y>

- Neef, S., Steffens, A., Pellicena, P., Mustroph, J., Lebek, S., Ort, K. R., Schulman, H. & Maier, L. S. (2018). Improvement of cardiomyocyte function by a novel pyrimidine-based CaMKII-inhibitor. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 115, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.12.015>
- Nie, D., Xia, C., Wang, Z [Zhiyu], Ding, P., Meng, Y., Liu, J., Li, T [Ting], Gan, T., Xuan, B., Huang, Y., Zhang, J., Su, G. & Li, J. (2022). CaMKII inhibition protects against hyperthyroid arrhythmias and adverse myocardial remodeling. *Biochemical and biophysical research communications*, 615, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.04.082>
- Njegic, A., Wilson, C. & Cartwright, E. J. (2020). Targeting Ca²⁺ Handling Proteins for the Treatment of Heart Failure and Arrhythmias. *Frontiers in physiology*, 11, 1068. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01068>
- Ohtani, T., Mohammed, S. F., Yamamoto, K., Dunlay, S. M., Weston, S. A., Sakata, Y., Rodeheffer, R. J., Roger, V. L. & Redfield, M. M. (2012). Diastolic stiffness as assessed by diastolic wall strain is associated with adverse remodelling and poor outcomes in heart failure with preserved ejection fraction. *European heart journal*, 33(14), 1742–1749. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs135>
- Orsborne, C., Chaggar, P. S., Shaw, S. M. & Williams, S. G. (2017). The renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure for the non-specialist: The past, the present and the future. *Postgraduate medical journal*, 93(1095), 29–37. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2016-134045>
- Patten, R. D. & Hall-Porter, M. R. (2009). Small animal models of heart failure: Development of novel therapies, past and present. *Circulation. Heart failure*, 2(2), 138–144. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.839761>
- Patterson, E., Lazzara, R., Szabo, B., Liu, H., Tang, D., Li, Y.-H., Scherlag, B. J. & Po, S. S. (2006). Sodium-calcium exchange initiated by the Ca²⁺ transient: An arrhythmia trigger within pulmonary veins. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(6), 1196–1206. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.12.023>
- Pellicena, P. & Schulman, H. (2014). CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Frontiers in pharmacology*, 5, 21. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00021>
- Pereira, L., Bare, D. J., Galice, S., Shannon, T. R. & Bers, D. M. (2017). β -Adrenergic induced SR Ca²⁺ leak is mediated by an Epac-NOS pathway. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 108, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.04.005>
- Picht, E., Desantiago, J., Huke, S., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. & Bers, D. M. (2007). CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits frequency-dependent acceleration of relaxation and Ca²⁺ current facilitation. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42(1), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.09.007>
- Picht, E., Zima, A. V., Blatter, L. A. & Bers, D. M. (2007). SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *American journal of physiology. Cell physiology*, 293(3), C1073-81. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00586.2006>

- Piper, H. (2000). The calcium paradox revisited An artefact of great heuristic value. *Cardiovascular Research*, 45(1), 123–127. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00304-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00304-1)
- Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Falk, V., González-Juanatey, J. R., Harjola, V.-P., Jankowska, E. A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J. T., Pieske, B., Riley, J. P., Rosano, G. M. C., Ruilope, L. M., Ruschitzka, F., . . . van der Meer, P. (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal*, 37(27), 2129–2200. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>
- Purohit, A., Rokita, A. G., Guan, X., Chen, B., Koval, O. M., Voigt, N., Neef, S., Sowa, T., Gao, Z., Luczak, E. D., Stefansdottir, H., Behunin, A. C., Li, N., El-Accaoui, R. N., Yang, B., Swaminathan, P. D., Weiss, R. M., Wehrens, X. H. T., Song, L.-S., . . . Anderson, M. E. (2013). Oxidized Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation. *Circulation*, 128(16), 1748–1757. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003313>
- Rawlings, N. D. & Salvesen, G. (Hrsg.). (2013). *Handbook of proteolytic enzymes* (3. ed.). Acad. Press. <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1058161>
- Rockman, H. A., Ross, R. S., Harris, A. N., Knowlton, K. U., Steinhilber, M. E., Field, L. J., Ross, J. & Chien, K. R. (1991). Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 8277–8281. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8277>
- Rodriguez, P., Bhogal, M. S. & Colyer, J. (2003). Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *The Journal of biological chemistry*, 278(40), 38593–38600. <https://doi.org/10.1074/jbc.C301180200>
- Sag, C. M., Wadsack, D. P., Khabbazzadeh, S., Abesser, M., Grefe, C., Neumann, K., Opiela, M.-K., Backs, J., Olson, E. N., Brown, J. H., Neef, S., Maier, S. K. G. & Maier, L. S. (2009). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circulation. Heart failure*, 2(6), 664–675. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.865279>
- Santulli, G., Lewis, D., Des Georges, A., Marks, A. R. & Frank, J. (2018). Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Sub-cellular biochemistry*, 87, 329–352. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_11
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schneidereit, D., Vass, H., Reischl, B., Allen, R. J. & Friedrich, O. (2016). Calcium Sensitive Fluorescent Dyes Fluo-4 and Fura Red under Pressure: Behaviour of Fluorescence and Buffer Properties under Hydrostatic Pressures up to 200 MPa. *PLoS one*, 11(10), e0164509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164509>

- Schnelle, M., Catibog, N., Zhang, M., Nabeebaccus, A. A., Anderson, G., Richards, D. A., Sawyer, G., Zhang, X [Xiaohong], Toischer, K., Hasenfuss, G., Monaghan, M. J. & Shah, A. M. (2018). Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 114, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.10.006>
- Seifert, R. (2018). *Basiswissen Pharmakologie. Springer-Lehrbuch*. Springer Berlin Heidelberg. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-56303-8> <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56303-8>
- Semwogerere, D. & Weeks, E. R. (2005). Confocal Microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*.
- Sergeant, G. P., Ohya, S., Reihill, J. A., Perrino, B. A., Amberg, G. C., Imaizumi, Y., Horowitz, B., Sanders, K. M. & Koh, S. D. (2005). Regulation of Kv4.3 currents by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *American journal of physiology. Cell physiology*, 288(2), C304-13. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00293.2004>
- Shahin, R., Shaheen, O., El-Dahiyat, F., Habash, M. & Saffour, S. (2017). Research advances in kinase enzymes and inhibitors for cardiovascular disease treatment. *Future science OA*, 3(4), FSO204. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0010>
- Sham, J. S., Song, L. S., Chen, Y., Deng, L. H., Stern, M. D., Lakatta, E. G. & Cheng, H [Heping] (1998). Termination of Ca²⁺ release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 15096–15101. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15096>
- Shan, J., Betzenhauser, M. J., Kushnir, A., Reiken, S., Meli, A. C., Wronska, A., Dura, M., Chen, B.-X. & Marks, A. R. (2010). Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and β -adrenergic receptor blockade in mice. *The Journal of clinical investigation*, 120(12), 4375–4387. <https://doi.org/10.1172/JCI37649>
- Shan, J., Kushnir, A., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., Li, J., Lehnart, S. E., Lindegger, N., Mongillo, M., Mohler, P. J. & Marks, A. R. (2010). Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *The Journal of clinical investigation*, 120(12), 4388–4398. <https://doi.org/10.1172/JCI32726>
- Shannon, T. R., Ginsburg, K. S. & Bers, D. M. (2002). Quantitative assessment of the SR Ca²⁺ leak-load relationship. *Circulation research*, 91(7), 594–600. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000036914.12686.28>
- Shannon, T. R., Pogwizd, S. M. & Bers, D. M. (2003). Elevated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circulation research*, 93(7), 592–594. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000093399.11734.B3>
- Shigekawa, M. & Iwamoto, T. (2001). Cardiac Na(+)-Ca(2+) exchange: Molecular and pharmacological aspects. *Circulation research*, 88(9), 864–876. <https://doi.org/10.1161/hh0901.090298>
- Sipido, K. R., Bito, V., Antoons, G., Volders, P. G. & Vos, M. A. (2007). Na/Ca exchange and cardiac ventricular arrhythmias. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1099, 339–348. <https://doi.org/10.1196/annals.1387.066>

- Sipido, K. R., Callewaert, G. & Carmeliet, E. (1995). Inhibition and rapid recovery of Ca²⁺ current during Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation research*, 76(1), 102–109. <https://doi.org/10.1161/01.RES.76.1.102>
- Sossalla, S., Fluschnik, N., Schotola, H., Ort, K. R., Neef, S., Schulte, T., Wittköpper, K., Renner, A., Schmitto, J. D., Gummert, J., El-Armouche, A., Hasenfuss, G. & Maier, L. S. (2010). Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circulation research*, 107(9), 1150–1161. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.220418>
- Sossalla, S., Kallmeyer, B., Wagner, S., Mazur, M., Maurer, U., Toischer, K., Schmitto, J. D., Seipelt, R., Schöndube, F. A., Hasenfuss, G., Belardinelli, L. & Maier, L. S. (2010). Altered Na(+) currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(21), 2330–2342. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.12.055>
- Srinivasan, M., Edman, C. F. & Schulman, H. (1994). Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *The Journal of cell biology*, 126(4), 839–852. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.4.839>
- Ståhlberg, M., Braunschweig, F., Gadler, F., Mortensen, L., Lund, L. H. & Linde, C. (2016). Cardiac resynchronization therapy: Results, challenges and perspectives for the future. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ*, 50(5-6), 282–292. <https://doi.org/10.1080/14017431.2016.1221530>
- Sumi, M., Kiuchi, K., Ishikawa, T., Ishii, A., Hagiwara, M., Nagatsu, T. & Hidaka, H. (1991). The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 181(3), 968–975. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)92031-e](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)92031-e)
- Sung, R. J., Wu, S.-N., Wu, J.-S., Chang, H.-D. & Luo, C.-H. (2006). Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias in relation to Andersen-Tawil syndrome under conditions of reduced IK1: A simulation study. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 291(6), H2597-605. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00393.2006>
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. D. & Herman, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews*, 79(4), 1089–1125. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1089>
- Tessier, S., Karczewski, P., Krause, E. G., Pansard, Y., Acar, C., Lang-Lazdunski, M., Mercadier, J. J. & Hatem, S. N. (1999). Regulation of the transient outward K(+) current by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circulation research*, 85(9), 810–819. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.9.810>
- Tobimatsu, T. & Fujisawa, H. (1989). Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *The Journal of biological chemistry*, 264(30), 17907–17912.

- Toischer, K., Hartmann, N., Wagner, S., Fischer, T. H., Herting, J., Danner, B. C., Sag, C. M., Hund, T. J., Mohler, P. J., Belardinelli, L., Hasenfuss, G., Maier, L. S. & Sossalla, S. (2013). Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 61, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.03.021>
- Toischer, K., Rokita, A. G., Unsöld, B., Zhu, W., Kararigas, G., Sossalla, S., Reuter, S. P., Becker, A., Teucher, N., Seidler, T., Grebe, C., Preuss, L., Gupta, S. N., Schmidt, K., Lehnart, S. E., Krüger, M., Linke, W. A., Backs, J., Regitz-Zagrosek, V., . . . Hasenfuss, G. (2010). Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation*, 122(10), 993–1003. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.943431>
- Tokumitsu, H., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mizutani, A., Terasawa, M. & Hidaka, H. (1990). KN-62, 1-N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of biological chemistry*, 265(8), 4315–4320.
- Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E. & Blaxall, B. C. (2016). Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circulation research*, 118(6), 1021–1040. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306565>
- Triposkiadis, F., Karayannis, G., Giamouzis, G., Skoularigis, J., Louridas, G. & Butler, J. (2009). The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(19), 1747–1762. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.015>
- U.S. National Library of Medicine. (2009, 13. Mai). *NCT00296257: Assessment of Safety, Pharmacokinetics and Efficacy in a Combination Treatment With SMP-114*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00296257>
- Viana, F. F., Shi, W. Y., Hayward, P. A., Larobina, M. E., Liskaser, F. & Matalanis, G. (2013). Custodiol versus blood cardioplegia in complex cardiac operations: An Australian experience. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 43(3), 526–531. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezs319>
- Voigt, N., Li, N., Wang, Q., Wang, W [Wei], Trafford, A. W., Abu-Taha, I., Sun, Q., Wieland, T., Ravens, U., Nattel, S., Wehrens, X. H. T. & Dobrev, D. (2012). Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*, 125(17), 2059–2070. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306>
- Voigt, N., Pearman, C. M., Dobrev, D. & Dibb, K. M. (2015). Methods for isolating atrial cells from large mammals and humans. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 86, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.07.006>
- Voigt, N., Zhou, X.-B. & Dobrev, D. (2013). Isolation of human atrial myocytes for simultaneous measurements of Ca²⁺ transients and membrane currents. *Journal of visualized experiments : JoVE*(77), e50235. <https://doi.org/10.3791/50235>

- Vos, T., Flaxman, A. D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J. A., Abdalla, S., Aboyans, V., Abraham, J., Ackerman, I., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Ali, M. K., AlMazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., . . . Murray, C. J. L. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2163–2196. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2)
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E. C. L., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S. K. G., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J. H., Bers, D. M. & Maier, L. S. (2006). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3127–3138. <https://doi.org/10.1172/JCI26620>
- Wagner, S., Hacker, E., Grandi, E., Weber, S. L., Dybkova, N., Sossalla, S., Sowa, T., Fabritz, L., Kirchhof, P., Bers, D. M. & Maier, L. S. (2009). Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, 2(3), 285–294. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.842799>
- Watson, A. M. D., Hood, S. G. & May, C. N. (2006). Mechanisms of sympathetic activation in heart failure. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 33(12), 1269–1274. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04523.x>
- Wehrens, X. H. T. (2011). CaMKII regulation of the cardiac ryanodine receptor and sarcoplasmic reticulum calcium release. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, 8(2), 323–325. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2010.09.079>
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Reiken, S. R. & Marks, A. R. (2004). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation research*, 94(6), e61-70. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2>
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Reiken, S., Vest, J. A., Wronska, A. & Marks, A. R. (2006). Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: A critical mediator of heart failure progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 511–518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510113103>
- Westra, J., Brouwer, E., van Roosmalen, I. A. M., Doornbos-van der Meer, B., van Leeuwen, M. A., Posthumus, M. D. & Kallenberg, C. G. M. (2010). Expression and regulation of HIF-1alpha in macrophages under inflammatory conditions; significant reduction of VEGF by CaMKII inhibitor. *BMC musculoskeletal disorders*, 11, 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-61>
- Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C. & Jones, L. R. (1991). Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *The Journal of biological chemistry*, 266(17), 11144–11152.
- Xiao, B., Jiang, M. T., Zhao, M., Yang, D [Dongmei], Sutherland, C., Lai, F. A., Walsh, M. P., Warltier, D. C., Cheng, H [Heping] & Chen, S. R. W. (2005). Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circulation research*, 96(8), 847–855. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000163276.26083.e8>

- Xu, L. & Meissner, G. (2004). Mechanism of calmodulin inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *Biophysical journal*, 86(2), 797–804. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74155-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74155-7)
- Yano, M., Yamamoto, T., Kobayashi, S. & Matsuzaki, M. (2009). Role of ryanodine receptor as a Ca²⁺(+) regulatory center in normal and failing hearts. *Journal of cardiology*, 53(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcc.2008.10.008>
- Yates, J. C. & Dhalla, N. S. (1975). Structural and Functional Changes Associated with Failure and Recovery of Hearts after Perfusion with Ca²⁺-free Medium. *Journal of molecular and cellular cardiology*(7), 91–103.
- Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z [Zhiguo] & Nattel, S. (1997). Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circulation research*, 81(4), 512–525. <https://doi.org/10.1161/01.res.81.4.512>
- Zaccolo, M. & Pozzan, T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5560), 1711–1715. <https://doi.org/10.1126/science.1069982>
- Zalk, R., Lehnart, S. E. & Marks, A. R. (2007). Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annual review of biochemistry*, 76, 367–385. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.053105.094237>
- Zhang, H., Makarewich, C. A., Kubo, H., Wang, W [Wei], Duran, J. M., Li, Y., Berretta, R. M., Koch, W. J., Chen, X., Gao, E., Valdivia, H. H. & Houser, S. R. (2012). Hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808 is not involved in cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Circulation research*, 110(6), 831–840. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.255158>
- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M. & Jones, L. R. (1997). Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *The Journal of biological chemistry*, 272(37), 23389–23397. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23389>
- Zhang, R., Khoo, M. S. C., Wu, Y., Yang, Y., Grueter, C. E., Ni, G., Price, E. E., Thiel, W., Guatimosim, S., Song, L.-S., Madu, E. C., Shah, A. N., Vishnivetskaya, T. A., Atkinson, J. B., Gurevich, V. V., Salama, G., Lederer, W. J., Colbran, R. J. & Anderson, M. E. (2005). Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nature medicine*, 11(4), 409–417. <https://doi.org/10.1038/nm1215>
- Zhang, T. & Brown, J. H. (2004). Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Research*, 63(3), 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.04.026>
- Zhang, T., Johnson, E. N., Gu, Y., Morissette, M. R., Sah, V. P., Gigena, M. S., Belke, D. D., Dillmann, W. H., Rogers, T. B., Schulman, H., Ross, J. & Brown, J. H. (2002). The Cardiac-specific Nuclear δ B Isoform of Ca²⁺ /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Induces Hypertrophy and Dilated Cardiomyopathy Associated with Increased Protein Phosphatase 2A

- Activity. *The Journal of biological chemistry*, 277(2), 1261–1267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108525200>
- Zhang, T., Kohlhaas, M., Backs, J., Mishra, S., Phillips, W., Dybkova, N., Chang, S., Ling, H., Bers, D. M., Maier, L. S., Olson, E. N. & Brown, J. H. (2007). CaMKII δ isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *The Journal of biological chemistry*, 282(48), 35078–35087. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707083200>
- Zhang, T., Maier, L. S., Dalton, N. D., Miyamoto, S., Ross, J., Bers, D. M. & Brown, J. H. (2003). The δ isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circulation research*, 92(8), 912–919. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000069686.31472.C5>
- Zima, A. V., Bovo, E., Bers, D. M. & Blatter, L. A. (2010). Ca²⁺ spark-dependent and -independent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in normal and failing rabbit ventricular myocytes. *The Journal of physiology*, 588(Pt 23), 4743–4757. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.197913>
- Zima, A. V., Bovo, E., Mazurek, S. R., Rochira, J. A., Li, W. & Terentyev, D. (2014). Ca handling during excitation-contraction coupling in heart failure. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 466(6), 1129–1137. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1469-3>
- Zima, A. V., Picht, E., Bers, D. M. & Blatter, L. A. (2008). Termination of cardiac Ca²⁺ sparks: Role of intra-SR Ca²⁺, release flux, and intra-SR Ca²⁺ diffusion. *Circulation research*, 103(8), e105-15. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.183236>
- Zimmerman, A. N. & Hülsmann, W. C. (1966). Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature*, 211(5049), 646–647. <https://doi.org/10.1038/211646a0>

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Stefan Wagner für die Vergabe dieser Dissertation sowie für die kompetente Betreuung bei ihrer Entstehung.

Für die Möglichkeit der Promotion am Lehrstuhl für Innere Medizin II der Universität Regensburg danke ich Prof. Dr. Lars Maier.

Den beteiligten Ärzten der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg möchte ich für die Aufklärung der Studienpatienten danken.

Auch der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg unter der Leitung von Prof. Dr. Christof Schmid danke ich für die Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Akquirierung des humanen Gewebes.

Weiterhin danke ich Dr. Karin Hammer, Felicia Radtke und Thomas Sowa für die stets schnelle, unkomplizierte und tatkräftige fachliche wie menschliche Unterstützung im Laboralltag.

Melanie Durczok möchte ich für ihre freundliche, durchdachte Einarbeitung danken.

Besonderer Dank für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gebührt auch der Laborgemeinschaft des H4 und meinen Mitdoktoranden, allen voran Lena Albersdörfer, Lukas Schöberl und Maria Giglberger, mit denen über das Fachliche hinausgehende enge Freundschaften entstanden.

Abschließend stehen meine Freunde und meine Familie, insbesondere meine Eltern Karin und Thomas sowie meine Schwester Kristina, die mir bei den Herausforderungen, die im Zuge des Entstehungsprozesses dieser Dissertation auftraten, stets mit Rat und Wort zur Seite standen.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Auswirkungen zweier neuartiger, potenziell klinisch anwendbarer Inhibitoren der Ca/Calmodulin-abhängigen Kinase II auf das diastolische Kalziumleck“

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Quellen und Hilfsmitteln wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Regensburg, den 04. Oktober 2022

Andreas Plözl